

# ELICITOROKKAL KIVÁLTOTT NÖVÉNYI VÉDEKEZÉSI VÁLASZ VIZSGÁLATA

Doktori értekezés

Orbán Norbert

Semmelweis Egyetem

Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Bóka Károly egyetemi docens, Ph.D.

Hivatalos bírálók:

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szőke Éva egyetemi tanár, D.Sc.

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kéry Ágnes egyetemi docens, Ph.D.

Dr. László Miklós Ph.D.

Budapest  
2008

# Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	5
Összefoglalás.....	7
Summary.....	8
<b>1. Bevezetés.....</b>	<b>9</b>
<b>2. Irodalmi áttekintés.....</b>	<b>10</b>
2.1. A NÖVÉNYI SEJTKULTÚRÁK ÁLTAL TÖRTÉNŐ HATÓANYAG TERMELTETÉS.....	11
2.2. A KALLUSZ KULTÚRÁK LÉTREHOZÁSA, A SEJTEK DIFFERENCIÁLTSÁGI ILLETVE DEDIFFERENCIÁLTSÁGI FOKÁNAK JELENTŐSÉGE.....	12
2.3. A NÖVÉNYI SEJTSZUSZPENZIÓS KULTÚRÁK JELLEMZÉSE, ALKALMAZÁSUK LEHETŐSÉGEI.....	14
2.4. A <i>RUBIA TINCTORUM</i> L., MINT VIZSGÁLATI OBJEKTUM.....	18
2.5. AZ ELICITÁLÁS FOGALMA, ELICITOR TÍPUSOK, AZ ELICITÁLÁS ÁLTALÁNOS HATÁSAI.....	23
2.5.1. Az elicitálás részfolyamatai.....	26
2.5.2. A növényi védekezési válasz elemei.....	28
2.6. A NÖVÉNYI SZIGNÁLTRANSZDUKCIÓ.....	28
2.6.1. GTP kötő fehérjék.....	29
2.6.2. Ion áramok és a $Ca^{2+}$ jel.....	29
2.6.3. Citoplazmatikus pH csökkenés.....	30
2.6.4. Az oxidatív stressz és a reaktív oxigén molekulák.....	31
2.6.5. Inozitol foszfátok, és a ciklikus nukleotidok.....	32
2.6.6. Szalicilsav (SA) és nitrogén monoxid (NO).....	33
2.6.7. Jazmonsav (JA) út.....	33
2.6.8. A mitogén aktivált protein kinázok (MAP) és foszfatázok, foszfoinozitol kinázok (PIK), és egyéb kinázok.....	34
2.6.9. Abszcisinsav (ABA) és etilén.....	35
2.6.10 A lipid szignalizáció (oxilipinek, foszfolipázok, és lipid hírvivők).....	35
2.6.11. A jelátviteli utak együtműködése (serkentés, gátlás).....	36
2.6.12. A különböző szignálok integrálása a transzkripciós faktorok révén.....	36
<b>3. Célkitűzések.....</b>	<b>38</b>
<b>4. Anyagok és Módszerek.....</b>	<b>40</b>
4.1. A <i>RUBIA TINCTORUM</i> L. NÖVÉNY JELLEMZÉSE.....	40
4.2. A KALLUSZ KÉPZÉSE A FESTŐBUZÉR LEVELEIBŐL.....	41

4.3. A KALLUSZ ÉS SEJTSZUSZPENZIÓS KULTÚRÁK FENNTARTÁSA.....	41
4.4. AZ ELICITOROK KÉSZÍTÉSE.....	41
4.5. AZ ELICITÁLÁS KIVITELEZÉSE.....	43
4.6. A KALLUSZ KÉPZŐDÉS VIZSGÁLATA.....	44
4.7. ELICITÁLT SEJTEK MIKROTUBULÁRIS RENDSZERÉNEK VIZSGÁLATA.....	46
4.8. ÉLETKÉPESSÉG VIZSGÁLATA .....	47
4.9. RUBIA TINCTORUM SEJTEK H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> TERMELÉSÉNEK VIZSGÁLATA .....	47
4.10. AZ ANTRAKINON SZÁRMAZÉKOK ANALITIKAI VIZSGÁLATA.....	50
4.11. ADATFELDOLGOZÁS ÉS ÉRTÉKELÉS.....	51
<b>5.Eredmények.....</b>	<b>52</b>
5.1. DEDIFFERENCIÁCIÓS JELENSÉGEK KALLUSZKÉPZŐDÉSKOR.....	52
5.1.1. Kalluszképződés morfológiája.....	52
5.1.2. A klorofill pigmenttartalom változása.....	53
5.1.3. Fénymikroszkópos megfigyelések.....	54
5.1.4. Az ultrastrukturális változások a kalluszképződés indukciója során.....	56
5.1.5. Egyes antrakinon-származékok mennyiségének változása a kallusz indukciójakor.....	64
5.2. AZ ELICITÁLÁS HATÁSA A SZUSZPENZIÓS KULTÚRÁK SEJTJEINEK ÉLETKÉPESSÉGÉRE ÉS H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> TERMELÉSÉRE .....	67
5.2.1. Különböző elicitorok hatása az életképességre.....	67
5.2.2. Az elicitorok hatása a sejteken belül mérhető H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> termelésére.....	68
5.2.3. Az elicitorok hatása a tenyészetek tápközegének H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> koncentrációjára.....	71
5.2.4. A gátló anyagok hatása BC elicitor indukált H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> termelésre.....	72
5.2.4.1. Lítium klorid befolyása a BC indukált H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> termelésre.....	72
5.2.4.2. A 2-APB előkezelés hatása a BC indukált H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> termelésre.....	73
5.2.4.3. Lantán (III) klorid hatása a BC indukált H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> termelésre.....	74
5.2.4.4. A neomicin kezelés hatása a BC indukált H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> termelésre.....	76
5.2.4.5. A nifedipin kezelés hatása a BC indukált H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> termelésre.....	77
5.2.5. Az elicitálást követő H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> termelés ultrastrukturális behatárolása.....	79
5.2.6. A H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> termelés lokális jellegének megerősítése EELS használatával.....	82
5.2.7. Gátlók hatása a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> termelés ultrastrukturális megjelenésére.....	85
5.2.7.1. Lítium klorid előkezelést követő BC elicitálás.....	85
5.2.7.2. 2-APB előkezelést követő elicitálás.....	88
5.2.7.3. Neomicin előkezelést követő BC elicitálás.....	90
5.2.7.4. Lantán (III) klorid előkezelést követő BC elicitálás.....	91
5.2.7.5. A nifedipin előkezelést követő BC elicitálás.....	93
5.3. A KÜLÖNBÖZŐ ELICITOROK HATÁSA A SEJTEK ANTRAKINON TERMELÉSÉRE.....	94
5.3.1. Az antrakinon-származékok azonosítása.....	94
5.3.2. Az antrakinon-származékok mennyiségi meghatározása.....	98
5.3.3. Az elicitálás hatása az antrakinon-származékok termelésére.....	98
5.4. A BC ELICITOR HATÁSA A SEJTEK MIKROTUBULÁRIS RENDSZERÉRE.....	103

<b>6. Megbeszélés.....</b>	<b>104</b>
6.1. A DEDIFFERENCIÁCIÓ/REDIFFERENCIÁCIÓ VIZSGÁLATA.....	104
6.2. AZ ELICITÁLÁS HATÁSA AZ ÉLETKÉPESSÉGRE.....	107
6.3. AZ ELICITÁLÁS HATÁSA A SEJTEK ÉS A MÉDIUM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> TARTALMÁRA.....	108
6.4. A GÁTLÓ ANYAGOK HATÁSA A BC ELICITOR INDUKÁLT H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> TARTALOMRA.....	110
6.4.1 A lítium kezelés hatása a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> tartalomra, és annak ultrastrukturális megjelenésére.....	110
6.4.2. A 2-APB kezelés hatása a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> tartalomra, és annak ultrastrukturális megjelenésére.....	112
6.4.3. A lantán kezelés hatása a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> tartalomra, és annak ultrastrukturális megjelenésére.....	113
6.4.4. A nifedidpin kezelés hatása a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> tartalomra, és annak ultrastrukturális megjelenésére.....	114
6.4.5. A neomicin kezelések hatása a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> tartalomra, és annak ultrastrukturális megjelenésére.....	115
6.5. A GÁTLÓKKAL VÉGZETT KÍSÉRLETEK EREDMÉNYEINEK ÖSSZEGZÉSE.....	116
6.6. A MIKROTUBULÁRIS RENDSZER VISELKEDÉSE A BC ELICITOR HATÁSÁRA.....	116
6.7. A KÜLÖNBÖZŐ ELICITOROK HATÁSA A SEJTEK ANTRAKINON TERMELÉSÉRE.....	118
<b>7. Következtetések.....</b>	<b>119</b>
<b>8. Irodalomjegyzék.....</b>	<b>122</b>
<b>9. Saját publikációk jegyzéke.....</b>	<b>133</b>
<b>10. Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>136</b>

## Rövidítések jegyzéke

- 2-APB: 2-aminoetil difenilborinát
- ABA: abszcizinsav
- BC: *Botrytis cinerea* gombából előállított elicitor
- cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát
- cADP: ciklikus adenzin-difoszfát
- cCMP: ciklikus citidin-monofoszfát
- Ce: cérium
- cGMP: ciklikus guanozin-monofoszfát
- Chl a+b: klorofill a+b
- CV1-CV3: *Coriolus versicolor* gombából előállított elicitor frakciók jelölései
- DAB: diaminobenzidin
- DAD: diódasoros Uv-Vis detektor
- DAG: diacil glicerol
- EELS: elektron energia veszteségi spektroszkópia
- ESI: elektronspray ionizáció
- GC-MS: gázkromatográfia-tömegspektrometria
- GTP: guanozin trifoszfát
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: hidrogén peroxid
- HMGC<sub>o</sub>A: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
- HPLC: nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
- HPLC-DAD-MS: nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia on-line diódasoros és tömegszelektív detektálással
- IES: indolecetsav
- IP<sub>3</sub>: foszfatidil inozitol 1,4,5 trifoszfát
- IPP: izopentenil difoszfát
- JA: jazmonsav
- La: lantán
- LRR domain: leucinban gazdag ismétlődő régió
- Lyso PC: lizfoszfolipid
- MAP kináz: mitogén aktivált protein kináz
- MEP: 2-C-metil-D-eritritol
- MTSB: mikrotubulus stabilizáló puffer
- MVA: mevalonsav

Mw: molekulatömeg  
NAA: naftilecetsav  
NO: nitrogén monoxid  
OSB: o-szukcinilbenzoát  
PA: foszfatidsav  
PAL: fenilalanin ammónia liáz  
PAMM: az elicitor patogén asszociált molekuláris mintázata  
PC: foszfatidil kolin  
PEELS: parallel elektron energia spektrum  
PIK: foszfoinozitol kináz  
PKC: protein kináz C  
PLA: foszfolipáz A  
PLC: foszfolipáz C  
PLD: foszfolipáz D  
PR protein: patogenezis indukált fehérje  
ROS: reaktív oxigén molekulák/gyökök  
RSD: relatív standard deviáció  
SA: szalicilsav  
SAR: szerzett szisztémás rezisztencia  
TF: transzkripció faktor  
VRK: vékonyréteg kromatográfia

## Összefoglalás

A növényi sejt kultúrákkal rentábilisan előállítható (gyógyszer) molekulák száma folyamatosan növekszik, főként az ily módon történő szintézis számos előnye miatt.

Munkánk során a létrehozott kalluszt, a sejt kultúrákat, valamint az elicitorokkal ezekben kiváltott növényi védekezési válasz egyes elemeit vizsgáltuk. Az általunk alkalmazott módszerek a vizsgálati anyagok (*Rubia tinctorum* és *Capsicum annuum*) elicitoros kezelését követő viselkedésének több irányból történő megközelítését tették lehetővé. A strukturális vonatkozásokat fény- és elektronmikroszkópos módszerekkel vizsgáltuk, másfelől a védekezési válasz egyes elemeinek mennyiségi jellemzését kvantitatív módszerekkel (spektrofluorimetria, spektrofotometria, HPLC-DAD-MS) végeztük.

Munkánkban megállapítottuk, hogy a *Rubia tinctorum* levelek nem sebzett részein a kallusz iniciációja a szállítónyalábok transzfersejtjeihez köthető. A transzfersejtben jelentős szerkezeti átrendeződés előzi meg az osztódó képesség visszanyerését. Bár a mezofill sejtekben hasonló folyamat elindult, ezek nem osztódtak. A kallusz képződés során létrejövő antrakinon-származékok felhalmozódása két lépcsős kinetikát mutatott.

A növényi védekezési válasz egyik fontos elemeként számon tartott  $H_2O_2$  termelődés az elicítálást követően számos produkciós maximumot mutatott, melyek megjelenése (időbeliség, amplitúdó) jellemző volt az alkalmazott elicitorra. Elektronmikroszkópos vizsgálatok megerősítették a  $H_2O_2$  termelődés jelenségét, valamint megállapítottuk, hogy a  $H_2O_2$  produkció lokális jelleggel bír, tehát a sejtekben körülírt területen és nem a jel iránya által megszabott helyű citokémiai végtermék felhalmozódás figyelhető meg. Gátlókkal végzett kísérleteink segítségével megállapítottuk, hogy a kalcium szignál megléte fontos szereppel bír az elicitorral indukált  $H_2O_2$  termelődés szempontjából. Erősen valószínűsíthető közvetlen kapcsolat az  $IP_3$  szignalizációval is.

HPLC mérésekkel igazoltuk, hogy a különböző elicitorok eltérő összetételű antrakinon tartalmat eredményeznek a *R. tinctorum* kultúrákban. Ez a felismerés szelektívebb hatóanyag termelési stratégiák kidolgozására ad lehetőséget, tehát a szabályozás befolyásolása hatékony eszközt jelent a kiválasztott termék mennyiségének és minőségének változtatására.

## Summary

The number of profitable (pharmaceutical) molecules produced by plant cell cultures is growing because of the several advantages of the applied methods.

In our work, we studied the callus formation and the features of reprogrammed cells, and we also evaluated particular steps of the elicitor induced plant defence response in cell cultures. The applied methods allowed us to examine the in vitro cultures of *Rubia tinctorum* and *Capsicum annuum* and their behaviour from several points of view after elicitor treatments. The structural investigations were carried out by microscopy and electron microscopy, while the appearance of particular steps of the plant defence response was followed by applying quantitative methods (spectrofluorimetry, spectrophotometry, HPLC-DAD-MS).

In our work, we observed that the callus formation from non-wounded parts of leaves of *Rubia tinctorum* was initiated by the transfer cells of vascular bundles. In the transfer cells significant structural changes were observed before the callus formation. In the mesophyll cells similar changes were also started, but these cells were not able to divide. The accumulation of anthraquinone derivatives during the callus formation exhibited two-step kinetic process.

The elicitor induced  $H_2O_2$  production (which is a known part of the plant defence response) exhibited several maximum values, and the appearance of these maxima (duration, time-course, amplitude) depended on the applied elicitor. The electron microscopic investigations affirmed the phenomenon of  $H_2O_2$  production, and we found that this  $H_2O_2$  production had local characteristics independent of the direction of the signal. By using inhibitors during the experiments, we pointed out that the presence of the calcium signal had important role in the elicitor induced  $H_2O_2$  production. Direct linkage with the  $IP_3$  signalization is presumable.

We confirmed by using liquid chromatographic method that application of different elicitors in *Rubia tinctorum* cell cultures resulted different anthraquinone compositions. This fact may give the opportunity to develop more selective anthraquinone-producing strategies in the in vitro systems.

Our results contribute to better understanding of the elicitor induced plant defence response. In this way, the influence on signaling pathways gives an effective tool to change the quantity and quality of the selected products.



## 1. Bevezetés

A növényi szervezetek evolúciójuk során kifinomult védekezési választ alakítottak ki annak érdekében, hogy megbirkózzanak környezetük számukra káros biotikus és abiotikus összetevőivel. Ezen védekezési válasz komplex jelenség. Egyes alkotóelemek megjelenhetnek általánosan, illetve egy részük, az egyes részfolyamatok együttes megjelenésének módja jellemző lehet az őket kiváltó faktorokra is.

A növényi védekezési válasz gyógyszerészi szempontból legfontosabb részei azon folyamatok, melyek a másodlagos anyagcseretermékek fokozott vagy megváltozott produkciójával járnak. A másodlagos anyagcsereutakon létrejött molekulákat a növényből történő közvetlen kinyerés után, vagy félszintézissel módosítva alkalmazhatják a gyógyászatban. Sajnálatos módon a hatóanyagok növényekből történő kinyerése nem gazdaságos minden esetben, aminek számos oka lehet (a növény alacsony koncentrációban tartalmazza a hatóanyagot, a hatóanyag képződése több évet vesz igénybe, trópusi eredetű növények esetében nem mindig biztosítható a megfelelő mennyiség/minőség stb.). A növényi biotechnológiai módszerek e problémák megoldását célozzák meg.

Az alkalmazott növényi biotechnológiai módszerek számos megközelítést kínálnak a másodlagos anyagcseretermékek produkciójának növelésére. Ezen megközelítések egyike a növényi sejtszuspenziós kultúrák létrehozása, fenntartása, manipulálása. Annak ellenére, hogy számos sikeres módszert fejlesztettek ki a másodlagos anyagcseretermékek produkciójának fokozására növényi sejtszuspenziós kultúrák esetében, a sejtszintű szabályozási és szignáltranszdukciós folyamatokról kevesebb ismerettel rendelkezünk. Az említett szabályozási folyamatok részletesebb ismerete tervezhetőbb, szelektívebb és nagyobb hatékonyságú hatóanyag termeltetést tehet lehetővé, mely a termelés költségeinek jelentős csökkenéséhez vezet.

Az egyik -növényi sejtszuspenziókban régóta alkalmazott- módszer az ún. elicitálás, amely azon a megfigyelésen alapul, hogy a növényi védekezési válasz kiváltásához nem feltétlenül szükséges az abiotikus és biotikus környezet egésze, elég ennek csak bizonyos szegmense, amit a növény fölismer. Ez biotikus stressz esetében a növényi patogének egy jellemző részletét jelenti (pl. sejtfal oligomer komponensei, toxinok stb.), melyet megfelelő mennyiségben a sejt kultúrába juttatva a rá jellemző védekezési választ váltja ki. Az elicitorok hatásmechanizmusának feltárása az elmúlt években a tudományos érdeklődés előterébe került és számos új felfedezés látott napvilágot, melyek alkalmazásával a közeljövőben jelentősen növekedhet a nagyobb

volumenű, rentábilis hatóanyag termelésre alkalmas sejt kultúrák száma.

Jelenlegi tudásunk szerint az elicitorokat növényi receptorok ismerik fel, melyek a plazmamembránban illetve a citoplazmában helyezkednek el. Az elicitor kapcsolódása és fölismerése után a receptorok aktiválják a rájuk jellemző effektorokat melyek másodlagos hírvivő molekulák segítségével modulálják meghatározott gének aktivitását. Végül a megváltozott génexpresszió megemelkedett hatóanyag termelésben nyilvánulhat meg. A növényi sejtek választ természetesen számos endogén faktor is befolyásolja, mint például a sejtek differenciáltsági foka, mely (többek között) alkalmassá teszi a sejteket a hatóanyag termelésre.

Az ELTE Növényfiziológiai Tanszékén fenntartott festő buzér (*Rubia tinctorum* L.) kallusz illetve sejt szuszpenziós kultúrákra jellemző a viszonylag magas és stabil (antrakinon-származék) hatóanyag termelés. A kultúrák könnyen fenntarthatóak, genetikailag viszonylag stabilak, illetve az elicitálás hatását szemmel is jól látható színváltozás követi bennük. Így ígéretes modellként használhattuk kísérleteinkhez.

Munkánkban egyrészt a *Rubia tinctorum* kallusz kultúrák létrehozása során megfigyelhető differenciációs/dedifferenciációs/redifferenciációs jelenségeket követtük struktúrális és kémiai változások szintjén, másrészt a festő buzérból létrehozott sejt szuszpenziós kultúrákban megfigyelhető elicitor indukált növényi válaszok egyes komponenseit (az oxidatív stressz kiépülése és annak kapcsolata az egyéb szignáltranszdukciós utakkal, illetve a hatóanyag termelés változásai különböző elicitoros kezelések hatására) vizsgáltuk mikroszkópos és analitikai módszerekkel.

## 2. Irodalmi áttekintés

Az elmúlt évtizedek tapasztalatai rávilágítottak arra, hogy a növényi biotechnológiai módszerek alkalmazása nem nyújt tökéletes megoldást minden hatóanyag termelésre érintő kérdésre, így sajnálatos módon a növényi sejt kultúrákkal rentábilis módon előállítható molekulák száma máig limitált maradt. Jelenleg ipari léptékben a naftokinon-származék sikonint (*Lithospermum erythrorhizon* sejt kultúrákban, Mitsui Petrochemical Industry Co. Ltd. Japán), az antrakinon-származék purpurint (*Rubia akane* sejt kultúrákban, Nitto Denko Corp. Japán), és -a növényi biotechnológia egyik legnagyobb áttörésének számító- diterpén-származék taxolt állítják elő (*Taxus cuspidata* sejt kultúrákban, Phyton-Bristol-Myers Squibb Co. USA) (1-2). Mindezek mellett számos növényi sejt kultúra segítségével termeltethető

jelentős mennyiségű másodlagos anyagcseretermék, köztük gyógyászati szempontból is fontos molekulák mint a hioszciamin, hipericin, baccatin III, digoxin, vinkrisztin, morfin (1-2).

A tudományos érdeklődés egyik része az elmúlt években a növényi sejtek jelátviteli folyamatainak vizsgálata felé orientálódott, mely az egyik kulcsfontosságú megközelítési mód lehet a jövőben a rentábilis hatóanyag produkció szempontjából.

## 2.1. A NÖVÉNYI SEJTKULTÚRÁK ÁLTAL TÖRTÉNŐ HATÓANYAG TERMELTETÉS

Az elmúlt évtizedek jelentős erőfeszítései nyomán számos mód adódott a hatékonyabb és magasabb kihozatalú másodlagos anyagcseretermék produkcióra növényi sejt kultúrákban. Ezen módszerek közül a következők a legfontosabbak:

- A célkomponensek hatékonyabb termelése érdekében történő bioreaktor és táptalaj tökéletesítés, és különböző prekursorok, elicitorok valamint stressz faktorok alkalmazása, a hatásmechanizmusuk figyelembe vétele nélkül (3).
- A növényi sejtek jelátviteli folyamatainak vizsgálata alapján jobban prognosztizálható célkomponens produkció érhető el (2).
- Transzkripciós faktorok és regulációs mechanizmusaik tanulmányozása (a regulátor gének genetikai manipulálását is ideértve) (4).
- Másodlagos anyagcseréhez kapcsolt gének klónozása, és a kulcs-gének genetikai módosítása a célmolekulához vezető metabolikus utak kapacitásának tervezhetősége érdekében (5).
- A metabolikus utak tanulmányozása, a metabolikus intermedierek föltárása, s ezen keresztül a célkomponenshez vezető egész metabolikus út és regulációjának megismerése (6).
- A másodlagos anyagcsere változásához kapcsolódó géntermékek vizsgálata, a globális génexpresszió jellemzése különböző körülmények között annak érdekében, hogy a növényi másodlagos anyagcsere illetve annak szabályozása átlátható legyen (7).

Munkánkban az 1. illetve 2. pontok alatti módszerekkel tanulmányoztuk a hatóanyagprodukció növelésének lehetőségeit illetve annak bizonyos háttérjelenségeit.

## 2.2. A KALLUSZ KULTÚRÁK LÉTREHOZÁSA, A SEJTEK DIFFERENCIÁLTSÁGI ILLETVE DEDIFFERENCIÁLTSÁGI FOKÁNAK JELENTŐSÉGE

A nem organizált sejt kultúrák kialakítása elsősorban kallusz kultúrák létrehozásán keresztül zajlik, a kalluszok képződése az első lépésnek tekinthető a dedifferenciált állapotú sejtek előállításához.

A kallusz kultúrák számos szervből/szövetből eredhetnek, feltételezve azt, hogy a szövet, melyből a kalluszt kívánjuk létrehozni még nem állandósult, tehát proliferációra, osztódásra alkalmas sejtekből áll, vagy azokká alakítható megfelelő hormonkezeléssel (8).

A kallusz tenyészetek előállítása során (mely aseptikus körülmények között történik) a táptalajra helyezett szövetdarab differenciált sejtjei dedifferenciálódnak (főképpen a sebzési felületen, illetve a szállítónyalábokhoz közeli részeken), és visszanyerik osztódó képességüket (8-13). Ezt a dedifferenciációs folyamatot számos endogén és exogén faktor befolyásolja, mint például a génexpresszió változása (14), a másodlagos anyagcsere regulációja (15), a felhasznált növényi szövet fejlődési szintje (16), a táptalaj hormon, cukor és makroelem összetétele (17-18), illetve a tenyésztési körülmények (8). A kallusz kultúrák egyik legfontosabb alkalmazási területe a különböző növényi biológiai/fiziológiai jelenségek vizsgálata (19-23).

Az organo- és hisztogenetikus dedifferenciáció és redifferenciáció szövettípusra ill. fajra jellemző kifejeződési lehetőségei közül az valószínűleg az, ami a differenciációért felelős gének aktiválódása illetve repressziója révén érvényesülhet; ez az érvényesülés viszont elsősorban a külső környezet által is szabályozott intracelluláris folyamatokon alapul (8,24). A kalluszok különböző sejtek populációiból állnak, melyekben a sejtek eltérő hozzáféréssel rendelkeznek a tápanyagokhoz/hormonokhoz, a sejtek megjelenési formái nem lesznek egyformák. Amennyiben ez a tápanyag gradiens hosszabb ideig fennáll, bizonyos sejtek tovább differenciálódnak (pl. tracheidákká).

A kallusz kultúrákban bekövetkező differenciálódásnak nagy jelentősége van a specializáció biológiai és fiziológiai vizsgálhatóságán túl a másodlagos hatóanyagok képződése szempontjából is. A másodlagos anyagcsere-termékek jelentős részének bioszintézise specializált szöveteket, sejteket, illetve a sejteken belül bizonyos organellumokat kíván meg, melyek megléte erősen korrelál a sejtek differenciáltsági fokával.

A dedifferenciált kultúrák elmaradó hatóanyag termelésének okai (25):

- A nem specializálódott sejtekben hiányzik azon gének expressziója, melyek a

hatóanyag szintézishez szükségese,

- Az anyagcsere szubsztrátok nem használhatók fel a másodlagos anyagcseretermék képződéshez,
- Bizonyos transzport mechanizmusok működésének hiánya, melyek a toxikus/gátló végterméket szállítanák el a képződés helyéről,
- A produktum tároló helyének hiánya,
- A megtermelt anyagcseretermék nem regulált katabolizmusa.

Így az egyes anyagok (például alkaloidok) bioszintéziséhez szükség lehet a kloroplasztisz, vezikulumok, vagy citoplazmatikus membrán rendszerek (endoplazmatikus retikulum) meglétére, a megtermelt anyagcseretermékek tárolásához pedig szükség lehet a fejlett vakuolum meglétére is (26). Számos -a bioszintézishez szükséges- specifikus szövet hiányozhat a teljesen dedifferenciált kultúrákból, ilyen lehet a Papaveraceae családra jellemző alkaloidok felhalmozódása esetében a tejcső, a mono- és szeszkviterpenoidok esetében pedig az epithel béléssel rendelkező skizogén járatok (Apiaceae család), valamint a specifikus kiválasztó szőrök (Lamiaceae család) megléte. Ezen problémák jórészen kiküszöbölése lehetővé válik a differenciáció elősegítése révén (27).

A kallusz tenyészetben az organogenezis kiváltható (8,23). Ennek egyik gyakorlati jelentősége különböző növényfajok szaporítása (9,17,23), az organogenezis biológiai és fiziológiai vizsgálata (8,23). Ezekon túlmenően bizonyos hatóanyagok termeltetése megoldható részben illetve teljesen organizált kultúrák segítségével, így a másodlagos anyagcsere biokémiai vizsgálatára alkalmasak, valamint a további biotechnológai módszerekhez (pl. hairy root kultúrák létrehozása) szükséges biomassa produkcióra is felhasználhatók (23,25). A hatóanyag produkciót tekintve általános szabályként elfogadott, hogy gyökér kultúrákat olyan anyagok termeltetésére alkalmazzák, melyek az intakt növény esetében is ezen szerveben termelődnek (tropán alkaloidok, indol alkaloidok, kinolin vázas alkaloidok, terpének /valepotriátok, szteroidok/, fenoloidok), míg ugyanezen szabály érvényes a hajtás kultúrákra is (25).

Összefoglalva, a kallusz kultúrák sokféle vizsgálat tárgyát képezhetik, felhasználhatóságuk széles skálája pedig biztosítja létjogosultságukat a növényi biotechnológia eszközei/kiindulási anyagai között (23).

## 2.3. A NÖVÉNYI SEJTSZUSZPENZIÓS KULTÚRÁK JELLEMZÉSE, ALKALMAZÁSUK LEHETŐSÉGEI

A növényi sejtszuszpenciós kultúrák elsősorban már meglévő (esetenként valamilyen szempont szerint szelektált) kallusz tenyészetekből származnak. A folyékony táptalaj végleges összetétele szintén optimalizálási kísérletek során jön létre, alapjául főként a Murashige-Skoog illetve a Gamborg B5 táptalaj szolgál (9-11).

A sejtszuszpenciós kultúrákra jellemző, hogy a tenyésztő edényben a sejtek leginkább néhány 10-100 sejtből álló aggregátumok formájában szabadon mozognak, illetve a levegőztetést/(táp)anyagcserét és a homogén környezet biztosítását is szolgáló keverés hatására állandó mozgásban vannak (8). A növényi sejtszuszpenciós kultúrákat lombikokban illetve speciálisan sejt kultúrák tenyésztésére létrehozott bioreaktorokban/fermentorokban tartják fenn (l. később) (23,24). Jellemző rájuk a kalluszoknál tapasztalhatótól eltérően a homogénebb környezet, így ebben az esetben a sejtek közötti differenciációs különbség kisebb. Mivel a sejtek itt is totipontensek (hasonlóan a kalluszokhoz) a sejtszuszpenciós kultúrákban is kiváltható az organo- illetve az embriogenezis (8,23).

A sejtszuszpenciós kultúrák, mint vizsgálati objektumok jelentőségét az adja, hogy egy jól definiált rendszerként foghatók fel, és alapvetően kétkompartmentes modellként értelmezhetők, ahol a metabolikus kompartment a sejten belüli tér, és az extracelluláris kompartment a tápközeget jelenti (28). Ez a megközelítés finomodik az intracelluláris térben lévő metabolikus és tároló egységekre, melyek között a metabolitok dinamikus áthelyeződése a másodlagos anyagcsere finomabb értelmezéséhez is hozzájárul, illetve a sejttel és médium együttese adta extracelluláris kompartmentet pedig (a sejtek által képzett anyagok szempontjából) mint degradációs teret értelmezik (28).

A sejtszuszpenciós kultúrák gyakorlati felhasználása a fent említettekben következően igen sokrétű. Alkalmazhatók:

- A növények biológiai, biokémiai, és fiziológiai alapjelenségeinek nyomonkövetésére (29),
- A növényi másodlagos anyagcsere vizsgálatára (30),
- A növényi védekezési válasz vizsgálatára (2),
- Bizonyos anyagok termeltetésére ezen belül:
  - a. enzim termelésre (pl. észterázok, lipázok, amiláz, proteáz stb.) (28),

- b. elsődleges és másodlagos anyagcseretermékek termelése (1-2),
- c. genetikai manipulációt követően fehérjék és egyéb anyagok termelése (23,31),
- Bizonyos anyagok kémiai átalakítására (biotranszformáció, pl. redukció, oxidáció, hidroxilezés, hidrolízis, izomeráció stb.) (32).

A sejtuszpenziós kultúrák bizonyos időközönként átoltásra szorulnak (illetve új kultúrák létrehozása esetén inokuláció történik), mely biztosítja a tápanyagok költését, illetve a felszaporodó metabolitok koncentrációját csökkenti. Az átoltást követő sejtosztódási és növekedési jelenséget az ún. növekedési görbe írja le (28). Az átoltást/inokulációt követően a sejtek lassan kezdenek el osztódni ez a fázis néhány napig tart. Az átoltástól számított kb. 7. naptól a 15. napig tart az ún. log fázis, erre a szakaszra jellemző a legnagyobb sejtosztódási ráta, majd ezt követően a lag fázis következik, melyre már kevésbé jellemző a sejtosztódás, viszont ebben a fázisban a már képződött nagyobb mennyiségű biomassza hajlamosabb a differenciálódásra.

A gyógyszerészi szempontból legfontosabb anyagcseretermékek produkciójára nem közömbös a fenti növekedési görbe, főként a nagyobb volumenű sejtfermentációs technikák alkalmazása során. A növekedési görbéhez kapcsolható hatóanyag produkció három modellje ismert (33).

- Első esetben a termék képződése közvetlenül követi a növekedés ütemét, ezen produkciós ütem az elsődleges anyagcsere produktumaira jellemző,
- A második esetben a termék produkció akkor jelenik meg, mikor a növekedés csökken a sejtsűrűségi maximum érték elérése előtt,
- A harmadik esetben akkor van produkció amikor a növekedés már megállt.

Ezen modellek természetesen nem írják le teljes mértékben és általánosan a hatóanyag produkció és a növekedés kapcsolatát, és gyakran a kondíciók megváltozásával a hatóanyag produkció növekedéshez való viszonya is megváltozhat (33).

A sejtuszpenziós kultúrák egyik legelterjedtebb (gyógyszerészi szempontból egyik legfontosabb) alkalmazása a másodlagos (speciális) anyagcseretermékek produkciója.

A másodlagos anyagcserén azokat a bioszintetikus folyamatokat értjük, melyek nem az alapvetően nélkülözhetetlen biomolekulák felépítését szolgálják. Ez a besorolás mára túlhaladottnak látszik, hiszen az élőlény számára nélkülözhetetlenek

tartott elsődleges biomolekulák és a nem alapvető funkciójú, nem nélkülözhetetlen biomolekulák között nem húzható éles határ, ezért az újabb szakirodalomban inkább speciális anyagcsereként nevezik a korábban másodlagos anyagcsérének hívott bioszintetikus utakat (34). Jelen felfogás szerint a speciális anyagcsere termékei fontossággal bírnak az egész növény általános kondíciója szempontjából (26), és fő funkcióik a következők:

- növényevő állatok elleni védelem,
- mikroorganizmusok elleni védelem,
- néhány anyagcsere termék metabolikus ill. ökológiai funkcióval bír (pl. UV-védelem).

A növényi speciális anyagcsérének gyógyszerészi szempontból óriási jelentősége van, hiszen számos gyógyászatban használt (ill. arra jelölt) bioaktív anyag termelődik a növényvilág fajaiban. A megismert molekulák száma a jövőben jelentősen növekedni fog, hiszen a növényvilág fajainak kb. tíz százalékáról rendelkezünk valamiféle ismerettel tartalmi anyagaik vonatkozásában. Ha ehhez hozzávesszük, hogy a növények pl. a királis molekulákat javarészt térhelyesen állítják elő, a növényi speciális anyagcsere kiaknázása már gazdasági megfontolásokból is lényeges előnyt jelenthet.

Az 1. táblázat összefoglalja azon gyógyszerészi szempontból is fontos hatóanyagokat, illetve azok típusait, melyeket sejtszuspenziós kultúrák segítségével termeltetni lehet. A táblázatból látható, hogy a növényi sejtszuspenziós kultúrák segítségével főként egyes fenoloidok, alkaloidok, és terpenoidok termelése tűnik ígéretesnek.

1. táblázat – (1-2, 35) alapján.

<b><i>Növényi sejt kultúra</i></b>	<b><i>Hatóanyag</i></b>	<b><i>Hatóanyag típusa</i></b>
<i>Anchusa officinalis</i>	Rozmaringsav	Fenoloid
<i>Artemisia annua</i>	Artemizin	Terpenoid
<i>Capsicum annuum/frutescens</i>	Kapszaicin	Alkaloid
<i>Catharantus roseus</i>	Vinkrisztin, Szerpentin, Ajmalin	Alkaloidok
<i>Coptis japonica</i>	Berberin	Alkaloid
<i>Crocus sativus</i>	Krocetin	Terpenoid
<i>Cupressus lusitanica</i>	$\beta$ -Tujapiklin	Terpenoid
<i>Daucus carota</i>	Antocianinok	Fenoloid
<i>Digitalis lanata</i>	Digoxin	Terpenoid
<i>Dioscorea deltoidea</i>	Dioszgenin	Terpenoid
<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgolidok	Terpenoid



<i>Növényi sejt kultúra</i>	<i>Hatóanyag</i>	<i>Hatóanyag típusa</i>
<i>Hyoscyamus muticus</i>	Szkopolamin	Alkaloid
<i>Lithospermum erythrorizon</i>	Sikonin	Fenoloid
<i>Nicotiana rustica</i>	Nikotin	Alkaloid
<i>Panax ginseng</i>	Ginzenozid	Terpenoid
<i>Papaver somniferum</i>	Morfin, Kodein, Szanguinarin	Alkaloid
<i>Rubia tinctorum/akane</i>	Antrakinin	Fenoloid
<i>Taxus cuspidata</i>	Taxol, Baccatin III	Terpenoid
<i>Thalictrum minus</i>	Berberin	Alkaloid
<i>Valeriana wallichii</i>	Valepotriátok	Terpenoid

A magasabb hatóanyag kihozatal nem elhanyagolható szempont a nagyvolumenű tervezésnél, hiszen a növényi sejtfermentációs technológia kiépítése és üzemeltetése igen költséges (33). A növényi sejt szuszpenziós kultúrák speciális anyagcsere útjait számos módon lehet befolyásolni a magasabb hatóanyag produkció/kihozatal érdekében. Ezen módok közül néhány gyakorlatban is alkalmazott technika (36-37):

- Screening (magasabb hatóanyag tartalomra)
  - A növény különböző részeire
  - Különböző növényekre
  - Különböző fajtákra
  - Különböző fajokra
- Jól szaporodó, régóta fenntartott kultúrák esetén alkalmazott screening
  - sejt aggregátum klónozás
  - protoplaszt klónozás (akár gén módosítás után is)
- Biokémiai variánsok szelekciója
- Táptalaj optimalizálás
- Hormon összetétel változtatása
- Esetleges gátló metabolitok/anyagcsere termékek eltávolítása
- Prekurzor adagolás
- Stressz hatások, elicitálás
- Genetikai módosítás (pl. hairy root kultúrák létrehozása)
- A megtermelt és növényi sejtek által tárolt anyagcsere termékek táptalajba történő exkréciójának elősegítése (ahol a produktum vízdékony, főként alkaloidok, néhány terpenoid, antocianinok, naftokinonok, egyéb fenolok esetében)
  - a. szelekció magasabb exkrécióval rendelkező sejt vonalakra
  - b. a kondíciók/táptalaj megváltoztatása olyan irányba, mely kedvez az exkréciónak

(pl. friss táptalajra helyezés)

- c. „metabolit csapdák” alkalmazása (valamely anyag alkalmazása, mely megkötí a metabolitot)
- d. periodikus vagy folyamatos táptalaj eltávolítás
- e. sejtek permeabilizálása (pl. detergenssek segítségével).

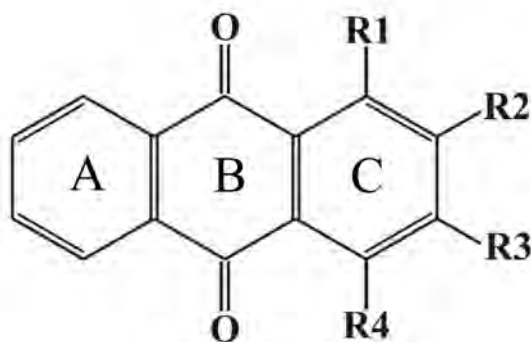
A növényi sejtfertmentációs technikák előnye abban rejlik, hogy a hatóanyag termelést függetleníteni tudják a külső környezettől (termőterület, időjárás stb.). A növényi hatóanyagok rentábilis termeltetésének egyik kulcsa a nagyobb volumenben történő tenyésztés megvalósítása a mesterségesen biztosított környezetben.

Ennek elérése viszont számtalan újabb problémát vet fel, túlmenően a „scale-up” eljárás nehézségein. Az első megközelítés az, hogy a termék ára közelítőleg minimum 1000 USA \$ kg<sup>-1</sup> körül legyen (a fönt említett költségek miatt). Az ipari mértékű hatóanyag termelés során számos olyan technikát alkalmaznak, melyek segítségével a termelési költségek lényegesen redukálhatók pl. az immobilizált sejt kultúrák alkalmazásával akár a 25 USA \$ kg<sup>-1</sup> ár is elérhető az 1000 USA \$ kg<sup>-1</sup> helyett (33).

#### 2.4. A RUBIA TINCTORUM L., MINT VIZSGÁLATI OBJEKTUM

A festő buzér (*Rubia tinctorum* L.) a *Rubiaceae* (buzérfélék) családjába tartozó élő faj. Gyöktörzse, valamint az arról eredő gyökerek jellemző vöröses narancssárga színűek a bennük található antrakinnon (9,10 antracéndion-származékok) típusú vegyületeknek köszönhetően (1. ábra.). Az antrakinnon származékok a gyöktörzs illetve a gyökerek elsődleges kérgében található parenchima sejtek sejt nedv vakuolumaiban halmozódnak fel legnagyobb mennyiségben (38). Ezek mellett a festő buzérból számos farmakológiai szempontból értékes hatóanyagot izoláltak (klorogénsav, aszperulozid, dafillozid, rutin, hiperozid) (39).

1. ábra. A festőbuzér rhizómájából izolált főbb antrakinnon komponensek kémiai szerkezete. (AQ=antrakinnon). Et= -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>; -Pr=primveróz (6-O-β-D-xylopiranozil-β-D-glükóz)



Antrakinon alapváz  
(A,B,C gyűrűk) a  
szubsztituensek  
elhelyezkedésének  
feltüntetésével (R1-R4)

Név	R1	R2	R3	R4
2-hidroxi-9,10-AQ	H	OH	H	H
2-metoxi-9,10-AQ	H	OCH <sub>3</sub>	H	H
1-hidroxi-2-metil-9,10-AQ	OH	CH <sub>3</sub>	H	H
1-metoxi-2-metil-9,10-AQ	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H
Alizarin	OH	OH	H	H
Alizarin-1-metiléter	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H
Alizarin-2-metiléter	OH	OCH <sub>3</sub>	H	H
Alizarin-2-O-glükózid	OH	O-glükóz	H	H
Alizarin-dimetiléter	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H
Xantopurpurin	OH	H	OH	H
Xantopurpurin-3-metiléter	OH	H	OCH <sub>3</sub>	H
Xantopurpurin-dimetiléter	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H
Quinizarin	OH	H	H	OH
Tectokinon	H	CH <sub>3</sub>	H	H
Rubiadin	OH	CH <sub>3</sub>	OH	H
Antragallol	OH	OH	OH	H
Antragallol-3-metiléter	OH	OH	OCH <sub>3</sub>	H
Antragallol-2,3-dimetiléter	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
Munjistin	OH	COOH	OH	H
Munjistin-2-metilészter	OH	COOCH <sub>3</sub>	OH	H
Lucidin	OH	CH <sub>2</sub> OH	OH	H
Lucidin-2-etiléter	OH	CH <sub>2</sub> OEt	OH	H
Lucidin-primverozid	OH	CH <sub>2</sub> OH	O-Pr	H
Purpurin	OH	OH	H	OH
Pszeudopurpurin	OH	COOH	OH	OH
Ruberitrinsav	OH	O-Pr	H	H
Nordamnacanthol	OH	CHO	OH	H

Az antrakinon-származékok bioszintézise a *Rubiaceae* családban sok szempontból speciális, nem a gombákra, a *Fabaceae*, *Rhamnaceae*, és *Polygonaceae* családokra jellemző poliketid szintézis utat követi. A bioszintézis egyik különlegessége, hogy a C gyűrű külön úton jön létre (40).

Az A és B gyűrű a sikimisav szintézisúton képződik (40). A kiindulási vegyületek a foszfoenol-piruvát és az eritróz-4-foszfát, melyekből sikimisavon keresztül

képződik a korizminsav, majd az izokorizimát-szintáz segítségével az izokorizminsav. Ehhez kapcsolódik a következő lépésben egy  $\alpha$ -keto-glutarát molekula, amit az o-szukcinilbenzoát (OSB)-szintáz enzim katalizál. A képződött OSB az OSB-CoA ligáz enzim segítségével OSB-CoA észterre alakul, amelyből létrejön az 1,4 dihidroxi-2-naftoinsav. Ennek gyűrűi a majdani antrakinon molekula A és B gyűrűi lesznek.

A C gyűrű a terpenoid szintézis úton képződik, ezen belül is kétféle úton (40).

Az egyik a mevalonsav út, mely esetén 2 db acetyl-CoA a kiinduló vegyület. Ezekből jön létre az acetoacetyl-CoA, melyet a hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA)-szintáz enzim HMG-CoA molekulává alakít. Ezt követően a molekulát a HMG-CoA reductáz enzim mevalonsavvá (MVA) alakítja, majd kétszeres foszforiláció után (kinázok segítségével) kialakul a mevalonsav-difoszfát, melyet egy dekarboxiláz enzim alakít át izopentenil difoszfáttá (IPP).

A másik út az ún. 2-C-metil-D-eritritol út (MEP), melynek kiinduló vegyületei a piruvát, és glicerin aldehid foszfát. Ezekből kialakul az 1-deoxi-D-xilulóz-5-foszfát, melyet egy reductáz enzim alakít MEP-foszfáttá. Ezek után több lépésen keresztül (4-citidil-difoszfó-2-C-metil-D-eritritol-2-foszfáton és 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciklodifoszfáton keresztül) létrejön az IPP.

A két úton keresztül létrejött IPP molekulákat az IPP izomeráz enzim 3,3 dimetilallil difoszfáttá alakítja, mely a korábban szintetizált 1,4 dihidroxi-2-naftoinsavhoz kapcsolódik több lépéses folyamaton keresztül, és létrejön az antrakinon molekula. A *Rubia tinctorum* antrakinonjainak jellegzetessége, hogy csak a C gyűrű szubsztituált (40) (1. ábra). A szubsztitúció a bioszintézis késői lépéseiben történik hidroxiláció illetve metiláció révén, a glikozilálást pedig öt különböző antrakinon specifikus glikozil transzferáz végzi (40).

A 9,10-antracéndion-származékok gyógyszerési jelentősége óriási. Jelenleg forgalomban a doxarubicin és származékai illetve a mitoxantron és származékai vannak. Az előbbieket akut leukaemia és szolid tumorok, az utóbbiakat haematológiai malignus betegségekben és egyéb daganatos betegségekben (kombinációkban) alkalmazzák (41). Sajnos számos mellékhatással rendelkeznek, főképpen a kardiális dekompenzáció említendő meg közülük, mint a legsúlyosabb kontraindikáló tényező.

A *Rubia tinctorum* L.-ből származó antrakinonok felhasználása is igen sokrétű. Egyrészt évezredek óta természetes eredetű narancssárga-piros festékként használják őket (a textil és élelmiszeriparban egyaránt) (39,42), másrészt számos biológiai aktivitással rendelkeznek (39). Egyik fontos hatásuk az antimikrobiális aktivitás; a glikozidok antibakteriálisak (*Shigellák*, *Staphylococcusok* ellen hatékonyak),

míg az aglikonok antifungális hatással rendelkeznek (*Candida*, *Geotrichum* fajok ellen hatékonyak). Ez utóbbi hatások valószínűleg hozzájárulnak a növény gyökerének gombákkal szemben tapasztalható rezisztenciájához (39,42). Másik jellemző –kémiai szerkezetükből eredő– hatásuk a Ca és Mg ionokkal történő komplexképzésen alapuló vesekőoldó hatás. A hatás a vizelet pH értékétől függ, hiszen az antrakinon-származékok pH=7 fölött színes, vízben oldhatatlan komplexet képeznek a fönti ionokkal, míg pH 5-7 között ez a komplex vízdékony, így a szervezetből képes távozni (42). A xanthopurpurin (1,3-dihydroxiantrakinon) molekulát, mint a kollagén indukált vérrögképzés aggregáció erős gátlóját írták le, így ennek az antrakinon-származéknak fontos szerepe lehet a vérrögképződés megakadályozásában (43).

A lucidin és származékai (1. ábra) mutagén aktivitást mutatnak különböző modellrendszerekben, valamint megállapítást nyert a DNS-hez való kötés lehetősége (44). Ezen igazolt karcinogén hatások miatt a festő buzér készítmények alkalmazása az utóbbi időben háttérbe szorult. Érdekességként megemlítendő, hogy néhány származékról épp ennek ellenkezője derült ki, a purpurin és alizarin antigenotoxikus (egyes genotoxikus ágensekkel szemben védenek) hatásúak (45-46).

A hatóanyagok szelektívebb kinyerése érdekében az egyik jelenlegi törekvés a festő buzér növények biodiverzitásának vizsgálata a hatóanyag produkció szempontjából, melynek eredményeként kiválaszthatók az optimális összetételű (legalacsonyabb mennyiségű lucidint és származékait, illetve legmagasabb mennyiségű egyéb antrakinonokat tartalmazó) növényegyedek (38). A másik megközelítési mód a *Rubia tinctorum*-ból származó olyan növényi sejt kultúrák létrehozása, melyek segítségével optimalizálhatóvá és manipulálhatóvá válik a festékként valamint gyógyászatban felhasználható hatóanyagok produkciója. A *Rubia tinctorum*-ból előállított kultúrák nagy előnye, hogy a fenntartás/kezelések során történő színanyag összetétel változása egyszerűen, szabad szemmel is követhető (2. ábra).



2. ábra. *Rubia tinctorum* L. sejtuszuspenziós kultúrák. Bal oldalon: desztillált vizes kezelés (DW), jobb oldalon *Botrytis cinerea* (Bot) eredetű elicitoros kezelés után. Kezelés időtartama 7 nap.

A festő buzérből létrehozott kallusz és sejtuszuspenziós, valamint genetikailag módosított kultúrák antrakinon termeléséről számos irodalmi adat áll rendelkezésre. A kallusz kultúrák fő komponense a ruberitrinsav és a rubiadin-3-glukozid (47). A sejtuszuspenziós kultúrák antrakinon összetétele változatosabb képet mutat: hét fő komponenst izoláltak, köztük a ruberitrinsavat és a lucidin primverozidot (48). Genetikailag módosított (transzformált) kultúrák fő komponensei az alizarin, purpurin (49), nordamnacanthal (50), ruberitrinsav, lucidin, pszeudopurpurin (51).

A fent említett kultúrák hatóanyag termelése tovább fokozható illetve irányítható elicitorok alkalmazásával. Ilyen -eddigiekben alkalmazott- elicitorok: prolin, aminoindan-2-foszfonsav (52); glutation (53), különböző gomba eredetű elicitorok (54-55), kitozán (56), és a növényi jelátvitelben szereplő molekulák: a jazmonsav és szalicilsav (57-58). A fenti módszerek nem csak az antrakinon bioszintézis növelésére alkalmasak, hanem bizonyos esetekben megváltoztathatják az antrakinon származékok összetételét is a kezelés során, szelektívebbé téve egyes komponensek termelését (58).

Az antrakinon összetétel befolyásolása fontos szempont, hiszen a beavatkozási pontok azonosítása után a termelés tovább szelektálható bizonyos antrakinon-származékok irányába, növelve a kitermelés hatékonyságát. A *Rubia tinctorum* L. sejtuszuspenziós kultúrák tenyésztethetők nagyobb volumenben is (59) így a leírt módszerek közvetlen gyakorlati fontossággal bírnak.

Az antrakinon-származékok analitikája az elmúlt évtizedben jelentős fejlődésen ment át. Az utóbbi tíz évben a nagyhatékonyságú kromatográfiai módszerek szinte egyeduralmukodóvá váltak, jól jellemzett reprodukálhatóság mellett. Az egyik igen elterjedt módszer a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) (az elválasztást

fordított fázisú oszlopon megvalósítva), melyet Uv-Vis detektálás egészít ki főként on-line spektrum felvétellel (49,60). Az antrakinon származékok molekulaszervezetének következménye, hogy 2-3 abszorbancia maximummal rendelkeznek a 200-800 nm közötti tartományban: 250-260 nm; 280 nm; és 410-430 nm környékén. Az utóbbi maximum az azonosítást segíti, de szinte kivétel nélkül a 250 nm környéki maximumot alkalmazzák a mennyiségi meghatározásra (38). Egy újabban bevezetett detektálási módszer a tömeg(szelektív) detektorok alkalmazása (61,62), melyek főleg az antrakinon-származékok azonosítására alkalmazhatók, érzékenyséjük kisebb, mint a diódasoros detektoroké. Az tömegszelektív detektálás során az alkalmazott interface kivétel nélkül „electrospray ionization” (ESI) elven alapul, mely lényegesen nagyobb érzékenységet tesz lehetővé az egyéb ionizációs módszerekkel összehasonlítva (61-63). Egy másik fontos módszer a gázkromatográfia-tömegspektrometria (GC-MS), melynél a mintaelőkészítés során a mintákat származékképzéssel teszik alkalmassá a vizsgálatra. A módszer előnye a jó reprodukálhatóságán túl, hogy az antrakinon-származékokon kívül a minta számos más komponense is vizsgálható (pl. cukrok, szerves savak) (62).

A minta előkészítés szerves oldószeres (etanol, metanol, aceton) kivonatkészítést jelent, ez megvalósulhat szobahőmérsékleten, valamint magasabb hőmérsékleten, az antrakinon glikozidok pedig vizsgálhatók natív formában, illetve hidrolízis (savas vagy enzimes) után (60,62).

A *Rubia tinctorum*ból előállított kultúrák felhasználhatók a leírtakon kívül egyéb biológiai és fiziológiai megfigyelések objektumaként is. Számos vizsgálati módszert írtak le az életjelenségek és anatómiai változások nyomkövetésére festő buzérből származó sejt kultúrákban (54,56,64).

## 2.5. AZ ELICITÁLÁS FOGALMA, ELICITOR TÍPUSOK, AZ ELICITÁLÁS ÁLTALÁNOS HATÁSAI

A növényi speciális anyagcsere és a növényi védekezési válasz közötti kapcsolat már régóta bizonyított (2). A növények válaszul a különböző -számukra kedvezőtlen- biotikus/abiotikus (stressz) faktorra védekezési mechanizmusok egész sorát alakították ki, mely magában foglalja a másodlagos anyagcseretermékek (pl. a fitoalexinek) termelésének növelését is (2). Miután kiderült, hogy a növényi védekezési válasz kiváltásához nem szükséges az egész biotikus/abiotikus környezet jelenléte, hanem annak egy kis, meghatározott faktora is elégséges, megindultak a vizsgálatok abban az irányban, hogy ezek a hatások, kis molekulák hogyan befolyásolják a növényi másodlagos anyagcsere egyes elemeit. Ezen felfedezések az 1970-es évek elejére-

közepére tehető, és Keen volt aki 1975-ben az „elicitor” terminológiát először használta (65).

Az elicítálás fogalma tehát több évtizedes múltat tekint vissza, az értelmezése viszont folyamatosan változik, maga az elicítálás (angol tükörfordításban: kicsal, kiderít) tudományos értelmezésben tulajdonképpen válasz generálást, válasz kiváltást jelent. Egy újabb megfogalmazás szerint: az elicitor olyan anyagként definiálhatjuk, melynek kis mennyisége egy élő sejtek alkotta rendszerbe juttatva indukálja, vagy megnöveli specifikus metabolitok bioszintézisét (66).

Az elmúlt évtizedekben számos faktorról bizonyították, hogy elicitorként alkalmazható, ezért szükségessé vált valamilyen rendszer szerinti osztályozásuk, így az elicitorokat általában az eredetük és molekuláris struktúrájuk alapján sorolják be. Mindegyik típusú elicitor szerkezetéből/tulajdonságaiból adódóan rendelkezhet specifikus hatással, mely főként a növény-elicitor interakciótól függ (2). Ezek alapján az elicitorokat másképpen is osztályozhatjuk: lehetnek általános elicitorok, melyek védekezési választ képesek generálni mind a rájuk jellemző gazda- és nem gazdanövényekben egyaránt, illetve lehetnek fajspecifikus elicitorok, melyek a rájuk jellemző gazda fajokban betegség elleni rezisztenciát válthatnak ki, attól függően, hogy, az avirulencia és rezisztencia gének megtalálhatók a patogénben és növényben egyaránt (67). Az elicitorok osztályozása során bizonyos esetekben nem különíthető el egyértelműen az abiotikus stressz és az abiotikus elicitor fogalma. Tágabb értelemben például a sejtszuspenziós kultúrák esetében a nyírási, vagy a hőmérsékleti stressz alkalmazása (annak ellenére, hogy semmilyen anyagot nem adunk a kultúrához) is elicítálásként fogható fel, különösen abban az esetben, ha ez valamely speciális anyagcseretermék megnövekedett produkciójához vezet.

A második táblázat a növényi rendszerekben alkalmazott elicitorok osztályozását tartalmazza (1-2,66) alapján.



2. táblázat. A növényi rendszerekben alkalmazott elicitorok osztályozása.

Elicitorok			
Abiotikus	Fizikai eredetű	Nyírási stressz, hőstressz, UV besugárzás	
	Kémiai eredetű	Fémionok (europium, kalcium, ezüst, vanádium)	
Biotikus	Kémiai eredetű	Nem definiált összetételű	Gomba sejtfal kivonatok, gomba spórák, baktérium tenyészet kivonatok, baktérium/gomba homogenizátumok
		Definiált összetételű	Poliszacharid
	Oligoszacharid		Galakturonidok
	Peptidek		Glutation, systemin
	Proteinek		Celluláz, elicitinek, oligandrin
	Lipidek		Lipopoliszacharidok, sziringolid
	Glikoproteinek	Criptogein	
Illó anyagok	Volicitin		

Az elicitálás mint eszköz sikerességét -a hatóanyag termelés szempontjából- az elicitor és növény közötti komplex kölcsönhatás határozza meg. Ezen interakció egyik fontos eleme az elicitor specifitása. A specifitást viszont az elicitor kémiai szerkezete, az őt felismerő receptor típusa és a receptorhoz kapcsolódó effektor molekulák jellege befolyásolja (1-2, 66, 68-69).

Az elicitor koncentrációja szintén befolyásolja a növény védekezési választát. A hatékony elicitor koncentrációt kísérletesen szokták megállapítani (54), mely általában a sejt kultúra által adott válasz egyes elemeinek mérésén alapul. Általánosságban elmondható, hogy kétféle dózis-válasz görbét írtak le az elicitoros kezeléseket követően. Az egyiknek az a jellegzetessége, hogy egy elicitor dózis fölött a rá adott válasz már nem növekszik, tehát egy tipikus szaturációs (telítési) profillal írható le, míg a másik típus esetén egy éles optimummal rendelkező görbe jellemzi a dózis-hatás összefüggést (70-71).

Az elicitorokat általában a tenyészet növekedési fázisának végén alkalmazzák, ahol a hatóanyag produkció mértéke növekedni kezd (ez leggyakrabban az exponenciális növekedési fázis vége) (54). Az elicitálás időtartamát szintén kísérletes

úton állapítják meg, a maximális hatóanyagprodukciónak elérése előtt gazdaságtalan a sejtekből történő kinyerés, míg a túl hosszú ideig tartó elicítálás következményeként elpusztuló sejtek raktáraiból (pl. vakuolum) felszabaduló hatóanyag jelentős mennyisége degradálódhat az extracelluláris enzimek hatására (28). Az elicitorok legtöbb esetben az elicítálás végéig a médiumban maradnak (kivételt képezhetnek pl. az immobilizált kultúrák, ahol a táptalaj csere egyszerűen kivitelezhető), bár elvileg a receptorhoz történő kapcsolódásukat követően beindul a védekezési válasz, így hatásuk kiváltásához elvileg néhány perc is elég.

Az elicítálás hatékonyságát befolyásolja a táptalaj hormon összetétele, a külső környezet (pl. fény), így az elicítálás optimális körülményeit szintén kísérletesen kell megállapítani (2).

Az elicítálás természetesen a növényi sejtekben a védekezési válasz részeként jelentős metabolikus és strukturális változásokat idéz elő (54,58). A metabolikus változások a speciális anyagcserén kívül az általános anyagcserét is érintik (72), melyek bizonyos elemei (pl. a glutation-transzferázok) befolyásolják a vakuoláris transzport folyamatokat, ezen keresztül a speciális anyagcsere tárolási kapacitását állítják be (2,72). A másik jellemző változás, hogy a megtermelt speciális anyagcseretermékek megjelennek a tápközegben is. Ezt a tényt az elicitorral kezelt sejtek megváltozott permeabilitásával, ozmotikus kondícióival, és membránpotenciáljával magyarázzák, de léteznek olyan elicitorok (pl. a kitozán), melyek direkt hatásuk révén permeabilizálják a sejtmembránokat (2,56).

### *2.5.1. Az elicítálás részfolyamatai*

Az elicitorok hatásának első lépése a növények által történő jelfelismerés. Ez a felismerési folyamat esszenciális a válasz kiváltásban és az elicitor ún. patogén asszociált molekuláris mintázatával (PAMM) hozható összefüggésbe. Ezt a mintázatot képes a növény fölismerni, mégpedig (az elengedhetetlen) fizikai/kémiai kontaktuson keresztül (73). A felismerés molekulái az ún. receptorok. A fizikai/kémiai kontaktus valamilyen (általában konformációs) változást idéz elő a receptoron, melynek függvényében a receptor a rá jellemző effektor molekulákat aktiválja, és az elicitor jelét átalakítja a metabolikus és genetikai apparátusa számára értelmezhető jellé (1-2,74). Az elicitor-receptor interakcióra a következő szabályszerűségek érvényesek:

- nagy affinitású,
- specifikus,

- reverzibilis,
- és a szaturálható kötődés.

Mindezek a receptor-ligand interakció meglétét igazolják (1).

A növényi receptorok sejtszintű elhelyezkedése ma sem teljesen tisztázott. A legjobban ismert csoportot a plazmamembránban elhelyezkedő receptorok alkotják (1-2), de receptor/effektor jelleggel rendelkező molekulák jelenléte kimutatható az extracelluláris (apoplasztikus) térben, illetve az intracelluláris térben is (pl. szalicilsav kötő proteinek, melyek effektor tulajdonságokkal is rendelkeznek) (75-76). A plazmamembránban elhelyezkedő ún. R proteinek (l. később) bizonyos csoportjában pedig a PAMM felismerő LRR (leucinban gazdag ismétlődő molekularész) régió intracellulárisan és extracellulárisan is elhelyezkedhet (1). További megfigyelés, hogy néhány glikolipid elicitor (pl. sziringolid) egy 34 kDa tömegű vízoldható molekula ismer föl (77).

A plazmamembránban található receptorok igen sokfélék lehetnek. Jellemző rájuk, hogy 34-193 kDa közötti molekulatömeggel rendelkező fehérjék, melyek különböző enzimaktivitással is rendelkezhetnek (apiráz, LRR kináz, 1,3- $\beta$ -glukanáz), és általában jellemző rájuk, hogy rendelkeznek egy extracelluláris (felismerésért felelős) molekularészlettel, egy- vagy több transzmembrán résszel, és egy intracelluláris részlettel, mely a moduláló és effektor molekulákkal van kapcsolatban (1-2).

A receptorok egy másik típusához sorolják az ún. R proteineket, melyek az inkompatibilis (növényt megbetegíteni nem tudó) pathogének avr génjének termékeit ismerik fel. Ez a jelenség a növényi rezisztencia szempontjából fontos. A növény rezisztens a pathogénnel szemben, amennyiben rendelkezik a patogén avr géntermékét felismerő R proteinnel. A növények igen sokféle R proteint képesek előállítani, melyek egyik fő csoportjára jellemző, hogy nukleotid kötőhellyel, valamint LRR doménnel rendelkeznek (1-2). A másik fő csoportjuk jellemzője, hogy extracelluláris LRR-el, transzmembrán résszel, és kisméretű citoplazmában elhelyezkedő doménnel rendelkeznek, míg a harmadik csoportra jellemző a citoplazmatikus serin/treonin protein kináz aktivitás (2).

Az elicitoros jelfelismerés után a receptorok aktiválják effektoraikat (G proteinek, protein kinázok, ion csatornák), melyek a jelet másodlagos hírvivő molekulákon keresztül végül a genom (illetve annak regulátor elemei) számára továbbítják.

### 2.5.2. A növényi védekezési válasz elemei

Az elicitorok indukálta védekezési válasz elemei sokfélék lehetnek (függően az elicitor specificitásától, az aktiválódó szignál transzdukciós utaktól, a növény genetikai adottságaitól), ezek közül a fontosabbakat az alábbi felsorolás tartalmazza.

- a citoszkeleton reorganizációja; a mikrotubulusok és mikrofilamentumok időbeli és térbeli eloszlás szabályozódik a védekező sejtben, ezáltal kontrollálják a védekezési választ. A mikrotubuláris rendszer szerveződésének dinamikus változása számos szignáltranszdukciós elem megjelenése során detektálható (pl. a foszfatidilinozitol kináz működése szorosan összefügg a mikrotubuláris rendszerrel, GTP-ázok kulcsfontosságú regulátorai az aktin citoszkeletonális rendszernek), így a növényi védekezési válasz fontos részét képezi (78).
- A védekezéssel összefüggő fehérjék (ún. Patogenezis-related proteins - PR proteins) felhalmozása (kitinázok, glukánázok, endopoligalakturonázok, melyek elősegítik a jelként funkcionáló, pl. pektin eredetű oligomer molekulák –mint endogén elicitorok- főlzabradulását; hidroxiprolinban gazdag glikoproteinek, proteáz inhibitorok stb.)
- Rezisztencia fehérjék megjelenése a fertőzött/elicitorral érintkező területeken, illetve (többek közt) ezen fehérjék részvételével történő hiperszenzitív válaszreakció (programozott sejthalál az infekció környékén) (79)
- A sejtfal strukturális változásai (lignifikáció, kallóz berakódás) (80)
- Növényi kis molekulasúllyal rendelkező molekulák (tanninok, fitoalexinek) megjelenése 2-4 órával az elicitálás után (1-2)
- Másodlagos jelátviteli molekulák/stresszhormonok (jazmonsav, szalicilsav) szintézise (74)
- Szerzett szisztémás rezisztencia (SAR). Pathogének (főként levél illetve hajtás károsítók) indukálta jelenség, mely a védekezési válasszal csaknem egyidőben kialakul, de annak helyétől távol eső szervekre jellemző. A SAR a pathogének széles skálája ellen képes védelmet nyújtani az elsődleges infekciót követően, és kialakulása szalicilsav megjelenéséhez kötött (75).

### 2.6. A NÖVÉNYI SZIGNÁLTRANSZDUKCIÓ

Az elicitor, mint jel fölismerése után a növényi sejt az elicitor által kiváltott

jelet továbbítja, fölerősíti és modulálja a génkészlet és a hozzá tartozó szabályozó elemek számára értelmezhető jellé. Az elicitorok indukálta jeltovábbítás tulajdonképpen egy sok komponenst felsorakoztató hálózat, melynek egyes elemei nem egymástól szeparáltak, hanem egymással párhuzamosan illetve bizonyos esetekben egymást fölerősítve/gyengítve/modulálva jelennek meg, elvezetve a génexpresszió megváltozásáig, illetve az anyagcsere fluxusok újrhangolásáig (81).

Az egyes jelátviteli elemek megjelenése, illetve a növényi védekezési válasz részjelenségei jeltípusonként (elicitoronként) és a felismerés jellege szerint különbözhetnek egymástól amit azonban erősen befolyásol a sejt génkészlete és általános állapota is. A különböző jelátviteli elemek megjelenésére jellemző, hogy a rövid időn belül jelentkező (0-1h) válaszelmelek függetlenek, míg a későbbi válaszelmelek már függhetnek a génexpresszió változásaitól. Az alábbi felsorolás azon legfontosabb jelátviteli elemeket tartalmazza, melyekről bizonyítást nyert szerepük az elicitorokra adott védekezési válasz kiváltásában.

### *2.6.1. GTP kötő fehérjék*

A G-fehérjék ősi eukarióta proteinek, magukban foglalják a heterotrimer komplexből fölépülő ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  alegységekből álló) illetve a kis méretű monomer G-fehérjéket. A heterotrimerek génjeinek mennyisége limitált a növények genomjában, a kis méretű G-fehérjék viszont számos típusal rendelkeznek (Rho, Rac, Rhab stb.). A G-fehérjék szerepe teljes mértékben még nem tisztázott a növényi sejtben, de bizonyított, hogy számos sejtszintű folyamatot regulálnak (növekedés, fejlődés, hormon jelátvitel, védekezési válasz) (1, 82). G-fehérjék aktiválják különböző növényfajokban a NADPH oxidázt, különböző ioncsatornákat ( $K^+/Ca^{2+}$ ), a foszfolipázok különböző típusait (PLA, PLC, PLD), részvételüket kimutatták továbbá számos speciális anyagcsere termék (pl. antrakinon-származékok) produkciójának növelésében is (1-2,82). Számos elicitor aktivál G-fehérjéket (aktiváció az elicitoros kezelés után néhány percen belül megjelenik), és néhány receptorról szintén bebizonyosodott, hogy a fölismert jelet az intracelluláris oldalon GTP-áz aktivitás növekedés követi. Így tehát a G-fehérjék fontos szerepet töltenek be az elicitor indukálta védekezési válasz formálásának korai szakaszában (2,82).

### *2.6.2. Ion áramok és a $Ca^{2+}$ jel*

Az elicitálás után néhány percen belül megjelenő különböző ionáramok ( $K^+/H^+$  csere,  $Cl^-$  kiáramlás,  $Ca^{2+}$  beáramlás) eredete még nem tisztázott, noha az elicitoros kezelést majdnem minden esetben különböző ionáramlások kísérik (83). Maga a megváltozott intracelluláris ionösszetétel is okozhat génexpresszió változásokat, de lényegesebb a kalcium ion szint változása a sejtben. Maga a kalcium jel úgynevezett kulcs hírvivő, mivel számos további jelátviteli elem aktiválódását befolyásolja. Különböző elicitorok különböző mértékű kalciumjelet okoznak (intracelluláris koncentráció a beáramlás esetén 50 nM-5 $\mu$ M) és a koncentráció csúcsainak időbeli megjelenése is fontossággal bír a további jelátvitel szempontjából (1). Általánosságban elmondható, hogy a kalcium jel legalább bifázisos, az első az elicitálást követő 1-5 percen belül jelentkezik, és az extracelluláris térből történő beáramlás okozza, míg a második csúcsot az intracelluláris raktárakból (vakuolum, Golgi apparátus, endoplazmás retikulum) az inozitol foszfátok hatására történő felszabadulás idézi elő (83). A  $Ca^{2+}$  jel esetében leírtak egy önerősítő folyamatot is, mégpedig a kalcium ion koncentráció növekedése a NADPH oxidáz enzimeken keresztül hidrogén-peroxid ( $H_2O_2$ ) termelődést idéz elő, ami elősegíti a kalcium beáramlást (1). A kalcium jel számos további folyamatban regulátor szerepet tölt be. Szerepe van a metabolit produkcióban (pl. antrakinon-származékok esetében), kalcium szenzorokon keresztül (pl. kalmodulin) számos kalcium/kalmodulin dependens molekula (protein kinázok, protein foszfatázok, membránhoz kötött enzimek, transzkripciós faktorok, foszfolipázok) működését befolyásolja. Az említett molekulák számos további, más hírvivő szintézisére hatással vannak (reaktív oxigén gyökök, jaszonsav, inozitol foszfátok, foszfatisav) (83). A másik szenzoros jellegű csoportot a kalcium dependens protein kinázok alkotják, melyek a további -gének irányába ható- folyamatok meghatározó elemei. A kalcium további fontos hatása, hogy közvetlenül transzkripciós faktorokat is aktivál (84).

Összefoglalva, a kalcium a további jelátviteli momentumok megjelenését segíti, a vele egy szinten álló szignalizációs elemeket is regulálja, azok jelentéseit integrálja, illetve tovább erősíti, és különböző egyéb irányok felé továbbítja, s mindemellett közvetlen transzkripciós hatással is rendelkezik.

### 2.6.3. Citoplazmatikus pH csökkenés

Egyik régóta ismert jelenség, hogy az elicitálás után a médium alkalinizálódik, a sejtek citoplazmája pedig savanyodik, ami a megváltozott ionáramok eredménye. Szerepét eddig az oxidatív stressz kialakulásában illetve a másodlagos

anyagcseretermékek produkciójának fokozásában mutatták ki (1,85). A citoplazmatikus savanyodás elősegíti a fenilalanin ammónia liáz (PAL), és a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductáz (HMGCoA) géntaszkrípiciót. Az első a fenilpropanoid, a második az izoprenoid szintézisút egyik kulcsenzime. A citoplazmatikus savanyodást elősegíti a G-fehérje aktivált foszfolipáz A<sub>2</sub>- lizofoszfatidilkolin szintézis is, mely a vakouális proton-ATP-ázon keresztül hatva szabadítja fel a sejten belüli raktárban lévő protonokat (1-2,85).

Összefoglalva, a citoplazmatikus savanyodás nemcsak az elicítálást követő jelenség, hanem egy fontos szabályozó folyamat, mely a fő fitoalexin szintézisutak kulcsenzimjein keresztül modulálja a védekezési választ.

#### *2.6.4. Az oxidatív stressz és a reaktív oxigén molekulák*

A reaktív oxigén molekulák (ROS) produkciója egy általános és korai időbeli megjelenésű növényi válaszelem a patogén/elicitor fölismerése után. A legfontosabb ROS molekulák a szuperoxid anion, hidroperoxil gyök, hidroxil gyök és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, melyek a légköri oxigén fokozatos redukciója során jönnek létre. A növényi védekezési válasz szempontjából a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rendelkezik kiemelkedő szereppel, hiszen a többi említett reaktív oxigén forma is (enzimes és nem enzimes úton) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-á alakulhat. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> relatíve hosszú élettideje és igen jó (membránokon keresztüli) diffúzibilitása miatt az egyik legfontosabb növényi védekezésben szereplő oxidatív molekula. Fő ROS előállító rendszerek a NADPH oxidáz, apoplastikus peroxidázok (ez a kettő bír fontossággal az elicitoros kezelése során), és más alternatív oxidázok a mitokondriumban, kloroplasztisban, és peroxiszómában (1,86). A ROS előállítás első lépése a sejtekben a szuperoxid gyökök képzése, melyek extrém módon toxikusak, a membrán lipidek peroxidációját okozzák (87). A szuperoxid dizmutáz enzimek a szuperoxid gyököket gyorsan hidrogén peroxiddá alakítják. A plazmamembránhoz kötött NADPH oxidáz enzim három aktivátora ismert. Az első egy eddig fel nem tárt mechanizmuson keresztül történő, közvetlen elicitor által kiváltott aktiváció, a második kalcium/kalmodulin dependens protein kinázon keresztül történő aktiválás, a harmadik esetben pedig a NADPH oxidáz a kalcium iont közvetlenül képes megkötni, és ezúton indul be a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produkció (1,89). A NADPH oxidázok elhelyezkedhetnek a tonoplasztban is. Főként ozmotikus és fémstressz esetén mutatták ki aktivitásukat ebben a membránban. A reaktív oxigén fajták létrejöhetnek nem enzimes úton is (pl. a Haber-Weiss reakció, Fenton reakció).

Az elicitoros kezelést követő  $H_2O_2$  megjelenés, jelenlegi tudásunk szerint, bifázios. Az első csúcs 5-30 perccel (ezen termelődési maximum kialakulásába a génexpresszió változása nem szól bele), a második 1-3 órával jelenik meg a jelfelismerést követően és számos esetben a kalcium ion intracelluláris mennyiségének növekedése előfeltétele a  $H_2O_2$  csúcs kialakulásának (1,86,89). A sejtek mindenkori redox státusza alapvetően befolyásolja az anyagcserét, ezt a redox státuszt a sejtek a mindenkori ROS termelődés és elimináló kapacitás összehangolásával állítják be. (86). A ROS elimináció fő enzimejei a szuperoxid dizmutázok, aszkorbát peroxidázok, glutation peroxidáz, kataláz. Ezen enzimek kapacitása jóval meghaladja a reaktív oxigén molekulák közömbösítéséhez szükséges szintet, így biztosítva azt, hogy az oxidatív stressz a sejtek számára szignálként funkcionáljon, és ne vezessen azonnali pusztulásukhoz (86,89). A hidrogén peroxidnak számos fontos hatása és funkciója van a patogén illetve elicitor indukált védekezési válaszban (1-2,86, 88-89):

- direkt antimikrobiális hatás
- sejtfal megerősítése a strukturális fehérjék illetve a lignin polimerek közötti keresztkötések létrehozásával
- részt vesz a hiperszenzitív válasz kialakításában
- védekezési molekulák (fitoalexinek) szintézisének elősegítése
- másodlagos hírvivő molekulaként számos jelátviteli folyamatot modulál: pl. lipid peroxidáción keresztül a jaszmonsav bioszintézist
- számos, fehérjét módosít oxidoredukció által (hisztidin kinázok, mitogén aktivált protein kinázok, protein foszfatázok),
- (valamint) nem enzimes reakción keresztül számos egyéb jelátviteli molekulát módosít.
- számos védekezésben részt vevő gén expresszióját közvetlenül elősegíti (szeszkviterpén ciklázok, PAL)

Összefoglalva, a hidrogén peroxid fontos jelátalakító, jelerősítő, moduláló, és a különböző lépések közötti összekapcsoló faktorként játszik szerepet a védekezési válaszban.

#### *2.6.5. Inozitol foszfátok, és a ciklikus nukleotidok*

A kalcium ion jel aktiválta foszfolipáz C (PLC) aktivitás hatására különböző inozitol foszfátok keletkeznek, melyek közül a legfontosabb a foszfatidil inozitol 1,4,5



trifoszfát (IP<sub>3</sub>). Ennek fő funkciója, hogy az intracelluláris raktárakból (vakuolum, Golgi készülék, endoplazmás retikulum) kalcium iont képes mobilizálni, kiváltva ezzel a kalcium jel második időbeli megjelenését. Az IP<sub>3</sub> szerepét számos elicitor indukált speciális anyagcsere termék produkciója során sikerült kimutatni (pl. antrakinonok, flavonoidok) (1-2).

A ciklikus nukleotidok közül a ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) és a ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) akkumulálódnak az elicitálást követően, és a plazmamembránban található kation csatornák regulációjában játszanak fontos szerepet. Szerepük van a Ca<sup>2+</sup>/K<sup>+</sup> dependens fitoalexin bioszintézis szabályozásában is (90). A ciklikus citidin-monofoszfát (cCMP) és a ciklikus adenzin-difoszfát (cADP) nukleotid érzékeny ioncsatornákat képesek aktiválni, az előbbi a plazmamembránban, az utóbbi pedig az intracelluláris térben található ioncsatornákhöz képes kötődni (1-2).

#### 2.6.6. Szalicilsav (SA) és nitrogén monoxid (NO)

A SA jól ismert növényi hormon, melynek koncentrációja a növény-patogén interakció helyszínén gyorsan növekszik, és kimutatható akkumulációt mutat az interakció helyszínétől távolabbi szervekben is (1). Főként a hiperszenzitív válaszreakció és a SAR kifejlődésében van szerepe. Néhány esetben közölték, hogy elicitor kezelés növeli a mennyiségét a sejten belül, és génexpresszió módosító hatását is leírták (1-2,91). A SA számos speciális anyagcsere termék szintézisét befolyásolja (antrakinonok, indol alkaloidok, tropán alkaloidok) (1-2).

Az NO jelenlétét néhány éve kutatják növényekben, szerepe a mai napig nem tisztázott. A növényben nem enzimátikus és enzimátikus (pl. NO szintáz) úton jöhet létre. Fontossággal bír a növekedési, fejlődési és védelmi folyamatokban (pl. a NO és a ROS együtt segíti a növényi rezisztencia kialakulását), és az utóbbi időben számos speciális anyagcsere termékről derült ki, hogy a szintézisét a NO befolyásolja (92).

#### 2.6.7. Jazmonsav (JA) út

A jazmonsav és származékai (pl. metil-jazmonát) régóta ismert bioaktív molekulák, melyek a növények számára hormonként illetve jeltovábbító molekulaként funkcionálnak. A JA egyik fontos regulátora a növény-patogén interakció során lezajló folyamatoknak és a környezeti hatásokra (pl. mechanikus ártalmak - sebzés) adott választ befolyásolja a génexpresszió megváltoztatásán keresztül (93). A speciális

anyagcseretermékek széles skáláját indukálja növényekben (terpenoidok, flavonoidok, alkaloidok, fenilpropanoidok), valamint jól ismert funkciója az elicitoros jel közvetítése is (58).

A JA a különböző szignalizációs utak egyik legfontosabb átkapcsoló (másodlagos hírvivő) molekulája, integrálva, erősítve illetve csillapítva a különböző utakról érkező jeleket (1-2). Így például az etilénnel együtt alakít ki bizonyos elemeket a védekezési válaszban, míg a SA és citokinin szintézisutak inhibitoros kapcsolatban állnak a JA szintézissal, ezáltal modulálva a különböző válaszjelenségeket a jelátviteli hálózaton belül (1-2,58,93).

#### 2.6.8. A mitogén-aktivált protein kinázok (MAP) és foszfatázok, foszfoinozitol-kinázok (PIK), és egyéb kinázok

Növényekben jelenleg 20 körüli MAP kinázt azonosítottak, melyek a jelátviteli folyamatok fontos molekulái. A MAP kináz kaszkád aktiválója számos külső stimulus lehet (sebzés, UV fény, elicitorok, hőstressz, szárazságstressz stb.) és további jellemző, hogy egy időben számos eltérő tulajdonságú MAP kináz működhet (2). A szignál molekulák/hormonok közül többek között a JA, etilén, és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> képes MAP kinázokat aktiválni, a kalcium ion koncentráció pedig reguláló tényezőként szerepel. A MAP kinázok szerepe kettős, egyrészt további molekulákat képesek foszforilálni (pl. ioncsatornákat), melyek funkciója a konformáció változással együtt megváltozik, másrészt bizonyos MAP kinázok képesek a sejtmagba transzlokálódni, és ott transzkripciós faktorok foszforilációján keresztül a génexpressziót változtatják meg.

A foszfatázokat is aktiválhatják a fönti szignál molekulák, szerepük hasonló a MAP kinázokéhoz, de jellemzőikről kevesebb adat áll jelenleg rendelkezésre (1-2).

A PIK aktivitás összefüggésben van a sejtek növekedésével, fejlődésével és a membránokhoz való dokkolásban játszanak szerepet. Kimutatták szerepüket a *R. tinctorum* szuszpenziós sejtek antrakinon produkciójában is (2). A PIK-k egy része szintén képes a magba transzlokálódni, ez felveti a lehetőségét a MAP kinázokhoz hasonló funkcióiknak (2).

A protein kinázok/foszfatázok nem csak a szorosabb értelemben vett szignalizációban vesznek részt (illetve a génexpresszió módosítói), hanem néhány speciális anyagcsere termék bioszintézisét közvetlenül is befolyásolhatják, pl. a ciklin-dependens protein kinázok foszforilálni képesek a PAL enzimet, ezzel befolyásolva a fenilpropanoid bioszintézis utat (2).

Összefoglalva, a különféle kinázok/foszfatazok funkciójukból adódóan a növényi védekezési válasz elemei közül a fehérjék poszt-transzlációs változtatásán keresztül fejtik ki jelátviteli funkciójukat igen sokféle irányban.

#### 2.6.9. Abszizinsav (ABA) és etilén

Az ABA egy jól ismert, öregedést stimuláló hormon, melynek számos fontos funkciója ismert a sejtek működésében (növekedés, csírázás, védekezési válasz során). Az ABA mint jelátviteli molekula számos stressz faktor esetén megjelenik (hipoosmotikus, szárazság, hideg stresszek) és számos (növekedési) gén expresszióját befolyásolja. Hatása a másodlagos anyagcserére nem általános; vannak olyan molekulák melyek szintézisét növeli (pl. indol alkaloidok, taxol, triptofán), míg más anyagcsere-termékek termelését gátolja (pl. flavonoidok) (2).

Az etilén szintén egy növényi hormon, mely az öregedési és érési folyamatokban valamint a sebzés, ózon, mikrobiális patogének hatására képződik. Bioszintetikus gének expresszióján keresztül növeli a flavonoid, antocianin, és a stilbén bioszintézist. Hatása az anyagcserére koncentráció függő; magas koncentrációban gátló hatású, míg alacsonyabb koncentrációban alkalmazva serkenti az elicitor által indukált anyagcsereválaszokat (2).

#### 2.6.10 A lipid szignalizáció (oxilipinek, foszfolipázok, és lipid hírvivők)

A foszfolipáz enzimek számos fontos funkcióval bírnak a növényi védekezési válasz alakításában. Három fő családjukat azonosították eddig növényekben: foszfolipáz A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), a foszfolipáz C (PLC), és a foszfolipáz D (PLD). Egyfelől az oxilipin bioszintézisben vesznek részt, másfelől egyéb lipid eredetű molekulákat is létrehozhatnak, melyek jelátvivő molekulaként is funkcionálnak. Ezen lipid hírvivők számos összetett élettani funkciót befolyásolnak (94).

Az oxilipinek azon biológiailag aktív molekulák csoportja, melyek a többszörösen telített zsírsavak katabolizmusán keresztül keletkeznek és mely katabolizmust egy részről lipázok, lipoxigenázok és citokromok koordinálnak, más részről oxilipinek létrejöhetnek nem enzimikus úton is, ilyenkor a ROS általi direkt oxidoredukciós reakciókon keresztül képződnek. A bioszintézisük mechanikai hatások vagy más környezeti stressz, illetve patogének hatására fokozódik, és számos védekezési jelenség kialakításában vesznek részt. Az enzimikus úton létrejövő oxilipinek

bioszintézisében a foszfolipáz A (PLA<sub>2</sub>) enzimnek van kulcsszerepe. A PLA<sub>2</sub> plazmamembránból szabadít fel zsírsav prekursorokat, melyeket az oxilipin szintetizáló enzimek használnak fel. A legismertebb oxilipinek a JA és származékai (95-96). Az oxilipinek számos funkcióval rendelkeznek, például a linolénsavból keletkező traumatin sejtostódást kiváltó hatású és fontos résztvevője a sebgyógyulásnak (2).

A PLA<sub>2</sub> foszfolipideket hidrolizál (pl. foszfatidil kolint /PC/) zsírsavra és lizofoszfolipidre (pl. lysoPC). A zsírsav lehet az oxilipin bioszintézis egyik kiinduló molekulája, a lysoPC pedig képes aktiválni a H<sup>+</sup>-ATP-ázt a tonoplastban, mely citoplazmatikus savanyodáshoz vezet (94). Az IP<sub>3</sub> kapcsán szóba került PLC a szignalizáció során diacil glicerolt (DAG) hoz létre, mely aktiválni képes a protein kináz C-t (PKC) és más kináz kaszkádokat (2,94). A PLD a foszfolipideket foszfatidsavra (PA) és szabad „fej” csoportra (pl. a foszfatidil kolint PA-ra és kolinra) bontja (97). A PA ROS generálásra és protein kináz kaszkád aktiválására képes. Valószínűsítik, hogy a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indukálni tudja a PLD szignalizációs utat (98). A PA és a DAG egymásba át tudnak alakulni foszfatázok/kinázok segítségével, ilyen módon kapcsolva át a két jelátviteli út információit (94).

#### *2.6.11. A jelátviteli utak együttműködése (serkentés, gátlás)*

Egyre több tanulmány világít rá arra a tényre, hogy a növényi védekezési válasz elemeit nem egyetlen szignalizációs út befolyásolja, hanem legalább kettő, de inkább több, jelátviteli folyamat vesz benne részt, s ezek egymással többé-kevésbé szorosan együttműködnek (1-2). A különböző szignalizációs utak közötti információcsere fontos koordinációs részét képezi növényi jelátviteli hálózatnak, melyet a 3. ábra szemléltet vázlatosan. A szignalizációs utak együttműködésének fő szerepe az, hogy a növényi sejtek lehetősége nyílik a különböző gén-csoportok aktivációját időben és térben összehangolni a különböző stresszek okozta esetekben. Néhány példa (l. az egyes utak leírásánál is): JA-SA inhibitoros kapcsolat; ROS-PLD aktivációs kapcsolat; PA-ROS aktivációs kapcsolat; Ca<sup>2+</sup>-ROS aktivációs kapcsolat; ROS-NO aktivációs kapcsolat stb.

#### *2.6.12. A különböző szignálok integrálása a transzkripció faktorok révén*

A sejtszintű folyamatokat általában különböző szinteken lehet befolyásolni, ezek a transzkripció, RNS szintű, transzlációs szabályozás, és az elkészült fehérjék

poszt-transzlációs módosítása (1).

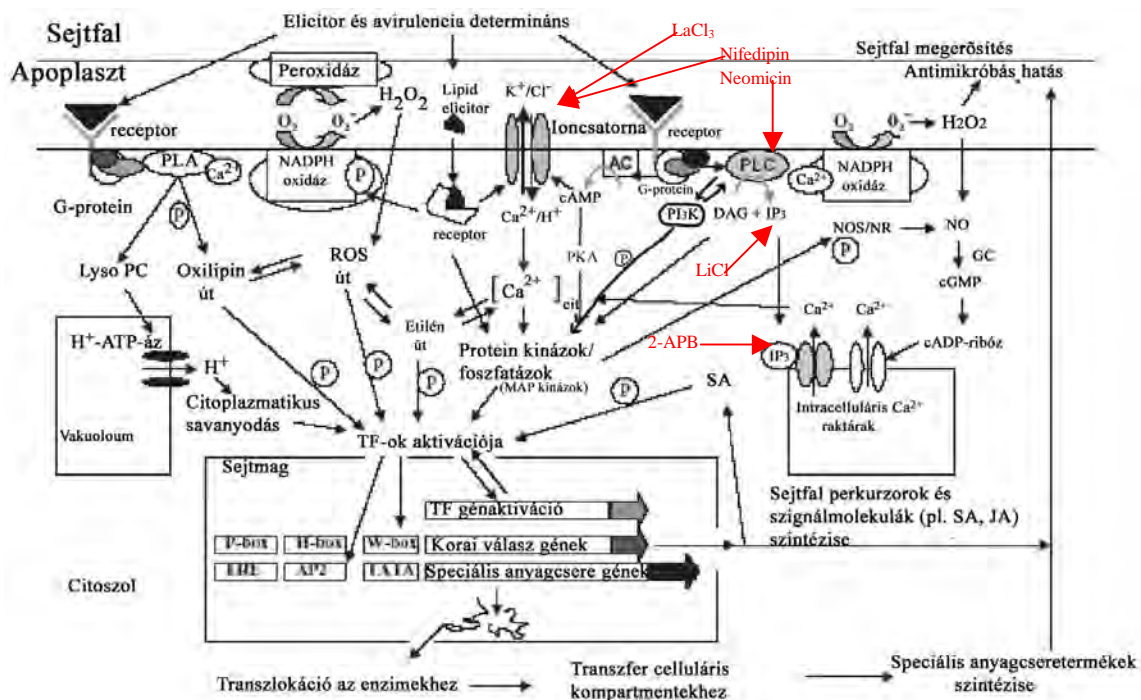
A transzkripció szintjén fontosak azon DNS kötő fehérjék, melyek a promoter régió bizonyos helyeihez kötődnek szekvencia-specifikusan. Ezeket transzkripciós faktoroknak (TF) is nevezik (1,99). Az (elicitoros) jel általi védekezési génaktiváció ezen fehérjék aktivációján keresztül valósul meg, elősegítik/felerősítik az általános transzkripciós mechanizmust. A TF-ok konzervatív struktúrájú fehérjék, melyek lokalizációja a sejtmag, valamint rendelkeznek egy szignál és egy DNS kötő régióval is (pl. helix-loop-helix; cink-ujj), amely lehetővé számukra, hogy egy specifikus szekvenciához kötődjenek a különböző gének környezetében (99). Az elmúlt időszakban számos speciális anyagcserével összefüggő gén (pl. PAL) TF rezponzív régiójához kötődő TF-át azonosították (pl. a Myb). Ezen TF-ok számos jel hatására (UV, elicitorok, sebzés) kötődnek a számukra megfelelő DNS régióhoz (4).

A TF-ok szintézise és aktivációja az alábbi módokon valósulhat meg (4,99):

- direkt módon stimulálhatók elicitorokkal, vagy szignál utak révén,
- más TF-ok regulálják működésüket pozitív feedback módon,
- folyamatosan szintetizálódnak inaktív formában, és más fehérjék, TF-ok aktiválják protein-protein interakciókon keresztül (pl. foszforiláció).

A TF-ok bioszintézisének ily módon történő regulációja, aktivációja és inaktiválása a növényi védekezési válasz egyes elemeinek (pl. fitoalexin produkció) megvalósítását szolgáló integrált, rugalmas, alkalmazkodó eszköze (1,4,99).

Összefoglalásként elmondható, hogy a növényi védekezési válasz sikere a fent felsorolt (és egyéb) szignalizációs utak és a hozzájuk köthető válaszelemek bonyolult, sokszor többszörösen átfedő, egymást erősítő/moduláló/gyengítő hálózatán nyugszik. Növényi védekezési válasz egyes elemeinek az egyik fontos vizsgáló módszere a többé-kevésbé specifikus gátló molekulák alkalmazása, melyek segítségével az adott szignalizációs út szerepe relatíve egyszerűen, és célzottan vizsgálható a különböző, akár mesterségesen kiváltott stimulusok esetében. Az egymással kapcsolt szignáltranszdukciós utakból felépülő komplex rendszer koordinációs/szintetizáló működése miatt azonban még a viszonylag „tisztá” esetek, a nagy specificitású gátlók hatásának következtében kimérhető változások interpretációja is óvatosan kezelendő.



3. ábra.: A növényi szignáltranszdukció fontosabb jelenségeinek összefoglaló ábrája a különböző szignalizációs utak átkapcsolási lehetőségeinek, valamint a dolgozatban alkalmazott gátlók támadáspontjának feltüntetésével (Zhao et al., 2005 alapján; Vasconsuelo és Boland 2007 szerint módosítva) (1-2).

Jelmagyarázat: G-protein=G-fehérje; Lyso PC= lizofoszfátidsav; PLA=foszfolipáz A<sub>2</sub>; TF=transzkripciós faktor; PKA=protein kináz A; PI3K=foszfatidilinozitol kináz; PLC=foszfolipáz C; AC=AMP cikláz; NOS=nitrogén oxid szintáz; NR=nitrát reduktáz; GC=GMP cikláz; [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub>=citoszolikus kalcium ion koncentráció; P betű bekarikázva: protein foszforiláció/defoszforiláció függő reguláció; Ca<sup>2+</sup> bekarikázva: kalcium ion koncentrációtól függő reguláció; IP<sub>3</sub> bekarikázva: IP<sub>3</sub> függő reguláció.

### 3. Célkitűzések

Munkánk célja a használt modell növénynél megfigyelhető differenciációs/dedifferenciációs jelenségek és szignáltranszdukciós események, valamint azok következményeinek vizsgálata volt. Ehhez a *Rubia tinctorum* L. növények, sejtszuspenziós kultúrák, mint modell rendszerek szerepeltek. A változásokat különféle elicitorokkal, illetve a kalluszosításakor alkalmazott hormonok használatával váltottuk ki. Célkitűzéseink főbb pontjai a következők voltak.

A. Első lépésben a kallusz kialakulás jellemzése FM és TEM szinten

- B. Mivel a munka egy része az antrakinon tartalom változásával foglalkozik, szeretnénk volna egy zéró szintről induló változást leírni, ezért levélből indított kalluszt vizsgáltunk ebből a szempontból és hasonlítottuk össze a rhizóma és in vitro tenyészetek antrakinon összetételével
- C. A különböző elicitorokkal kiváltható szignál transzdukciós jelenségek vizsgálata és az antrakinon tartalom és összetétel változásának követése az előzetesen vizsgált modell rendszerben

Ezek alapján a kitűzött céljaink részletesen:

- A dedifferenciáció/differenciáció egyes jelenségeinek vizsgálata a (levélből eredő) kallusz indukciót követően 14 napon keresztül:
  1. Struktúrális/ultrastruktúrális változások megfigyelése sztereo-, fény- és elektronmikroszkópos technikák segítségével,
  2. A klorofill pigment mennyiségi változások mérése a kalluszosított levélben spektrofotometriás és VRK módszerekkel,
  3. Az antrakinon származékok mennyiségi változásának követése HPLC-DAD-MS módszerrel kalluszosodó levélmintákban a dedifferenciáció és az antrakinon termelés kapcsolatának feltárása érdekében.
- Az elicitor indukálta növényi szignáltranszdukció egyes részjelenségeinek vizsgálata sejtszuspenziós kultúrákban
  1. A sejtek életképességének vizsgálata az elicitoros hatást követő 4 napon keresztül,
  2. Az elicitálás után kialakuló  $H_2O_2$  termelődés dinamikájának (hosszú és rövid időtartamú) vizsgálata mind sejtekben, mind a felülúszóban fluorimetriás és spektrofotometriás kvantitatív módszerekkel,
  3. A  $H_2O_2$  termelődés sejtszintű lokalizációjának vizsgálata cérium kloridos citokémiai reakcióval, s annak megerősítése elektron energia veszteségi spektroszkópia (EELS) módszerrel,
  4. A  $H_2O_2$  termelődés befolyásolhatóságának vizsgálata specifikus gátló anyagok alkalmazásával,

5. A mikrotubuláris rendszer elicitoros hatásra történő változásainak vizsgálata fluoreszcencia mikroszkóppal (Ezt *Capsicum annuum* sejtszuszpenziós kultúrában is végeztük a *Rubia tinctorum* sejtek erős autofluoreszcenciája miatt.)
- Az elicitorok hatásai a sejtszuszpenziós kultúrák antrakinon származékainak termelésére
    1. Sejtszuszpenziós kultúrák antrakinon összetételének minőségi és mennyiségi elemzése HPLC-DAD-MS módszerrel. A változásokat összevetettük a gyökérzetben és a stabil kalluszban található antrakinon összetétellel is.
    2. Az elicitorok hatásainak vizsgálata az antrakinon származékok termelésére HPLC-DAD-MS módszer alkalmazásával, valamint néhány elicitor (JA, SA) antrakinon termelés szempontjából optimális mennyiségének megállapítása

#### 4. Anyagok és Módszerek

##### 4.1. A *RUBIA TINCTORUM* L. NÖVÉNY JELLEMZÉSE

A festőbuzér – a Rubiales (buzérvirágúak) rendjébe, a Rubiaceae (buzérfélék) családjába tartozó évelő faj. Hosszú, négyszögletes, ismételten elágazó szára – amely legfeljebb az 1 méter hosszúságot éri el – a talaj felszínén elterülő, vagy horgas szőreivel más növényekre felkapaszkodó (4. ábra). A száron rövid nyelű, elliptikus vagy lándzsás levelek találhatók álörvös elhelyezkedésben. A levelek 1-3 cm szélesek, tüskés élűek. Bogernyő virágzatában kevés apró, sárga pártájú virág található. A párták cimpái eleinte összehajlók, a virágok június-júliusban nyílnak. Termése két termőlevélből, alsó állású magházból képződik, 3-5 mm átmérőjű sima, fekete, gömbölyű álbogyó. Gyöktörzséből hernyószerűen vastagodott, piros vagy narancs-piros gyökerek erednek. Színüket főként a gyöktörzs és gyökér elsődleges kérgében található, a parenchima sejtek vakuolumaiban felhalmozódó antrakinon származékoknak köszönhetik.

4. ábra. A: *Rubia tinctorum* növény, B: a rhizóma keresztmetszete az antrakinon tartalmú régiókkal (Dr. Boldizsár Imre felvételei).





#### 4.2. A KALLUSZ KÉPZÉSE A FESTŐBUZÉR LEVELEIBŐL

A kifejlett növényegyedek a Gyógynövénykutató Intézet Botanikus Kertjéből származtak és 2004. májusában kerültek felhasználásra. A hajtások középső régióiról leválasztott levelek felszínét 1 % (v/v) Na-hipoklorit oldatban sterilizáltuk 3 percig; ezt követően 2 alkalommal mostuk steril desztillált vízben (szintén 3-3 percig), majd 40 %-os etanolba helyeztük 1 percig. Végül a leveleket kétszer mostuk steril desztillált vízben, 1-2 cm<sup>2</sup>-es darabokra vágtuk és táptalajra helyeztük. A kallusz indukció természetes megvilágítás mellett, szobahőmérsékleten, Petri-csészében, szilárd Murashige-Skoog (MS) táptalajon történt (0.6 % agar, 30 g L<sup>-1</sup> szacharóz, 1 mg L<sup>-1</sup> indolecetsav (IES), 0.2 mg L<sup>-1</sup> naftilecetsav (NAA) és 0.2 mg L<sup>-1</sup> kinetin).

#### 4.3. A KALLUSZ ÉS SEJTSZUSZPENZIÓS KULTÚRÁK FENNTARTÁSA

A *Rubia tinctorum* L. sejtszuszpenziós kultúrák stabil, folyamatosan fenntartott kalluszból származtak. A rhizóma eredetű kallusz fenntartása szilárd MS táptalajon történt szobahőmérsékleten, sötétben 2 hónaponkénti átoltás mellett. A szuszpenziós tenyészeteket 500 mL-es Erlenmeyer lombikokban (200 mL tenyészet lombikonként) folyékony MS táptalajon 125 fordulat perc<sup>-1</sup> fordulatszám mellett, természetes megvilágításnál tartottuk fenn. A sterilizálás előtt az MS tápközeg pH értékét 5.8-ra állítottuk, a kultúrákat 14 naponként friss tápközegre oltottuk.

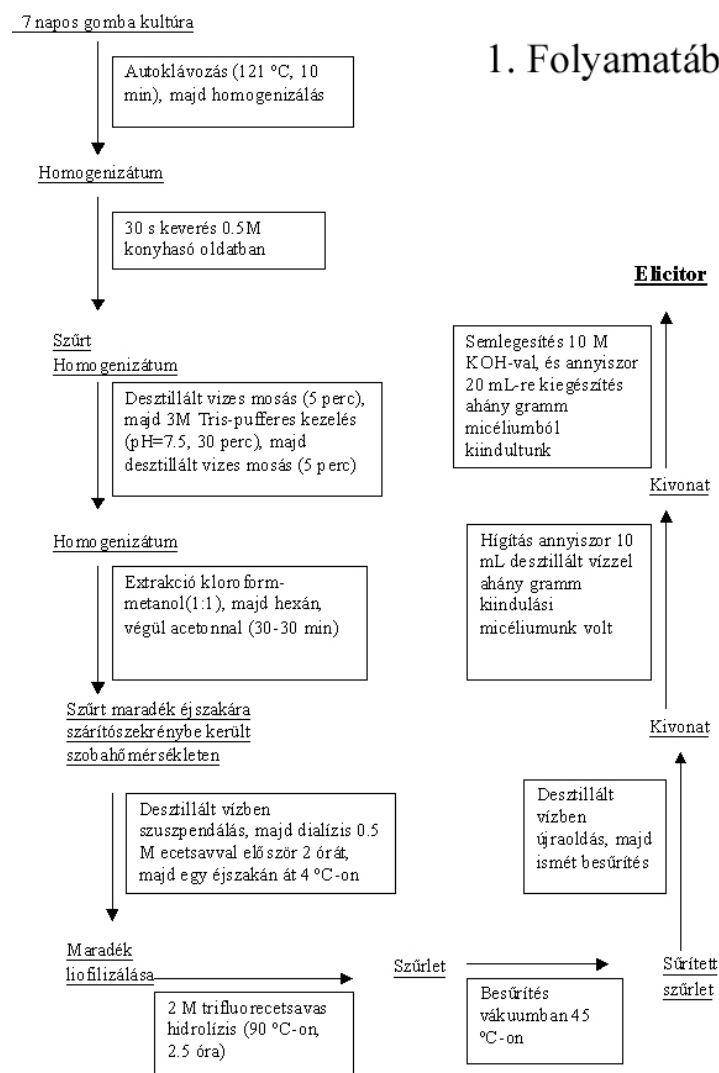
#### 4.4. AZ ELICITOROK KÉSZÍTÉSE

A Bevezetés 2.6.11. A jelátviteli utak együttműködése (serkentés, gátlás)

fejezetben vázoltakkal összhangban az elicitor elnevezés általános használatakor a továbbiakban olyan bioaktív, kis molekulájú anyagokat (növényi hormonokat, pl. JA, SA) is ide sorolunk, melyek alkalmasak a védekezési válasz egyes részének vagy egészének kiváltására, s hatásuk a klasszikusan elicitornak tekintett anyagok által altivált szignalizációs utakon keresztül (is) manifesztálódik.

A JA és SA a Sigma cégtől származott (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, USA).

A fitopatogén *Botrytis cinerea* Pers. ex. Pers. kultúrákat (melyek Az Univerzita Komenského v Bratislave Egyetem Sejt és Molekuláris Biológiai Tanszékéről származtak) 3 % (w/v) maláta táptalajon tenyésztettük. A sejtfa oligoszacharidokat tartalmazó elicitor tisztítással és hidrolizálással állítottuk elő a szubmersz tenyészetekből. Az elicitor készítését az 1. folyamatábra szemlélteti.



Az így elkészített elicitor redukáló cukor tartalmát anthronos méréssel ellenőriztük, jellemeztük és hígítással 12-14 glukóz ekvivalencia értékre állítottuk be (az így készített elicitor a továbbiakban BC-vel jelöljük).

A nekrotróf-parazita *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel. termőtestek a Budai-hegységből származtak. A termőtestek vízdoldékony poliszacharid tartalmát forró vizes extrakcióval vontuk ki (95 °C-on 3 óra). A kivonatból a poliszacharidokat 96 %-os etanollal kicsaptuk, majd a kapott poliszacharid keveréket gélszűréssel frakcionáltuk (Sephadex G-200 oszlopon, desztillált víz eluenssel). Ennek eredményeként három különböző molekulatömegű poliszacharid frakciót kaptunk (Ezek jelölései a továbbiakban CV1:  $Mr > 60$  kD; CV2:  $60$  kD  $> Mr > 5$  kD; CV3:  $Mr < 5$  kD).

#### 4.5. AZ ELICITÁLÁS KIVITELEZÉSE

Elicitáláskor az elicitor és hormon (BC, CV1-3, JA, SA) koncentrációkat optimalizálási előkísérletek során különböző koncentrációk alkalmazásával állapítottuk meg. Az elicitorokat steril állapotban (desztillált vízben oldva), és aseptikus körülmények között juttattuk a sejtszuszpenziós kultúrákba. A JA-ból 3, 7, 15, 30  $\mu\text{L}^{-1}$  koncentrációjú oldatokat készítettünk. Jelölésük az alábbiak szerint történt:

<u>Koncentráció (<math>\mu\text{L}^{-1}</math>)</u>	<u>Jelölés</u>
3	JA1
7	JA2
15	JA3
30	JA4

A SA-ból 13, 27, 67.5, 100  $\text{mg mL}^{-1}$  koncentrációjú oldatokat készítettünk. Jelölésük az alábbiak szerint történt:

<u>Koncentráció (<math>\text{mg mL}^{-1}</math>)</u>	<u>Jelölés</u>
13	SA1
27	SA2

67.5	SA3
100	SA4

A CV1-CV3 elicitorokból 80 mg mL<sup>-1</sup> koncentrációjú oldatokat készítettünk.

A főnti oldatokból 1-1 ml-t adtunk 100.0 mL-nyi *Rubia tinctorum* sejtszuszpenziós kultúrához. A BC elicitor esetében a kapott hidrolizátumból 1.25 mL-t adtunk 100.0 mL szuszpenziós kultúrához. A kontroll kezelések során a 100.0 mL kultúrához 1.00 mL, illetve 1.25 mL autoklávozott desztillált vizet adtunk a fentiekkel megegyező körülmények között (és azokkal párhuzamosan).

A BC elicitor által kiváltott H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelődést és az antrakinon származékok képződését különböző specifikus gátló anyagok felhasználásával vizsgáltuk:

- Lítium-klorid (inozitol monofoszfátáz izoenzimek gátlója), melyet 1 mM és 20 mM koncentrációban alkalmaztunk a sejtszuszpenziós kultúrákban,
- 500 µM LaCl<sub>3</sub> (általános kalcium csatorna gátló),
- 80 µM Nifedipin (L típusú kalcium csatorna gátló),
- 125 és 250 µM Neomicin (Foszfolipáz C inhibitor),
- 15 µM 2-aminoetil difenilborinát (2-APB) (IP<sub>3</sub> receptor mediált kalcium felszabadulás gátló),

Az említett gátlók koncentrációit irodalmi adatok alapján használtuk azok hatásosságának előkísérleti ellenőrzése után (56).

A gátlós kezelésekkor egyrészt a gátlókat önmagukban használtuk (mock kontroll), másrészt a gátló molekulákkal történő 15 perces előkezelést követően figyeltük meg az elicitálás után bekövetkező változásokat.

Minden kontroll, mock kontroll és elicitálás esetében legalább 3 független párhuzamos kísérletet végeztünk.

#### 4.6. A KALLUSZ KÉPZŐDÉS VIZSGÁLATA

A kallusz képződés vizsgálatokor a strukturális (sztereo-, fény- és elektronmikroszkópos) és a klorofill pigment tartalom vizsgálatokhoz a kallusz indításától számított 1-14. napokon; az antrakinon származékok kvantitatív mennyiségi meghatározásához a kalluszosított levelekből 2., 4., 6., 8., 10., 12., 13. napokon vettünk

mintákat. Kontroll mintaként intakt leveleket is vizsgáltunk. A kontroll mintákat a következőképpen jelöltük: kontroll-1 = 0 nap kallusz indukció után; kontroll-2 = sterilizálatlan intakt levél.

A kalluszosodás mértékével párhuzamosan mért antrakinon származékok mennyiségi változásához összehasonlításként intakt rhizóma, fenntartott kallusz, és stabil sejtszuszpenziós kultúra liofilizált mintáit is mértünk.

A kallusz indukció megfigyelése során sztereomikroszkópot, fény- és elektronmikroszkópos módszert alkalmaztunk a strukturális változások nyomkövetésére. Az elektronmikroszkópos megfigyelésekhez a mintákat 2.5 % glutáraldehidben fixáltuk (2 órát, mely 0.07M foszfát pufferben volt oldva, pH=7.2) majd 1 % ozmium-tetroxidban (ugyanazzal a pufferrel készítve) utófixáltuk. Ezek után a mintákat a fenti foszfát pufferben mostuk, majd emelkedő koncentrációjú etanol-sorozat segítségével dehidráltuk és Durcupan ACM műgyantába ágyaztuk be. A fénymikroszkópos megfigyelésekhez 1  $\mu\text{m}$  vastag metszeteket, illetve az elektronmikroszkópos vizsgálathoz az ultravékony (70 nm) metszeteket Reichert Jung Ultracut mikrotómmal (Vienna, Austria) készítettük. A fénymikroszkópos (Olympus BH2 DIC fénymikroszkóp, Tokyo, Japan) megfigyelésekhez a mintákat toluidinkékkel festettük meg. Az ultravékony metszeteket 5 % uranil-acetát oldattal (4 perc), és ólom-citrát oldattal (6 perc) festettük. Ezeket a mintákat Hitachi 710 TEM (Tokyo, Japan) mikroszkóppal vizsgáltuk, 75 kV gyorsítófeszültség mellett.

A kallusz képződés során lejátszódó Chl a+b pigment mennyiségi változásokat VRK módszer segítségével követtük (100). A mintavételi időpontokban (és a kontroll mintákból) 0.2 g mintát liofilizáltunk. Minden porított mintából 20 mg-ot 2 ml 80 % (v/v) metanollal extraháltunk 3 órát szobahőmérsékleten kétszer egymás után. Centrifugálás (8000 g 10 percig) után 25 és 50  $\mu\text{l}$ -t Merck 60F<sub>254</sub> szilikagél 20  $\times$  20 cm (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) típusú lemezre vittünk föl. A kifejlesztés távolsága 10 cm volt, a kifejlesztő elegy pedig dietiléter-aceton-hexán (20:20:60 v/v). A pigmentek foltjait Desaga CD-60 (Desaga GmbH, Heidelberg, Germany) típusú denzitométerrel vizsgáltuk 425 nm-en. A Chl a+b azonosítása az  $R_f$  érték alapján történt. A kvantitatív meghatározás megerősítése spektrofotometriás módszerrel is megtörtént a megfelelő kontroll mintákat alkalmazva (101).

Az antrakinon származékok kallusz képződés során mérhető mennyiségi

változásait HPLC-DAD-MS módszerrel értékeltük, a módszer leírását a 4.10. fejezetben adtuk meg. A HPLC mérés esetében az időpontonként kapott 3-3 független mintát egyesítettük, ezen egyesített minták kivonatai kerültek három alkalommal mérésre. Erre az egyszerűsítésre azért volt szükség, mert csak így volt lehetőségünk ilyen nagy mennyiségű mintával megbírkózni, viszont szerettünk volna valamilyen képet kapni az antrakinon-származékok termelődésének és a sejtek differenciáltsági fokának kapcsolatáról.

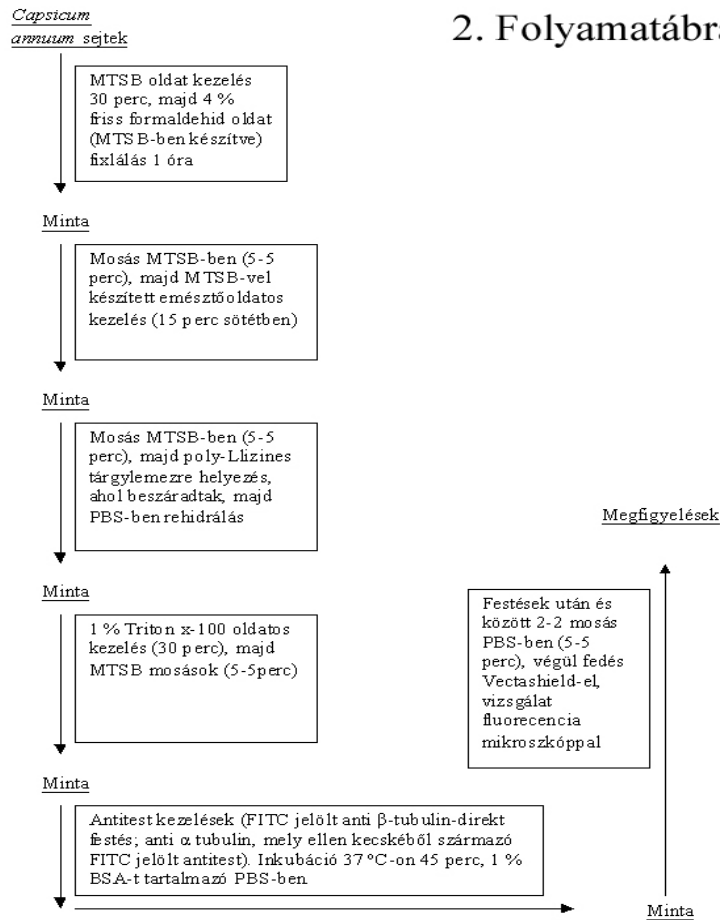
#### 4.7. ELICITÁLT SEJTEK MIKROTUBULÁRIS RENDSZERÉNEK VIZSGÁLATA

Az elicitalás hatását a citoskeletáris rendszerre szerettük volna a *Rubia tinctorum* szuszpenziós tenyészetében vizsgálni, de az előkísérletekben kiderült, hogy a sejtfal és a sejttartalom erős autofluoreszcenciája miatt nem készíthető megfelelő fluoreszcenciájú preparátum. Megpróbálkoztunk a vizsgálati objektum kiváltásával.

A sejtek mikrotubuláris rendszerének vizsgálata *Capsicum annuum* L. embrióból származó sejtsuszpenziós kultúrákban történt. A *Capsicum annuum* sejtsuszpenziós kultúra sejtjeiből a mikrotubuláris rendszer vizsgálatához a BC elicitalást követően 4, 8, 30, 50 perc és 1, 2, 4, 8, 12, 48 óra elteltével vettünk mintákat, valamint szintén alkalmaztunk desztillált vizes kontroll mintákat is. A mikrotubulus festést Panteris és mtsi. 1992. (102) módszere alapján végeztük (2. folyamatábra). Megjegyzések a 2. folyamatábrához: MTSB - mikrotubulus stabilizáló puffer (50 mM Pipes, 5mM magnézium szulfát heptahidrát, 5 mM EGTA, pH=6.8); az emésztőoldat összetétele – 1-1 % celluláz, hemicelluláz, és drizeláz MTSB-oldattal készítve; PBS – foszfát puffer pH=6.8; BSA-t tartalmazó PBS – 1 % szarvasmarha szérumfehérjét tartalmazó PBS oldat. A Vectashield lefedőanyag a Vector Labs Burlingame, U.S.A.-tól, míg az antitestek (FITC konjugált primer egér anti- $\beta$  tubulin, egerből származó anti- $\alpha$  tubulin és az ellene kecske eredetű FITC konjugált sekunder antitest) és egyéb vegyszerek a Sigma-tól (Sigma-Aldrich Co. St. Louis USA) származtak.

A megfigyeléseket Olympus BH2-RFCA fluoreszcencia fénymikroszkóppal végeztük.

## 2. Folyamatábra



### 4.8. ÉLETKÉPESSÉG VIZSGÁLATA

A kontroll (desztillált vízzel kezelt) és a JA2, az SA2 valamint a BC kezelt szuszpenziós tenyészetek életképességét a kezeléseket követően 2, 4, 8, 24, 48, 96 órával néztük fluorescein-diacetátos (FDA) festéssel, s az élő sejtek %-os arányát határoztuk meg. A kezeléseket esetén a vizsgálati minták preparátumain 10-10 véletlenszerűen kiválasztott látótérben történt az élő sejt/összes sejt számolása. A statisztikai értékeléshez Microsoft Excel programot használtunk. A megfigyeléseket Olympus BH2-RFCA fluoreszcencia fénymikroszkóppal végeztük.

### 4.9. *RUBIA TINCTORUM* SEJTEK $H_2O_2$ TERMELÉSÉNEK VIZSGÁLATA

A sejtekben indukált hidrogén-peroxid termelődés kvantitatív meghatározáshoz a kontroll és a BC, JA2, SA2 elicitorokkal kezelt tenyészetek

esetében a 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 60 perc; 1.5, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48 óra időpontokban vettünk mintákat. A gátló vegyületek hatásának vizsgálatához a BC elicitorral elicított és gátlókkal előkezelt (15 perc) minták esetén 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 perc, 2, 4 óra időpontokban vettük a mintákat.

A felülúszóban történő hidrogén-peroxid meghatározáshoz a BC, JA2 és SA2 elicítást, valamint a gátló vegyületekkel előkezelt BC elicítást követően 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 perc, 2, 4 óra elteltével vettük a mintákat. A kontroll mérések ugyanazon időpontokban történtek a desztillált víz hozzáadása után.

A  $H_2O_2$  sejten belüli elhelyezkedésének elektronmikroszkópos vizsgálatához a SA2, JA2, és BC kezeléseket követően (valamint a kontroll tenyészetekből) 0.5, 1, 2, 4, 8 órával vettünk mintákat.

A gátló vegyületekkel előkezelt, BC elicított minták esetén a  $H_2O_2$  sejten belüli elhelyezkedésének vizsgálatához az elicítást követően 0, 5, 10, (esetenként 20, 30 is) 40, 60, 90, 240 perc eltelte után történtek a mintavételek, ugyanígy a kontroll minták (csak BC kezelt, és desztillált vízzel kezelt) esetében is. Az időpontok kiválasztása a  $H_2O_2$  termelődés dinamikáját leíró görbék alapján történt.

A  $H_2O_2$  sejten belüli elhelyezkedésének vizsgálatára Bestwick citokémiai módszerét alkalmaztuk (103). A kontroll, elicított és gátlóval is kezelt elicított kultúrákból származó kisméretű sejtaggregátumokat 30 percig inkubáltunk frissen készített 5 mM cérium (III) klorid oldatban (50 mM MOPS puffer, pH= 7.2) a glutáraldehidben történő fixálás előtt. A fixálási és beágyazási lépések megegyeztek a 4.6.-ban leírtakkal. A  $H_2O_2$  sejten belüli megjelenésének bizonyításához, és a termelődés helyének egyértelmű lokalizálásához elektron energiaveszteségi spektroszkópiát (EELS) használtunk. A cérium ionok kimutatása a sejten belül relatíve egyszerű, hiszen sejtidegen anyag, és az alkalmazott módszer igen érzékeny. A Ce ionok a hidrogén peroxiddal különböző összetételű, elektron denz Ce perhidroxid csapadékká alakulnak. A csapadék a reakció helyén marad a sejten belül, így a denz csapadék kialakulása és a Ce ionok jelenlétének bizonyítása EELS módszerrel egyben bizonyítja a  $H_2O_2$  jelenlétét is. Az elemanalízist Gatan 678 postcolumn imaging filter (Gatan, Pleasanton, California, U.S.A.) segítségével végeztük el. A Gatan szűrő alkalmazásával parallel elektron energia spektrumot kaphatunk (PEELS) 125 kV-os gyorsítófeszültség mellett. A minták Ce tartalmát a  $CeO_2$  kontroll spektrumának 883 és



901eV-hoz tartozó csúcsai segítségével azonosítottuk. A mérések alapján elemtérképek is készültek.

A sejtszuszpenziós kultúrák  $\text{H}_2\text{O}_2$  tartalmát a fenti mintavételi időpontokban határoztuk meg. Számos, széles körben alkalmazott irodalmi módszert próbáltunk ki előkísérleteink során (DAB festés, piranin fluoreszcencia oxidatív kioltása, luminol kemilumineszcens reakció, scopoletin fluoreszcens módszer, és titán-peroxo komplexképzés), melyek közül az utóbbi kettőt alkalmaztuk, mivel ezen két módszernek jobb volt az érzékenysége, illetve a reprodukálhatósága is. A sejten belüli hidrogén-peroxid koncentrációkat a titán-peroxo komplexlépzésen alapuló módszerrel (104 alapján kissé módosítva) határoztuk meg. 5g sejtet 10 mL hideg (0 °C) acetonban homogenizáltunk, majd 5 mL desztillált vizet adtunk az elegyhez, ezután leszűrtük. 2.5 ml szűrlethez 0.25 mL titán reagenst (20 % titán-tetraklorid 80% tömény sósavban) adtunk, majd homogenizálás után 0.75 mL tömény ammónia oldat hozzáadásával leválasztottuk a titán-peroxid komplexet. A csapadékot centrifugálással (8000 g 10 perc) választottuk el, majd dekantálás után 15 mL 2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  oldatban oldottuk fel. Az így kapott oldat abszorbanciáját 415nm-en határoztuk meg Pharmacia Ultrospec Plus (Cambridge, U.K.) spektrofotométer segítségével. A kalibráció ismert mennyiségű hidrogén-peroxid oldatnak a fönti mintaelőkészítés utáni azonos módon történő meghatározásával történt.

A festőbuzér sejtek számos antrakinon származékot tartalmaznak, melyek stabil színes komplexet képezhetnek különböző fémionokkal (pl. titán ionokkal). Ez zavarhatja a titán-peroxid komplex meghatározását, így kívánatos volt olyan  $\text{H}_2\text{O}_2$  - mentes minták előállítását, melyekben meghatározható a zavaró komplexek összabszorbanciája. Ezen referencia mintákat a többi mintához hasonló módon készítettük, az 5 g sejthez a homogenizálás előtt viszont 0.5 mL imidazolt (NADPH oxidáz inhibitor) adtunk (15 percig) megszüntetve a sejtek hidrogén-peroxid termelését. A sejtek desztillált vizes átmosása után a minták maradék  $\text{H}_2\text{O}_2$  tartalmát 5 mL (600 egység  $\text{mL}^{-1}$ ) kataláz tartalmú oldattal bontottuk el. Ezek után a mintákat a föntiekhez hasonlóan készítettük elő. Az egyes minták  $\text{H}_2\text{O}_2$  tartalmát a minta abszorbanciájának és a referencia minta abszorbanciájának különbségeként számoltuk. Minden egyes mérési sorozathoz készítettünk referencia mintákat.

A sejtek felülúszójában található  $\text{H}_2\text{O}_2$  tartalmát a scopoletin oxidációja miatt

bekövetkező fluoreszcencia kioltáson alapuló módszerrel határoztuk meg (105). A mérés során a sejtek felülúszójából vettünk 5-5 mL mintát, amit centrifugálással (12000 g, 3 perc) tisztítottunk, majd a scopoletin reagenst (0.25 mM-os scopoletin oldatból 15  $\mu\text{L}$ -t) és peroxidázt (40 egység  $\text{mL}^{-1}$  oldatból 30  $\mu\text{L}$ -t) hozzáadva a fluoreszcencia kioltást mértük FluoroMax3 fluoriméterrel (Jobin Yvon Horiba, Paris, France) 2 perc elteltével. A kalibrációhoz itt is ismert koncentrációjú (0-2  $\mu\text{M}$ )  $\text{H}_2\text{O}_2$  oldatokat alkalmaztunk (105).

#### 4.10. AZ ANTRAKINON SZÁRMAZÉKOK ANALITIKAI VIZSGÁLATA

A antrakinin származékok szintézisére ható különböző elicitorok és hormonok (BC, JA1-JA4, SA1-SA4 CV1-CV3) kvalitatív és kvantitatív vizsgálata során először meghatároztuk az optimális kezelési időintervallumot egy -az előkísérletek szerint- ígéretesen működő elicitor segítségével (CV1). Ebben az esetben az elicitálás utáni 1., 2., 5., 7., 10. napokon vettünk mintákat. A kontroll szuszpenziós kultúrák esetén (desztillált vizes) a kezelést követő 1., 5., és 10. napokon vettünk mintákat. Az összes többi elicitoros kísérletben az optimálisnak talált elicitálási idő elteltével vettük a mintákat. Az összehasonlítás kedvéért itt is vizsgáltunk liofilizált rhizóma mintákat.

Az antrakinin-származékok kvantitatív meghatározását HPLC-DAD-MS műszerrel végeztük validált irodalmi módszer alapján (62). A mintákat szárítószekrényben szárítottuk (60 °C, 5 napig), majd porítottuk. Ezt követően minden mintából 0.2 g-ot 30 mL 80 %-os(v/v) etanollal extraháltunk reflux berendezés segítségével 1 órát. Az elegyet kihűlés után szűrtük, majd a megmaradó leszűrt mintát még egyszer hasonlóképpen extraháltuk. Az egyesített kivonatokat 100.0 mL-re egészítettük ki, majd ebből az oldatból 15.0 mL-t vákuumban beszárítottunk (30-40 °C-on). A beszárított maradékot 1.5 mL 80 %-os (v/v) etil alkoholban vettük fel, centrifugálással tisztítottuk (8000 g 10 perc) és ebből injektáltunk a műszerbe (Agilent 1100 HPLC-DAD-1946A MSD system /Agilent, Waldbronn, Germany/), melyhez automatikus mintaadagoló is csatlakozott (injektált térfogat 20  $\mu\text{L}$ ). Az analízist szobahőmérsékleten végeztük MOS Hypersil BDS 150 mm  $\times$  4 mm ID, 5  $\mu\text{m}$  partikulum méretű RP  $\text{C}_{18}$  oszlopon. Lineáris gradiens elúcióval választottuk el az

egyed antrakinson-szármaezékokat. Az A eluens 15:85 (v/v) acetónitril-0.02 M ammonium acetát pufferből (pH=4.0) állt; a B eluens pedig 85:15 (v/v) acetónitril-0.02 M ammonium acetát pufferből (pH=4.0) állt. Az elúció során a B eluens mennyiségét 20 %-ról 80 %-ra emeltük 40 perc alatt, 1 mL perc<sup>-1</sup> áramlási sebesség mellett. A diódasoros detektor beállítási: on-line spektrum felvétel 200-600 nm, a kvantitatív meghatározást 254 nm-en végeztük. A tömegszelektív detektor beállítási: elektropray ionizáció, pozitív ion mód scan: 140-700 m/z, N<sub>2</sub> szárító gáz (8 L perc<sup>-1</sup>), 3500 V kapilláris feszültség, 80 V fragmentációs feszültség. Az antrakinson-szármaezékok kvantitatív meghatározása külső standard kalibrációval történt, de a lucidin-primverozid és ruberitrinsav esetén az alizarin válaszjeléből, míg a pszeudopurpurin esetében a purpurin válaszjeléből kalkuláltuk a kvantitatív értékeket. Az antrakinson standardokat részben a Reanalról (Reanal Rt., Budapest) (alizarin, antrakinson), részben az ICN-től (ICN Biomedicals Inc., Costa Mesa, U.S.A.) (purpurin és quinizarin) szereztük be. Az egyéb antrakinson-szármaezékokat laboratóriumunkban izoláltuk, az 1-hidroxi antrakinson, és 2-hidroxi antrakinson pedig irodalmi módszerek alapján állítottuk elő (62). A standardokat 80 % (v/v) etanolban oldottuk, és így injektáltuk őket.

#### 4.11. ADATFELDOLGOZÁS ÉS ÉRTÉKELÉS

A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kvantitatív meghatározások során három párhuzamos kísérletet végeztünk, a kísérletenkénti mintákat legalább 3 ismétlésben mértük meg.

Az antrakinson-szármaezékok, valamint a klorofill pigment tartalom kvantitatív meghatározása során szintén három párhuzamos kísérletet végeztünk (a kísérletenkénti mintákat legalább 3 ismétlésben mértük meg), a mintavételek az irodalomban elfogadott módon történtek (62, 100-101).

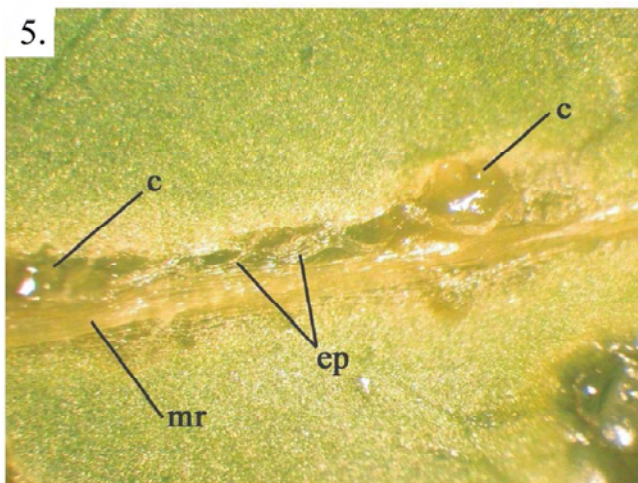
Excel programmal (Microsoft, U.S.A.) dolgoztuk fel a mérési eredményeket, és számoltuk ki a statisztikai értékeket (átlag, szórás, standard hiba, relatív szórás /RSD/, szignifikancia vizsgálat). Szintén ezzel a programmal készítettük a kvantitatív mérési eredmények bemutatására szolgáló ábrákat is.

## 5. Eredmények

### 5.1. DEDIFFERENCIÁCIÓS ESEMÉNYEK KALLUSZKÉPZŐDÉSKOR

#### 5.1.1. Kalluszképződés morfológiája

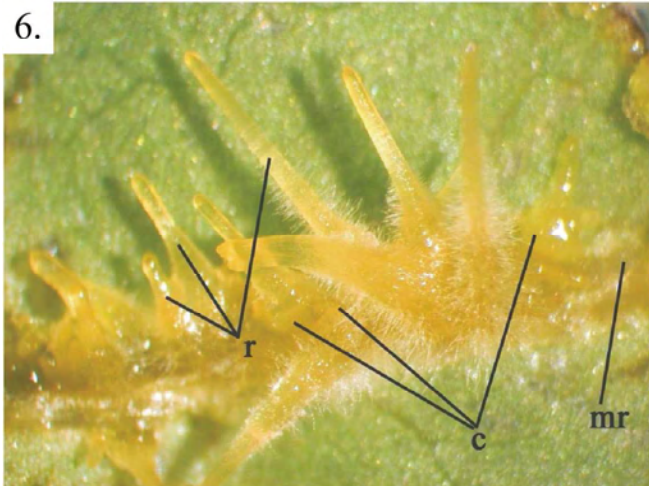
A kalluszosított levelek néhány nap múltán hullámossá váltak. A levelek intenzív zöld színe fakult, de zöld színűek maradtak a megfigyelések végéig. Az első hét végére az eredeti zöldesfehér árnyalatból az erek színe sárgára változott, ezzel csaknem egyidőben a kalluszképződés ezeken a helyeken az epidermisz felrepedésével megindult (5. ábra).



5. ábra. A kallusz képződése a levélerek környékén (10 napos kallusz indukált levél). c = kallusz, ep = epidermisz maradvány, mr = főér. (30×-os nagyítás)

A képződött kallusz sejtek csoportjai a továbbiakban áttörték az epidermiszt a főbb erek környékén, majd néhány hét elteltével gyökérkezdemények jelentek meg a primer kalluszon (6. ábra).

6.

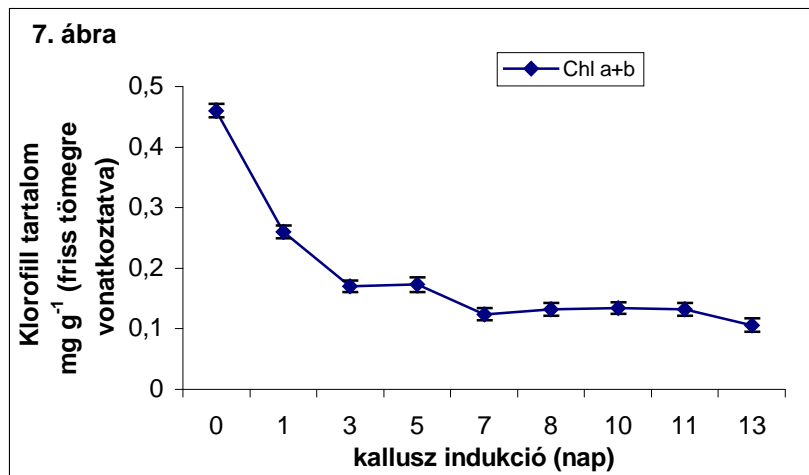


6. ábra. A gyökérkezdemények képződése a primer kalluszokon  
c=kallusz, mr= főér.  
r=gyökér kezdemények.  
(30× -os nagyítás)

A levéldarabok sérült széleinél szintén intenzív kalluszosodás volt megfigyelhető, de mivel az ilyen kalluszosodási módokról számos munkát írtak már, mi csak az erek mentén bekövetkező változásokra koncentráltunk.

#### 5.1.2. A klorofill pigmenttartalom változása

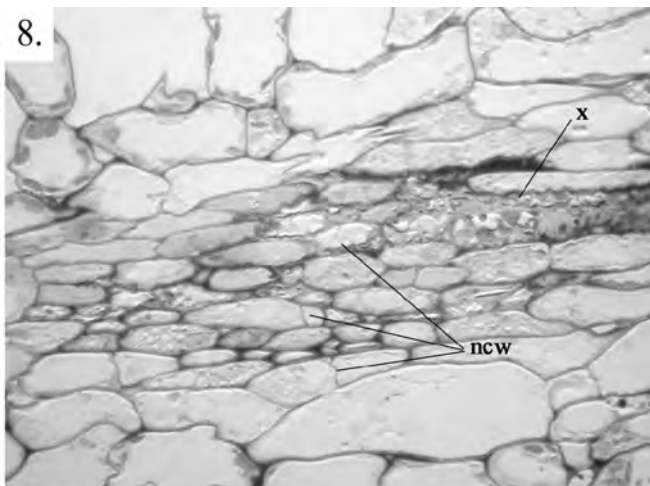
A makroszkópos megfigyelés alapján a levelek pigment tartalmának csökkenése nyilvánvaló volt, de a degradáció csak részlegesen történt meg a vizsgált időtartam alatt. A Chl a+b mennyisége erősen csökkent az első három nap során, majd ezek után a Chl tartalom csökkenés lassult, az 5-7. napok környékén enyhe átmeneti stagnálás volt tapasztalható. A kalluszosítás 13. napjára a pigment tartalom az eredeti 23 % -ára csökkent (7. ábra). A levelek a kísérlet időszaka után sem veszítették el zöld színüket, noha a stabilizálódott tenyészeteket az utolsó mintavétel után még hetekig megfigyeltük. Csak a kallusz mennyiségének változását láttuk.



7. ábra.  
Kalluszosított levelek klorofill mennyiségének változása a kallusz képződés során. A szórások feltüntetve, n=3.

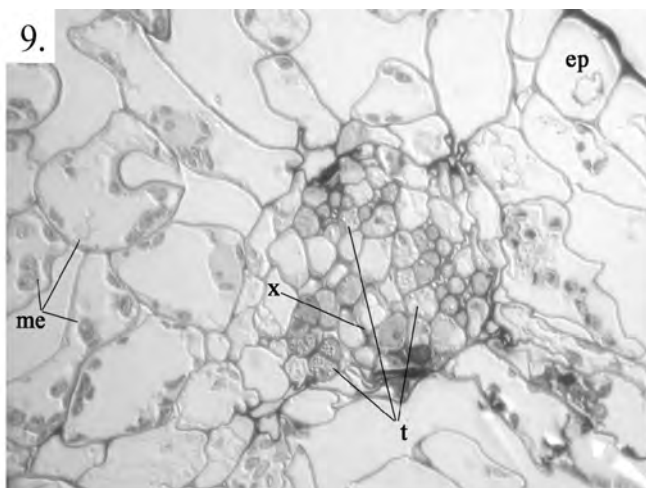
### 5.1.3. Fénymikroszkópos megfigyelések

A két hétig tartó naponkénti mintavétel feldolgozása teljes egészében megtörtént, itt csak a főbb dedifferenciációs és redifferenciációs történések leírására szorítkozunk. Az első sejtosztódásokat a kallusz indukció után már 3 nappal észleltük az edénnyalábok bizonyos sejtjeiben (8. ábra). A kontroll mintákat a következőképpen jelöltük: kontroll-1 = 0 nap kallusz indukció után; kontroll-2 = sterilizálatlan intakt levél.



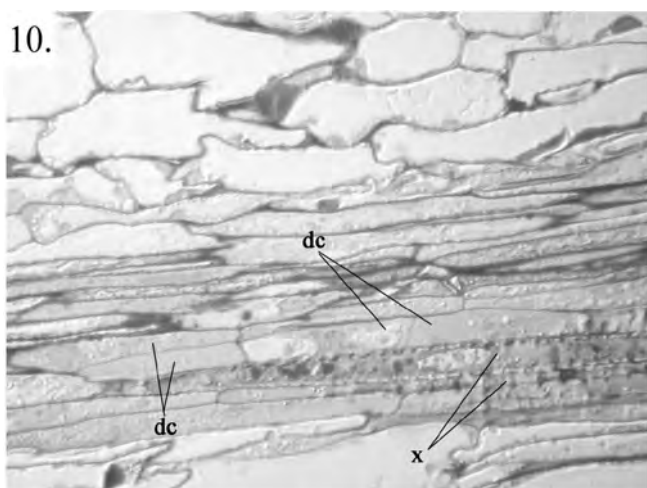
8. ábra. Levél keresztmetszete a levélr hosszszetszeti részletével (3 nappal a kallusz indukció után). ncw = újonnan létrejött sejtfaak, x = xylem. (425× -ös nagyítás)

Ezzel egy időben a mezofillum sejtjeiben nem volt fellelhető jelentős strukturális változás (9. ábra), osztódások itt nem voltak megfigyelhetőek.



9. ábra. Levél keresztmetszete (3 nappal a kallusz indukció után) benne a levélér keresztmetszeti képe. A transzfersejtek jól kivehetők ep = epidermisz, me = mezofillum sejtjei, t = transzfersejtek, x = xylem. (425×-ös nagyítás)

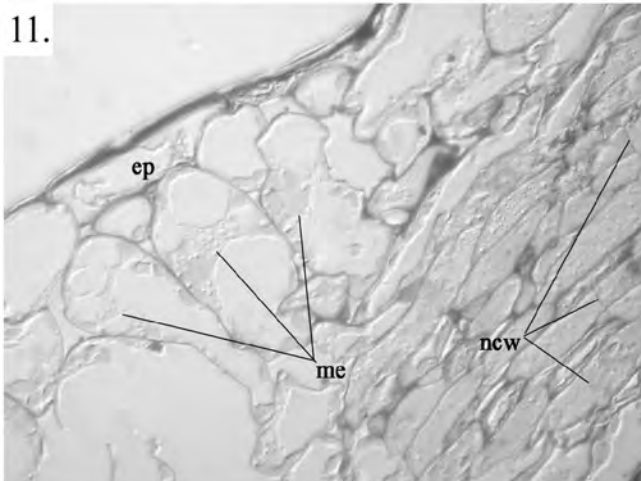
Hét nap elteltével a szállítóyalábok osztódó sejtjeiből származó leánysejtek láthatók voltak a levelekből készült metszeteken (10. ábra).



10. ábra. Levél hosszmetzete a levélér részletével (7 nappal a kallusz indukció után). dc = leánysejtek, x = xylem. (425×-ös nagyítás)

A mezofillum sejtek citoplazma tartalma magasabb volt, mint eredetileg és változások voltak észlelhetők a vakoulizáltságukban is. A nagy központi vakuolum az esetek többségében számos kisebb kompartmentre tagolódott, és kisebb vakuolumok csoportjai jelentek meg a citoplazmában, főként a sejtmag mellett (11. ábra; illetve 22. és 25. ábra).

11.

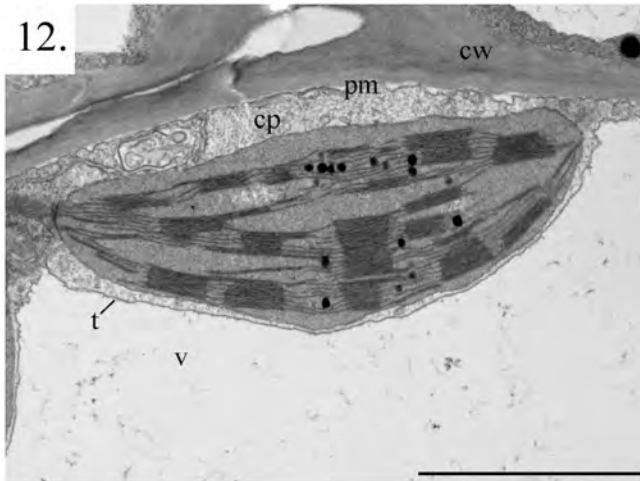


11. ábra. Levél keresztmetszete a mezofillum sejtekkel és a levélér részletével (7 nappal a kallusz indukció után). ep = epidermisz, me = mezofill sejtek, ncw = újonnan létrejött sejtfaalak. (425× -ös nagyítás)

#### 5.1.4. Az ultrastrukturális változások a kalluszképződés indukciója során

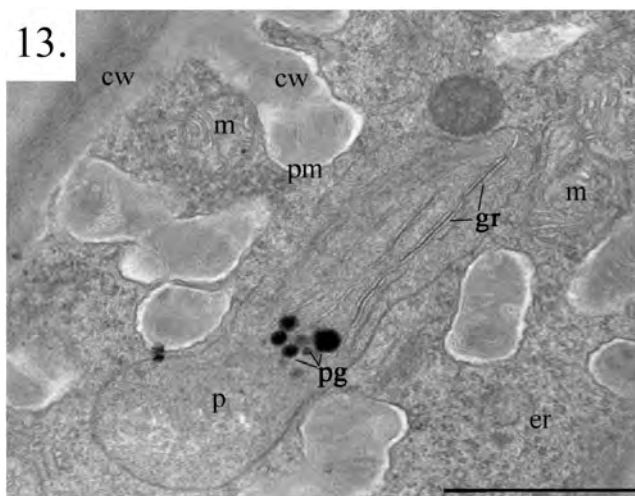
A vizsgált időtartamban a kalluszképződés során az egyes sejtípusok ultrastrukturális változásai szembetűnőek és karakterisztikusak voltak, számos változás volt megfigyelhető a mezofillum sejtek, illetve a szállítóyalábok régióiban egyaránt. A kontroll-1 és kontroll-2 minták mezofillum sejtjeiben a tavasszal megszokott, fejlődő kloroplasztisz ultrastrukturát láttuk, kis méretű és elektronenz plasztoglobulusokkal. Keményítőt nem detektáltunk, a plasztiszok belső membrán rendszere is normál strukturával rendelkezett. A nagy központi vakuolum csak kis mennyiségben tartalmazott precipitátumokat, a tonoplaszt ép volt, ami a membránok jó megtartását jelzi a fixálás során. A mezofillum sejtek plazmamembránját enyhe hullámosság jellemezte (12. ábra). A kontroll-1 és kontroll-2 levelek ultrastrukturájában nem voltak jelentős eltérések.





12. ábra. Kontroll-1 mezofillum sejt részlete. cp = citoplazma, cw = sejtfal, pm = plazmamembrán, t = tonoplaszt, v = vakuolum. Bar = 2  $\mu$ m.

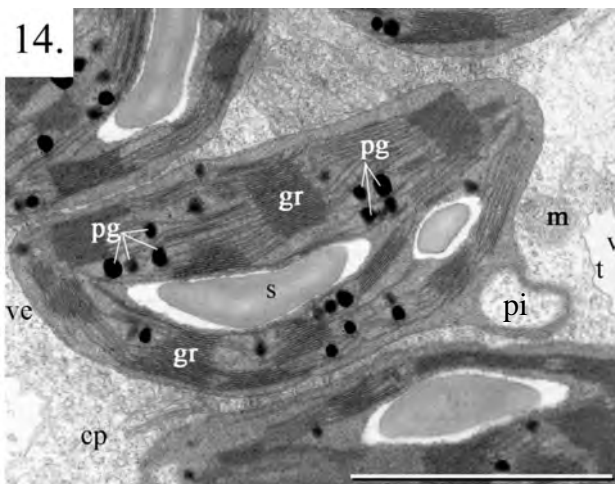
A szállítónyalábokban tipikus transzfersejtek voltak megfigyelhetők. Ezek a sejtek karakterisztikus –helyenként mélyen a sejt lumenébe benyomuló, csapos jellegű sejtfalvastagodásokat tartalmaztak. A vastagodott sejtfal részek többé-kevésbé hasonló denzitással rendelkeztek, mint a sejtfal egyéb részei. A sejtekben csak néhány nagyméretű vakuolum volt megfigyelhető, a plastiszok közepes méretűek voltak, és csak kevés gránum volt fellelhető bennük. A gránumok csak néhány tilakoidból álltak (13. ábra).



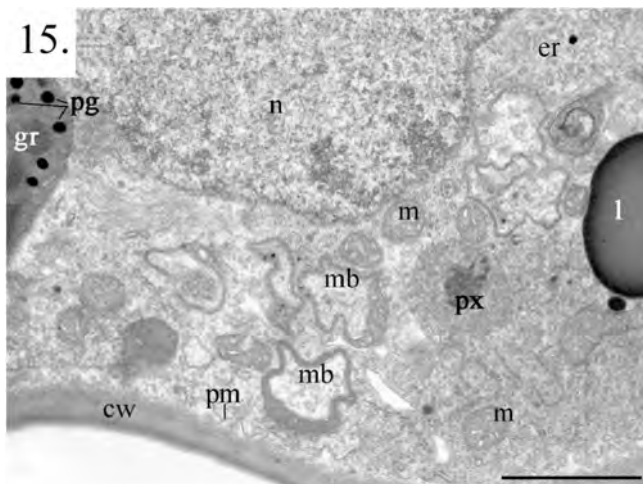
13. ábra. Kontroll-1 levélben transzfersejt részlete. cw = sejtfal, gr = gránum, m = mitokondrium, p = kloroplasztisz, pg = plasztoglobulus, pm = plazmamembrán. Bar = 1  $\mu$ m.

A kallusz indukálása után 1 nap elteltével a mezofillum sejtekben az endoplazmás retikulum dezintegrálódni kezdett, invaginációk jelentek meg a kloroplasztiszokon és mitokondriumokon. Számos vezikula képződött a plazmamembrán közeli régiókban, azonban az eredeti vakouolumok nem mutattak méretbeli eltérést. A kontroll-1 és kontroll-2 sejtekéhez viszonyítva a kloroplasztiszok nem mutattak jelentős változást, eltekintve attól, hogy számottevő mennyiségű

keményítő jelent meg a plasztiszokban (1-3 szemcse/plasztisz), és hogy ezen plasztiszokban a plasztoglobulusok mérete és száma kissé megnőtt (14-15. ábra).

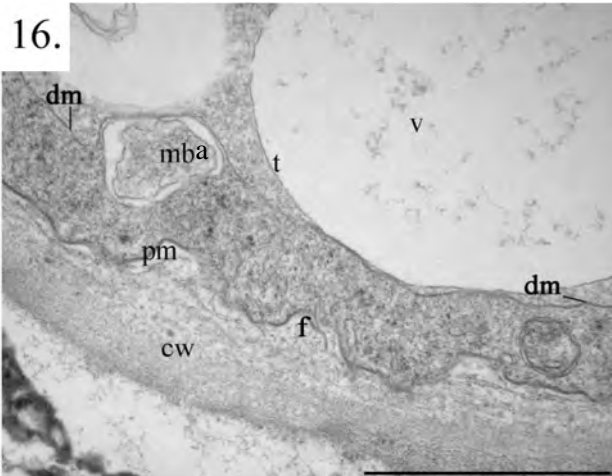


14. ábra. 1 napos kallusz indukált levél mezofillum sejtjének részlete, plasztiszok. cp = citoplazma, gr = gránum, m = mitokondrium, pg = plasztoglobulus, pi = plasztisz invagináció, s = keményítő szemcse, v = vakuolum, ve = vezikulum, t = tonoplaszt. Bar = 2  $\mu$ m.

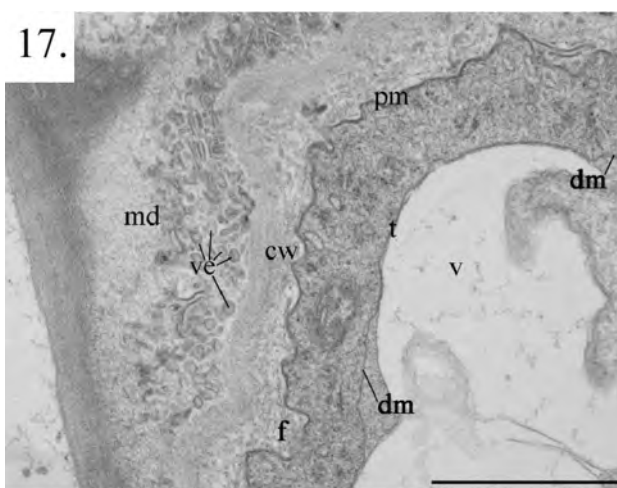


15. ábra. 1 napos kallusz indukált levél mezofillum sejtjének részlete, sejtmag környéki citoplazma. cw = sejtfa, er = endoplazmás retikulum, gr = gránum, l = lipid csepp, m = mitokondrium, mb = mitokondrium invagináció, n = sejtmag, pg = plasztoglobulus, pm = plazmamembrán, px = peroxiszóma Bar = 2  $\mu$ m

Az 1 napos kallusz indukált levél transzfersejtjének struktúrája szintén változáson ment át. A fokozott autofágiát jelezte, hogy membránnal körülhatárolt citoplazma részletek és vakuolumok jelentek meg mielin jellegű struktúrákkal a citoplazma központi részében (16-17. ábra). Néhány sejt falában a lítikus aktivitás jelei voltak láthatók. Ennek az aktivitásnak köszönhetően a középlemez fellazult. A sejtfa belső rétege és a denzebb régiók elektron-áteresztőbbé és fibrilláris állományúvá váltak.

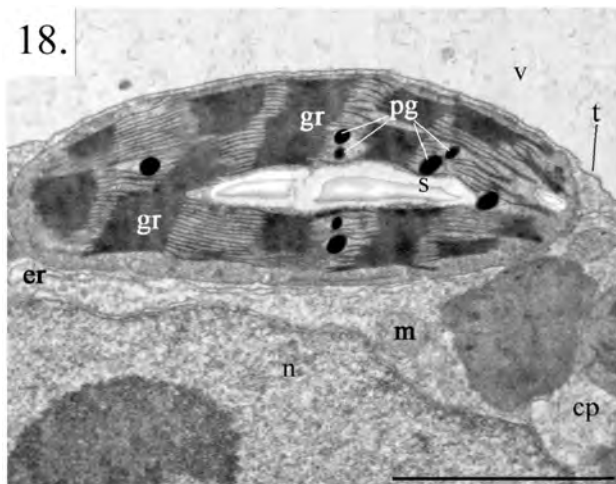


16. ábra. 1 napos kallusz indukált levél transzfersejtjének részlete.  
 cw = sejtfa, dm = körülhatároló membrán, f = a sejtfa fibrilláris régiója, mba = citoplazma részlet izoláló membránnal körülvéve, pm = plazmamembrán, t = tonoplaszt, v = vakuolum. Bar = 1  $\mu$ m.



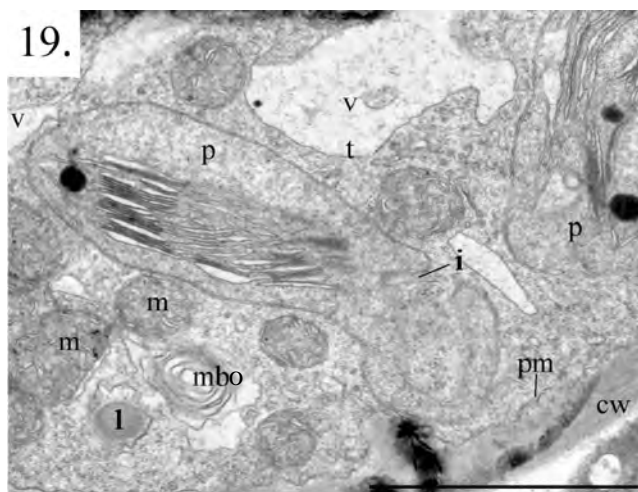
17. ábra. 1 napos kallusz indukált levél transzfersejtjének részlete.  
 cw = sejtfa, dm = körülhatároló membrán, f = a sejtfa fibrilláris régiója, md = középlemez, pm = plazmamembrán, v = vakuolum, t = tonoplaszt. Bar = 1  $\mu$ m.

A 3 napos kallusz indukált minták mezofillum sejtjeiben a kloroplasztiszok gránumai enyhén nagyobb méretűvé váltak, a keményítő tartalom viszont ekkorra már csökkent. A citoplazmában számos vakuolum jelent meg a sejtmag közelében, melyek a sima felszínű endoplazmás retikulum vezikuláiból keletkezhetnek. A citoplazma enyhén ritkábbá vált, az organelumok pedig aggregálódni kezdtek (18. ábra).



18. ábra. 3 napos kallusz indukált levél mezofillum sejtjének részlete. cp = citoplazma, er = endoplazmás retikulum, gr = gránum, m = mitokondrium, n = sejtmag, pg = plasztoglobulus, s = keményítő szemcse, v = vakuolum, ve = vezikula, t = tonoplaszt. Bar = 2  $\mu$ m.

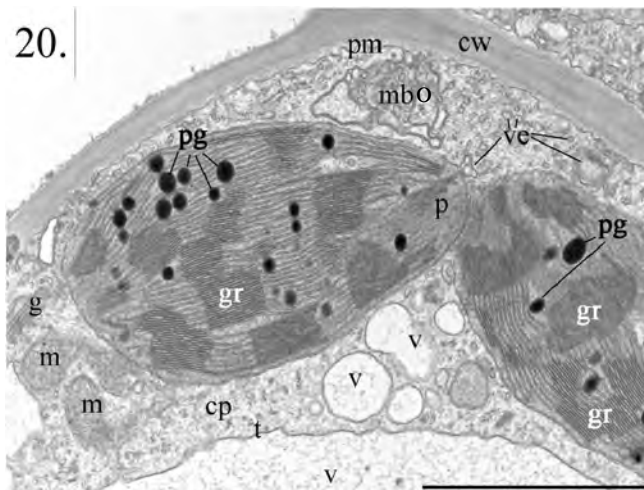
A 3 napos kallusz indukált levél transzfersejtjeinek némelyikében a körülhatárolt citoplazma eltűnni látszott az autolízis következményeként. Más sejtekben hasonló változások zajlottak le, de a sejteknek csak kisebb, körülhatárolt régióit érintették. A plasztiszok osztódása számos esetben inekválisnak tűnt. A sejtfa plazmamembrán melletti régiói világosabbá, de kompaktabb szerkezetűekké váltak, a sejtbe behatoló vastagodások nélkül, míg néhány esetben a sejtfa struktúráisan alig változott (19. ábra).



19. ábra. 3 napos kallusz indukált levél transzfersejtjének részlete. cw = sejtfa, i = befűződés (osztódó plasztiszon), l = lipid csepp, m = mitokondrium, mbo = mielin test, p = kloroplasztisz, pm = plazmamembrán v = vakuolum. Bar = 2  $\mu$ m.

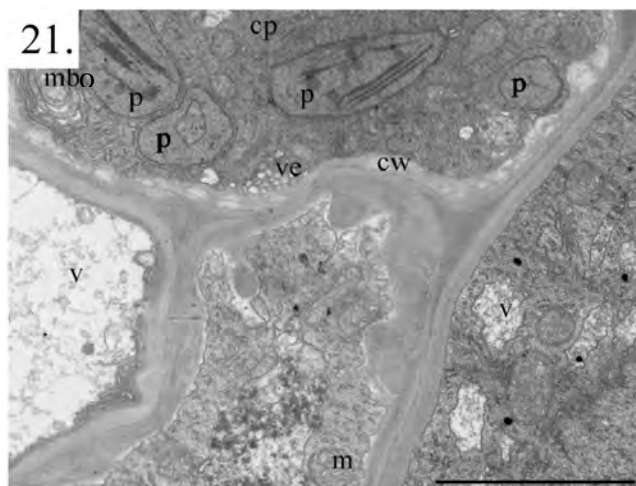
Öt nappal a kallusz indukációt követően a mezofillum sejtek plasztiszai már csak elvéve tartalmaztak keményítőt, míg a gránumok mérete tovább nőtt. A plasztoglobulusok számban és méretben is szintén növekedtek. Nagy számú mitokondrium volt látható a citoplazmában, és számos vezikula volt fellelhető,

valamint sok kis méretű vakuolum volt jelen. A központi vakuolumon és a citoplazmatikus vakuoláris struktúrákon kívül néhány mielin test jelenléte utalt a folytatódó autolítikus aktivitásra. A plazmamembrán megjelenése kevésbé hullámosnak bizonyult (20. ábra).



20. ábra. 5 napos kallusz indukált levél mezofillum sejtjének részlete.  
cw = sejtfa, cp = citoplazma, g = Golgi apparátus, gr = gránum, m = mitokondrium, mbo = mielin test, p = kloroplasztisz, pg = plasztoglobulus, pm = plazmamembrán, t = tonoplaszt, v = vakuolum, ve = vezikulák. Bar = 2  $\mu$ m.

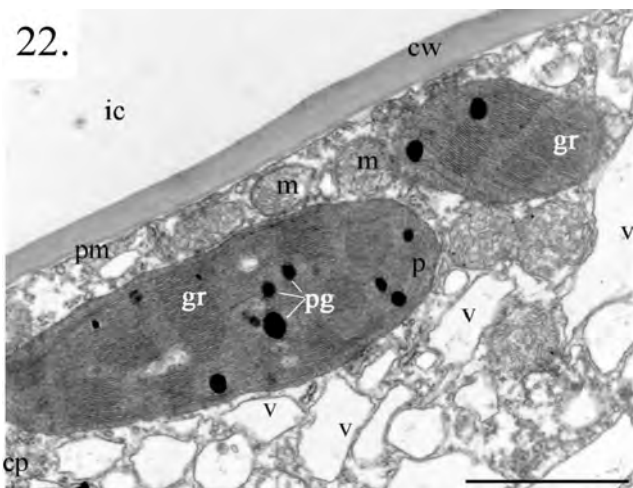
A dedifferenciálódó transzfersejtek citoplazmája ebben az időpontban denz megjelenésű volt, a plasztiszok mérete erősen variábilisnak bizonyult. Valószínűsíthetően a további inekvális osztódások eredményeképpen, a kisebb méretű plasztiszok gyengén fejlett tilakoidokkal rendelkeztek (21. ábra).



21. ábra. 5 napos kallusz indukált levél transzfersejtjének részlete.  
cp = citoplazma, cw = sejtfa, m = mitokondrium, mbo = mielin test, p = plasztisz, v = vakuolum, ve = vezikula. Bar = 2  $\mu$ m.

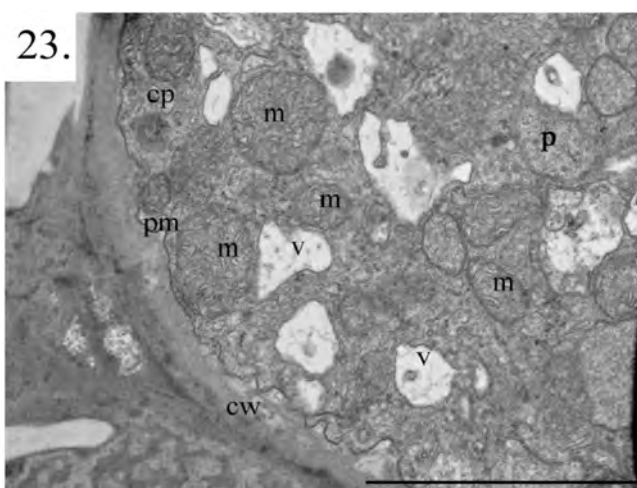
A kallusz indukciót követő 7-9. napokon a mezofill sejtek plasztoglobulusainak száma és mérete jelentősen növekedett, és gyakran csoportokba rendeződtek. A kloroplasztiszok keményítő tartalma eltűnt, a gránumok megfigyelhetők

voltak, de a dezorganizáció jeleit mutatták. A citoplazma megjelenése világosabb volt, kevesebb organelum és riboszóma volt jelen. A csoportban elhelyezkedő kis méretű citoplazmatikus vakuolumok mérete enyhén nőtt; a citoplazmában még mindig megfigyelhetőek voltak autolítikus területek (22. ábra).



22. ábra. 7 napos kallusz indukált levél mezofillum sejtjének részlete.  
 cp = citoplazma, cw = sejtfa, gr = gránum, ic = intercelluláris tér, m = mitokondrium, p = kloroplasztisz, pg = plasztoglobulus, pm = plazmamembrán, v = vakuolum. Bar = 2  $\mu$ m.

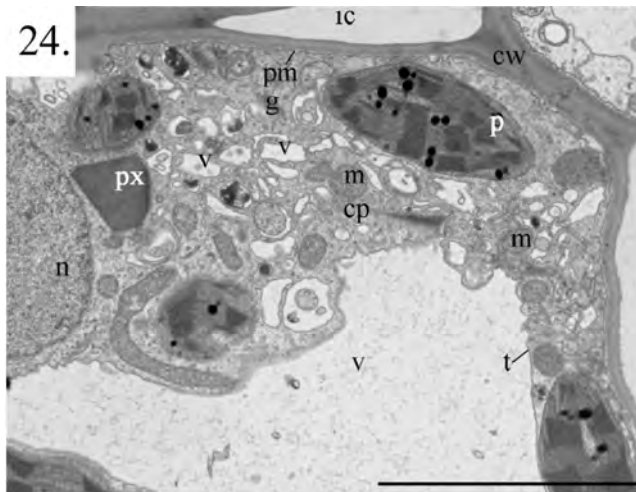
A transzfersejtek citoplazmája 7-9 nappal a kallusz indukciót követő időszakban denz és kompakt struktúrát mutatott, néhány sejtben a vakuolumok csaknem teljesen hiányoztak. A sejtfa belső rétege denzebbé vált, de elkülöníthető maradt. A számos mitokondrium nehezen kivehető volt a kicsi mitokondrium-citoplazma kontrasztkülönbség miatt (23. ábra).



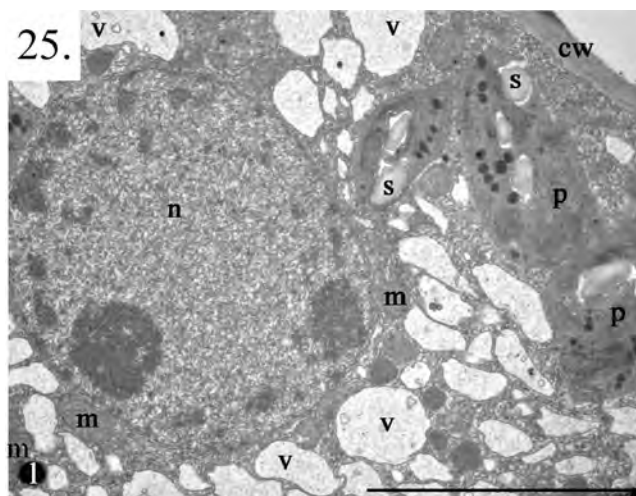
23. ábra. 7 napos kallusz indukált levél transzfersejtjének részlete.  
 cw = sejtfa, cp = citoplazma, m = mitokondrium, p = plasztisz, pm = plazmamembrán, v = vakuolum. Bar = 2  $\mu$ m.

11-13 nappal a kallusz indukciót követően az erek környéki mezofill sejtek vakuolumaiban finom precipitátum jelent meg. A kis méretű citoplazmatikus

vakuolumok gyakran rendeződtek csoportokba a sejtmag köré vagy fúzionáltak a meglévő központi vakuolummal. A kloroplasztiszok jól fejlett tilakoidokkal és viszonylag magas gránumokkal rendelkeztek. Keményítő nem volt látható a 11. napon, de kis mennyiségben érzékelhető volt a 13. napon. A plasztoglobulusok száma és csoportba való rendeződésük mértéke csökkent (24-25. ábra). Erre az időpontra a mezofillum sejtek citoplazma állománya jelentősen megnőtt.

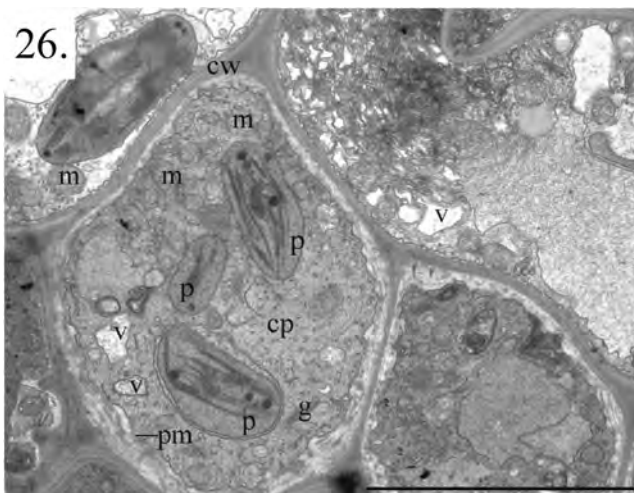


24. ábra. 11 napos kallusz indukált levél mezofillum sejtjének részlete.  
cp = citoplazma, cw = sejtfa, g = Golgi apparátus, ic = intercelluláris tér, m = mitokondrium, n = sejtmag p = kloroplasztisz, pm = plazmamembrán, px = peroxiszóma, t = tonoplaszt, v = vakuolum. Bar = 5  $\mu$ m.

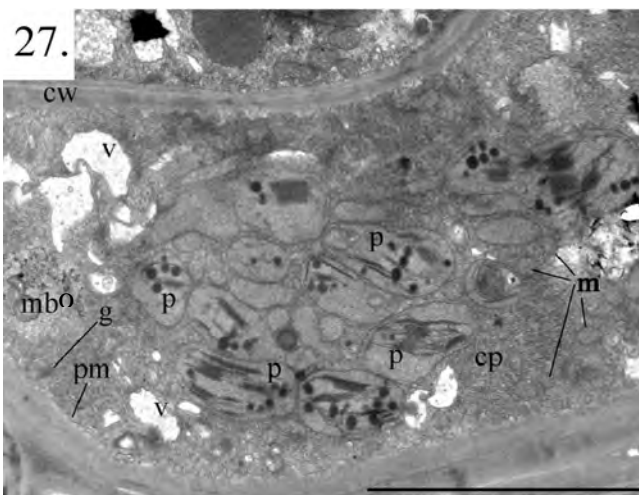


25. ábra. 13 napos kallusz indukált levél mezofillum sejtjének részlete.  
cw = sejtfa, l = lipid csepp, m = mitokondrium, n = sejtmag, p = kloroplasztisz, s = keményítő, v = vakuolum. Bar = 5  $\mu$ m.

A transzfersejtek citoplazmája ebben a mintavételi időpontban denz volt, a sejtmag körül nagyobb számú organellumot tartalmazott. A sima felszínű endoplazmás retikulum nagyobb mennyisége, a Golgi apparátusok és mitokondriumok, valamint a különböző méretű plasztiszok nagyobb száma volt a jellegzetes. A sejtmagok mérete nagyobb volt, gyakran kondenzálódni látszó kromatinnal. A dedifferenciálódó transzfersejtek bizonyos régióiban kis méretű vakuolumok csoportjai voltak láthatók. Ezeken a helyeken nagyobb számú mitokondrium is megfigyelhető volt (26-27. ábra).



26. ábra. 11 napos kallusz indukált levél transzfersejtjei. cp = citoplazma, cw = sejtfa, g = Golgi apparátus, m = mitokondrium, p = plastisz, pm = plazmamembrán, v = vakuolum. Bar = 5  $\mu$ m.



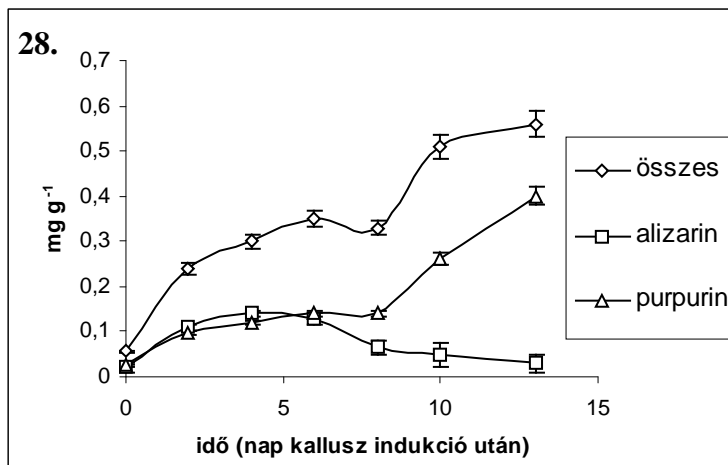
27. ábra. 13 napos kallusz indukált levél transzfersejtjének részlete. cp = citoplazma, cw = sejtfa, g = Golgi apparátus, m = mitokondrium, mbo = mielin test, p = plastisz, pm = plazmamembrán, v = vakuolum. Bar = 5  $\mu$ m.

#### 5.1.5. Egyes antrakinon-származékok mennyiségének változása a kallusz indukációjakor

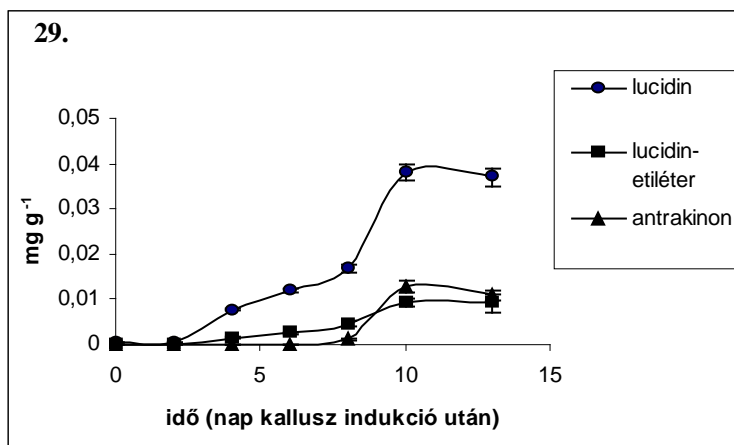
A kontroll-1 és kontroll-2 levél gyakorlatilag nem tartalmazott antrakinonokat. A kallusz képződése során a vizsgált levelekben az antrakinonok mennyisége növekedett, de az egyes származékok mennyiségei nem egyformán változtak. Az alizarin egy átmeneti jellegű felhalmozódást mutatott, a maximum értéke a 4. nap körül volt látható. A 9, 10 antrakinon (antrakinon) a levelekben csak a 8. naptól volt detektálható, maximumát a 10. napon érte el (érdekes módon nem volt kimutatható az összehasonlításként használt rhizómákban és korábban képzett kallusz kultúrákban). Jelentős változások voltak láthatók a purpurin, és lucidin mennyiségekben is. Az említett anyagok kezdeti gyors felhalmozódását követően a mennyiségi növekedés lelassult az 5. nap környékén, majd ismét erősebb növekedés kezdődött a 8. naptól, ami



a 10. napig tartott. Ezen időpont után lassú mennyiségi csökkenés következett (a purpurin értékek kivételével). A legnagyobb mennyiségi növekedést a lucidin mutatott. Az összmennyiségek hasonló, 2 fázisú felhalmozódási kinetikát mutattak (28-29. ábra).



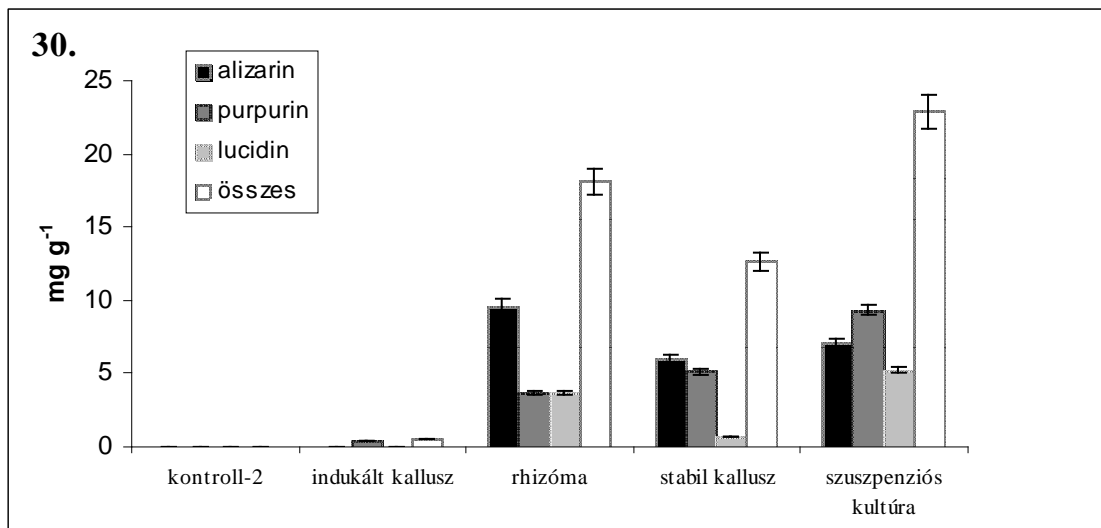
28.ábra. Az összes-antrakinon, alizarin és purpurin mennyiségi változásai a kallusz indukció során a levelekben. A koncentráció értékek száraztömegre lettek megadva. Jelölve: 3 mérés átlaga és a szórás.



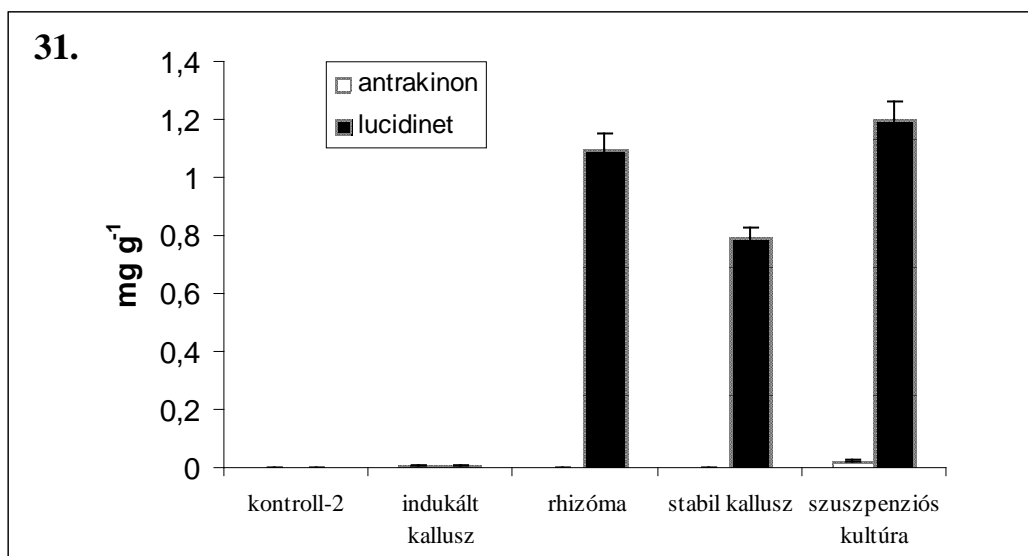
29.ábra. A lucidin, lucidin-etiléter, és 9,10-antrakinon mennyiségi változásai a kallusz indukció során a levelekben. A koncentráció értékek száraztömegre vonatkoztatva lettek megadva. Jelölve: 3 mérés átlaga és a szórás.

Az antrakinon-származékok mennyiségeit összehasonlítottuk a kontroll-2, az indukált kallusz (13 napos kallusz indukciót követő levél minta), a fenntartott stabil kallusz (korábban gyökérből létrehozott szilárd táptalajon hosszabb ideje fenntartott kallusz) és az intakt rhizóma mintákban. Jelentős különbségek láthatók a kontroll-2 és a stabil kallusz értékei között (30-31. ábra). Például a lucidin mennyisége a stabil kalluszban 1320-szor nagyobb volt, mint a levelekben. A lucidin-etiléter nem volt detektálható a kontroll-2 levelekben, a stabil kalluszban viszont megjelent. Az antrakinon-származékok összmennyisége 233-szorosa volt a stabil kalluszban a kontroll-2 levelekhez viszonyítva, és szintén nagy különbség adódott a 13 napos kallusz indukált

levelek és a fenntartott stabil kallusz között (az utóbbi javára 22-szer nagyobb összes antrakinon tartalom volt mérhető, illetve az alizarin 200-szor nagyobb mennyiségben volt jelen a stabil kalluszban.)



30. ábra. Az alizarin, purpurin és lucidin valamint az összes antrakinon tartalom mennyiségének összehasonlítása a kontroll-2, indukált kallusz, fenntartott stabil kallusz, rhizóma, és szuszpenziós kultúra mintákban. A koncentráció érték száraztömegre lett vonatkoztatva. Jelölve: 3 mérés átlaga és a szórás.



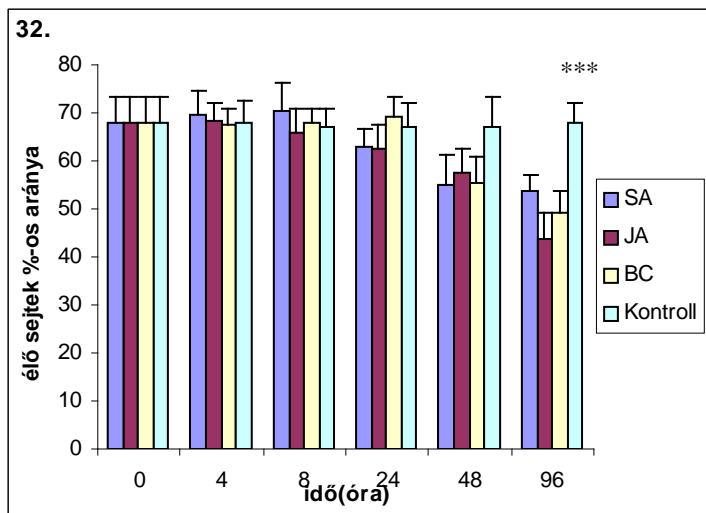
31. ábra. Az antrakinon és lucidin-etiléter mennyiségének összehasonlítása a kontroll-2, indukált kallusz, fenntartott stabil kallusz, rhizóma, és szuszpenziós kultúra mintákban. A koncentráció érték száraztömegre lett vonatkoztatva. Jelölve: 3 mérés átlaga és a szórás. lucidinet= lucidin-etiléter.

Különbségek voltak mérhetőek a rhizóma, stabil kallusz, és szuszpenziós kultúrák vizsgált antrakinon-származékainak mennyiségeiben. Az összes mért antrakinon tartalom a legmagasabb a szuszpenziós kultúrában volt mérhető (2-szer magasabb értékkel, mint a stabil kalluszban). A genotoxikus lucidin mennyisége a stabil kalluszban volt a legalacsonyabb (5.5-ször kisebb, mint a rhizómában, és 8-szor kisebb, mint a szuszpenziós kultúrában). Nem volt nagy különbség a lucidin-etiléter mennyiségek között, de az antrakinon csak a szuszpenziós kultúrában volt detektálható. Említésre érdemes még, hogy a rhizóma tartalmazta a legmagasabb alizarin mennyiséget, a purpurin viszont itt volt kimutatható a legkisebb mennyiségben (30-31. ábra).

## 5.2. AZ ELICITÁLÁS HATÁSA A SZUSZPENZIÓS KULTÚRÁK SEJTJEINEK ÉLETKÉPESSÉGÉRE ÉS H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> TERMELÉSÉRE

### 5.2.1. Különböző elicitorok hatása az életképességre

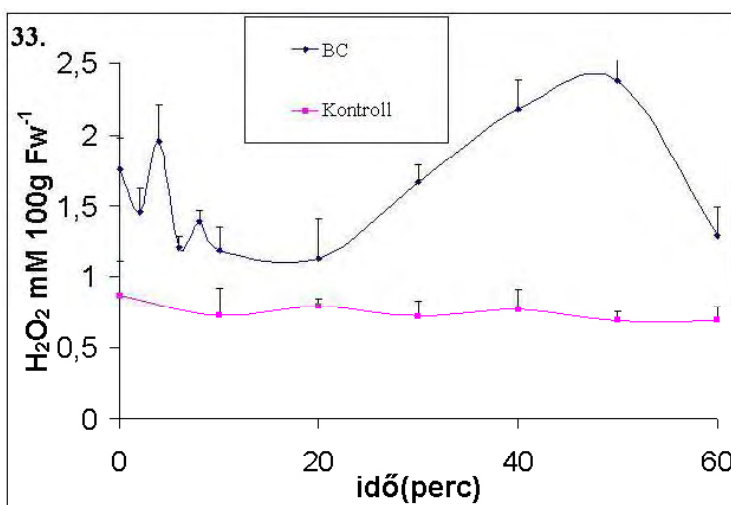
Az elicitáláskor detektálható strukturális és metabolikus változások értelmezésének alapfeltétele volt annak ellenőrzése, hogy a mért eredmények nem a sejtek elhalása következtében alakultak-e ki. Az életképességi tesztek azt mutatták, hogy az élő sejtek száma nem változott jelentősen az 1.25mL BC /100 mL szuszpenziós tenyészet, 35 µM JA, 2mM SA elicitálást követő 24 óráig. A későbbi időpontokban az elicitált tenyészetek sejteinek viabilitása kissé csökkent, azonban ez a csökkenés csak 96 óra elteltével lett szignifikáns (32. ábra).



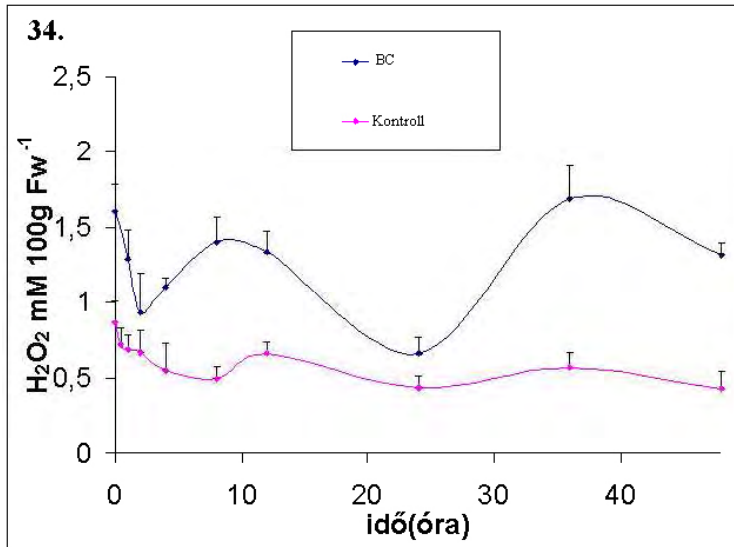
32. ábra. A BC, JA, SA elicitorokkal kezelt sejtsuszpenziós kultúrák életképességének változása. Standard hiba, n=10. Az elicitálást követően 96 órával a SA2, JA2, és BC esetében szignifikáns (csillagokkal jelölve) az életképesség csökkenés ( $P < 0.01$ ).

### 5.2.2. Az elicitorok hatása a sejteken belül mérhető $H_2O_2$ termelésére

A BC elicitált sejtekben a  $H_2O_2$  mennyiségek 5 maximumot mutattak a vizsgált 48 órás periódus alatt. Az első maximum a kezelést követő 4. percben jelent meg, majd egy kisebb 8 perces csúcs után a  $H_2O_2$  mennyisége csökkent és ebben a koncentráció intervallumban maradt egy hosszabb periódusban, létrehozva egy „negatív plateau-t”. 30 percet követően a  $H_2O_2$  koncentráció lassan növekedni kezdett, mely átment egy új, 50 perc környékén észlelhető maximumba. A később jelentkező két maximum 8 és 36 órával a kezelést követően volt mérhető (33-34. ábra). A kontroll értékek a desztillált vízzel kezelt mintákra vonatkoznak.

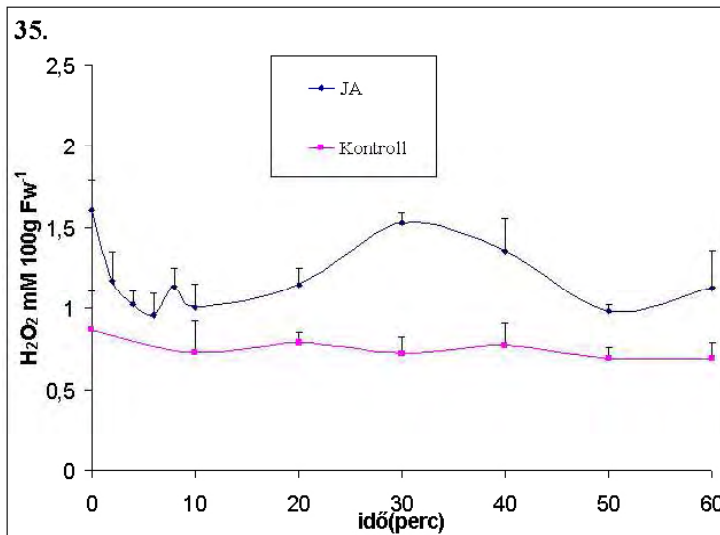


33. ábra. A sejtek  $H_2O_2$  mennyiségének változása BC és desztillált vizes kezelés (kontroll) után (1 óráig). Az értékek friss tömegre vannak vonatkoztatva, Standard hiba, n=3.

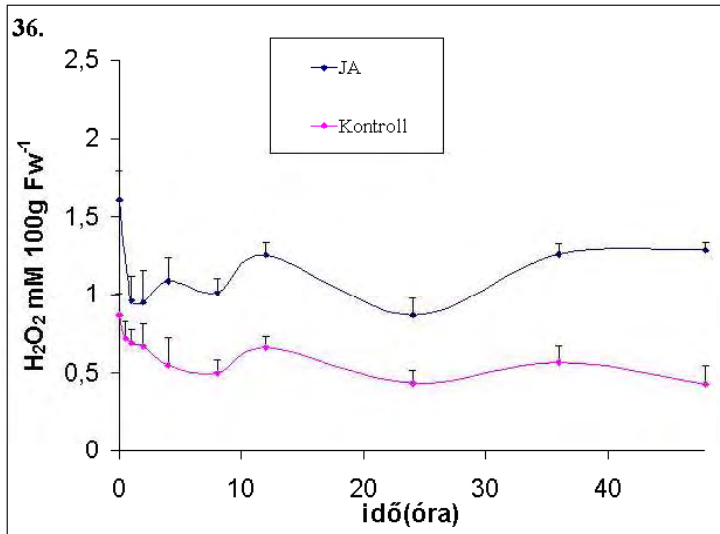


34. ábra. A  $H_2O_2$  mennyiségének változása BC, és desztillált vizes kezelés (kontroll) után (48 óráig). Az értékek friss tömegre vannak vonatkoztatva, Standard hiba,  $n=3$ .

JA2 és SA2 kezelések esetében karakterisztikus különbségek adódtak a maximumok számában, amplitúdójában, és megjelenési idejében. A JA kezelés jelentősen csökkentette a 8 perces maximum előtti  $H_2O_2$  koncentrációt, és a következő három maximum is érzékelhető időbeni eltolódást mutatott (35-36. ábra). A megváltozott dinamikát a 40 óra utáni stabilizálódott magasabb  $H_2O_2$  szint is mutatja (36. ábra).



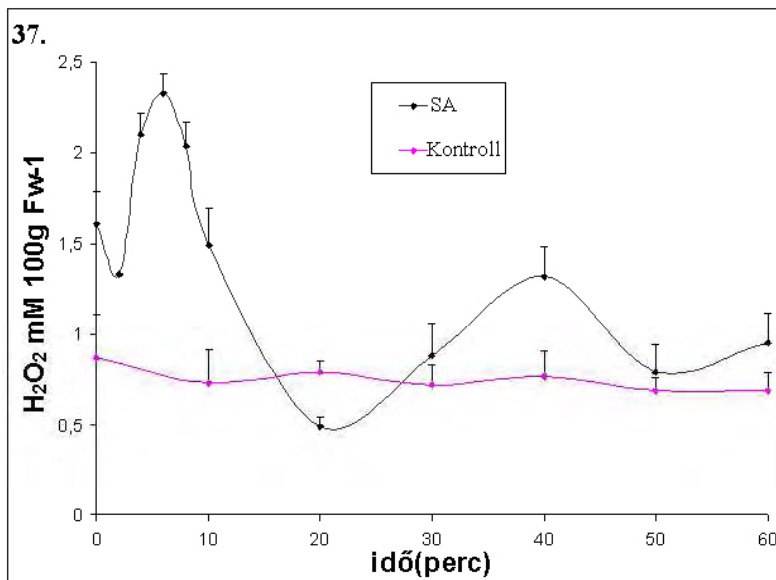
35. ábra. A  $H_2O_2$  mennyiségének változása JA, és kontroll (desztillált vízzel történt) kezelés után (1 óráig). Az értékek friss tömegre vannak vonatkoztatva, Standard hiba,  $n=3$ .



36. ábra. A sejtek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mennyiségének változása JA, és kontroll (desztillált vízzel történő) kezelés után (48 óráig).

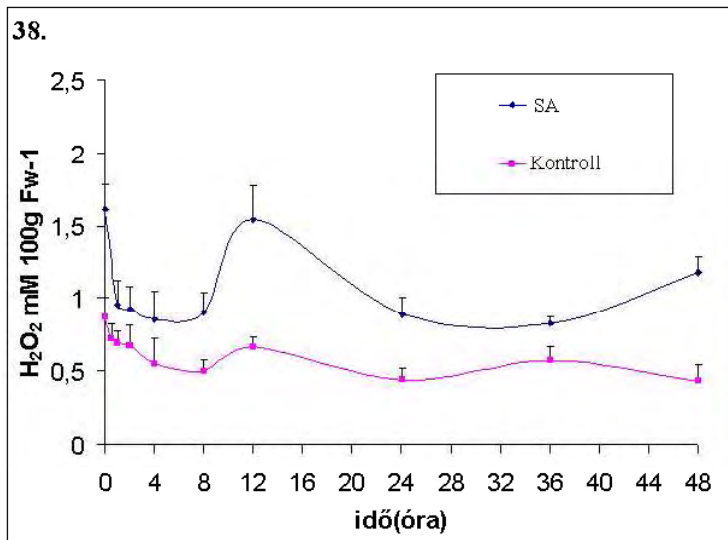
Az értékek friss tömegre vannak vonatkoztatva, Standard hiba, n=3.

A SA kezelés hatására az első nagy amplitúdójú maximum 6 perc elteltével jelentkezett, és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mennyisége a sejtekben jellemző módon eltérő volt a BC és JA kezelt tenyészetekhez képest a későbbi időpontokban is (37-38. ábra). A kontroll (desztillált vízes) minták H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tartalma a kezelési idő alatt itt sem változott jelentősen.



37. ábra. A sejtek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mennyiségének változása SA, és a kontroll (desztillált vízzel történő) kezelés után (1 óráig).

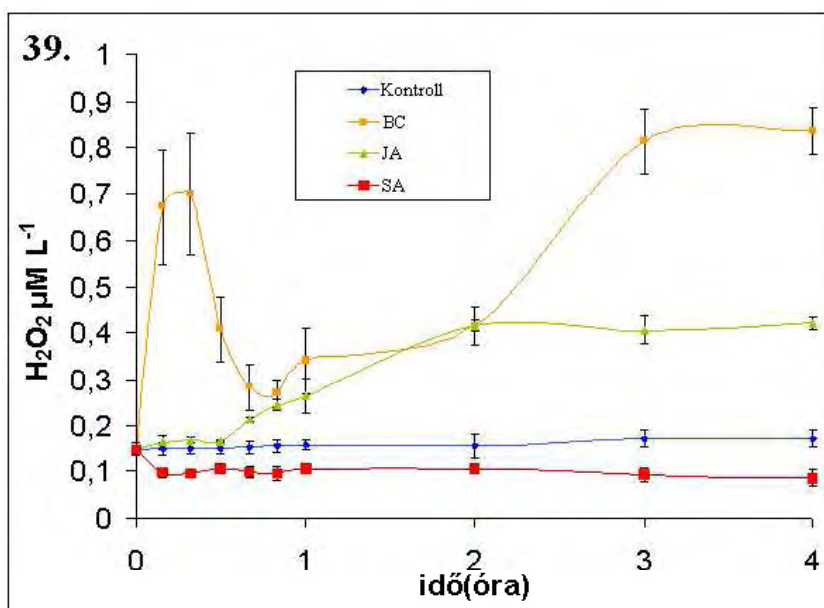
Az értékek friss tömegre vannak vonatkoztatva, Standard hiba, n=3.



38. ábra. A sejtek  $H_2O_2$  mennyiségének változása SA és kontroll (desztillált vízzel történő) kezelés után (48 óráig). Az értékek friss tömegre vannak vonatkoztatva, Standard hiba,  $n=3$ .

### 5.2.3. Az elicitorok hatása a tenyészetek tápközegének $H_2O_2$ koncentrációjára

A  $H_2O_2$  mennyisége a felülúszóban eltérően változott a különböző elicitorokkal történő kezelések hatására, míg megközelítően konstans maradt a kontroll minták (desztillált víz hozzáadása) esetében. A BC kezeléskor a felülúszó  $H_2O_2$  koncentrációja jelentősen növekedett a kezelést követő és 20-30 percben, valamint 1 óra elteltével, majd ismét növekedett 4 óráig. A JA kezelés enyhébb és termelődési csúcsok nélküli  $H_2O_2$  koncentráció növekedést váltott ki, míg a SA kezelés enyhén csökkentette a  $H_2O_2$  mennyiségét a szuszpenziós tenyészetek felülúszójában (39. ábra).



39. ábra. A felülúszó  $H_2O_2$  koncentrációjának változása a különböző elicitoros BC, JA, SA és kontroll (desztillált vizes) kezeléseket követően (4 óráig). Standard hiba,  $n=3$ .

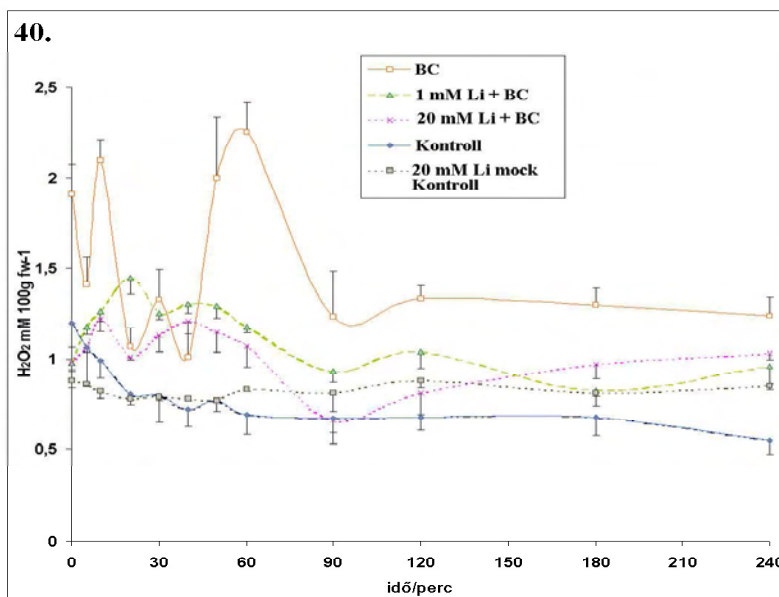
#### 5.2.4. A gátló anyagok hatása BC elicitor indukált $H_2O_2$ termelésre

Ebben a fejezetben a kontroll minták a desztillált vizes mintákat, míg a mock kontroll minták az adott gátló anyaggal önmagában történő kezelést jelölik.

##### 5.2.4.1. Lítium klorid befolyása a BC indukált $H_2O_2$ termelésre

A mock kontroll (1 illetve 20 mM LiCl) mintáknál a sejtekben a lítium nem eredményezett  $H_2O_2$  mennyiségi változásokat a vizsgált időintervallumban. A tápközegben a 20 mM kezelés 3-4 óra környékén enyhe  $H_2O_2$  mennyiségi növekedést eredményezett (a 41. ábrán jelölve).

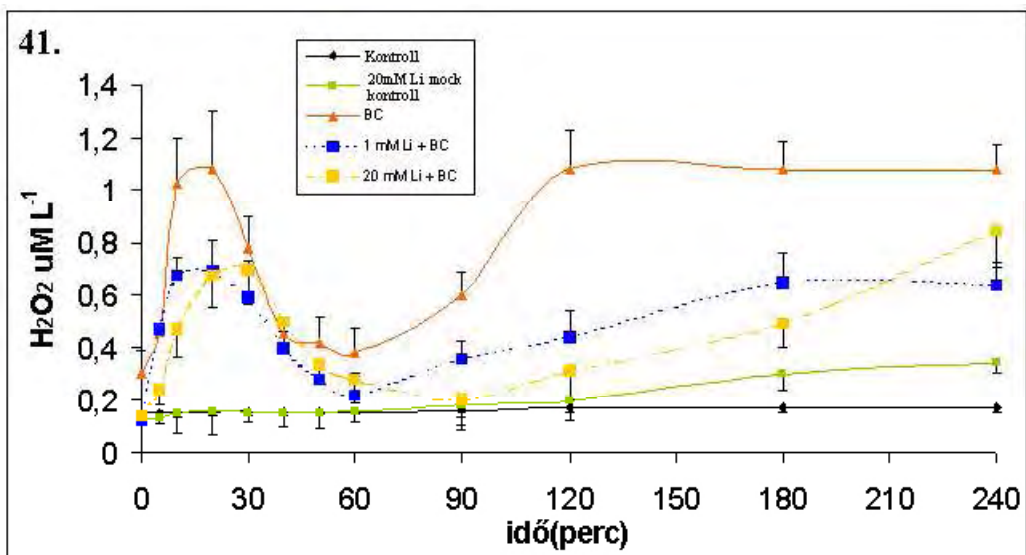
A lítium klorid a sejtek BC indukált  $H_2O_2$  termelését jelentős mértékben befolyásolta. Egyrészt a  $H_2O_2$  produkciós csúcsok amplitúdóját csökkentette az előkezelés a koncentrációval összefüggő mértékben, másrészt a  $H_2O_2$  termelés időbeli megjelenése különbözött a csak BC kezelt tenyészetektől. A lítium előkezelt elicított sejtekben a rövid időn belül jelentkező csúcs későbbre (20 perc környékére) tolódott, a 60 perc körüli maximum pedig 120 perc környékére került. A 20 mM előkezelt mintákban a rövid időn belül jelentkező csúcs látható, de igen kis amplitúdóval (40. ábra).



40. ábra. A lítium klorid előkezelés hatása a sejtek  $H_2O_2$  termelésére (4 óráig). 1mM Li + BC = 1 mM LiCl előkezelt BC elicított minták; 20mM Li + BC = 20 mM LiCl előkezelt BC elicított minták, Kontroll = desztillált vizes minták, 20 mM Li mock kontroll = 20 mM LiCl kezelt minták. Standard hiba, n=3.



A lítium előkezelés utáni BC elicitálás hatására a felülszóban is csökkent a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentráció amplitúdója a korai megjelenésű csúcs esetében. A 20 mM előkezelés ezt a csúcsot időben is enyhén eltolta. Az előkezelés eredményeként a 4 óránál megjelenő maximum is kisebb amplitúdójú, és időbeli megjelenése is különbözött a BC kezelt mintáétól.



41. ábra. A lítium klorid előkezelés hatása a felülszó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentrációjára (4 óráig).

20 mM Li kontroll = 20 mM LiCl mock kontroll minták; 1 mM Li+ BC = 1 mM LiCl előkezelt BC elicitált minták; 20 mM Li+ BC = 20 mM LiCl előkezelt BC elicitált minták.

Standard hiba, n=3.

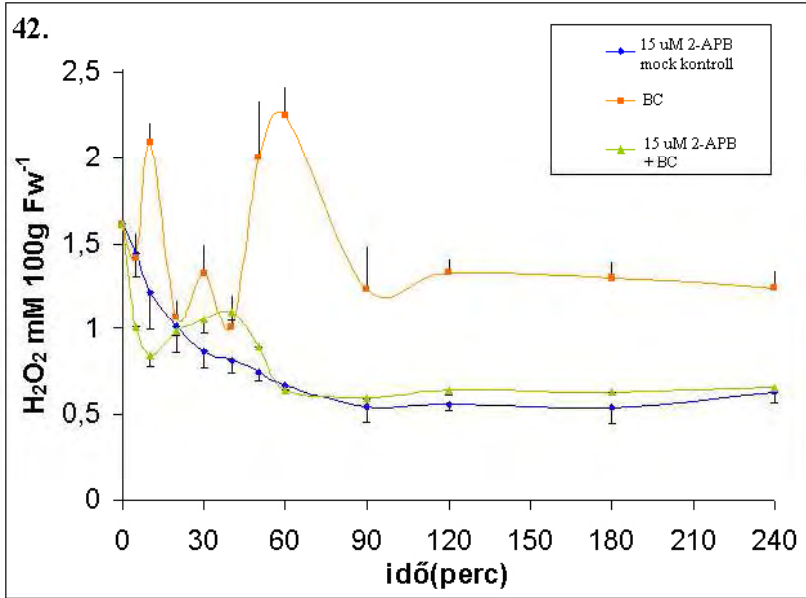
#### 5.2.4.2. A 2-APB előkezelés hatása a BC indukált H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelésre

A 15  $\mu$ M 2-APB mock kontroll kezelés nem okozott H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelődést a vizsgált időszakban, és a görbe lefutása gyakorlatilag megegyezett a desztillált vizes kontrolléval (a 40. és 43. ábrán jelölve) (42.ábra).

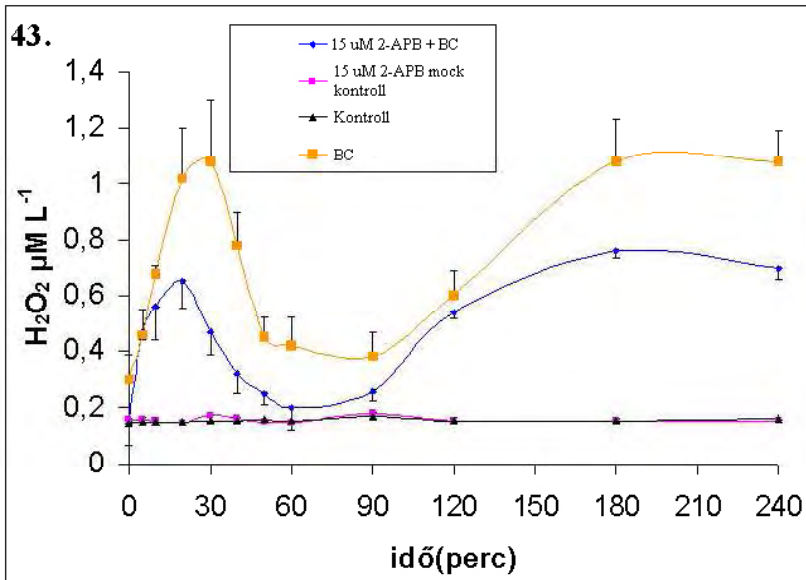
Az együttes 2-APB előkezelés és BC elicitálás hatására a sejtek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelése szintén jelentős mértékben csökkent a csak önmagában BC kezeléshez képest. A rövid időn belül (4-8 perc) megjelenő csúcsok eltűntek, és egy hosszabb ideig tartó, de lényegesen kisebb amplitúdójú csúcs jelent meg 40 perc környéki maximummal. A további időszakban a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelés a mock kontrollhoz hasonlított.

A mock kontroll minták és a kontroll minták görbéjének lefutása

gyakorlatilag megegyezett, tehát a 2-APB kezelés önmagában nem vezet  $H_2O_2$  koncentráció növekedéshez a felülúszóban (43. ábra). A sejtek felülúszójában található  $H_2O_2$  koncentráció a 2-APB-vel történő előkezelt majd BC-vel elicított minták esetében szintén eltért a csak BC elicított mintákhoz képest. A termelődési maximum időben kissé hamarabb, viszont lényegesen alacsonyabb amplitúdóval jelent meg, a 4 óra környéki csúcs amplitúdója is jelentősen kisebb volt (43. ábra).



42. ábra. A 15  $\mu$ M 2-APB előkezelés hatása a sejtek BC indukálta  $H_2O_2$  termelésére (4 óráig). Standard hiba, n=3.



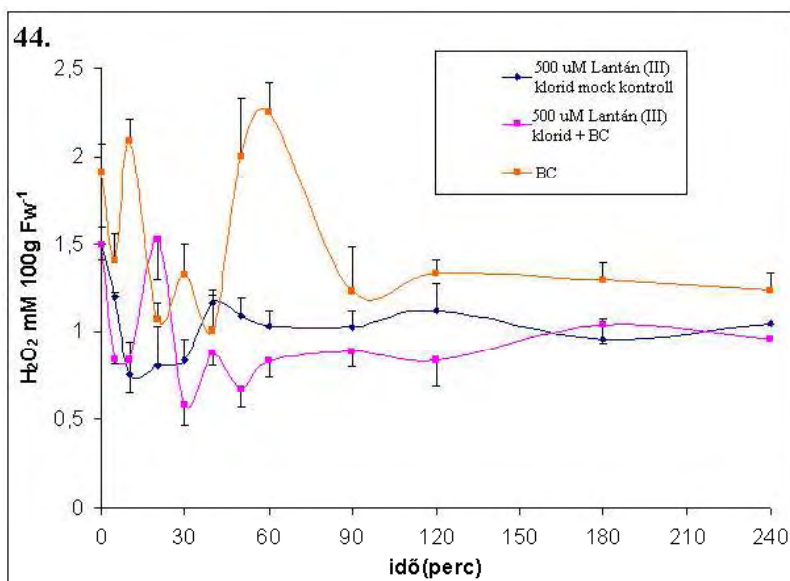
43. ábra. A 15  $\mu$ M 2-APB előkezelés hatása a felülúszó  $H_2O_2$  koncentrációjára BC elicított sejtekben (4 óráig). Standard hiba, n=3.

#### 5.2.4.3. Lantán (III) klorid hatása a BC indukált $H_2O_2$ termelésre

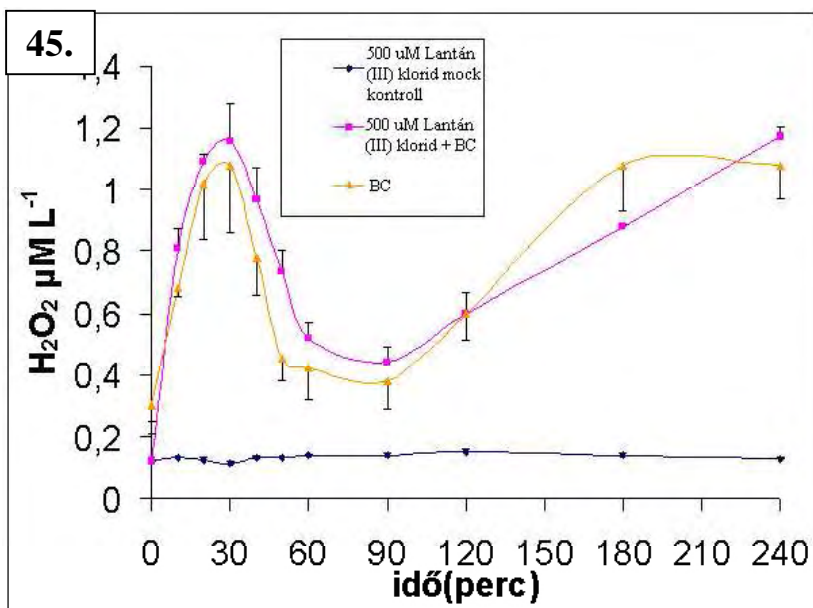
A lantán előkezelés (500  $\mu\text{M}$   $\text{LaCl}_3$ ) hatására a BC kezelt mintákban a sejtekben mért  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelése szintén jelentősen csökkent. A korai megjelenésű csúcs időben későbbre tolódott (20 perc környékére), amplitúdója viszont kisebb mértékben csökkent, mint pl. a 2-APB esetében. 40 perc környékén egy kis amplitúdójú, átmeneti csúcst követően a vizsgálat hátralévő idejében a  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelés a lantán mock kontroll mintákéhoz volt hasonló.

A tápközeg  $\text{H}_2\text{O}_2$  koncentrációit tekintve a lantánnal előkezelt BC elicítált és az önmagában BC kezelt tenyészetekben mért hatás összevethető volt, nem követte a sejtekben tapasztalható változásokat (45. ábra.).

A lantán mock kontroll és kontroll mintákban (mind sejtben, mind felülúszóban) tapasztalható  $\text{H}_2\text{O}_2$  mennyiségei nem tértek el egymástól jelentősen, tehát a lantán előkezelés önmagában nem okozott  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelődést (44.-45. ábra). A desztillált vizes kontroll minták eredménye a 40. ábrán /sejtek/ illetve a 43. ábrán /felülúszóban/ van feltüntetve, a 44.-45. ábrán a jobb áttekinthetőség kedvéért kihagytuk.



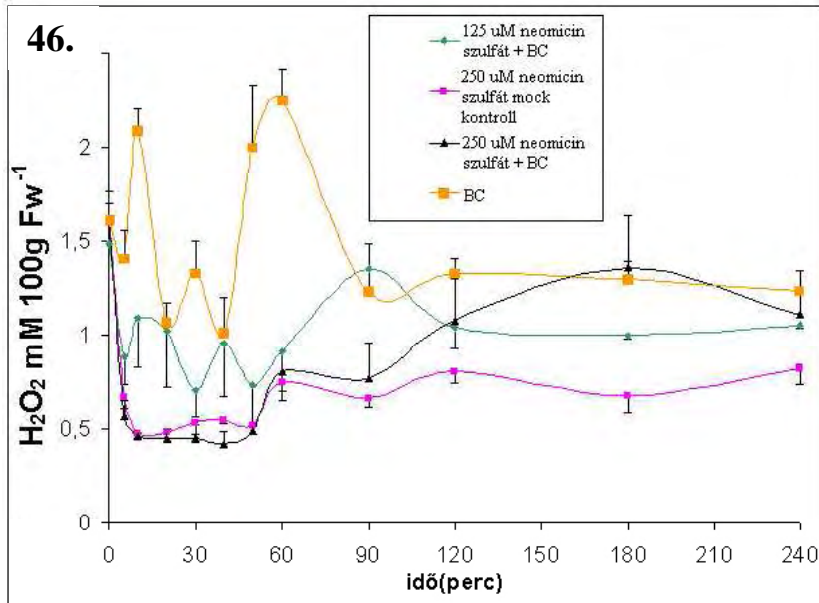
44. ábra. Az 500  $\mu\text{M}$  lantán (III) klorid előkezelés hatása a sejtek  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelésére (4 óráig). Standard hiba,  $n=3$ .



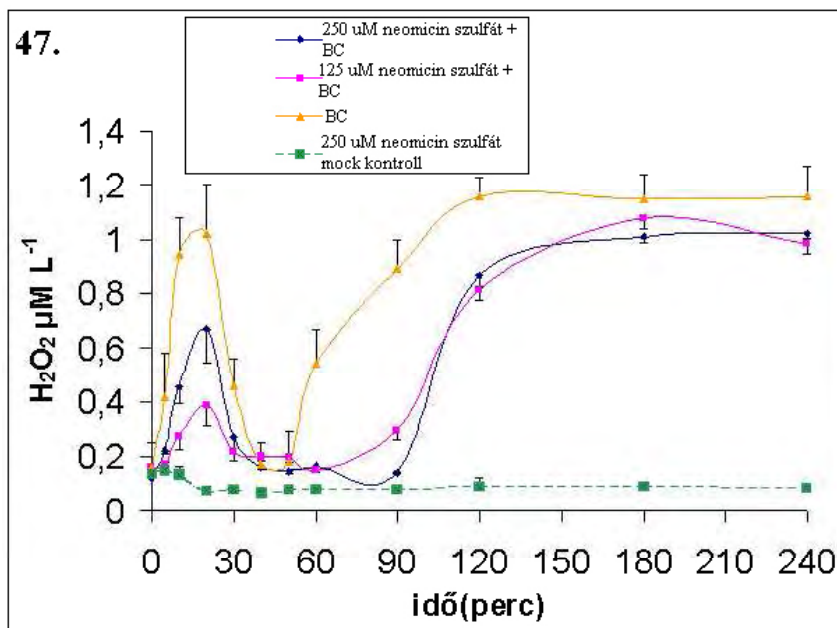
45. ábra. A lantán (III) klorid előkezelés hatása a felülúszó  $H_2O_2$  koncentrációjára (4 óráig). Standard hiba,  $n=3$ .

#### 5.2.4.4. A neomicin kezelés hatása a BC indukált $H_2O_2$ termelésre

A neomicin előkezelés a BC elicitor okozta, a sejtekben mért  $H_2O_2$  termelődést a neomicin koncentrációjától (125  $\mu M$  és 250  $\mu M$ ) függően változtatta meg. A 125  $\mu M$  neomicin előkezelés esetében a csúcsok amplitúdója jelentős mértékben csökkent, időbeli megjelenésük későbbre tolódott (pl. a 60 perces csúcs a 125  $\mu M$  neomicinnel előkezelt BC elicítált mintákban 90 perc környékén jelent meg). 250  $\mu M$  neomicin előkezelés hatására a korai csúcsok teljesen eltűntek, csak 60 perc után volt tapasztalható némi emelkedés: széles időintervallumban mérhető, 180 perc környéki maximum értékkel (46. ábra). A felülúszóban tapasztalható változásokra jellemző volt, hogy míg a korai csúcsot a neomicin kezelés koncentrációjától függően csökkentette, addig a késői  $H_2O_2$  termelésre a koncentráció különbségnek gyakorlatilag nem volt hatása, és a mért  $H_2O_2$  érték csak kis mértékben tért el a BC kezelt tenyészetekétől (47. ábra). Az önmagában 125 és 250  $\mu M$  neomicinnel történő mock kontroll kezelések között nem volt lényeges eltérés, így csak a 250  $\mu M$ -os kezelést tüntettük fel. A neomicin mock kontroll kezelések a  $H_2O_2$  termelődésben változást nem okoztak, a desztillált vizes kontroll mintákhoz hasonló eredményt adtak (46-47. ábrán nics feltüntetve).



46. ábra. A 125 és 250 μM neomycin szulfát előkezelések hatása a sejtek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelésére (4 óráig). Standard hiba, n=3.

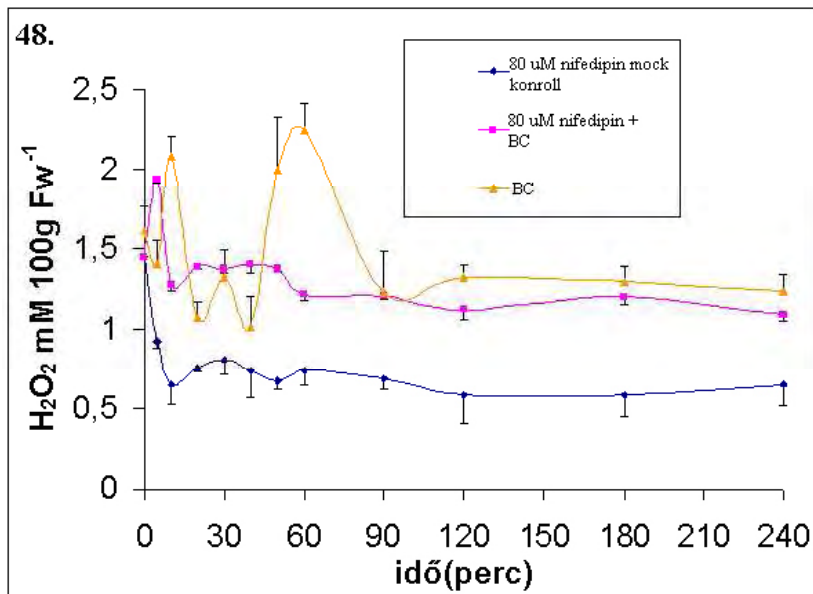


47. ábra. A 125 és 250 μM neomycin szulfát előkezelés hatása a felülúszó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentrációjára (4 óráig). Standard hiba, n=3.

#### 5.2.4.5. A nifedipin kezelés hatása a BC indukált H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelésre

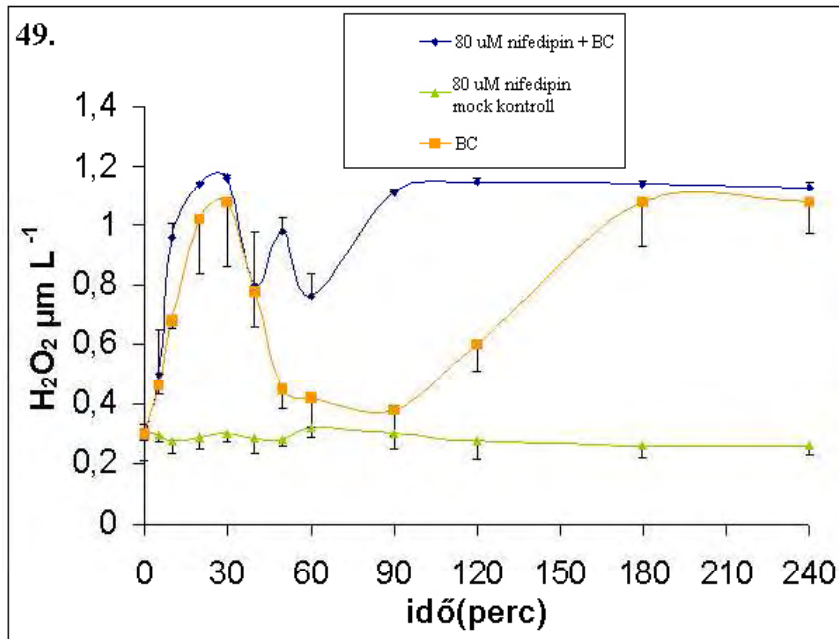
A 80 μM nifedipin előkezelést követő BC elicitálás hatása jellegzetes a sejtek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelése szempontjából, noha a nifedipin önmagában nem okozott H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> szint változást. A nifedipin előkezelte, majd BC elicitált mintákban csak egy igen korai 5 perc környéki csúcs jelent meg. Ráadásul ennek maximum értéke összevethető volt a csak

BC vel elicított minták amplitúdójával. A továbbiakban a görbe lefutása a nifedipin mock kontroll mintákéhoz volt hasonló, azzal a különbséggel, hogy a  $H_2O_2$  koncentráció egy magasabb szinten maradt a 4 órás intervallum végéig (48. ábra).



48. ábra. A 80  $\mu M$  nifedipin előkezelések hatása a sejtek  $H_2O_2$  termelésére (4 óráig). Standard hiba,  $n=3$ .

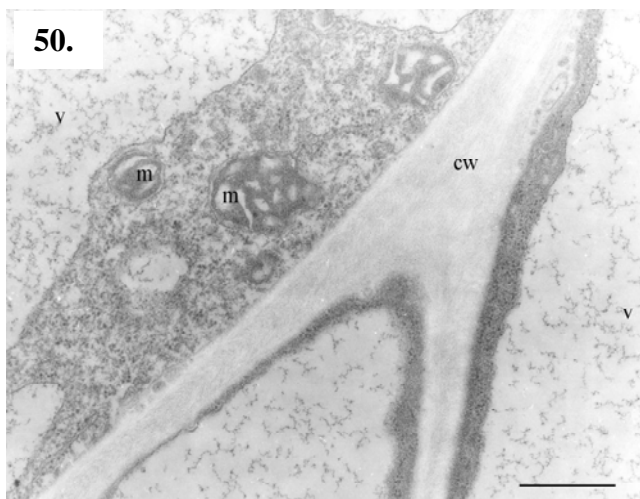
A tenyészetek felülúszójában a sejtekben mértől eltérő változás volt mérhető. A nifedipin kezelés önmagában itt sem okozott megváltozott  $H_2O_2$  termelődést, a görbe a desztillált vízzel kezelt kontroll mintákéhoz volt hasonló. 80  $\mu M$  nifedipinnel előkezelt BC elicított mintákban a felülúszó  $H_2O_2$  mennyisége az első csúcs időbeli megjelenését és amplitúdóját tekintve összevethető volt a BC kezelések eredményeivel. Ezt követően még egy észlelhető csúcs alakult ki 50 perc környékén, majd egy átmeneti rövid minimum után gyakorlatilag maximális értéken maradt a mért 4 órás intervallum végéig (49. ábra). Az előkísérletek során a 20  $\mu M$  nifedipin előkezelt BC elicított mintákban mért  $H_2O_2$  termelődési dinamizmus hasonló volt a csak BC vel kezelt mintákéhoz (a 49. ábrán ez nincs jelölve), ami a nifedipin kezelés koncentráció függésére utal.



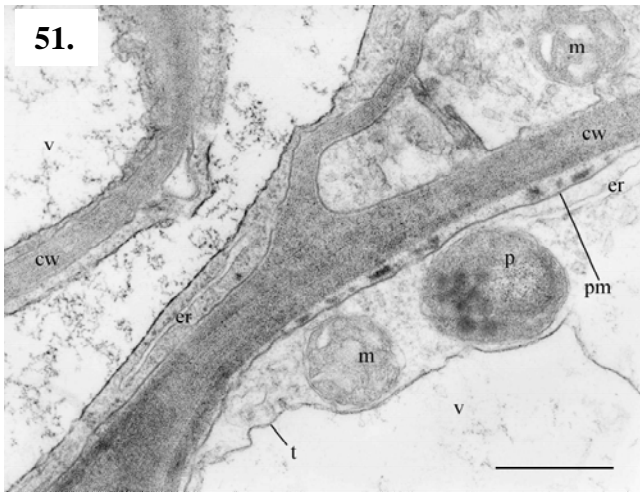
49. ábra. A 80 µM nifedipin előkezelés hatása a felülúszó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentrációjára (4 óráig). Standard hiba, n=3.

#### 5.2.5. Az elicitálást követő H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelés ultrasztuktúrális behatárolása

Az elicitorokkal kezelt, majd CeCl<sub>3</sub>-al inkubált sejtekben cérium perhidroxid csapadékot tudtunk kimutatni, mely a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelődés bizonyítéka. A megfigyelések során nem volt jelentős különbség a desztillált vizes és a desztillált vizes + cériumos kontroll minták között (50-51. ábra), míg az elicitorok időben változó mennyiségben kimutatható, cérium perhidroxidokból álló csapadék kiválását okozták. Az elektronmikroszkópos megfigyeléseink megerősítették, hogy a különböző elicitorok fokozott H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelődést váltanak ki, ennek intenzitása időben változik és gátlókkal is befolyásolható.



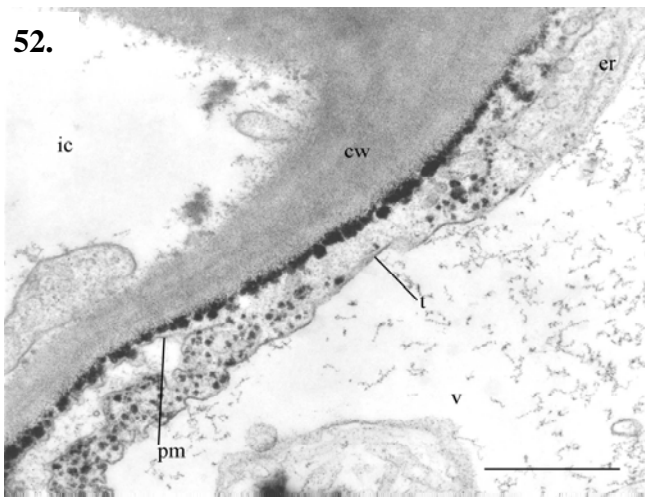
50. ábra  
A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detektálása sejtekben Ce módszerrel: desztillált vizes kontroll sejt részlete. cw = sejtfal, m = mitokondrium, v = vakuolum. Bar = 500 nm.



51. ábra

A  $H_2O_2$  detektálása sejtekben Ce módszerrel: desztillált víz + cérium kezelt kontroll sejt részlete. cw = sejtfa, er = endoplazmás retikulum, m = mitokondrium, p = plasztisz, pm = plazmamembrán, t = tonoplaszt, v = vakuolum. Bar = 500 nm.

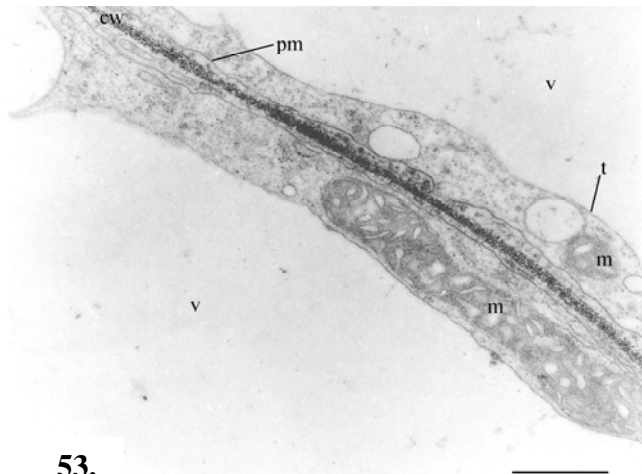
Erős citokémiai festődés volt tapasztalható a BC kezelt sejtekben a kezelést követően 30 perccel, 4 és 8 órával. A cérium perhidroxid csapadék főként a plazmamembrán külső részén (pl. 30 perces mintában, 52. ábra) vagy a sejtfaiban jelent meg (pl. a 8 órás mintában, 53. ábra). Bizonyos esetekben (pl. 30 perces minták) citokémiai pozitív granulák voltak detektálhatók a citoplazmában. Gyakran olyan elrendezésben, ami egyfajta exocitotikus folyamatra emlékeztet (52. és 59-60. ábrák).



52. ábra

A  $H_2O_2$  detektálása sejtekben Ce módszerrel: BC elicitált (30 perc) sejt részlete. cw = sejtfa, er = endoplazmás retikulum, ic = intercelluláris tér, pm = plazmamembrán, t = tonoplaszt, v = vakuolum. Bar = 500 nm.





53. ábra

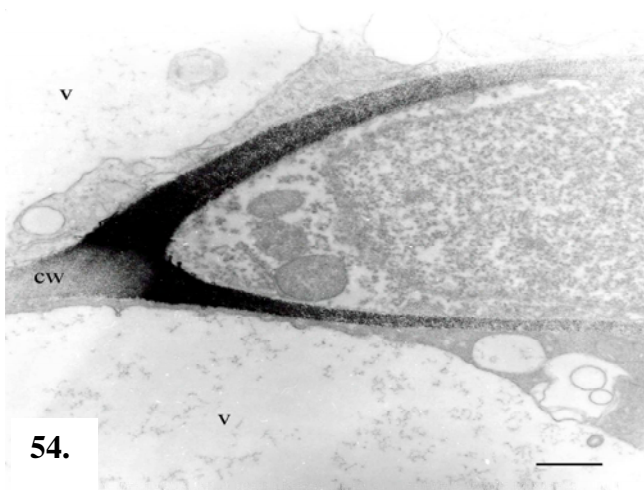
A  $H_2O_2$  detektálása sejtekben Ce módszerrel: BC elicítált (8h) sejt részlete.

cw = sejtfa, m = mitokondrium, pm = plazmamembrán, t = tonoplast, v = vakuolum.  
Bar = 500 nm.

53.

Nem volt detektálható  $H_2O_2$  termelődés a peroxiszómákban, mitokondriumban, plasztiszokban és a központi vakuoláris térben (az erre vonatkozó adatok nem kerülnek itt bemutatásra).

A JA kezelést követően erős reakció volt észlelhető a 4 és 8 órás mintákban (54. ábra).



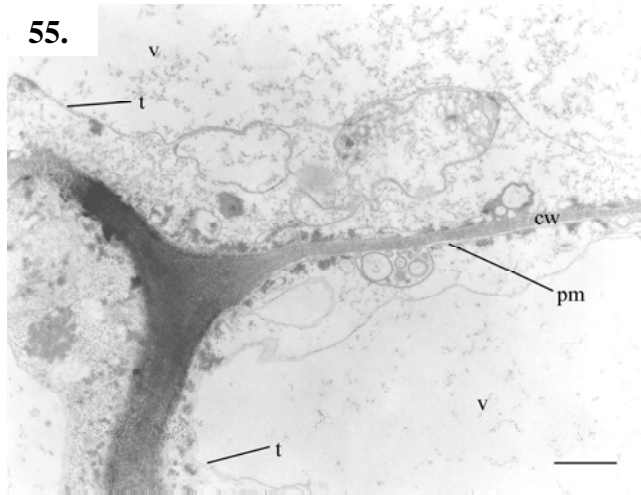
54. ábra

A  $H_2O_2$  detektálása sejtekben Ce módszerrel: JA elicítált (8h) sejt részlete.

cw = sejtfa, v = vakuolum.  
Bar = 500 nm.

54.

A SA elicítálást követően is kimutatható volt a  $H_2O_2$  termelődés a kezelt sejtekben, azonban a sejtek citoplazmájának erősen dezorganizált megjelenése, granulált citoplazmája már a korai mintákban is szembevető (55. ábra).

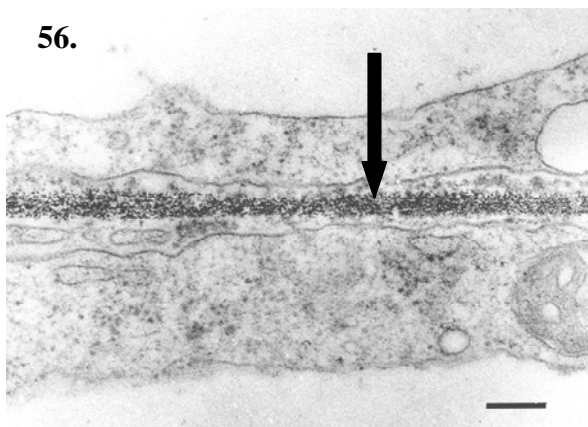


55. ábra  
A  $H_2O_2$  detektálása sejtekben  
Ce módszerrel: SA elicitált  
(2h) sejt részlete.  
cw = sejtfa, pm =  
plazmamembrán, t =  
tonoplaszt, v = vakuolum.  
Bar = 500 nm.

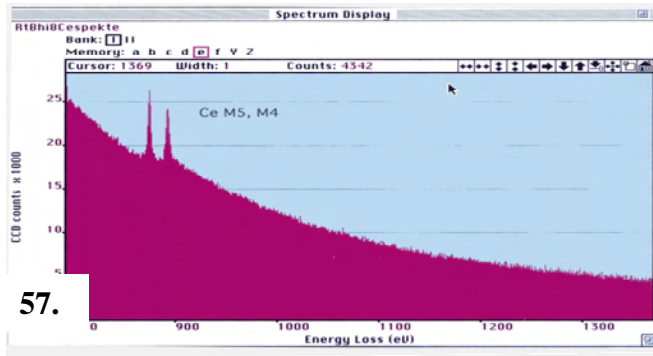
TEM vizsgálatokkal követni lehetett a fluoriméteres mérésekből kapott  $H_2O_2$  termelődési kinetikát, így az eredményeket más detektálási módszerrel is megerősítettük. Az ultrastrukturális megfigyelések ezen túlmenően új információkat adtak a citokémiai reakció topológiájáról, lokális jellegéről. Mindig csak a sejtek egyes részletei festődtek, soha nem láttunk  $H_2O_2$  termelődést jelző Ce csapadék kiválását az egész sejt felszínen.

#### 5.2.6. A $H_2O_2$ termelés lokális jellegének megerősítése EELS használatával

Az EELS vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a cérium tartalmú csapadék (tehát a  $H_2O_2$  reakciótermék) megjelenése a kezelt sejtekben specifikus. A citokémiai precipitátum spektruma a cérium standardra jellemző energia veszteségi jellemzőket (csúcsokat) mutatta (56-58. ábra)



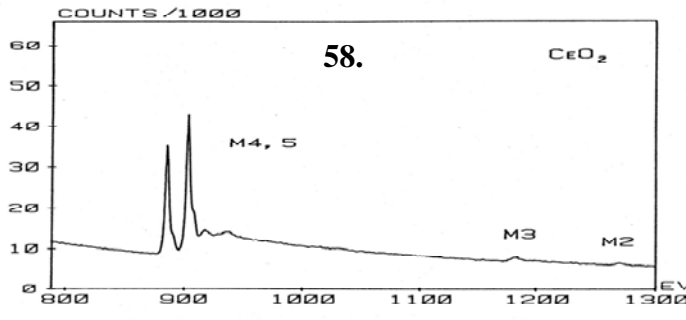
56. ábra.  
A cérium perhidroxid citokémiai  
precipitátum vizsgálata (a hidrogén  
peroxid elhelyezkedése) a sejtben.  
BC elicitált (8 óra) sejt részlete. A  
nyíl az EELS vizsgálat helyét  
mutatja.  
Bar = 500nm.



57.

57. ábra.

Az 56. ábrán nyíllal jelölt terület EELS spektruma a jól látható Ce M4 és M5 csúcsokkal.

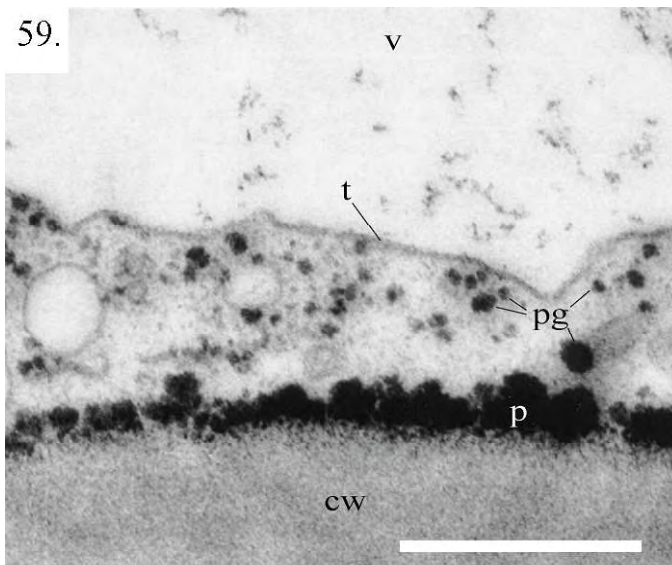


58.

58. ábra. CeO<sub>2</sub> standard EELS spektruma, a karakterisztikus Ce M4 és M5 csúcsokkal.

A citoplazma elektron denz partikulumokat és vezikulákat tartalmazott, de az utóbbiakból nem mindegyik hordozott cérium perhidroxid csapadékot is. A citokémiai festődés 30 perc BC kezelés után a plazmamembrán környékén, a citoplazma ehhez közeli granulásban volt látható, valamint később a sejtfal behatárolt régióiban is megjelent. Az elemterképek megerősítették ezeket a megfigyeléseket. Az elkészített elemterképeken a világos foltok a cérium tartalmú régiókat jelölik, melyek a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-specifikus citokémiai reakció termékeiből származnak (59-60. ábra).

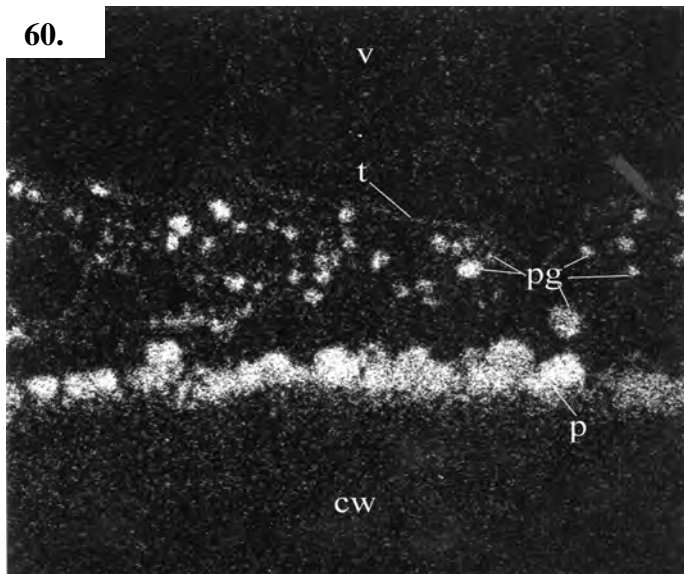
59.



59. ábra.

BC elicált sejt (30 perc) elektronmikroszkópos részlete. cw = sejtfal, p = precipitátum, pg = precipitátum jellegű granulomok, t = tonoplaszt, v = vakuolum. Bar = 500nm.

60.



60. ábra.

Az 59. ábrán látható sejtrészlet cérium elemterképe.

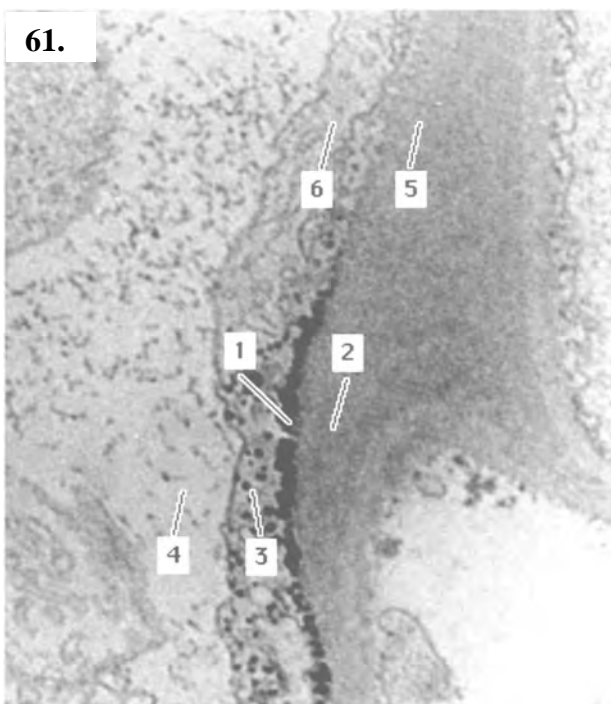
A világosan ábrázolódó részek jelölik a cérium tartalmú helyeket a mintában.

cw = sejtfal, p = (cérium tartalmú) precipitátum, pg = precipitátum jellegű granulumok, t = tonoplaszt, v = vakuolum.

Méretarány: mint 59. ábrán

A citokémiai festődés elhelyezkedése, kiterjedése lokális jelleget mutatott. A csapadék megjelenése független volt a sejteket minden irányból egyformán érintő külső szignáloktól (BC, JA, SA). Egész sejtfelületen kialakuló citokémiai festődést egyetlen sejten sem tudtunk megfigyelni. BC, SA, JA kezelésekkor nem találtunk festődést a vakuolumokban és a citoplazma organelumaiban sem. A cérium jelölődés lokális voltát demonstrálja a 61-62. ábra. A 61. ábrán számok jelölik azon helyeket, ahol EELS segítségével megmértük az egyes körülírt területek energiaveszteségi spektrumait. Ezen spektrumokat a 62. ábra szemlélteti.

61.

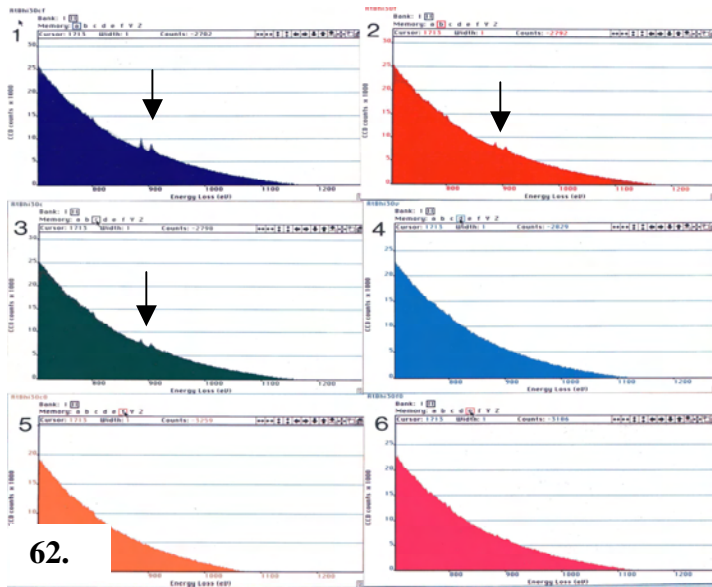


61. ábra.

BC elicítált (30 perc) sejt részlete (TEM).

A számok azokat a helyeket jelölik, amelyekről EELS spektrumokat készítettünk.

Az 1-2-3.-as areák a citokémiai precipitátumok területén találhatóak, míg a 4-5-6-os areák azoktól kissé távolabb (vakuolumban, citoplazmában és sejtfalban).



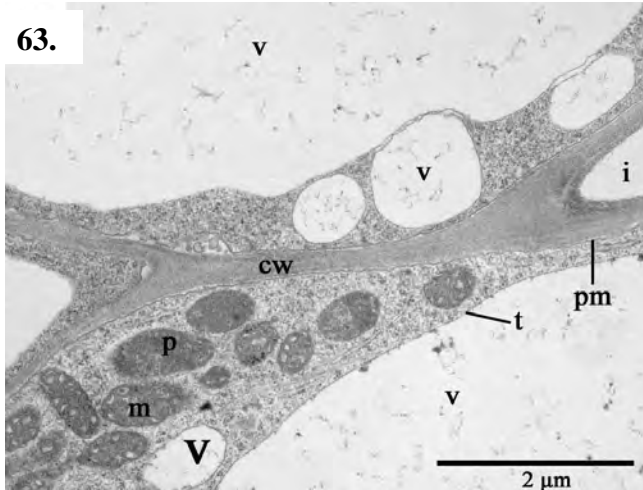
62. ábra.  
 A 61. ábrán számmal jelölt areák EELS spektrumai. A nyilak a cérium karakterisztikus M4 és M5 csúcsait jelölik. Csak az 1-2-3-as számmal jelölt helyeken sikerült cériumot kimutatni.

### 5.2.7. Gátlók hatása a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelés ultrastrukturális megjelenésére

#### 5.2.7.1. Lítium klorid előkezelést követő BC elicitalás

A desztillált vizes kontroll minták nem tartalmaztak citokémiai festődést, és az 50-51. ábrához hasonló megjelenést mutattak. A 20 mM lítium kloriddal kezelt minták esetében 50 perc után esetenként egyes helyeken nagyon enyhe festődés jelent meg finom granulumok formájában (néhol a citoplazma plazmamembrán környéki részein festődött, kismértékben a sejtfalban az intercellulárisok környékén) (63. ábra).

63.



63. ábra.

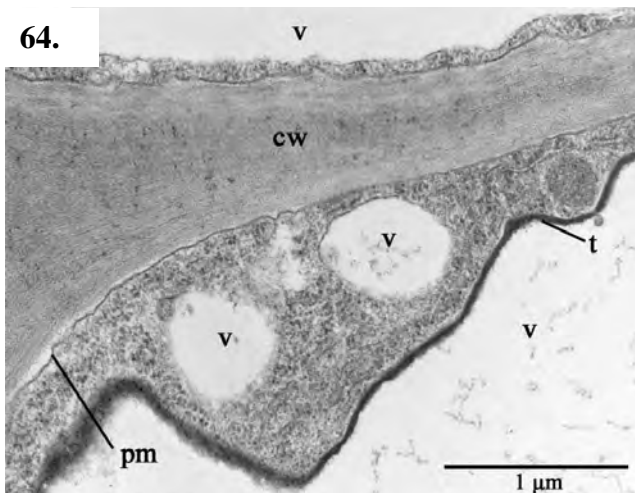
20 mM lítiummal kezelt sejt részlete (50 perc).

cw = sejtfal, i = intercelluláris, m = mitokondrium, p = plasztisz, pm = plazmamembrán, t = tonoplaszt, v = vakuolum.

(a sejtfal jobb oldali részén, az intercelluláris melletti falrészén, enyhe festődés figyelhető meg)

A legszembeütőbb és legváratlanabb festődést az 1mM lítiummal előkezelt és BC elicítált 5 perces mintájában találtuk: a tonoplaszt környékén igen erős precipitátum felhalmozódás volt megfigyelhető, ami a reakciót mutató vakuolum tonoplasztjának teljes felületén látható volt (64. ábra). Azonban voltak olyan vakuolumok is a sejtben, akár ugyanabban is, ahol a festődés hiányzott.

64.

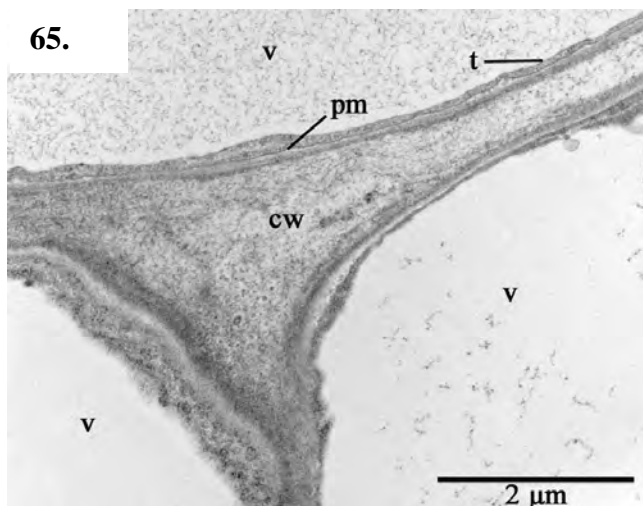


64. ábra. 1mM lítiummal előkezelt BC elicítált sejt részlete (5 perc).

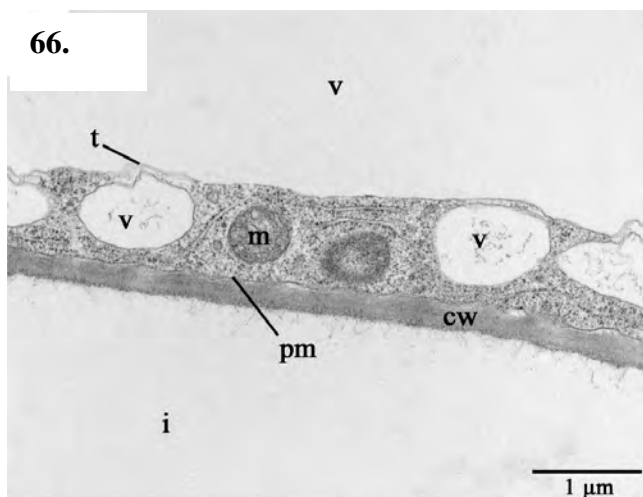
cw = sejtfal, pm = plazmamembrán, t = tonoplaszt, v = vakuolum.

Ugyanezen kezelés későbbi mintavételeinél nem volt megfigyelhető festődés a tonoplaszt környékén. Az 1mM előkezelt elicítált mintákra jellemző volt, hogy a festődés minden esetben gyengébben látszott, mint a csak BC elicítált minták esetén, valamint a citokémiai reakció terméke itt is csak limitált helyeken fordult elő. A festődés mértéke megközelítőleg arányos volt a kvantitatív adatok esetén tapasztalt  $H_2O_2$  termelődés mértékével. A 20mM lítiummal előkezelt BC elicítált esetben nem

volt tapasztalható festődés a tonoplaszt környékén egyik mintában sem. 5 perc elteltével valamivel erősebb festődés volt tapasztalható a sejtfal egyes helyein (65. ábra). Hasonlóan az 1mM előkezelt mintákhoz, az intenzitás itt is párhuzamba állítható volt a kvantitatív eredményekkel, s a későbbi időpontokban a precipitátum szinte teljesen hiányzott (66. ábra, összevetésre 40. ábra).

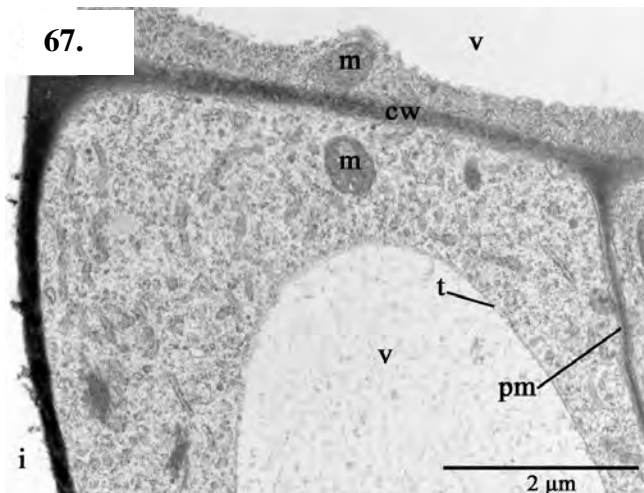


65. ábra. 20 mM LiCl előkezelt BC elicítált sejt részlete (5 perc). cw = sejtfal, pm = plazmamembrán, t = tonoplaszt, v = vakuolum.



66. ábra. 20 mM LiCl előkezelt BC elicítált sejt részlete (50 perc). cw = sejtfal, i = intercelluláris tér, m = mitokondrium, t = tonoplaszt, v = vakuolum.

Az 1 és 20mM lítiummal előkezelt és BC elicítált mintákban 240 perc elteltével erősebb, de kis gyakorisággal előforduló festődés jelentkezett (67. ábra).

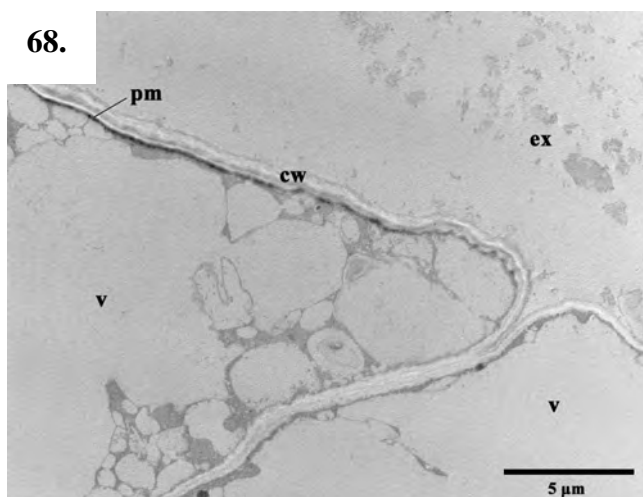


67. ábra.  
20mM lítiummal előkezelt BC elicált sejt részlete (240 perc).  
cw = sejtfa, m = mitokondrium,  
pm = plazmamembrán, t = tonoplaszt, v = vakuolum.

#### 5.2.7.2. A 2-APB előkezelést követő BC elicálás

A 2-APB és egyéb gátlók hatásait a BC elicált sejtek  $H_2O_2$  termelésére ugyanazzal a cériumos citokémiai módszerrel vizsgáltuk, mint a lítium kezelések esetében, de mivel irodalmi adatok alapján erősebb gátló hatás (e miatt gyengébb citokémiai reakció) volt várható, a jobb detektálás érdekében (azért, hogy a kontrasztosítás ne maszkírozza a megjelenő citokémiai terméket) nem kontrasztosított mintákat (és kontroll mintákat) vizsgáltunk.

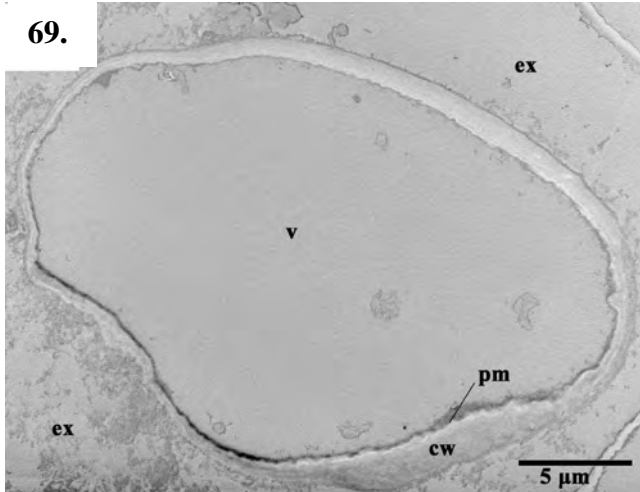
A nem kontrasztosított, desztillált vízzel kezelt minták nem tartalmaztak citokémiai festődést. A nem kontrasztosított BC kezelt minták jellegzetes festődést mutattak (68-69. ábra). A festődés jellege és erőssége megfelelt az 5.2.5. fejezetben leírtaknak.



68. ábra.  
BC elicált sejt részlete (nem kontrasztosított, 10 perc).  
cw = sejtfa, ex = extracelluláris tér, pm = plazmamembrán, v = vakuolum.



69.

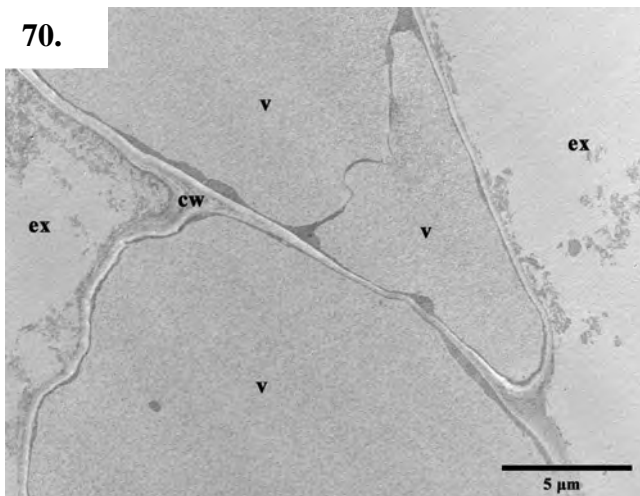


69. ábra.

BC elicált sejt részlete (nem kontrasztzott, 60 perc).  
cw = sejtfal, ex =  
extracelluláris tér, pm =  
plazmamembrán, v =  
vakuolum.

Az önmagában történő 2-APB kezelés (mock kontroll) a sejtek  $H_2O_2$  termelését nem növelte (42-43. ábra), nem volt kimutatható citokémiai festődés (70. ábra).

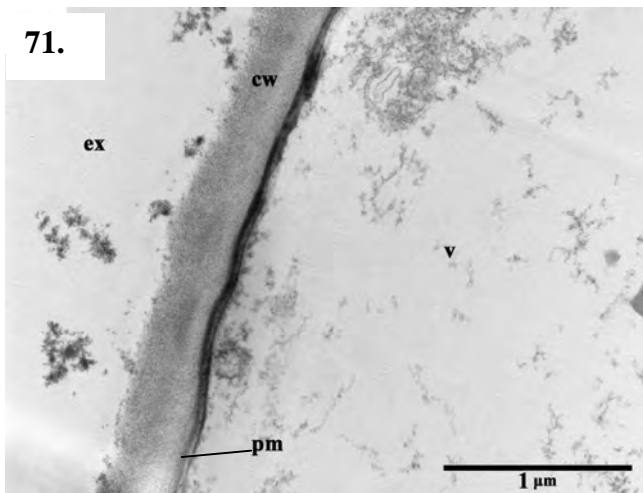
70.



70. ábra.

15 μM 2-APB mock kontroll  
kezelt sejt részlete (nem  
kontrasztzott, 40 perc).  
cw = sejtfal, ex =  
extracelluláris tér, v =  
vakuolum.

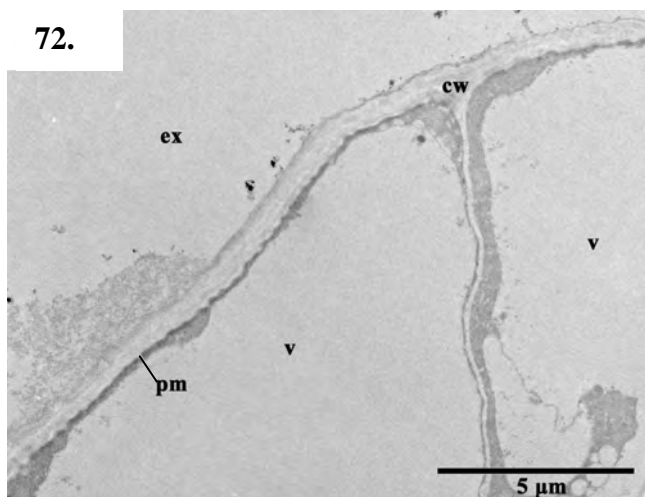
A 2-APB előkezelt BC elicált sejtek  $H_2O_2$  termelésére jellemző volt, hogy a rövidebb időknél (0-30 perc) nagyon gyenge festődés volt megfigyelhető, 40 perc környékén gyenge, de egyértelmű festődés volt látható (az apoplastikus oldalon is) (71. ábra). A későbbi időpontokban (90-240 perc) a festődés szinte teljesen hiányzott.



71. ábra.  
15  $\mu\text{M}$  2-APB előkezelt, BC elicítált sejt részlete (nem kontrasztzott, 40 perc).  
cw = sejtfa, ex = extracelluláris tér, pm = plazmamembrán, v = vakuolum.

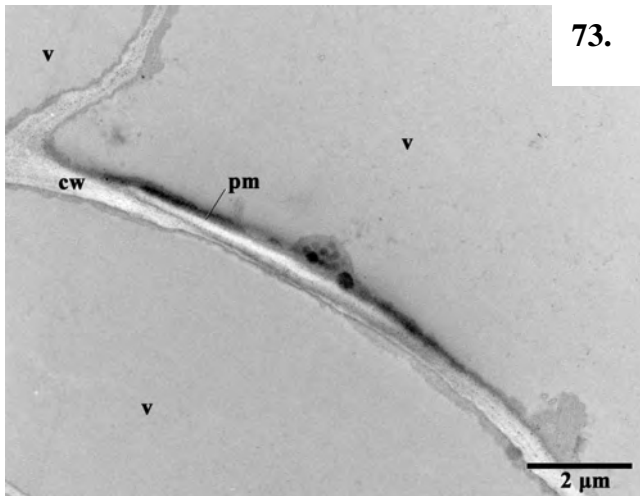
### 5.2.7.3. Neomicin előkezelést követő BC elicitálás

Mivel a 125  $\mu\text{M}$  és 250  $\mu\text{M}$  mennyiségekkel történő kezelés nem volt jelentős hatással a sejtek  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelésére (46.-47. ábra), a mock kontroll TEM vizsgálatokat csak a 250  $\mu\text{M}$ -os előkezeléssel végeztük. A neomicin kezelés önmagában nem okozott látható  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelődést a sejtekben a vizsgált időtartamban (72. ábra).

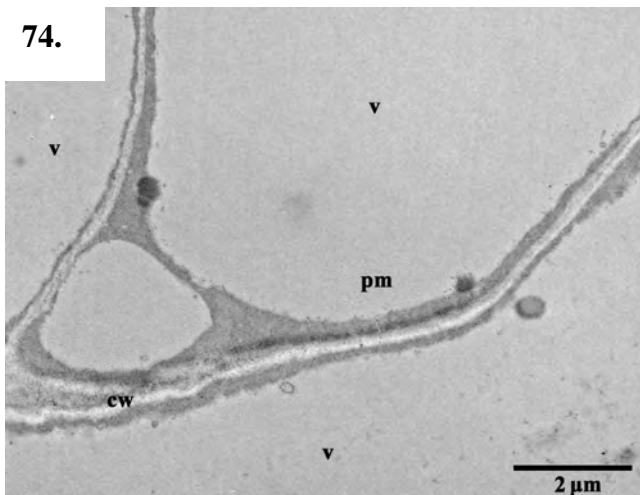


72. ábra.  
250  $\mu\text{M}$  neomicin szulfáttal előkezelt sejt részlete (nem kontrasztzott, 60 perc).  
cw = sejtfa, ex = extracelluláris tér, pm = plazmamembrán, v = vakuolum.

A neomicin előkezelt, BC elicítált mintákra általában jellemző volt, hogy gyenge és kevés helyen felfedezhető festődést tartalmaztak, amely festődés megjelenése illeszkedett a kvantitatív eredmények időbeli és intenzitásbeli értékeihez. A 125  $\mu\text{M}$ -os mintákban a festődés valamelyest erősebb volt (73. ábra), mint az erősebb gátlást okozó 250  $\mu\text{M}$ -os kezeléseknél (74. ábra).



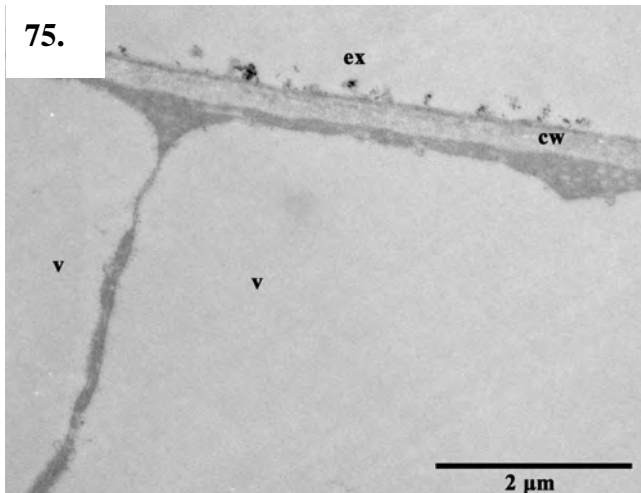
73. ábra.  
125 µM neomicin szulfáttal előkezelt, BC elicítált sejt részlete (nem kontrasztzott, 60 perc).  
cw = sejtfa, pm = plazmamembrán, v = vakuolum.



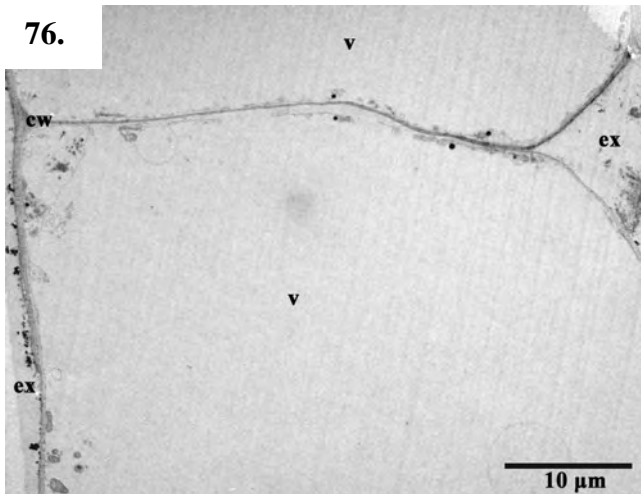
74. ábra.  
250 µM neomicin szulfáttal előkezelt, BC elicítált sejt részlete (nem kontrasztzott, 60 perc).  
cw = sejtfa, pm = plazmamembrán, v = vakuolum.

#### 5.2.7.4. Lantán (III) klorid előkezelést követő BC elicitálás

A lantán (III) klorid mock kontroll mintákban nem volt detektálható citokémiai precipitátum. A lantán előkezelt BC elicítált mintákban a várakozásnak megfelelően 10 perccel az elicitálás után nem lehetett citokémiai precipitátumot kimutatni (75. ábra). A 20 perces mintában a kvantitatív eredményeknek megfelelően (44. ábra) gyenge festődés volt detektálható (76. ábra).

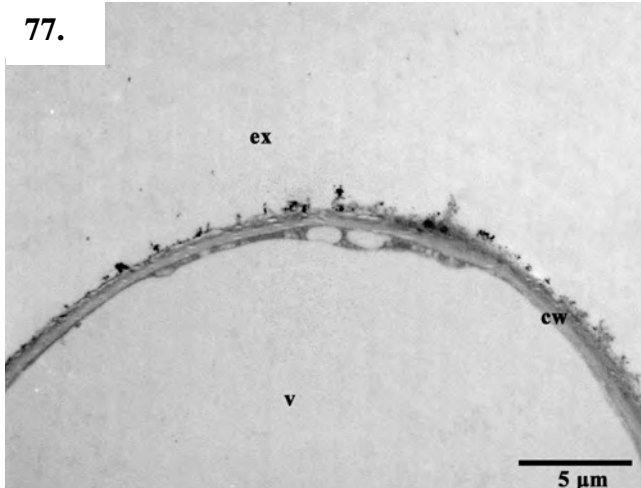


75. ábra.  
500 mM LaCl<sub>3</sub>-al előkezelt BC elicítált sejt részlete (nem kontrasztosított, 10 perc).  
cw = sejtfa, ex = extracelluláris tér, v = vakuolum.



76. ábra.  
500 mM LaCl<sub>3</sub>-al előkezelt BC elicítált sejt részlete (nem kontrasztosított, 20 perc).  
cw = sejtfa, ex = extracelluláris tér, v = vakuolum.  
(gyenge festődés látható a kép jobb felső részletében)

A későbbi mintákban esetenként igen gyenge festődés jelent meg, és az apoplastikus oldalon is látható precipitátum (77. ábra). A kapott eredmények jelzik, hogy a lantán előkezelt BC elicítált minták H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tartalmának ultrastrukturális megjelenése összhangba hozható a kvantitatív eredményekkel.

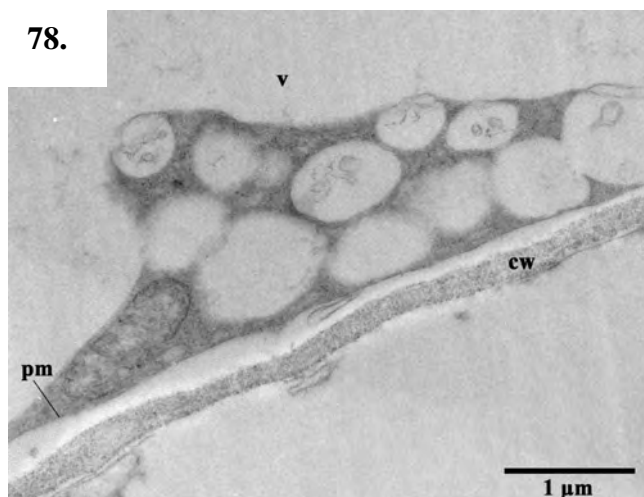


77. ábra.  
500 mM  $\text{LaCl}_3$ -al előkezelt, BC elicított sejt részlete (nem kontrasztosított, 40 perc).  
cw = sejtfa, ex = extracelluláris tér, v = vakuolum.

#### 5.2.7.5. A nifedipin előkezelést követő BC elicitálás

A nifedipin kezelés önmagában nem okozott detektálható citokémiai precipitátum felhalmozódást a vizsgált időintervallumban.

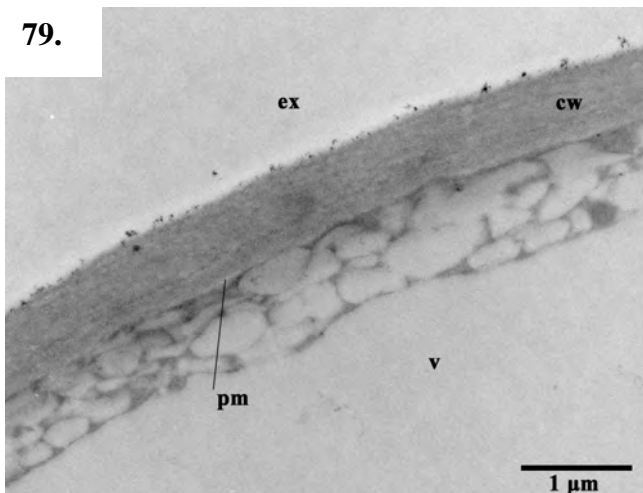
A nifedipinnel előkezelt 5 perces BC elicított mintákban (78. ábra) nem lehetett festődést észlelni, annak ellenére, hogy a kvantitatív eredmények alapján ezt vártuk (48. ábra).



78. ábra.  
80  $\mu\text{M}$  nifedipinnel előkezelt BC elicított sejt részlete (nem kontrasztosított, 5 perc).  
cw = sejtfa, pm = plazmamembrán, v = vakuolum.

A 10 perces mintákban szintén, de előre sejthetően, nem volt detektálható citokémiai precipitátum (79. ábra). A 40 perces mintákban a sejtfa apoplasztikus oldalán enyhe festődés jelent meg, amely esetenként a sejtfa belsőbb részeiben is detektálható volt (80. ábra). A további időpontokban vett mintákban nem volt jellemző a citokémiai precipitátumok jelenléte, illetve egy-egy esetben jelentek meg nagyon enyhe jelleggel.

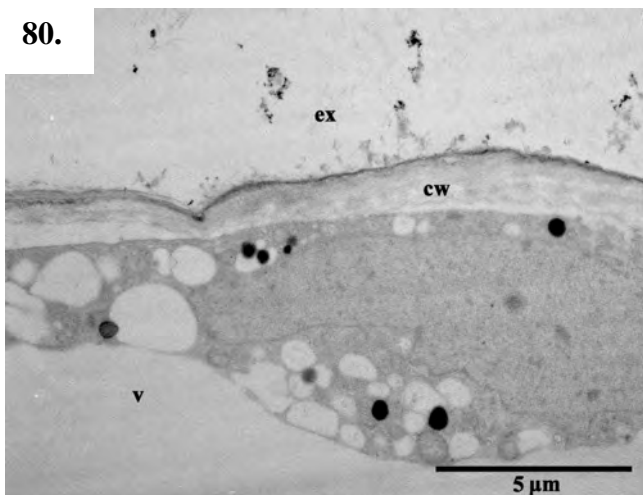
79.



79. ábra.

80  $\mu$ M Nifedipinnel előkezelt BC elicítált sejt részlete (nem kontrasztosított, 10 perc).  
cw = sejtfal, ex = extracelluláris tér,  
pm = plazmamembrán, v =  
vakuolum.

80.



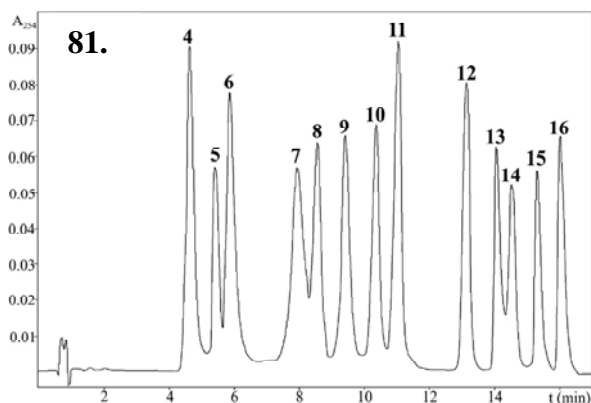
80. ábra.

80  $\mu$ M Nifedipinnel előkezelt BC elicítált sejt részlete (nem kontrasztosított, 60 perc).  
cw = sejtfal, ex = extracelluláris  
tér, v = vakuolum.

### 5.3. A KÜLÖNBÖZŐ ELICITOROK HATÁSA A SEJTEK ANTRAKINON TERMELÉSÉRE

#### 5.3.1. Az antrakinon-származékok azonosítása

Az antrakinon származékok azonosításához a standardok oldatait injektáltuk, majd meghatároztuk retenciós idejüket, Uv-Vis spektrumukat (81. ábra), és a tömegdetektorral mérhető molekulaionok, valamint további fragmensek m/z értékeit. A 3. táblázatban a rhizómában/sejtszuszpenziós kultúrákban kimutatható anyagok standardjait (62-63) foglaltuk össze, feltüntetve szerkezetüket és molekulatömegüket. Vastagon szedett betűvel jelöltük azon származékokat, melyeket saját sejtszuszpenziós kultúrákban is azonosítottunk.

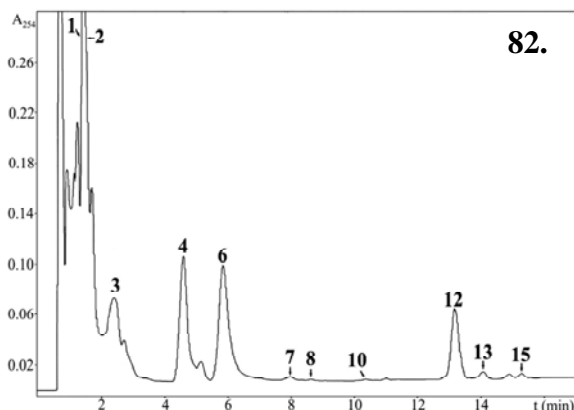


81. ábra.  
Standard antrakinon keverék HPLC kromatogramja Uv-Vis detektorral mérve ( $\lambda=254$  nm). A számok megfelelőit lásd a 3. Táblázatban.

3. Táblázat a *Rubia tinctorum* rhizómában/szuszpenziós kultúrában előforduló antrakinon-származékok. Az 1. táblázatban 8-as számmal jelölt származékot nem sikerült azonosítani. A vastagon szedett származékokat sikerült azonosítani a saját szuszpenziós kultúrákban is.

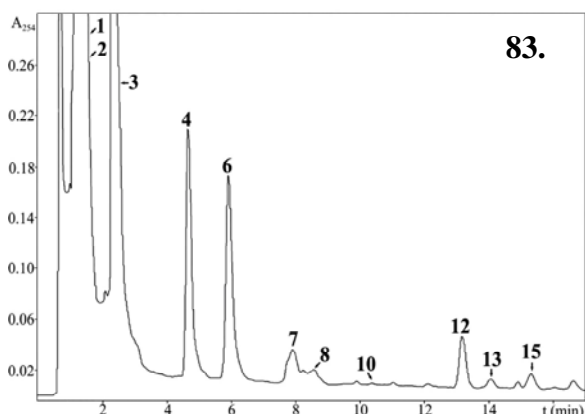
Szám (kromatogramokon jelölve)	Származék	R1	R2	R3	R4	Molekulatömeg
<b>1. Lucidin primeverozid</b>		OH	CH <sub>2</sub> OH	O-Pr*	H	564
<b>2. Ruberitrinsav</b>		OH	O- Pr*	H	H	534
<b>3. Pszeudopurpurin</b>		OH	COOH	OH	OH	300
<b>4. Lucidin</b>		OH	CH <sub>2</sub> OH	OH	H	270
5. 2-hidroxi-antrakinon		H	OH	H	H	224
<b>6. Alizarin</b>		OH	OH	H	H	240
<b>7. Purpurin</b>		OH	OH	H	OH	256
9. Lucidin-metiléter		OH	CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>	OH	H	284
<b>10. Alizarin-2-metiléter</b>		OH	OCH <sub>3</sub>	H	H	254
11. Antrakinon		H	H	H	H	208
<b>12. Lucidin-<math>\omega</math>-etil éter</b>		OH	CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OH	H	298
<b>13. Nordamnacanthal</b>		OH	CHO	OH	H	268
14. 1-hidroxi-antrakinon		OH	H	H	H	224
<b>15. Munjistin-etilészter</b>		OH	COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OH	H	312
16. Quinizarin		OH	H	H	OH	240

A 82. ábrán egy kontroll (desztillált víz hozzáadásával „kezelt”) sejtszuszpenzióból származó minta reprezentatív HPLC kromatogramja látható.



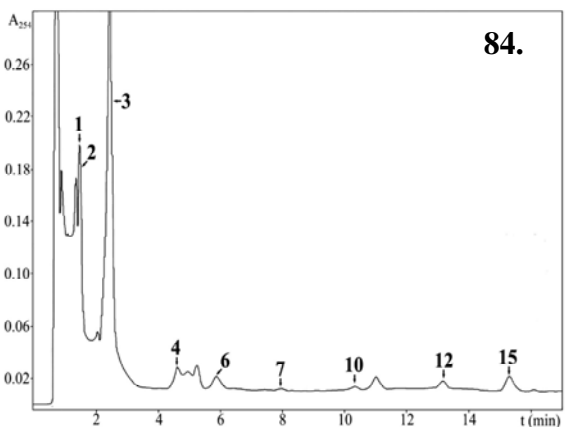
82. ábra.  
Kontroll (desztillált vizes)  
sejtszuszpenziós kultúra mintájának  
HPLC kromatogramja Uv-Vis  
detektorral mérve ( $\lambda=254$  nm). A  
számok megfelelői a 3. Táblázatban  
vannak feltüntetve.

A 83. ábrán egy CV1 elicitált sejtszuszpenzióból származó, az elicitálást követő 7. napon vett minta jellemző HPLC kromatogramja látható.



83. ábra.  
CVI elicitált (7 napos)  
sejtszuszpenziós kultúra jellemző  
mintájának HPLC kromatogramja  
Uv-Vis detektorral mérve ( $\lambda=254$   
nm). A számok megfelelői a 3.  
Táblázatban vannak feltüntetve.

A 84. ábrán egy JA2 elicitált sejtszuszpenzióból származó, az elicitálást követő 7. napon vett minta reprezentatív HPLC kromatogramja látható.

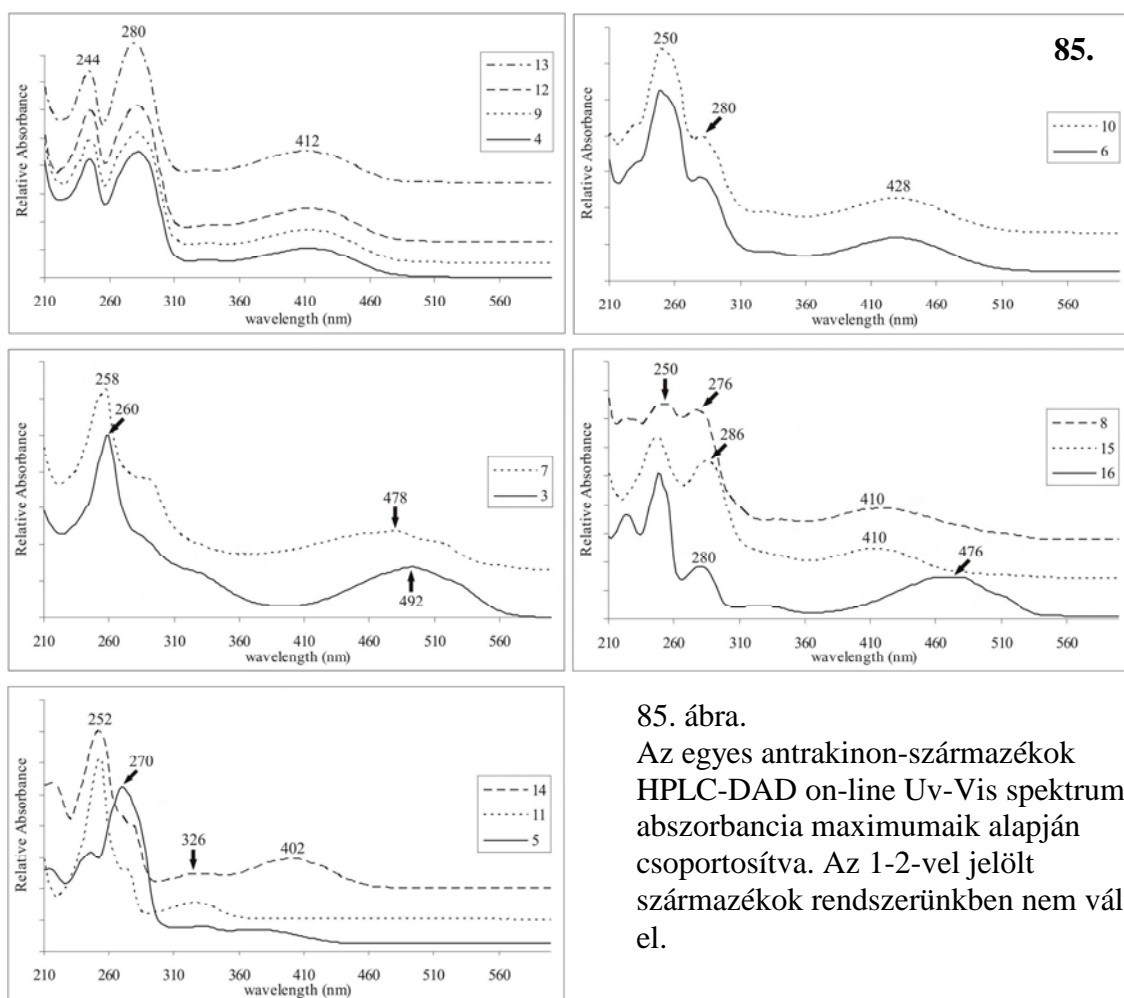


84. ábra.  
JA2 elicitált (7 napos) sejtszuszpenziós  
kultúra mintájának HPLC  
kromatogramja Uv-Vis detektorral  
mérve ( $\lambda=254$  nm). A számok  
megfelelői a 3. Táblázatban vannak  
feltüntetve.



A 82-84. ábrákon látható, hogy az egyes kezelések jelentős mértékben befolyásolják az antrakinon-származékok mennyiségét és az antrakinon összetételt.

Az antrakinon származékok mintákban történő azonosítása egyfelől a standard anyagok Uv-Vis spektrumai alapján (85. ábra), másfelől az antrakinon-származékok tömegspektrumai alapján történtek (86. ábra). Az Uv-Vis spektrumok alapján csoportosíthatók a vizsgált molekulák, így pl. a lucidin (4-es számmal jelölt), lucidin-metiléter (9-es számmal jelölt), lucidin- $\omega$ -etiléter (12-es számmal jelölt), valamint a nordamnacanthal (13-as számmal jelölt) három specifikus maximummal rendelkeznek: 244, 280, és 412 nm-nél.



85. ábra.

Az egyes antrakinon-származékok HPLC-DAD on-line Uv-Vis spektrumai, abszorbancia maximumaik alapján csoportosítva. Az 1-2-vel jelölt származékok rendszerünkben nem váltak el.

A tömegspektrumok elemzése során főként a protonált ( $m/z = [M+H]^+$ ) és/vagy Na-kationizált molekulaionok ( $m/z = [M+Na]^+$ ) formájában voltak

azonosíthatók a vizsgált antrakinon-származékok (86.ábra). Ezek alapján a sejtszuspenziós kultúrákban azonosítható antrakinon-származékok (melyek a 3. táblázatban vastagon szedettek) a következő molekulaionokkal rendelkeztek (86. ábra):

1+2: lucidin primverozid ( $M_w = 564$ );  $m/z = [\text{MNa}]^+ = 587.1$  + ruberitrinsav

( $M_w = 534$ );  $m/z = [\text{MNa}]^+ = 557.1$ ;

3: pszeudopurpurin ( $M_w = 300$ );  $m/z = [\text{MNa}]^+ = 301.1$ ;

4: lucidin ( $M_w = 270$ ),  $m/z = [\text{MH} - \text{H}_2\text{O}]^+ = 253.0$ ;  $m/z = [\text{MNa} - \text{H}_2\text{O}]^+ = 275.0$ ;

$m/z = [\text{MNa}]^+ = 293.0$ ;

6: alizarin ( $M_w = 240$ ),  $m/z = [\text{MH}]^+ = 241.0$ ;

7: purpurin ( $M_w = 256$ ),  $m/z = [\text{MH}]^+ = 256.9$ ;

8: ismeretlen ( $M_w = 418$ , presumably),  $m/z = [\text{MH}]^+ = 419.0$ ;  $m/z = [\text{MNa}]^+ = 441.1$ ;

10: alizarin-2-metiléter ( $M_w = 254$ ),  $m/z = [\text{MH}]^+ = 255.0$ ;

12: lucidin- $\omega$ -etiléter ( $M_w = 298$ ),  $m/z = [\text{MH} - (\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})]^+ = 253.0$ ;

$m/z = [\text{MNa} - (\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})]^+ = 275.0$ ;  $m/z = [\text{MNa}]^+ = 321.1$ ;

13: nordamnacanthal ( $M_w = 268$ ),  $m/z = [\text{MH}]^+ = 269.0$ ;  $m/z = [\text{MNa}]^+ = 291.0$ ;

15: munjistin-etilészter ( $M_w = 312$ ),  $m/z = [\text{MH}]^+ = 313.0$ ;

$m/z = [\text{MH} - (\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})]^+ = 267.0$ ;  $m/z = [\text{MNa} - \text{H}_2\text{O}]^+ = 319.0$ ;

$m/z = [\text{MNa}]^+ = 335.0$ .

### 5.3.2 Az antrakinon-származékok mennyiségi meghatározása

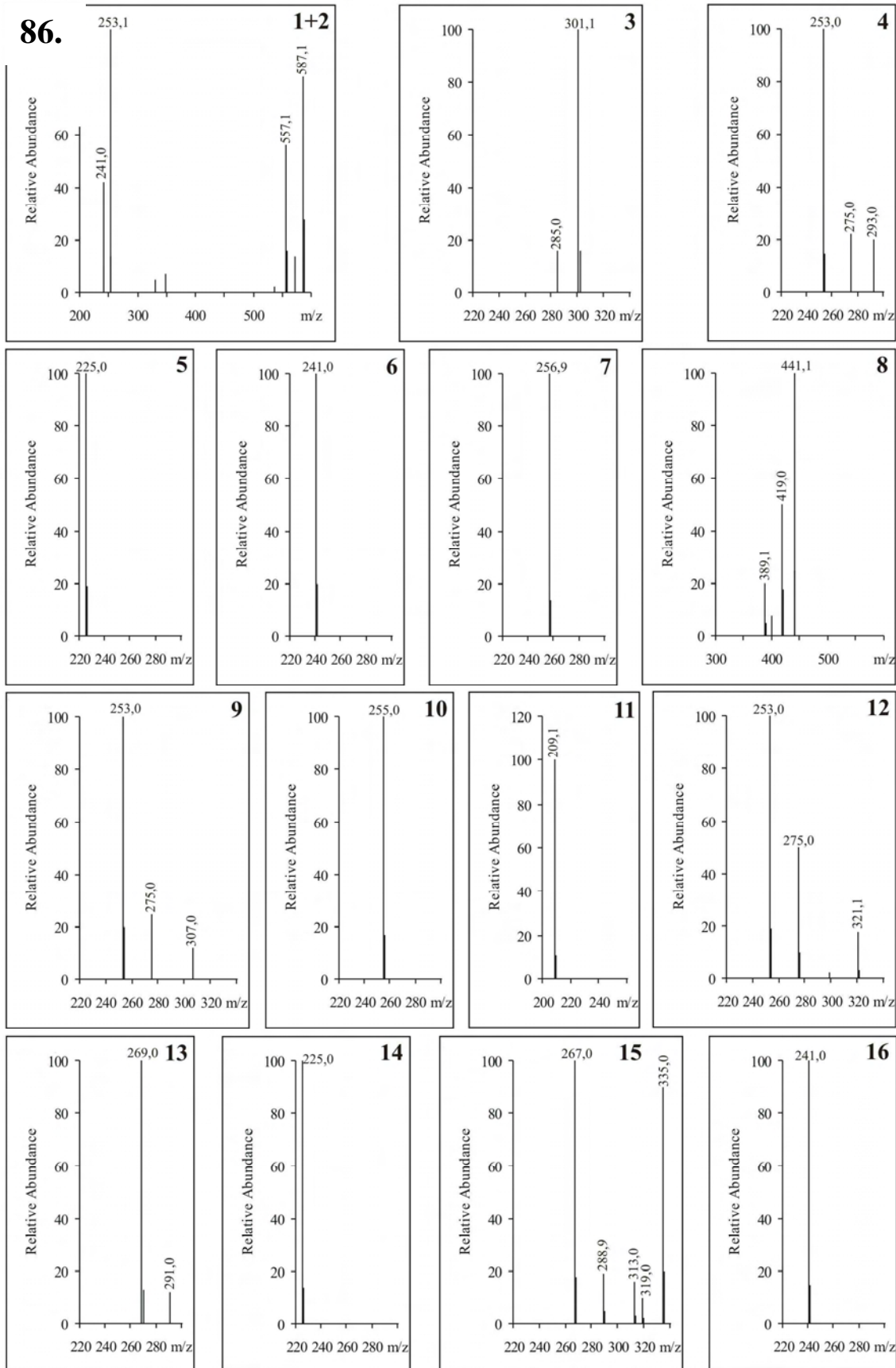
Az antrakinon-származékok mennyiségi meghatározása során a relatív standard deviáció (RSD) átlagértéke 4.46 % volt, az RSD 2.59-6.5 % között mozgott (4. Táblázat).

### 5.3.3. Az elicitálás hatása az antrakinon-származékok termelésére

Az elicitálást követő időintervallum (1-10 nap) alatt a vizsgált antrakinon-származékok mennyisége a kontroll (desztillált vizes) mintákban a mérések hibahatárán belül változott. Az antrakinon-származékok termelésének összehasonlíthatósága érdekében először az optimális elicitálási időt határoztuk meg. A kezdeti biztató eredmények alapján a CV1 elicítort választottuk ki az elicitálási idő optimalizálásához.

A CV1 elicítást követően 1, 2, 5, 7, 10 nappal határoztuk meg az antrakín szarmazékok mennyiségét a mintákban (4. táblázat). Az eredmények azt mutatták, hogy az elicítás optimális ideje 7 nap, ezek után a többi minta antrakín tartalmát 7 nap elteltével határoztuk meg.

Az összes antrakín tartalmat figyelembe véve elmondható, hogy gombapoliszacharidok eredményezték a legnagyobb antrakín termelést a sejtszuszpenziós kultúrákban. A gomba eredetű elicitorok hatékonysága a következő volt: CV1>CV2>CV3>BC, mely számokban kifejezve (az előbbi sorrendet alapul véve) 262.0, 182.9, 148.5, és 107.7 mg g<sup>-1</sup> (4. Táblázat). Összehasonlításként a desztillált vízzel kezelt kultúrák összes antrakín tartalmának átlagos mennyisége 72.5 mg g<sup>-1</sup> volt, míg a gyökérminták összes antrakín tartalma 82.8 mg g<sup>-1</sup>-nek adódott. Megállapítható tehát, hogy a gomba eredetű elicitorok jelentősen növelik a kultúrák összes antrakín tartalmát, főképpen a lucidin-primverozid, ruberitrinsav, és pszeudopurpurin komponensek mennyiségét.



86. ábra. A vizsgált antrakinon-származékok HPLC-MS online spektrumai.

Az eredmények azt mutatták, hogy a CV1-CV3 elicitorok egymáshoz hasonló hatással rendelkeztek, az összes illetve az egyes antrakinon-származékok mennyiségben tapasztalható eltérésekkel (4. táblázat).

A szignál transzdukcióban résztvevő növényi hormon molekulák hatását a következőkben lehet összefoglalni (4. táblázat):

- A hormonok kisebb mennyiségei (SA1, JA1) nem voltak eléggé hatékonyak, hogy jelentősen befolyásolják a kultúrák antrakinon termelését.
- A JA és SA a pszeudopurpurin specifikus elicitorai. A kontroll minták pszeudopurpurin tartalma átlagosan  $2.93 \text{ mg g}^{-1}$  volt, míg JA4 hatására  $84.9 \text{ mg g}^{-1}$ -ra nőtt; SA4 hatására pedig  $17.3 \text{ mg g}^{-1}$ -ra növekedett, JA3 és JA4 esetében a mért érték magasabb volt, mint a leghatékonyabb CV1 elicitoros kezelést követően.
- Mindkét elicitoroként használt hormon, még nagyobb koncentrációknál is, csökkentette a lucidin primverozid és ruberitrinsav mennyiségét, de nem egyforma mértékben (JA2-4 kezelések csökkentették a leghatékonyabban).
- Mindkét elicitor csökkentette a genotoxikus lucidin mennyiségét magasabb koncentrációban alkalmazva (JA2-4, SA2-4).
- Mindkét elicitor növelte az alizarin termelését magasabb koncentrációban alkalmazva (JA3-4, SA3-4).
- Az alizarin termelődését a kis koncentrációjú kezelések (JA1-2, SA1-2) csökkentették.

4. Táblázat. A *Rubia tinctorum* sejtszuspenziós tenyészetek különböző elicitorok hatására létrejövő antrakinon termelése összehasonlítva a gyökér antrakinon összetételével. Az értékek mg g<sup>-1</sup>-ban megadva, és a száraz súlyra vonatkoznak CV1-CV3: *Coriolus versicolor* eredetű, molekulatömeg szerint elválasztott glikoprotein elicitorok, BC: *Botrytis cinerea* eredetű elicitor, JA: jazmonsav, JA1-JA4: különböző jazmonsav koncentrációk, SA: szalicilsav, SA1-SA4: különböző szalicilsav koncentrációk. A zárójelben látható számok a relatív standard deviációt mutatják (%RSD), d: detektálható, nd: nem detektálható.

Komponensek	<i>Rubia tinctorum</i> szuszpenziós tenyészetek antrakinon összetétele																			Rubia tinctorum gyökér antrakinon összetétele
	Desztillált vízzel kezelt kontroll tenyészetek			Elicitált szuszpenziós tenyészetek																
				Coriolus eredetű elicitorral történt kezelés						BC elicitálás	Jazmonsav elicitálás				Szalicilsav elicitálás					
	CV1					CV2	CV3		JA1	JA2	JA3	JA4	SA1	SA2	SA3	SA4				
	1 nap	5nap	10 nap	1nap	2nap	5 nap	7 nap	10 nap	7 nap	7 nap	7 nap	7 nap	7 nap	7 nap	7 nap	7 nap	7 nap	7 nap	7 nap	
Lucidin primverozid + ruberitrinsav	52.5 (4.94)	55.2 (3.84)	51.0 (4.34)	55.8 (3.37)	59.6 (5.4)	63.8 (5.7)	172.4 (4.13)	165.9 (5.6)	131.4 (4.27)	110.5 (3.74)	82.6 (5.1)	37.3 (4.27)	12.2 (4.88)	10.7 (6.04)	11.8 (3.34)	44.6 (3.53)	18.5 (3.46)	17.8 (2.89)	19.2 (4.78)	57.4 (3.14)
Pseudopurpurin	2.98 (6.3)	2.76 (4.02)	3.04 (2.68)	5.6 (4.16)	9.2 (4.35)	28.0 (4.67)	60.8 (4.28)	60.2 (3.06)	25.2 (3.81)	19.2 (2.59)	10.7 (4.33)	3.12 (3.91)	48.6 (4.56)	70.3 (4.18)	84.9 (4.66)	3.79 (4.52)	10.8 (4.24)	12.6 (6.42)	17.3 (4.49)	23.3 (4.92)
Lucidin	7.2 (3.71)	7.4 (2.89)	7.1 (3.72)	7.9 (4.82)	8.8 (3.24)	12.2 (3.38)	13.1 (6.2)	12.9 (4.71)	11.9 (5.7)	7.9 (4.58)	8.0 (2.92)	6.5 (4.77)	0.36 (3.53)	0.48 (5.82)	0.5 (4.58)	7.1 (4.84)	0.76 (5.2)	0.28 (3.6)	0.26 (4.63)	0.35 (4.30)
Alizarin	6.9 (4.42)	6.7 (5.2)	6.8 (4.66)	7.6 (4.06)	8.5 (4.62)	9.9 (5.4)	10.5 (4.31)	10.1 (3.42)	9.5 (2.79)	6.4 (3.72)	2.70 (3.84)	4.22 (2.68)	0.35 (4.21)	8.3 (3.85)	10.3 (2.99)	5.8 (3.94)	0.81 (5.59)	17.1 (4.37)	16.9 (3.87)	0.92 (5.19)
Purpurin	0.23 (2.98)	0.26 (5.1)	0.23 (4.53)	0.69 (3.19)	1.20 (5.5)	1.25 (3.42)	1.30 (5.5)	1.28 (5.0)	1.20 (3.97)	1.11 (4.23)	0.23 (4.40)	0.34 (5.12)	0.20 (3.16)	0.22 (4.65)	0.28 (4.21)	0.32 (6.11)	0.23 (6.1)	0.19 (4.46)	0.24 (4.18)	0.63 (4.65)
Alizarin-2-metiléter	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	0.12 (3.84)	d	d	0.18 (5.17)	0.2 (4.12)	d
Lucidin- $\omega$ -etiléter	2.13 (5.1)	2.09 (4.74)	2.19 (4.86)	2.04 (4.69)	2.57 (3.62)	3.50 (4.14)	3.51 (3.76)	3.87 (3.38)	3.38 (6.5)	3.05 (4.72)	2.91 (3.25)	1.98 (5.36)	0.11 (4.57)	0.14 (6.23)	0.1 (5.7)	1.87 (5.27)	0.32 (5.44)	0.12 (5.39)	0.17 (5.81)	d
Nordamnacanthal	0.17 (4.79)	0.14 (5.3)	0.15 (4.78)	0.14 (5.1)	0.16 (4.06)	0.16 (4.76)	0.18 (4.84)	0.17 (6.2)	0.14 (5.9)	0.17 (4.39)	0.15 (6.1)	nd	nd	d	d	nd	nd	d	d	d
Munjistin-etilészter	d	d	d	d	d	0.18 (4.23)	0.25 (4.48)	0.23 (5.1)	0.15 (4.76)	0.13 (3.92)	d	d	0.27 (5.1)	0.25 (5.56)	0.26 (5.31)	d	0.10 (6.2)	d	d	0.2 (4.11)
Összes mért antrakinon	72.2	74.6	70.6	79.8	90.1	119.0	262.0	254.7	182.9	148.5	107.7	53.5	62.1	90.4	108.3	63.5	31.5	48.3	54.3	82.8

#### 5.4. A BC ELICITOR HATÁSA A SEJTEK MIKROTUBULÁRIS RENDSZERÉRE

A *Rubia tinctorum* sejtek mikrotubulusainak festése nem szolgáltatott értékelhető eredményt a sejtek erős autofluoreszcenciája miatt, ezért a továbbiakban a *Capsicum annuum* sejtek mikrotubuláris rendszerét tanulmányoztuk.

Az előkísérletek során megállapítottuk, hogy a sejtek mikrotubuláris rendszerének megjelenítési módjai közül az alfa tubulin festése jobb felbontást és részletgazdagabb képet eredményezett, mint a direkt  $\beta$ -tubulinnal történő festés. Ezért ezek után a vizsgálatokat már csak az alfa tubulin elleni (indirekt) antitest módszer segítségével végeztük.

A kontroll mintákban a kortikális mikrotubulusok jellemzően homogén eloszlást mutattak. A sejtmag környékén a mikrotubulusok sűrűbben helyezkednek el a sejt egyéb területeihez viszonyítva. A sejtfalhoz közeli kortikális mikrotubuláris rendszer állapotában nem volt változás a megfigyelés időtartama alatt, csak a képződő új falaknál látszott átrendeződés. A desztillált vízzel kezelt minták esetében ez a kép maradt a 48 órás időtartam alatt.

Az elicítált sejtek esetében a vizsgálatokat a sejtekben történő  $H_2O_2$  csúcsok időpontjában végeztük, illetve finomabb felbontással a korai időszakban (1 órán belül). Az általunk használt elicitor koncentráció nem okozott változást a kortikális mikrotubulusok szerveződésében sem az egy óránál rövidebb, sem az annál hosszabb elicitálási idejű mintákban. A BC kezelt sejtek mikrotubuláris rendszere tehát a kontrolléhoz volt hasonlítható, nem láttuk nyomát sem leépülésnek, sem átrendeződésnek.

## 6. Megbeszélés

### 6.1. A DEDIFFERENCIÁCIÓ/REDIFFERENCIÁCIÓ VIZSGÁLATA

A kallusz képződésének vizsgálatát azért tartottuk fontosnak elvégezni, mert a levélből eredő sejtek differenciációjának foka fontossággal bírhat a hatóanyag-produkció, valamint a védekezési válasz egyes részjelenségeinek megjelenése szempontjából is.

A dedifferenciáció alkalmankénti megjelenése, nehezen észrevehető és követhető mivolta, valamint a különböző sejtípusok komplex interakciója miatt a dedifferenciáció megfigyelése meglehetősen nehéz természetes körülmények között (106). Az *in vitro* kultúrák ellenőrzöttebb és szabályozott feltételek között egyszerűbb modell-rendszerként működnek, melyek alkalmasak a dedifferenciáció alapvető lépéseinek követésére. További előnye az ilyen típusú kísérletes munkának, hogy számos (természetes körülmények között előforduló) befolyásoló tényező kizárható, ezáltal a megfigyelések eredményei jobban értelmezhetővé válnak (107).

Az alkalmazott növénytől függően a táptalajra helyezett szövetdarab (szöveti) eredete meghatározza annak citológiai karakterét, az organogenetikai kapacitását és az osztódásra való képességet. A *Rubia tinctorum* gyökérből képzett dedifferenciált kallusz sejtek morfológiailag nagymértékben hasonlítottak egymásra, tracheida-szerű struktúrák majdnem hiányoztak, emellett nagy antrakinon tartalommal rendelkeztek a sejtek (54,59). Az *in vitro* indukált levél sejtek viszont alapvetően különböztek az előzőektől: a levelet felépítő különböző típusú sejtek különböző dedifferenciációs fokot értek el, és képesek voltak új, egymáshoz képest eltérő redifferenciációs fejlődési irányok követésére. Az előzőekben említett tulajdonság mellett a levélből indított kallusz kialakulásakor megfigyelhető folyamatok nagy előnye még a *Rubia tinctorum* esetében, hogy maga a levél detektálhatósági szint alatt tartalmaz antrakinonokat, míg a kallusz sárgás színe jelzi az antrakinon felhalmozást.

A kallusz képződése a szállítónyalábok környékén, és a sebzett felületeken indult meg, és szabad szemmel is látható volt 10-14 nappal az indukciót követően. Az erősen determinált differenciációs szintű epidermális sejtek nem változtak. A nem sebzett régiók mezofilláris sejtjei egy bizonyos fokig dedifferenciálódtak, de ezek a sejtek nem voltak képesek az osztódásra, noha a citoplazma mennyisége, a vakuolizáltság és az organellek felszaporodása egyaránt a dedifferenciációs folyamatok beindulására utal. Az ér környéki régiók színváltozása zöldről sárgásra



jelezte az újonnan létrejött sejtek elhelyezkedését és differenciációs változását. A levél többi régiója intenzív zöld színéből veszített a klorofill kb 75 %-ának lebomlása miatt, de zöld színe nem változott meg. Bár a levelek klorofill pigment tartalma nem csökkent tovább jelentős mértékben az indukciót követő 8. nap után, korán megkezdődött az antrakinon-származékok felhalmozódása, utalva a dedifferenciációt követő redifferenciáció folyamatára. HPLC segítségével megállapítható volt, hogy az antrakinon-származékok szintézise 2 lépcsős. Egy korai bioszintetikus aktivitás növekedést egy újabb aktív periódus követ. Ennek a 2 lépcsős felhalmozódásnak a háttere még nem tisztázott, valószínűsíthető, hogy a sejtek nem tudják minden bioszintetikus útvonalat egyidőben megnyitni (108). Az egyes antrakinon-származékok mennyiségei nem egyformán változnak a kalluszosodás folyamán. Mivel a bioszintetikus folyamatok késői lépéseiben történik a szubsztitúensek gyűrűkre kerülése, feltételezhető, hogy ezen lépések aktivitása sem egyforma (40). Az aktuális szabályozás megszabhatja a szubsztitúció minőségi és mennyiségi viszonyait, ami jellemzően tükröződik az egyes antrakinon származékok arányában. E tény nagy jelentőséggel bír a szignál transzdukción keresztüli metabolit termelés tervezésénél.

Érdekes módon a korábbi eredmények is azt mutatják, hogy a dedifferenciáció következményei (pl. a sejtmag kromatin dekonzenzációja, és a sejtmag festődésének változása) 72-96 órát vesznek igénybe, két elkülöníthető lépésben (106,109). A dedifferenciációs lépésekkel egyidőben a fotoszintetikus pigmentek degradációját és ultrastrukturális változásokat figyeltünk meg, valamint az antrakinon-származékok felhalmozódásának első lépcsőjét. Már a korai ultrastrukturális változások is különböztek a mezofillum és transzfersejtek esetében. Ezek a különbségek részben a sejtek különböző specializáltsági státuszából adódtak. A litikus aktivitás és a vakuolizáció megváltozása mindkét sejt típusban megfigyelhető volt, de eltérő értékben valósult meg. Ez elsősorban a dedifferenciációs/redifferenciációs státusz eltérése volt, és nem a folyamatok megindulásának vagy hiányának tényére hívja fel a figyelmet.

A mezofilláris sejtekben az átmeneti keményítő felhalmozódás jellemző volt, az 1-2. kalluszosítást követő napon detektálható maximummal, míg a későbbiekben ennek a tartalék tápanyagnak a mennyisége erősen csökkent (3-5 nap). A magasabb (kezdeti) keményítő tartalom jelzi a fotoszintetikus előállított anyagok transzportjának zavarát. Erre egyfelől hatással volt a kalluszindukció okozta stressz, továbbá a táptalajban található magas cukor koncentráció. Hasonló, átmeneti keményítő felhalmozódás megfigyelhető volt más, különböző stressz faktoroknak kitett növényekben is (110).

3-5 nap elteltével egyes trszfersejtek inekválisán osztódtak, a létrejött leánysejtek méretben és ultrastruktúrában is különböztek egymástól. Ehhez hasonló, de más sejttípusokban végbemenő dedifferenciációs jelenségeket más fajokban is leírtak (106,108,111). A kontoll levelek trszfersejtjeiben látható plasztiszok kevésbé differenciált állapotúak (kevés belső membrán, alacsony plasztoglobulus szám). A dedifferenciáció során e sejtek plasztiszai inekvális osztódáson mentek keresztül, és a dedifferenciált sejtek így különböző méretű és struktúráltságú plasztiszokat tartalmaztak. Ezen sejttípus másik karakterisztikus ultrastuktúrális változása a sejtfalban volt megfigyelhető: a belső, speciálisan vastagodott rétege elvékonyodott, a felépítő anyaga fibrilláris szerkezetűvé és elektron-áteresztőbbé vált. Az aktivitást mutató trszfersejtek középlemeze vezikulált lett, fellazult. Ez utalhat a környező sejtektől történő, legalább részleges izolálódásra. Ezzel szinte egyidejűleg a citoplazmában elhatároló membrán jelenik meg, mely igen szorosan kapcsolt kettős membránnak tűnik. Megjelenésével kezdetét veszi egy igen komoly mértékű autolitikus folyamat, ami a trszfersejtekben végbemenő redifferenciáció előfeltételének tűnik. Ilyen belső, elhatároló membrán kialakulását a mezofillumban nem detektáltunk. Ezen sturktúrális változások valószínűleg az eredeti funkció elvesztésével, a sejtek izolálódásával és a sejtek aktív sejtciklusba lépésével hozhatók összefüggésbe (109).

A fõnt említett változások jól megfelelnek a korábban publikált adatoknak: a citoplazma vezikulálódása, organellunok számának emelkedése, plasztisz osztódás (108,111-113); ugyanakkor a belső membrán felszaporodás, sejtfal átszerveződés, litikus aktivitás a sejtfalban és a középlemez régiójában található vezikulált részek a trszfersejtek specifikus dedifferenciációs lépéseinek tûnnek. Az inekvális plasztisz osztódást más szerzõk cikkeinek képein is láttuk (114-115), bár a szerzõk nem írták le egyenlõtlen osztódásként. Mivel inekvális osztódásként jeleztük a látott nagy számú, ilyen képet mutató plasztiszok alapján, de tényszerûen és biztosan csak akkor jelenthetjük ki, ha más módszerekkel (pl. a plasztiszok célzott fluoreszcencia mikroszkópos vizsgálata) is igazoljuk ezt. Az intenzív hidrolitikus mûködés, a sejtfalban történõ változások és az inekvális plasztisz osztódások komoly változásokra utalnak az apoplaszt és a szimplaszt funkciójában egyaránt.

A dedifferenciáció további lépései is különböztek a mezofillum és trszfer sejtekben. A mezofillum sejtekben az autolitikus folyamatok nem állnak le. A mitokondriumok számának, a simafelszínû endoplazmás retikulum mennyiségének növekedése, a sejtmagban végbemenõ változások az RNS és protein szintézis nagyobb intenzitására, felerõsödött metabolikus aktivitásra utalnak (106,108).

A transzfersejtekben is nőtt a citoplazma mennyisége, az organelumok denzitása, a citoplazma kompaktabb megjelenésűvé vált, a simafelszínű endoplazmatikus retikulum mennyisége nőtt, míg a központi vakoulum eltűnt. A denzebb citoplazma különböző méretű plasztiszokat tartalmazott, melyek egy része proplasztiszokra emlékeztető mérettel és struktúrával bírt (114), habár a fejlődési folyamat során amöboid plasztiszok nem jelentek meg (108).

A leírt dedifferenciációs jelenségek igazolják, hogy a transzfersejtekből (melyekben a struktúrális változások igen jelentősek és visszanyerik osztódási képességüket) képződnek a kallusz sejtek a levél ereinek környékén, míg a mezofillum sejtek valószínűleg megállnak a dedifferenciáció egy bizonyos stádiumában, a kiindulásnál magasabb bioszintetikus aktivitást produkálva. Aoki és Hase (115) már 1964-ben leírták, hogy a plasztisz dedifferenciáció magasabb glukóz koncentrációk mellett indukálható. Eredményeink szerint a transzfer és mezofillum sejtek, s bennük a plasztiszok, különböző képpen viselkednek annak ellenére, hogy mindkét sejtípus azonos cukor és hormon koncentrációnak volt kitéve. Ez a tény arra világít rá, hogy az endogén effektorok szintén fontos, adott esetben meghatározó szabályozási szereppel bírnak.

A vizsgálati eredmények rámutatnak arra, hogy a kallusz indukciót követően eltérő dedifferenciációs hajlam jellemző a *Rubia tinctorum* levelek különböző sejtípusaira, és csak a transzfersejtek képesek osztódásra, a kallusz létrehozására a nem sebzett levél területeken.

Egy további sajátos tulajdonsága az ily módon képződött kallusznak a nagy organogén kapacitás. A kallusz képződése után már néhány héttel gyökér kezdemények voltak megfigyelhetők a kalluszon, és ez a jellemző hosszabb (több, mint egy év) ideig fennmaradt a transzfersejt eredetű kalluszok fenntartása során.

## 6.2. AZ ELICITÁLÁS HATÁSA AZ ÉLETKÉPESSÉGRE

Számos szerző számolt már be különböző modellrendszerekben fenntartott és elicítált sejtek életképességének változásáról. Oligogalakturonid elicitor nem befolyásolta az élő sejtek számát (95 %) szója sejt kultúrában (116). Inkompatibilis növény-patogén interakció esetében a sejtpusztulás zöme a patogén inokulációt követő 5 órával kezdődött, és a sejtpusztulás késett vagy elmaradt, amikor kompatibilis partnerrel történt az inokuláció (117). Más szerzők szerint a kadmium kezelés jelentősen befolyásolja a sejtek életképességét, még alacsony koncentrációk alkalmazása esetén is

drámaian csökkent az élő sejtek száma néhány órán belül (118).

Az elicítálás következtében kialakuló reakciók mérésekor ki akartuk zárni annak lehetőségét, hogy a sejtek elhalásának következményeit detektáljuk, ezért FDA életképességi tesztet végeztünk. A BC, JA, SA elicitorok nem befolyásolták a sejtek vitalitását az elicítálást követő 48 óráig, és az élő sejtek száma szignifikánsan csak 96 óra elteltével csökkent. A vitalitási mérésekből levonhattuk a következtetést, hogy az általunk használt elicitorok ebben a koncentrációban egy közepes terhelést jelentettek a sejteknek, nem okozták azok gyors és tömeges pusztulását, tehát a 48 órás időtartamban az élő sejtekben végbemenő változások biztonsággal kimérhetőek.

### 6.3. AZ ELICITÁLÁS HATÁSA A SEJTEK ÉS A MÉDIUM $H_2O_2$ TARTALMÁRA

Az előkísérletek során több módszerrel próbáltuk detektálni a  $H_2O_2$ -t: DAB festés (128), keményítő-jód reakció (119), pyranin fluoreszcencia quenching (116), luminol kemilumineszcencián alapuló módszer (120), scopoletin fluoreszcencia quenching (103), titán (IV) komplex képzésen alapuló módszer (102). Kísérleteink során a scopoletin fluoreszcencia módszer bizonyult a legmegbízhatóbbnak (reprodukálhatóság, érzékenység) a felülúszó  $H_2O_2$  tartalmának nyomkövetésére, míg a titán (IV) módszer alkalmazása volt a leghatékonyabb a sejtekben történő detektálásra. Az utóbbi módszer előnye az volt, hogy az aceton használatával egyidejűleg vált lehetővé a sejtek gyors elpusztítása, a  $H_2O_2$  extrakciója, valamint azon enzimek gyors gátlása, melyek a sejtek  $H_2O_2$  háztartásában szerepet játszhatnak. Ily módon a kapott értékek közvetlenül a sejtekben található  $H_2O_2$  tartalomra vonatkoztak, viszonylag jó időbeli felbontás volt elérhető és a mért értékek a sejtek mindenkori oxidatív státuszát jelezték. A 0 idejű minták relatíve magas  $H_2O_2$  tartalma nem váratlan eredmény (valószínűsíthetően a rázatáskor jellemző nyírási stresszből ered), más szerzők is leírták (119).

A sejtek és a felülúszó esetében detektált oxidatív változások specifikusak voltak az elicitorra. A  $H_2O_2$  sejtekben megfigyelhető produkciójának négy fázisa (4-8 perc, 30-50 perc, 8-12 óra, 36 óra) különbözött az időbeli megjelenésükben, amplitúdójukban és időtartamukban. A korábbi, indukált  $H_2O_2$  termelődésről szóló adatok egy korai és késői termelődési maximumról számoltak be (objektumtól függően 10-60 perc között és 4 óra környékén) az elicitoros kezelést követően (117, 121), habár korábbi  $H_2O_2$  termelődés kimutatható volt a sejt kultúrák felülúszójából 4-6 perccel mastoparan, kitozan (120), vagy kadmium kezelés után (118). A mi eredményeink

ezekkel összhangban vannak, azonban több maximumot tudunk kimutatni feltehetően az alkalmazott módszer és a mintavételi idők (gyakoriság, időtartam) jó megválasztása miatt.

A  $H_2O_2$  felhalmozódása a felülúszóban az alkalmazott elicitorától függ. A BC és JA elicitor a  $H_2O_2$  koncentrációját növelte, jól egyezve a korábbi eredményekkel (116), viszont a koncentráció növekedések ideje és mértéke különbözött. Eredményeink azt mutatják, hogy a SA elicitor hatására a felülúszó  $H_2O_2$  koncentrációja csökkent (annak ellenére, hogy a sejtekben egyértelmű növekedés volt mérhető). Ez az eddigi eredményeknek ellentmond (120,122), habár újabb eredmények arról számoltak be, hogy a SA a reaktív oxigén formák csökkenését okozza (123-124). Az alacsony külső  $H_2O_2$  szint felveti az endoszómás  $H_2O_2$  termelődést követő transzport/diffúzió, s ezzel a sejten belüli  $H_2O_2$  felhalmozódás és HR iniciáció összefüggését. A továbbiakban ez még vizsgálendő az egyértelmű bizonyítás érdekében.

A növények számos enzimátikus mechanizmust fejlesztettek ki (pl. szuperoxid dizmutázok, aszkorbát peroxidázok, glutation peroxidáz, kataláz) a reaktív oxigén formák koncentrációjának szabályozása céljából, illetve a sejtek redox státuszának beállítása érdekében (88,89). A reaktív oxigén formák egy adott időpillanatban tapasztalható aktuális koncentrációja tulajdonképpen a termelődés és eliminálás mindenkori egyensúlyától függ (125). A SA hatására tapasztalható alacsonyabb  $H_2O_2$  koncentráció a felülúszóban magyarázható a sejtek kisebb  $H_2O_2$  leadásával és/vagy az elimináló rendszer fokozottabb aktivitásával (118, 124). Hasonló jelenséget leírtak NahG transzgenikus rizs növényekben is, ahol a csökkent SA mennyiségek reaktív oxigén formák akkumulálódásához vezettek (123). A  $H_2O_2$  valószínűsíthető másodlagos hírvivő szerepe (126) összhangban van koncentrációjának megfigyelt dinamikus változásaival. Ezt a feltételezett hatásmódot támogatja a  $H_2O_2$  termelődésének különbözősége is, melyet a különböző (kompatibilis és nem kompatibilis) patogén - növény interakciókban szintén megfigyeltek (117).

A SA és JA két igen fontos regulátora a növényi védekezési válasznak (122), és szignalizációs útjaik közvetlenül összekapcsolódnak inhibitoros/aktivációs jelleget mutatva (127). Kísérleteink azt mutatják, hogy a SA és JA a  $H_2O_2$  termelődés dinamikus változását okozták a vizsgált sejtszuspenziós kultúrákban, mely változások jellegükben hasonlítottak az elicitor indukálta változáshoz. A hatásukra történő  $H_2O_2$  termelésben megfigyelt időbeli, amplitúdóbeli, és időtartambeli különbségek valószínűsíthetően a különböző szignalizációs utakon keresztüli hatásukkal függenek össze.

A korai (4-10 perc)  $\text{H}_2\text{O}_2$  koncentráció változások valószínűsíthetően olyan korai szignalizációs történésekkel függenek össze, mint a foszforilációs/defoszforilációs folyamatok, és /vagy ion csatorna aktivációk (88,118,121). A későbbi koncentráció változások, melyek tartósabban meghatározzák az egész sejt redox státuszát, részt vehetnek a védekezéssel összefüggő gének közvetlen vagy közvetett aktiválásában (125).

Az EELS segítségével történő megfigyelések egyértelműen bizonyították, hogy a cérium reakcióval történő  $\text{H}_2\text{O}_2$  detektálás (100) egy jól alkalmazható módszer, melynek segítségével a  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelődés topológiája vizsgálhatóvá válik ultrastruktúra szintjén, és a cérium perhidroxid csapadék megjelenése alkalmas a felhalmozódás területeinek direkt behatárolására. Az EELS fő előnyei a nagy felbontás, a lehetőség az ultrastruktúra és az elemtérkép összehasonlítására, valamint a nagy érzékenység ozmium fixált minták esetében is.

Az elektronmikroszkópos megfigyelések eredményei azt mutatták, hogy a  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelődés lokális jelleggel rendelkezik, hiszen a cérium mennyisége a detektálás körülírt helyétől távolodva drámaian csökkent annak ellenére, hogy a sejtek azonos mértékű külső szignált kaptak minden irányból. Hasonló lokális jelleget már korábban is leírtak, de azokban a munkákban a baktérium- vagy gomba fertőzés hatására egy jól meghatározható irányból érte a sejteket külső stimuláció (100,128). A vizsgálataink során megállapított lokális elhelyezkedésű cérium tartalmú precipitátumok arra utalnak, hogy az indukált  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelődés szempontjából egy lehetséges előre meghatározott polaritás jellemzi a sejteket, akár a sejtszuspenziós kultúrák sejtjeit is. A különböző elicitorokkal és gátlókkal végzett kísérleteink eredményei minden esetben alátámasztották a lokális megjelenést, csak a kiterjedtség és a megjelenés helye variálódott. Ezek pontosabb felmérése és az összefüggések további elemzése a tervezett további munka részét jelentik.

#### 6.4. A GÁTLÓ ANYAGOK HATÁSA BC ELICITOR INDUKÁLT $\text{H}_2\text{O}_2$ TARTALOMRA

##### 6.4.1 *A lítium kezelés hatása a $\text{H}_2\text{O}_2$ tartalomra, és annak ultrastruktúrális megjelenésére*

A PLC szignalizációs út és az oxidatív események közötti kapcsolat jelenleg nem teljesen tisztázott, de a funkcionális kölcsönös hatás valószínűsíthető. A szoros információ csere (pl. NAD(P)H oxidáz aktiváció a sejt belső raktáraiból

származó kalcium jel által direkt módon vagy kalcium-dependens protein kinázokon keresztül) jelzi a két szignalizációs út szoros együttműködését. Az inozitol monofoszfátáz izoenzimek bénítójaként számon tartott lítium alkalmas ezen kapcsolat egyes részleteinek vizsgálatára (129).

Eredményeink alapján látható az  $IP_3$  metabolizmus megzavarásán keresztül a lítium ion kezelés a csak lítiummal kezelt esetben enyhén megemelte a  $H_2O_2$  mennyiségét a felülúszóban a kontrollhoz viszonyítva 60 percet követően. Ez az enyhe emelkedés a sejtekben TEM módszerrel is detektálható volt. Ezen megfigyelések arra utalnak, hogy a lítium kezelés hatására bekövetkező  $IP_3$  mennyiség csökkenés (130) képes mérhető mennyiségű  $H_2O_2$  termelés kiváltására. Ez a jelenség szerepet játszhat az eddig leírt, lítium által előidézett fiziológiai változások értelmezésében (131). A lítium előkezelt elicitált mintákban jelentős  $H_2O_2$  mennyiségi változások voltak mérhetőek, és a két alkalmazott lítium koncentráció eltérő hatással is rendelkezett. A különböző koncentrációjú kezelések esetében a csúcsok amplitúdója csökkent mind a sejtekben, mind a felülúszóban. Az 1 mM-os előkezelés mind a csúcsok időtartamát, mind pedig az amplitúdót érintette. Az ultrastrukturális detektálás az 5 perces lítium előkezelt BC elicitált mintában váratlan eredményre vezetett: a cérium csapadék a tonoplaszt környékén jelent meg. Ilyen tonoplaszt környéki  $H_2O_2$  termelődést leírtak kadmium kezelt (118), valamint ozmotikus stressznek kitett (132) sejtuszuspenziókban is, de a jelenség oka illetve szerepe nem tisztázott. Más időpontban vett ilyen kezelésű mintáinkban ilyen csapadék nem volt detektálható. A 20 mM-os előkezelt és BC elicitált mintákban szintén csökkent a  $H_2O_2$  mennyisége és a csúcsok megjelenése is eltolódott. Az lítium előkezelt BC elicitált mintákban a  $H_2O_2$  ultrastrukturális megjelenése gyengébb volt, de a csak BC-vel kezeltkéhez hasonlóan lokális megjelenést mutatott (100) jelezve, hogy a fent leírt valószínűsíthető polarizáció itt is kifejezésre jutott.

Az eredmények alapján elmondható, hogy a korai  $H_2O_2$  termelődési jelenségek vélhetően a sejtekbeni mindenkori, gyakran változó  $IP_3$  mennyiségekkel függenek össze, hiszen a stressz szignálok hatására az  $IP_3$  mennyisége növekszik, majd 1-2 óra múlva a mennyisége jelentősen csökken (116,130,133). Így a relatíve magas  $IP_3$  koncentráció lehet az egyik oka a korai  $H_2O_2$  mennyiségi változásoknak. A 240 perces elicitált és előkezelt-elicitált minták esetében jól látható citokémiai festődés detektálható TEM-el (előkezelt elicitált esetben gyengébb, mint a csak elicitált mintákban), mely szintén összefügghet az ilyen kezelési időtartam után regenerálódott  $IP_3$  mennyiségekkel. A másik valószínűsíthető ok a  $H_2O_2$  csökkenésnek, hogy a lítium

béníthat néhány, a  $H_2O_2$  termelődésben szerepet játszó enzimet. Ez a lehetőség sem zárható ki, hiszen a lítiumról ismert, hogy számos enzim aktivitását befolyásolni képes (130).

#### 6.4.2. A 2-APB kezelés hatása a $H_2O_2$ tartalomra, és annak ultrastrukturális megjelenésére

A 2-APB alkalmazása megfelelő eszköz az intracelluláris kalcium mobilizáció szerepének vizsgálatára a növényi szignál transzdukcióban (56,134). A felszabaduló kalcium szerepe nem teljesen tisztázott, sokrétű (1-2). *Rubia tinctorum* sejtszuszpenziós kultúrákban a 2-APB kezelés jelentősen csökkenti az antrakinon bioszintézist, jelezve, hogy az intracelluláris kalcium raktárakból történő kalcium felszabadulás az antrakinon biogenezisében is fontos regulátor szereppel bír (56). A *Rubia tinctorum* sejtszuszpenziós kultúrákban (többek között) a PKC-t aktiválja, mely a MAP kináz kaszkád irányába szolgál aktiváló tényezőként (2,56). A 2-APB-vel gátolt kalcium felszabadulás tehát jelentősen csökkenti a további szignalizációs folyamatok aktiválódását (1-2).

Az általunk használt modellben a 2-APB kezelés önmagában nem provokált  $H_2O_2$  termelődést sem a sejtekben, sem a felülúszóban. Kapott eredményeink azt mutatják, hogy a 2-APB előkezelés a sejtekben jelentősen csökkentette a BC aktivált  $H_2O_2$  termelődést, valamint annak időbeli megjelenését is eltolta. Csak egyetlen termelődési maximumot lehetett detektálni a vizsgált 4 órás időintervallumban. A felülúszó  $H_2O_2$  tartalmát is jelentősen csökkentette a 2-APB előkezelt elicítált mintákban, bár a görbe lefutása a BC-vel kezelt mintáéhoz volt hasonló. Mindezek alapján megállapítható, hogy a sejten belüli kalcium raktárakból felszabaduló kalcium, mint jel, fontos tényező az oxidatív stressz kialakulásában, modulálásában. A megjelenő kisebb és eltolt csúcs viszont valamilyen „mentő” útra utal, mely ki tudja kerülni a kalcium jel teljes kiesését és egy független, de kisebb amplitúdójú  $H_2O_2$  csúcs jöhet létre. A  $Ca^{2+}$  jel esetében a már leírt önerősítő folyamat (mely során a kalcium ion koncentráció növekedése a NADPH oxidáz enzimeken keresztül  $H_2O_2$  termelődést idéz elő, ami elősegíti a kalcium beáramlást) tehát azzal finomodik, hogy a sejten belüli raktárakból származó kalciumnak ebben a folyamatban is fontos, de nem kizárólagos szerepe lehet (1-2, 56).

A TEM vizsgálatok párhuzamba állíthatók a kvantitatív eredményekkel, a sejtekben mérhető csúcs időpontjában sikerült citokémiai precipitátumot kimutatni az



előkezelt és BC elicított mintákban, de a későbbiekben (a kvantitatív görbe lefutásának megfelelően) nem volt kimutatható  $H_2O_2$  termelődés. A 2-APB kezelés önmagában nem indukált  $H_2O_2$  termelődést jelentő Ce perhidroxid csapadék kiválást a sejtekben.

#### 6.4.3. A lantán kezelés hatása a $H_2O_2$ tartalomra, és annak ultrastruktúrális megjelenésére

A lantán (III) ion, mint nem specifikus kalcium csatorna gátló, szerepe a növényi védekezési válaszban még nem teljesen tisztázott, hiszen toxikus tulajdonságán túl bizonyos hatóanyagok (pl. taxol) bioszintézisét és exkrécióját növelni képes sejtkultúrákban (135). A lantán előkezelés a nehézfém indukált (15 percen belül a felülúszóban mérhető) oxidatív stressz kialakulását meggátolja dohány sejtkultúrában (118). Az önmagában alkalmazott lantán kezelés kísérleteinkben nem okozott megnövekedett  $H_2O_2$  termelődést a *Rubia tinctorum* sejtekben és a felülúszóban sem.

A lantán előkezelt BC elicított minták esetében a La a megjelenő termelődési csúcsokat eltolta és amplitúdójukat csökkentette, de nem olyan mértékben, mint a 2-APB. Ez a jelenség azzal magyarázható, hogy nem specifikus volta miatt valószínűsíthetően a stressz válaszban részt vevő többféle kalcium csatornát is blokkol, de kevésbé hatékonyan (1-2). Ennek a gyengébb gátlásnak lehet az eredménye, hogy a felülúszóban a BC és a lantánnal előkezelt BC minták  $H_2O_2$  tartalma nem tért el jelentősen. Ez az eredmény nincs összhangban a kadmium indukálta, lantán kezeléssel megszüntethető oxidatív változásokkal (118). Ennek magyarázata valószínűleg az elicitor tulajdonságaival hozható összefüggésbe (1-2). Mivel a lantán ionok az összes kalcium csatornát bénítják, így annak a szerepnek a tisztázása viszont fontossággal bírhat, hogy a nem intracelluláris kalcium felszabadulás/beáramlás milyen hatással van a  $H_2O_2$  termelődésre. Jelenleg a feszültség függő kalcium csatornák szerepéről azt tudjuk, hogy az elicitor indukált antrakinnon termelést befolyásolják, a termelődés csökkenthető az említett csatornák gátlásával (136).

A TEM vizsgálatok alapján kimutatható volt a 20 perc környékén megjelenő, kvantitatívan meghatározott  $H_2O_2$  termelődési csúcs a sejtekben az előkezelés és BC elicitálás után. A TEM vizsgálatok eredményei párhuzamba állíthatók a kvantitatív eredményekkel. A lantán kezelés önmagában nem indukált citokémiai reakciót a sejtekben.

#### 6.4.4. A nifedipin kezelés hatása a $H_2O_2$ tartalomra, és annak ultrastruktúrális megjelenésére

A nifedipin, mely L-típusú kalcium csatorna blokkoló, a *Rubia tinctorum* sejtek antrakinon szintézisét csökkenti (2,136). Mint a többi kalcium transzport gátlónak, a nifedipinnek is fontos szerepe van a növényi szignál transzdukció egyes elemeinek vizsgálatában (137). Eredményeink azt mutatták, hogy a BC elicított sejtek  $H_2O_2$  termelését igen erősen csökkenti a nifedipin előkezelés. Csak egyetlen, de az önmagában BC vel kezelt mintákhoz képest rövidebb időn belül kialakuló (de hasonló amplitúdójú) termelődési csúcs mutatható ki. Ez az eredmény arra utalhat, hogy a korai termelődési csúcshoz nem szükséges az L-típusú csatornákon beáramló kalcium megléte, a további termelődési csúcsokhoz viszont már igen, legalább ko-effektorként. A minták felülúszójában a sejtekben tapasztalttól eltérő eredmények születtek: a nifedipinnel előkezelt BC elicított sejtekben a  $H_2O_2$  koncentrációja magasabb értéken állt hosszabb időn keresztül, mint a csak BC-vel kezelt tenyészetekben. A nifedipin kezelés a kadmium kezelt dohány kultúrák esetében a felülúszóban mérhető  $H_2O_2$  mennyiségét szintén jelentősen csökkentette (118). Ez a váratlan eredmény nehezen magyarázható, de valószínűleg a sejtek apoplastikus terében található peroxidázok aktivitásával hozható összefüggésbe (138). Ez a látszólagos ellentmondás részben a növényi sejtek elicitorokra adott különböző válaszelemeivel, tehát az elicitor specificitásával hozható összefüggésbe (1-2), részben az apoplastikus antioxidatív rendszer aktivitásának változása feltételezhető. A nifedipin önmagában nem váltott ki  $H_2O_2$  termelődést az általunk használt kultúrákban.

Az eredmények arra engednek következtetni, hogy az L-típusú kalcium csatornák szerepe fontos az elicitor indukált oxidatív stressz későbbi termelődési maximumainak kialakulásában (1-2).

A TEM módszerrel nem sikerült az előkezelt és BC elicított mintákban 5 perc után citokémiai festődést kimutatni. Ennek valószínűsíthető oka lehet, hogy maga a  $H_2O_2$  termelődési csúcs nagyon rövid ideig volt detektálható, és a TEM módszer nem olyan finom felbontású, hogy ez a tranziens termelődési maximum megfigyelhető legyen. A későbbi (40 perces) mintákban már látható volt festődés, valószínűen azért, mert a termelődés ekkor volt olyan volumenű, amit már detektálni lehetett. A TEM-el kapott eredmények tehát itt kevésbé illeszthetők a kvantitatív eredményekhez. A nifedipin kezelés önmagában a sejtekben nem okozott citokémiai precipitátum felhalmozódást.

#### 6.4.5. A neomicin kezelések hatása a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tartalomra, és annak ultrastrukturális megjelenésére

A foszfolipáz C gátló neomicin alkalmazása kevéssé előre látható eredményeket hozott, mivel a neomicin foszfolipáz gátló hatása mellett rendelkezik (humán idegsejteken bizonyított) feszültség érzékeny kalcium csatorna gátló hatással is, mely nem érinti a Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> antiportert. A G-fehérje aktivált PLC enzim fontos szerepet tölt be az elicitor indukált növényi válaszban (1-2,56,136). A neomicin kezelés önmagában H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelődést nem provokált.

A neomicin előkezelés hatása a sejtek BC indukált H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelésére koncentrációtól függ. Az alkalmazott kisebb koncentráció (125 μM) esetében még lehetett termelődési maximumokat mérni, igaz, amplitúdóban jelentősen kisebb és időben eltolt maximumok voltak a jellemzők. A nagyobb koncentrációra jellemző volt, hogy a 2 órán belül (a csak BC kezelés esetén) észlelhető termelődési csúcsok eltűntek, és csak 180 perc környékén jelent meg egy szélesebb, kisebb amplitúdójú csúcs. A felülúszó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tartalmára jellemző volt, hogy az 1. termelődési csúcs amplitúdóját koncentrációtól függően csökkentette, a későbbi változásokra már nem volt hatással. A neomicin nem befolyásolta a kadmium kezelt dohány kultúrák H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelését (118), ennek oka az elicitorok eltérő specificitása lehet (1-2).

A TEM vizsgálatokkal gyenge, és a sejtek körülírt területein megjelenő festődéseket tapasztaltunk. A citokémiai precipitátumok megjelenése a kvantitatív eredményekkel párhuzamba vonhatók a különböző koncentrációkkal előkezelt és BC elicított mintákban. A neomicin kezelések önmagukban nem okoztak citokémiai festődést a sejtekben a vizsgált időintervallumban.

Összefoglalva a neomicin kettős támadáspontú bénító molekula (56,136). A nagyobb koncentrációjú gátlós kezelés rávilágít arra a tényre, hogy a BC indukált H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelődés korai megnyilvánulásához egyidejűleg szükség van a PLC enzimre és a feszültség érzékeny kalcium csatornák megfelelő működésére. Amennyiben ezek gátlása egyidejűleg valósul meg, az elicitor indukált H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelés elmarad. Az irodalmi eredmények, melyek leírják, hogy az elicitor kiváltotta antrakinon termelődés gátolható neomicinnel (1,56), és az antrakinon termelődéshez elengedhetetlen a PLC enzim normális működése (56), tehát finomodnak azzal a ténnyel, hogy a PLC és a feszültség függő kalcium csatornák bénítása a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelődést is megszünteti. A fentebb leírtakból egy alapvető fontossággal bíró kérdés következik: szükséges-e az

oxidatív jelenségek komplett megléte az antrakinon bioszintézishez. Ez további, jövőben elvégzendő vizsgálatok hivatottak bizonyítani, avagy cáfolni.

#### 6.5 A GÁTLÓKKAL VÉGZETT KÍSÉRLETEK EREDMÉNYEINEK ÖSSZEGZÉSE

A gátlók segítségével végzett kísérletekből a fentiek alapján megállapítható, hogy a BC indukált  $H_2O_2$  termelődés zavartalan lefolyásához szükséges a kalcium jel(ek) megléte, valamint a PLC enzim zavartalan működése. Az intracelluláris kalcium mobilizáció megzavarása (litium vagy 2-APB kezeléssel) befolyásolta a  $H_2O_2$  szintézis időbeli és amplitúdóbeli megjelenését, de nem szüntette meg. Ez jelzi, hogy a  $H_2O_2$  szintézist az intracelluláris kalcium mobilizáció nem önmagában alakítja ki. Kalcium csatornák bénítása önmagában (lantán vagy nifedipin) sem elég a BC indukált  $H_2O_2$  termelődés elnyomására, bár a nifedipin kezelés már jó hatásfokkal csökkentette azt. A neomicin által előidézett PLC bénítás és feszültség függő kalcium csatornák gátlása okozott 2 órán belül  $H_2O_2$  termelődés elmaradást, a későbbiekben megjelenő kicsi amplitúdójú csúcs az ezen utaktól független szabályozásra utal. A nifedipin és neomicin által okozott gátló hatás jellegéből következik, hogy a korai  $H_2O_2$  termelődés szabályozásában inkább a feszültség függő kalcium csatornák és a PLC szabályozás, míg a későbbi (2 óra utáni) csúcsok kialakulásának szabályozásában inkább az L típusú kalcium csatornák dominálnak, de az eredmények jelentős átfedést is jeleznek.

A TEM eredmények azt mutatják, hogy az alkalmazott gátlók jelentős mértékben visszafogják az elicitor indukált  $H_2O_2$  termelést a sejtekben. Az esetek túlnyomó részében a kapott citokémiai jel megjelenése párhuzamba vonható a kvantitatív eredményekkel (kivéve nifedipin). A kontrasztosítás elhagyása a gátlóval kezelt preparátumok esetében lehetővé tette, hogy az igen gyenge festődés is detektálhatóvá váljon. Összefoglalva, a TEM módszer alkalmazása nemcsak megerősíti a kvantitatív eredményeket, hanem bizonyos esetekben további információkat szolgáltat az elicitor indukált  $H_2O_2$  termelésről.

#### 6.6. A MIKROTUBULÁRIS RENDSZER VISELKEDÉSE A BC ELICITOR HATÁSÁRA

Irodalmi adatok alapján valószínűsíthető, hogy a NADPH oxidáz enzim nem teljes mennyisége van kihelyeződve a plazmamembránba, hanem annak csak egy bizonyos része. A maradék rész membránba való kihelyeződését a sejtek citoskeletális

rendszere irányítja. Az elvégzett munka tervezésénél ezt a tényt vettük figyelembe, mikor a sejtek mikrotubuláris rendszerének vizsgálatát tűztük ki egyik célunknak. Kapcsolatot kerestünk továbbá az elicított sejtek lokális megjelenésű  $H_2O_2$  szintézise és a mikrotubuláris rendszer megjelenése között.

A növényi citoszkeleton egy dinamikus struktúra, mely a külső stimulusokra reorganizációjával válaszol, de ezen túlmenően a citoszkeletális elemek (mikrotubulusok, mikrofilamentumok) részt vesznek a növényi védekezési válasz reakcióiban, főképpen a gombák által történő fertőzések esetében (78). A növényi citoszkeletális rendszer kapcsolatban áll a védekezési válasz egyes elemeivel, mint például a PI3K-val és egyéb kinázokkal, valamint GTP-ázokkal is, s ezen kapcsolatok teremtenek lehetőséget a citoszkeletális elemek reorganizációjára és annak modulálására biotikus stressz esetében, másfelől a citoszkeleton állapota és annak egyes elemei szabályozó szerepet is betöltenek a sejtben (139-140).

A *Rubia tinctorum* sejtek erős autofluoreszcenciája miatt a mikrotubuláris rendszer elicitor kezelésre várt változásainak kutatásában áttértünk a *Capsicum annuum* sejtekre. Vizsgálataink során a BC elicított sejtek mikrotubuláris rendszerének mikroszkópos megjelenése nem változott jelentősen. A  $H_2O_2$  termelődési maximumokban végzett megfigyelések alapján elmondhatjuk, hogy a BC kezelés morfológiailag nem változtatta meg a sejtek mikrotubuláris rendszerét, még azon időpontokban sem, mikor a sejtek oxidatív státusza a kontroll értéktől jelentős mértékben eltért. A sejtek mikrotubulus rendszere nem mutatott polarizálódást, mint ahogy azt a  $H_2O_2$  termelődés mutatott ultrastruktúrálisan. Ezen eredmények az irodalmi adatokkal nem vonhatók párhuzamba (78).

Az irodalmi adatokkal (78,139-140) kevésbé párhuzamba vonható eredményeink egyik valószínűsíthető oka az lehet, hogy a BC eredetű elicitor az alkalmazott koncentrációban a vizsgált növényi objektumon nem alkalmas a citoszkeletális válasz kiváltására. Az elicitor indukált citoszkeletális válaszokról ugyanis kiderült, hogy bizonyos elicitorok nem váltanak ki észlelhető változásokat (pl. oligogalakturonidok), míg mások a mikrotubuláris rendszer szétesését okozzák (pl. cryptogein – mely hiperszenzitív reakciót vált ki dohány sejteken) (141). Az irodalmi adatokkal kevésbé párhuzamba vonható eredmények másik oka lehet, hogy sejszuszpenziós kultúrák mikrotubuláris rendszerének viselkedése az alkalmazott elicitor koncentrációjától is függ, ami a mikrofilamentáris rendszerénél is kimérhető (142). Így elképzelhető, hogy az általunk alkalmazott elicitor koncentráció nem volt elegendő a mikrotubuláris rendszer megváltozásának kiváltásához, noha az oxidatív

stressz eseményeinek kiváltásához megfelelt.

#### 6.7. A KÜLÖNBÖZŐ ELICITOROK HATÁSA A SEJTEK ANTRAKINON TERMELÉSÉRE

Az általunk alkalmazott HPLC-DAD-MS módszer előnye, hogy egy injektálással 10 antrakinon-származék mennyisége egyidejűleg vizsgálható az adott mintában hidrolízis nélkül, relative rövid idő alatt (16 perc) (60-62). A DAD és MS mérések segítségével sikerült azonosítani és kvantitatíve meghatározni 10 antrakinon származék mennyiségét a különböző elicitorokkal kezelt és kontroll (desztillált vízzel kiegészített) mintákban.

Eredményeink azt mutatják, hogy a *Coriolus* (CV1-3) és *Botrytis* (BC) gomba eredetű poliszacharidok és a két növényi hormon (JA, SA), mint elicitorok jól használhatók és a hatásuk az antrakinon származékok szintézisére különböző. A *Coriolus* és *Botrytis* gomba eredetű elicitorok alkalmazásakor kimagasló összes antrakinon termelődést mértünk. A *Rubia tinctorum* gyökér mintákhoz hasonlítva a CV1 elicitorral akár több mint háromszoros össz-antrakinon kitermelés érhető el. A JA elicitálás szelektív a pseudopurpurin termeltetésre, míg a SA elicitálás szelektívebb az alizarin termeltetésre.

Az antrakinon termelésre vonatkozó mennyiségi adatok megfelelnek a korábbi irodalmi adatoknak (48-52, 59), és egyes elicitorok esetében bizonyos molekulákra vonatkoztatva (pl. CV1: glikozidok és pseudopurpurin; JA4: pseudopurpurin) előnyösebb összetételek is elérhetők.

A CV1-CV3 elicitorok rendelkeztek a legerősebb elicitoros hatással az antrakinon termelődés szempontjából. Mivel a legerősebb hatást ezen a csoporton belül a CV1, tehát a legnagyobb molekulatömeggel rendelkező frakció (bár molekuláris szerkezetük nem teljesen tisztázott) váltotta ki, felmerült a kérdés, hogy miért. A *Coriolus* eredetű, proteinhez kötött poliszacharidokat számos szerző vizsgálta (143-145), mely munkák megállapították, hogy ezen molekulák immun-moduláns, antitumor, analgetikus és hepatoprotektív hatással rendelkeznek. A glikoproteinek molekuláris szerkezetét szintén többen vizsgálták: a poliszacharid részben számos ismétlődő régiót találtak, valamint a peptid tartalom 6.4-10% között mozgott (144-146). Sajnálatos módon azonban az elicitor növényi receptor számára a felismerésül szolgáló régióját (65,73) ez ideig nem sikerült azonosítani. Eredményeink alapján elmondható, hogy a CV1-3 frakciók hatása csak a kihazatalban különbözött, a termelődött antrakinon-származékok aránya hasonlóan alakult e három elicitornál. Így tehát a különböző

molekulatömegű frakciók valószínűsíthetően mindegyike tartalmazta az azonos – növényi sejt számára felismerhető- molekuláris régiókat, csak eltérő mennyiségben. Az eredmények alapján feltehető, hogy a nagyobb molekulatömegű frakció (CV1) több ilyen részletet tartalmazhatott.

## 7. Következtetések

A gyógynövények hatóanyag termelésének fokozása, valamint a termelés ellenőrzött körülmények közé helyezése gyógyszerészi, hatóanyag termelési szempontból fontos feladat, hiszen a kontrollált körülmények jelentős anyagi és környezeti terhercsökkentést eredményeznek. A növényi sejtfermentációs technikák lehetőséget nyújtanak a növényi hatóanyagok ellenőrzött és nagy volumenű termeltetéséhez. A kitermelés további javítása érdekében számos módszer jelent meg az elmúlt időszakban, melyek közül egyes módszerek a növényi védekezési válasz indukálásán/befolyásolásán keresztül érnek el nagyobb hatóanyag produkciót. Ezen technikák előnye nyilvánvaló a hatóanyag produkciót tekintve, azonban a biológiai hátterük kevésbé feltárt, az egyes szabályozási folyamatok szerepéről, azok kapcsolatairól kevés információval rendelkezünk. A biológiai/fiziológiai folyamatok ismerete az alapkutatási fontosságukon túlmenően az alkalmazott módszerek jobb megértését, és ezáltal továbbfejlesztésüket, valamint hatékonyságuk javítását eredményezhetné. E célból egyfelől a növényi sejtszuspenziós kultúrák létrehozásának első lépését (a kallusz képződésének néhány jellemzőjét), valamint az indukálható növényi védekezési válasz részjelenségeit tanulmányoztuk. Munkánkban az elicitor indukált növényi védekezési válasz egyes elemeit vizsgáltuk *Rubia tinctorum*, valamint *Capsicum annuum* sejtszuspenziós kultúrákban. A sejtszuspenziós kultúrák alkalmazásának előnye, hogy a vizsgálati eredmények jobban értelmezhetők a tenyésztési körülmények állandósága miatt.

Vizsgálatainkban megállapítottuk, hogy a kalluszképződés során a nem sebzett, intakt levélrészeken esetén a kallusz képződése a szállítóyalábok környékén található transzfersejtekből indukálódik. Megállapítottuk, hogy a mezofillum sejtek is dedifferenciálódnak, de e folyamat egy bizonyos fokán megállnak, és nem dedifferenciálódnak tovább, nem osztódnak. A transzfer sejtek viselkedése nem várt eredményt hozott: specifikus autofágiás folyamat volt megfigyelhető. Megállapítottuk, hogy a dedifferenciációt jelző antrakinson-származékok felhalmozódása kétlépcsős kinetikát mutat, és az egyes komponensek időbeli megjelenése nem azonos.

Megállapítottuk, hogy az általunk alkalmazott néhány elicitor a kezeléstől számított 96 órán belül nem befolyásolja a sejtek életképességét szignifikánsan.

Megállapítható, hogy különböző elicitorok  $H_2O_2$  termelődést váltanak ki az alkalmazott növényi sejtszuszpenziós kultúrában, melynek időbeli megjelenése több termelődési maximumot tartalmaz, mint azt az irodalomban eddig jelezték. Az alkalmazott elicitorok (egyrésztől gomba eredetű, másrésztől növényi hormon molekulák) a  $H_2O_2$  termelést a sejtekben rájuk jellemző módon (amplitúdó, időtartam, megjelenési idő) befolyásolták. A termelődött  $H_2O_2$ -csúcsok megjelenése a felülúszóban is az alkalmazott elicitorra jellemző kinetikát mutatta. Ultrastrukturális vizsgálómódszer segítségével megállapítottuk, hogy a korai  $H_2O_2$  megjelenés a sejtek plazmamembránjához közeli részeken, később a sejt falban a legszembetűnőbb, és lokális jelleggel rendelkezik (függetlenül attól, hogy a szignál az egész sejtet minden irányból egyformán érintette). Az elemanalízis egyértelműsíti, hogy a kapott jel az elicitálás hatására termelődött  $H_2O_2$  kimutatására használt citokémiai reakcióból származik.

Vizsgálataink során kapott új eredmény az is, hogy a szignál transzdukciós folyamatok (általunk alkalmazott) gátlószerei rájuk jellemző módon befolyásolják az elicitor indukált  $H_2O_2$  termelődés (mind sejtekben, mind felülúszóban mérhető) mértékét és kinetikáját. Az ehhez tartozó ultrastrukturális megfigyelések megerősítik a biokémiai mérési eredményeket. A gátlók segítségével megállapítható, hogy az elicitor indukált rövid távú (0-4 óra)  $H_2O_2$  termelődésben fontos szerepe van a sejten belüli kalcium felszabadulásnak, a feszültség függő és L-típusú kalcium csatornák, és a PLC enzim megfelelő működésének. A feszültség függő kalciumcsatornák és a PLC egyidejű gátlásával a korai elicitor indukált (0-2 óra)  $H_2O_2$  termelődés teljes mértékben gátolható a sejtekben. Ugyanakkor a belső kalcium raktárak kiürítése nem tűnik általános szabályozó jellegűnek.

Megállapítottuk, hogy az alkalmazott elicitor a használt koncentrációban nem alkalmas a paprika sejtszuszpenziós kultúra sejtjeiben a mikrotubuláris rendszer fluoreszcencia mikroszkópos módszerrel detektálható megváltoztatására.

Az alkalmazott gomba eredetű elicitorok és növényi hormonok a *Rubia tinctorum* sejtek antrakinon termelését fokozták, de eltérő módon befolyásolták. A *Coriolus* és *Botrytis* gomba eredetű elicitorok elsősorban a glikozidok mennyiségét és az össz-antrakinon tartalmat növelték, a jaszmonsav kezelés főként a pszeudopurpurin mennyiségét növelte, míg a szalicilsav az alizarin termelést befolyásolta szelektíven. Az összes antrakinon tartalom alapján megállapítottuk, hogy a gomba eredetű elicitorok,



valamint a nagyobb koncentrációjú JA3-4 kezelés alkalmazása előnyösebb az intakt növény földalatti szerveiből történő hatóanyag kinyerésnél. A két növényi hormon alkalmazása a sejtszuszpenziókban szelektívebb antrakinon termelődést kiváltó tulajdonságuk miatt előnyösebb az intakt növényből történő hatóanyag kinyerésnél.

## 8. Irodalomjegyzék

1. Zhao J, Davis LC, Verpoorte R. (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolism. *Biotechnology Advances*, **23**:283-333.
2. Vasconsuelo A, Boland R. (2007) Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science*, **172**:861-875.
3. Zhong JJ. (2001) Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell cultures. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **72**:1-26.
4. Memelink J, Kijne JW, van der Heijden R, Verpoorte C. (2001) Genetic modification of plant secondary metabolite pathways using transcriptional regulators. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **72**:103-125.
5. Verpoorte R, Memelink J. (2002) Engineering secondary metabolite production in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**:181-187.
6. Sumner LW, Mendes P, Dixon RA. (2003) Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry*, **62**:817-836.
7. Goossens A, Hakkinen ST, Laakso I, Seppanen-Laakso T, Biondi S, De Sutter V. (2003) A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**:8595-8600.
8. Maróti M. (1976) *A növényi szövettenyésztés alapjai*. pp. 11-31. Akadémiai Kiadó, Budapest.
9. Junqiang L, Yongqing W, Lihua L, Lijun Z, Nan L, Qunxian D, Junren X, Chunxia H, Yuan Q. (2008) Embryogenesis and plant regeneration from anther culture in loquat (*Eryobotrya japonica* L.). *Scientia Horticulturae*, **115**:329-336.
10. Murashige T, Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **17**:636-643.
11. Trejo-Tapia G, Balcazar-Aguilar JB, Martínez-Bonfil B, Salcedo-Morales G, Jaramillo-Flores M, Arenas-Ocampo ML, Jiménez-Aparicio A. (2008) Effect of screening and subculture on the production of betaxanthins in *Beta vulgaris* L. var 'Dark Detroit' callus culture. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **9**:32-36.
12. Koblitz H. (1972) *Zell- und Gewebezüchtung bei Pflanzen*. pp. 22-67. Fischer, Jena.
13. White PR. (1963) *The cultivation of animal and plant cells*. pp. 34-76. The Ronald Press, New York.
14. Jamet E, Durr A, Parmentier Y, Criqui MC, Fleck J. (1990) Is ubiquitin involved in the dedifferentiation of higher plant cells? *Cell Differentiation and Development*, **29**:37-46.

15. Komamine A, Sakuta M, Hirose M, Hirano H, Takagi T, Kakegawa K, Ozeki Y. (1989) Regulation of secondary metabolism in relation to growth and dedifferentiation. In: *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*, (ed.: Kurz, WGW) pp. 49-52. Springer-Verlag, Berlin – Heideberg.
16. Kintzios S, Drossopoulos J, Manousaridou M, Holveas CD. (1996) Competence for callus induction on mature pepper leaves depends upon specific developmental stages of the donor plant. *Scientia Horticulturae*, **65**:341-347.
17. Roy J, Banerjee N. (2003) Induction of callus and plant regeneration from shoot-tip explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. Var. *Oculatum* HK.f. *Scientia Horticulturae*, **97**:333-340.
18. Kintzios S, Stavropoulou E, Skamelli S. (2004) Accumulation of selected macronutrients and carbohydrates in melon tissue cultures: association with pathways of *in vitro* dedifferentiation and differentiation (organogenesis, somatic embryogenesis). *Plant Science*, **167**:655-664.
19. Dudits D, Cserháti M, Miskolczi P, Fehér A, Ayaydin F, Horváth GV. (2007) Use of alfalfa *in vitro* cultures in studies on regulation of cyclin-dependent kinase (CDK) functions. In: *Biotechnology and Sustainable Agriculture 2006 and Beyond*, (ed.: Zhihong X, Jiayang L, Yongbiao X, Weical Y) pp.149-152. Springer, The Netherlands.
20. László I, Szőke É, Tyihák E, Szende B. (2001) Programmed cell death in *Datura Innoxia* Mill. callus cultures cultivated in light and in dark. *Plant Growth Regulation*, **33**:231-236.
21. Ötvös K, Pasternak TP, Miskolczi P, Domoki M, Dorjgotov D, Szűcs A, Bottka S, Dudits D, Fehér A. (2005) Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. *The Plant Journal*, **43**:849-860.
22. Csiszár J, Fehér-Juhász E, Kótai É, Ivankovits-Kiss O, Horváth GV, Mai A, Gallé Á, Tari I, Pauk J, Dudits D, Erdei L. (2005) Effect of osmotic stress on antioxidant enzyme activities in transgenic wheat calli bearing MsALR gene. *Acta Biologica Szegediensis*, **49**:49-50.
23. Dudits D, Heszky L. (2003) *Növényi biotechnológia és géntechnológia*. pp. 8-23 Agroinform Kiadó, Budapest.
24. Yeoman MM, Aitchison PA. (1973) Growth patterns in tissue callus cultures. In: *Plant tissue culture*, (ed.: Street HE) pp. 240-268. Blackwell Publishing, Oxford.
25. Charlwood BV, Charlwood K, Molina-Torres J. (1990) Accumulation of secondary compounds by organized plant cultures. In: *Secondary Products from Plant Tissue Culture*, (ed.: Charlwood BV, Rhodes MJC) pp. 23-41. Clarendon Press, Oxford.
26. Wink M. (1987) Physiology of the accumulation of secondary metabolites with special reference to alkaloids. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol 4. (ed.: Constabel F), pp. 17-42. Academic Press, London.
27. Wink M. (1990) Physiology of secondary product formation in plants. In: *Secondary*

- Products from Plant Tissue Culture*, (ed.: Charlwood BV, Rhodes MJC) pp. 23-41. Clarendon Press, Oxford.
28. Barz W, Beimen A, Dräger B, Jaques U, Otto CH, Süper E, Upmeier B. (1990) Turnover and storage of secondary products in cell cultures. In: *Secondary Products from Plant Tissue Culture*, (ed.: Charlwood BV, Rhodes MJC) pp. 79-102. Clarendon Press, Oxford.
29. Aharon GS, Gelli A, Snedden WA, Blumwald E. (1998) Activation of a plant plasma membrane  $Ca^{2+}$  channel by TGa1, a heterotrimeric G protein alpha-subunit homologue. *FEBS Letters*, **424**:17–21.
30. Davies KM, Schwinn KE. (2003) Transcriptional regulation of secondary metabolism. *Functional Plant Biology*, **30**:913–25.
31. Girard LS, Fabis MJ, Bastin M, Courtois D, Pétiard V, Koprowski H. (2006) Expression of a human anti-rabies virus monoclonal antibody in tobacco culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **345**:602-607.
32. Yeoman MM, Holden MA, Corchet P, Holden PR, Goy G, Hobbs MC. (1990) Exploitation of disorganized plant cultures of secondary metabolites. In: *Secondary Products from Plant Tissue Culture*, (ed.: Charlwood BV, Rhodes MJC) pp. 139-166. Clarendon Press, Oxford.
33. Payne GF, Schuler ML, Brodelius P. (1987) Large Scale Plant Cell Culture. In: *Large Scale Cell Culture Technology*, (ed.: Lydersen BK) pp. 195-229. Hanser Publishers, Munich Vienna New York.
34. Boross L, Sajgó M. (1993) *A Biokémia Alapjai*, pp. 295, Mezőgazda Kiadó, Budapest.
35. Becker H, Sauerwein M. (1990) Manipulating the biosynthetic capacity of plant cell cultures. In: *Secondary Products from Plant Tissue Culture*, (ed.: Charlwood BV, Rhodes MJC) pp. 43-57. Clarendon Press, Oxford.
36. Renaudin JP, Guern J. (1990) Transport and vacuolar storage of secondary metabolites in plant cell cultures. In: *Secondary Products from Plant Tissue Culture*, (ed.: Charlwood BV, Rhodes MJC) pp. 59-78. Clarendon Press, Oxford.
37. Berlin J. (1990) Screening and selection for variant cell lines with increased levels of secondary metabolites. In: *Secondary Products from Plant Tissue Culture*, (ed.: Charlwood BV, Rhodes MJC) pp. 119-137. Clarendon Press, Oxford.
38. Boldizsár I, László-Bencsik Á, Szűcs Z, Dános B. (2004) Az antrakinon-összetétel vizsgálata különböző származású *Rubia tinctorum* L. növények gyöktörzs- és gyökérmintáiban. *Acta Pharmaceutica Hungarica*, **74**:142-148.
39. Singh R, Geetanjali S, Chauhan SMS. (2004) 9,10-anthraquinones and other biologically active compounds from the genus *Rubia*. *Chemistry & Biodiversity*, **1**:1241-1264.
40. Han YS, Van der Heijden R, Verpoorte R. (2001) Biosynthesis of anthraquinones in

- cell suspension cultures of the Rubiaceae. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **67**:201-220.
41. Dzierzbicka K, Kołodziejczyk AM. (2005) Antracenedione analogues – synthesis and biological activity. *Polish Journal of Chemistry*, **79**:1-29.
42. Derksen CGH, Van Beek TA. (2002) *Studies in Natural Products Chemistry*, (ed.: Atta-ur Rahman) **26**:629-684. Elsevier, The Netherlands.
43. Chung MI, Jou SJ, Cheng CN, Lin FN, Ko CN, Teng J. (1994) Antiplatelet constituents of formosan *Rubia akane*. *Journal of Natural Products*, **57**:313-316.
44. Westendorf J, Pfau W, Schulte A. (1998) Carcinogenicity and DNA adduct formation observed in ACI rats after long-term treatment with madder root, *Rubia tinctorum* L. *Carcinogenesis*, **19**:2163-2168.
45. Takahashi E, Marczylo TH, Watanabe T, Nagai S, Hayatsu H, Negishi T. (2001) Preventive effects of anthraquinone food pigments on the DNA damage induced by carcinogens in *Drosophila*. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **480**:139-145.
46. Marczylo T, Arimoto-Kobayashi S, Hayatsu H. (2000) Protection against Trp-P-2 mutagenicity by purpurin: mechanism of in vitro antimutagenesis. *Mutagenesis*, **15**:223-228.
47. Stara D, Suchy V, Blanarik P. (1992) Tissue culture of *Rubia tinctorum* and production of anthraquinones. *Ceska a Slovenska Farmacie*, **44**:1687-1695.
48. Krizsán K, Szókán Gy, Tóth A, Hollósy F, László M, Khlafulla A. (1996) HPLC analysis of anthraquinone derivatives in madder root (*Rubia tinctorum*) and its cell cultures. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, **19**:2295-2314.
49. Bányai P, Kuzovkina IN, Kursinszki L, Szőke É. (2006) HPLC analysis of alizarin and purpurin produced by *Rubia tinctorum* L.: hairy root cultures. *Chromatographia*, **63**:111-114.
50. Van der Heijden R, Verpoorte R, Hoekstra SS, Hoge JHC. (1994) Nordamnacanthal a major anthraquinone from an *Agrobacterium rhizogenes* induced root culture of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **32**:399-404.
51. Sato K, Yamazaki T, Okuyama E, Yosishira K, Shimomura K. (1991) Anthraquinones production by transformed root cultures of *Rubia tinctorum*: influence of phytohormones and sucrose concentration. *Phytochemistry*, **30**:1507-9.
52. Perassolo M, Quevedo C, Busto V, Ianone F, Giulietti AM, Talou JR. (2007) Enhance of anthraquinone production by effect of proline and aminoindan-2-phosphonic acid in *Rubia tinctorum* suspension cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, **41**:181-185.
53. Sato K, Kubota H, Goda Y, Yamada T, Maitani T. (1997) Glutathione enhanced anthraquinone production in adventitious root cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Biotechnology (Tokyo)*, **14**:63-66.

54. Bóka K, Jakab J, Király I. (2002) Comparison the effect of different fungal elicitors on *Rubia tinctorum* L. suspension culture. *Biologia Plantarum*, **45**:281-290.
55. van Tegelen LJP, Bongaerts RJM, Croes AF, Verpoorte R, Wullems GJ. (1999) Isochorismate synthase isoforms from elicited cultures of *Rubia tinctorum*. *Phytochemistry*, **51**:263-269.
56. Vasconsuelo A, Guilietti AM, Picotto G, Talou JR. (2003) Involvement of the PLC/PKC pathway in chitosan-induced anthraquinone production by *Rubia tinctorum* L. cell cultures. *Plant Science*, **165**:429-436.
57. Mantrova OV, Dunaeva MV, Kuzovkina IN, Schneider B, Müller-Uri F. (1999) Effect of methyl jasmonate on anthraquinone biosynthesis in transformed madder roots. *Russian Journal of Plant Physiology*, **46**:276-279.
58. Gundlach H, Muller MJ, Kutchan TM, Zenk MH. (1992) Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**:2389-2393.
59. László M, Kretovics J, Dános B, Szókán Gy, Liszt K, Hollósy F. (1992) The production of secondary metabolites by plant cells of *Rubia tinctorum* cultivated in bioreactors. *Planta Medica*, **47**:A613.
60. Derksen CGH, Lelyveld GP, van Beek T, Capelle A, de Groot AE. (2004) Two validated HPLC methods for the quantification of alizarin and other anthraquinones in *Rubia tinctorum* cultivars. *Phytochemical Analysis*, **15**:397-406.
61. Derksen CGH, Niederländer HAG, van Beek TA. (2002) Analysis of anthraquinones in *Rubia tinctorum* L. by liquid chromatography coupled with diode-array UV and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, **978**:119-127.
62. Boldizsár I, Szűcs Z, Füzfai Zs, Molnár-Perl I. (2006) Identification and quantification of the constituents of madder root by gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1133**:259-274.
63. Rafaëly L, Héron S, Nowik W, Tchaplá A. (2008) Optimisation of ESI-MS detection for the HPLC of anthraquinone dyes. *Dyes and Pigments*, **77**:191-203.
64. Nakanishi F, Nagasawa Y, Kabaya Y, Sekimoto H, Shimomura K. (2005) Characterization of lucidin formation in *Rubia tinctorum* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, **43**:921-928.
65. Keen NT. (1975) Specific elicitors of plant phytoalexin production – determinants of race specificity in pathogens? *Science*, **187**:74-75.
66. Radman R, Saez T, Bucke C, Keshavarz T. (2003) Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **37**:91-102.
67. Staskawicz BJ, Ausubel FM, Baker BJ, Ellis JG, Jones JD. (1995) Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, **268**:661-667.

68. Hahlbrook K, Schröder J, Vieregge J. (1980) Enzyme regulation in parsley and soybean cell cultures. In: *Advances in Biochemical Engineering*, Vol 18 (ed.: Fiechter A), pp. 39-60. Springer, Berlin.
69. Becker H, Chavadej S, Thies PW, Finner E. (1984) The structure of new valepatriates from tissue cultures of *Valeriana walchii*. *Planta Medica*, **50**:245-248.
70. Kombrink E, Hahlbrock K. (1986) Responses of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi. *Plant Physiology*, **1**:216-221.
71. Dixon R, Dey P, Murphy D, Withead M. (1981) Dose responses for *Colletotrichum lindemuthianum* elicitor-mediated enzyme induction in French bean cell suspension cultures. *Planta*, **151**:272-280.
72. Broeckling CD, Huhman DV, Farag MA, Smith JT, May GD, Mendes P, Dixon RA, Sumner LW. (2005) Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals the effectors of biotic and abiotic elicitors on metabolism. *Journal of Experimental Botany*, **410**:323-336.
73. Nürnberger T, Brunner F. (2002) Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen associated molecular patterns. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**:318-324.
74. Szigeti Z. (1998) A növények és a stressz. In: *Növényélettan, A növényi anyagcsere*. (szerk.: Láng F.) pp. 915-984. ELTE, Eötvös Kiadó, Budapest.
75. de Wit PJGM. (2007) How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **64**:2726-2732.
76. Kumar D, Klessig DF. (2003) High affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**:16101-16106.
77. Ji C, Boyd C, Slaymaker D, Okinaka Y, Takeuchi Y, Midland SL, Sims JJ, Herman E, Keen N. (1998) Characterization of a 34-kDa soybean binding protein for the syringolide elicitors. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**:3306-3311.
78. Kobayashi I, Kobayashi Y. (2000) Control of the response to biotic stresses. In: *Plant Microtubules*, (ed.: Nick P.), pp. 83-101. Springer, Berlin.
79. Salánki K, Gellért Á, Náray-Szabó G, Balázs E. (2007) Modeling-based characterization of the elicitor function of amino acid 461 of Cucumber mosaic virus 1a protein in the hypersensitive response. *Virology*, **358**:109-118.
80. Kauss H, Jeblick W, Domard A. (1989) The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Chataranthus roseus*. *Planta*, **178**:385-392.
81. Boller T. (1995) Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annual*

*Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **46**:189-214.

82. Yang Z. (2002). Small GTPases: versatile signaling switches in plants. *Plant Cell*, **14**:375-388.

83. Trewavas AJ, Malhó R. (1998) Ca<sup>2+</sup> signalling in plant cells: the big network! *Current Opinion in Plant Biology*, **1**:428-433.

84. Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JL. (1997) Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> amplitude and duration. *Nature*, **386**:855-858.

85. Sakano K. (2001) Metabolic regulation of pH in plant cells: role of cytoplasmic pH in defense reaction and secondary metabolism. *International Review of Cytology*, **206**:1-44.

86. Bolwell GP, Wojtaszek P. (1997) Mechanism for the generation of reactive oxygen species in plant defence- a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **51**:347-366.

87. Ádám A, Farkas T, Somlyai G, Hevesi M, Király Z. (1989) Consequence of O<sub>2</sub>-generation during a bacterially induced hypersensitive reaction in tobacco: deterioration of membrane lipids. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **34**:13-26.

88. Fodor J, Gullner G, Ádám AL, Barna B, Kömives T, Király Z. (1997) Local and systemic responses of antioxidants to tobacco mosaic virus and to salicylic acid in tobacco. *Plant Physiology*, **114**:1443-1451.

89. Apel K, Hirt H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, **55**:373-399.

90. Zhao J, Guo Y, Fujita K, Sakai K. (2004) Involvement of cAMP signaling pathway in elicitor-induced phytoalexin accumulation in *Cupressus lusitanica* cell cultures. *New Phytologist*, **161**:723-733.

91. Taguchi G, Yazawa T, Hayashida N, Okazaki M. (2001) Molecular cloning and heterologous expression of novel glucosyltransferases from tobacco cultured cells that have broad substrate specificity and are induced by salicylic acid and auxin. *European Journal of Biochemistry*, **268**:4086-4094.

92. Yang Q, Trinh XH, Imai S, Ishihara A, Zhang LQ, Nakayashiki H, Tosa Y, Mayama S. (2004) Analysis of the involvement of hydroxyanthranilate hydroxycinnamoyltransferase and caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase in phytoalexin biosynthesis in oat. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **17**:81-89.

93. Wasternack C, Parthier B. (1997) Jasmonate-signaled plant gene expression. *Trends in Plant Science*, **2**:302-307.

94. Meijer HJG, Munnik T. (2003) Phospholipid-based signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, **54**:265-306.

95. Bate NJ, Sivasankar S, Moxon C, Riley JMC, Thompson JE, Rothstein SJ. (1998) Molecular characterization of an *Arabidopsis* gene encoding hydroperoxide lyase, a



- cytochrome P-450 that is wound inducible. *Plant Physiology*, **117**:1393-1400.
96. Thoma I, Loeffler C, Sinha AK, Gupta M, Krischke M, Steffan B, Roitsch T, Mueller MJ. (2003) Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *Plant Journal*, **34**:363-375.
97. Wang X. (2002). Phospholipase D in hormonal and stress signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**:408-414.
98. Yamaguchi T, Tanabe S, Minami E, Shibuya N. (2004) Activation of phospholipase D induced by hydrogen peroxide in suspension-cultured rice cells. *Plant Cell and Physiology*, **45**:1261-1270.
99. Liu L, White MJ, MacRae TH. (1999) Transcription factors and their genes in higher plants functional domains, evolution and regulation. *European Journal of Biochemistry*, **262**:247-257.
100. Isaksen I. (1991) Natural Pigments. In: *Handbook of Thin-Layer Chromatography*, (ed.: Sherma J, Fried B) **55**: pp. 625-662. Marcel Dekker, New York..
101. Porra RJ. (2002). The chequered history of the development and use of simultaneous equation for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research*, **73**:149-156.
102. Panteris E, Apostolakos P, Galatis B. (1992) The organization of F-actin in root tip cells of *Adiantum capillus veneris* throughout the cell cycle. *Protoplasma*, **170**:128-137.
103. Bestwick CS, Brown IR, Bennett MHR, Manfield JW. (1997) Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *The Plant Cell*, **9**:209-221.
104. Brennan T, Frenkel C. (1977) Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. *Plant Physiology*, **59**:411-416.
105. Cazalé AC, Rouet-Mayer MA, Barbier-Brygoo H, Mathieu Y, Lauriere C. (1998) Oxidative burst and hypoosmotic stress in tobacco cell suspensions. *Plant Physiology*, **116**:659-669.
106. Harikrishna PK, Fioroni O, Draper J. (1989) Dedifferentiation of *Asparagus officinalis* L. mesophyll cells during initiation of cell cultures. *Plant Science*, **65**: 111-117.
107. Preininger É, Gyurján I, Bóka K, Pónyi T, Zatykó Z, Korányi P. (2003) A new approach for the biolistic method: bombardment of living nitrogen-fixing bacteria into plant tissues. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, **39**: 443-449.
108. Sjolund RD, Weier TE. (1971) An ultrastructural study of chloroplast structure and dedifferentiation in tissue cultures of *Strephantus tortuosus* (Cruciferae). *American Journal of Botany*, **58**:172-171.

109. Zhao J, Morozova N, Williams L, Libs L, Avivi Y, Grafi G. (2001) Two phases of chromatin decondensation during dedifferentiation of plant cells. *Journal of Biological Chemistry*, **276**:22772-22778.
110. Nyirai P, Bóka K, Gáspár L, Sárvári É, Keresztes Á. (2004) Rejuvenation of ageing bean leaves under the effect of low-dose stressors. *Plant Biology*, **6**:708-714.
111. Mikuła A, Tykarska T, Zielińska M, Kuraś M, Rybczyński J. (2004) Ultrastructural changes in zygotic embryos of *Gentiana punctata* L. during callus formation and somatic embryogenesis. *Acta Biologica Cracoviensis (Ser. Bot.)* **46**:109-120.
112. Nishitani K, Shibaoka H, Masuda Y. (1979) Growth and cell wall changes in azuki bean epicotyls. II. Changes in wall polysaccharides during auxin-induced growth of excised segments. *Plant Cell Physiology*, **20**:463-472.
113. Fransz FP, Schel JHN. (1991) Cytodifferentiation during the development of friable embryogenic callus of maize (*Zea mays*). *Canadian Journal of Botany*, **69**:26-33.
114. Glick RE, Sears BB. (1994) Genetically programmed chloroplast dedifferentiation as a consequence of plastome-genome incompatibility in *Oenothera*. *Plant Physiology*, **106**:367-373.
115. Aoki S, Hase E. (1964) De- and re-generation of chloroplasts in the cells of *Chlorella protothecoides*. I. Syntheses of nucleic acids and protein in relation to the process of regeneration of chloroplast. *Plant Cell Physiology*, **5**:473-484.
116. Legendre L, Reuter S, Heinstejn FP, Low SP. (1993) Characterization of the oligogalakturonide-induced oxidative burst in cultured soybean (*Glycine max*) cells. *Plant Physiology*, **102**:233-240.
117. Baker CJ, Orlandi EW. (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, **33**:299-321.
118. Olmos E, Martínez-Solano JR, Piqueras A, Hellín E. (2003). Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells. *Journal of Experimental Botany*, **54**:291-301.
119. Gómez Ros LV, Paradiso A, Gabaldón C, Pedreño MA, de Gara L, Ros Barceló A. (2006) Two distinct cell sources of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the lignifying *Zinnia elegans* cell culture system. *Protoplasma*, **227**:175-183.
120. Kauss H, Jeblick W. (1995) Pretreatment of parsley suspension cultures with salicylic acid enhances spontaneous and elicited production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Plant Physiology*, **108**:1171-1178.
121. Low PS, Merida JR. (1996) The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. *Physiologia Plantarum*, **96**:533-542.
122. Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP, Murr DP, Watkins CB. (1997) Influence of salicylic acid on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, oxidative stress and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolizing enzymes.

*Plant Physiology*, **115**:137-149.

123. Yang Y, Qi M, Mei C. (2004) Endogenous salicylic acid protects rice plants from oxidative damage caused by aging as well as biotic and abiotic stress. *The Plant Journal*, **40**:909-919.

124. Agarwal S, Sairam RK, Srivastava GC, Meena RC. (2005) Changes in antioxidant enzymes activity and oxidative stress by abscisic acid and salicylic acid in wheat genotypes. *Biologia Plantarum*, **49**:541-550.

125. Mehdy MC, Sharma YK, Sathasian K, Bays NW. (1996) The role of activated oxygen species in plant disease resistance. *Physiologia Plantarum*, **98**:365-374.

126. Orozco-Cárdenas ML, Narváez-Vásquez J, Ryan CA. (2001) Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *The Plant Cell*, **13**:179-191.

127. Niki T, Mitsuhara I, Seo S, Ohtsubo N, Ohashi Y. (1998) Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant Cell Physiology*, **39**:500-507.

128. Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB. (1997) Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal*, **11**:1187-1194.

129. Gillapsy GE, Keddie JS, Oda K, Gruissem W. (1995) Plant inositol monophosphatase is a lithium-sensitive enzyme encoded by a multigene family. *The Plant Cell*, **7**:2175-2185.

130. Monreal JA, López-Baena FJ, Vidal J, Echevarría C, García-Maourino S. (2007). Effect of LiCl on phosphoenolpyruvate carboxylase kinase and the phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase in leaf disks and leaves of *Sorghum vulgare*. *Planta*, **225**:801-812.

131. Bartolo ME, Carter JV. (1992) Lithium decreases cold-induced microtubule depolymerization in mesophyll cells of spinach. *Plant Physiology*, **99**:1716-1718.

132. Wi SG, Chung BY, Kim J-H, Lee K-S, Kim J-S. (2006). Deposition pattern of hydrogen peroxide in the leaf sheaths of rice under salt stress. *Biologia Plantarum*, **50**:469-472.

133. DeWald DB, Torabinejad J, Jones CA, Shope JC, Cangelosi AR, Thompson J, Prestwich GD, Hama H. (2001) Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-triphosphate correlates with calcium mobilization in salt-stressed *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **126**:759-769.

134. Ma TH, Patterson RL, van Rossum DB, Birnbaumer L, Mikoshiba K, Gill DL. (2000) Requirement of the inositol triphosphate receptor for activation of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels. *Science*, **287**:1647-1651.

135. Wu J, Wang C, Mei X. (2001) Stimulation of taxol production and excretion in

*Taxus* spp cell cultures by rare earth chemical lanthanum. *Journal of Biotechnology*, **85**:67-73.

136. Vasconsuelo A, Morelli S, Picotto G, Giulietti AM, Boland R. (2005) Intracellular calcium mobilization: a key step for chitosan-induced anthraquinone production in *Rubia tinctorum* L. *Plant Science*, **169**:712-720.

137. Dombrowski JE, Bergey DR. (2007) Calcium ions enhance systemin activity and play an integral role in the wound response. *Plant Science*, **172**:335-344.

138. Marczak Ł, Wojtaszek P, Stobiecki M. (2008) Influence of plant secondary metabolites on in vitro oxidation of methyl ferrulate with cell wall peroxidases from lupine apoplast. *Journal of Plant Physiology*, **165**:239-250.

139. Xu P, Lloyd CW, Staiger CJ, Drøbak BK. (1992) Association of phosphatidylinositol 4-kinase with the plant cytoskeleton. *The Plant Cell*, **4**:941-951.

140. Hall A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, **279**:509-514.

141. Binet MN, Humbert C, Lecourieux D, Vantard M, Pugin A. (2001) Disruption of microtubular cytoskeleton induced by cryptogein, an elicitor of hypersensitive response in tobacco cells. *Plant Physiology*, **125**:564-572.

142. Yuan H-Y, Yao L-L, Jia Z-Q, Li Y, Li Y-Z. (2006) *Verticillium dahliae* toxin induced alterations of cytoskeletons and nucleoli in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Protoplasma*, **229**:75-82.

143. Kidd PM. (2000) The use of mushroom glycans and proteoglycans in cancer treatment. *Alternative Medicine Review*, **5**:4-27.

144. Ng TB. (1998) A review of research on the protein-bound polysaccharide (polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes: Polyporaceae). *General Pharmacology*, **30**:1-4.

145. Jeong SC, Yang BK, Ra KS, Wilson MA, Cho Y, Gu YA, Song CH. (2004) Characteristics of anti-complementary biopolymer extracted from *Coriolus versicolor*. *Carbohydrate Polymers*, **55**:255-263.

146. Boldizsár I, Horváth K, Szedlay Gy, Molnár-Perl I. (1998) Simultaneous GC-MS quantitation of acids and sugars in the hydrolyzates of immunostimulant, water-soluble polysaccharides of Basidiomycetes. *Chromatographia*, **47**:413-9.

## 9. Saját publikációk jegyzéke

### A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

- 1. Orbán N, Boldizsár I, Szűcs Z, Dános B. (2008)**  
Influence of different elicitors on the synthesis of anthraquinone derivatives in *Rubia tinctorum* L. cell suspension cultures.  
Dyes and Pigments, 77 (1):249-257 (IF 2007: 2.796)
- 2. Orbán N, Boldizsár I, Bóka K. (2007)**  
Structural and chemical study of dedifferentiation associated with callus formation initiated from leaves of *Rubia tinctorum* L.  
Biologia Plantarum, 51(3):421-429 (IF 2007: 1.259)
- 3. Bóka K, Orbán N. (2007)**  
New aspect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling.  
Plant Signaling & Behaviour, 2(6):498-500. (IF -)
- 4. Bóka K, Orbán N, Kristóf Z. (2007)**  
Dynamism and localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in elicited plant cells.  
Protoplasma, 230:89-97 (IF 2007: 1.493)

### Könyvfejezet

**Orbán N, Boldizsár I, Bóka K.** Enhanced anthraquinone dye production in plant cell cultures of *Rubiaceae* species: emerging role of signaling pathways. In: Lang AR (ed.), Dyes and Pigments: New Research. Nova Science Publishers, New York, USA. (*in press*). ISBN: 978-1-60692-027-5.

### Előadások

**Orbán N, Bóka K. (2004)**  
Dynamism and localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in elicited plant cells.  
The 14<sup>th</sup> Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology, August 2004, Cracow, Poland.

### Magyar kiadványban megjelent publikáció (angol nyelvű összefoglalóval):

- 1. Boldizsár Imre, Orbán Norbert, Dános Béla**  
Az antrakinon-összetétel befolyásolásának lehetősége *Rubia tinctorum* L. szuszpenziós tenyészetben. XII. Magyar Növényanatómiai Szimpózium Sárkány Sándor Emlékére 2006. június 22-23, pp.78-83 (Jate Press, Szeged, 2006; Szerk.: Mihalik Erzsébet; ISBN 963 482 767 5)
- 2. Orbán Norbert, Boldizsár Imre, Bóka Károly**  
Dedifferenciációs és redifferenciációs események kalluszosított *Rubia tinctorum* levelekben. XII. Magyar Növényanatómiai Szimpózium Sárkány Sándor Emlékére 2006. június 22-23, pp.169-173 (Jate Press, Szeged, 2006; Szerk.: Mihalik Erzsébet; ISBN 963 482 767 5)

### Poszterek

- 1. Kristóf Z, Orbán N, Bóka K.** Hidrogénperoxid felszabadulás vizsgálata elicitált növényi sejtekben citokémia, EELS, és elektronmikroszkóp segítségével. A Magyar Mikroszkópos Társaság 2008. évi Konferenciája, Balatonalmádi, 2008. 05. 15-17.

**2. Boldizsár I, Orbán N, Szűcs Z, Bóka K, Dános B, Füzfa Zs, Molnár-Perl I.**  
Determination of anthraquinone derivatives in cell suspension cultures of *Rubia tinctorum* L.: elicitation's impact on the amount of the compounds formed.  
7<sup>th</sup> Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods In Memoriam Szabolcs Nyiredy, Siófok, 2007. 09. 05-07.

**3. Norbert Orbán, Károly Bóka, Imre Boldizsár**  
Cytological features of dedifferentiating cells during callus induction.  
The 15<sup>th</sup> Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology, July 2006, Lyon, France.

**4. Boldizsár Imre, Orbán Norbert, Dános Béla**  
Az antrakinon-összetétel befolyásolásának lehetősége *Rubia tinctorum* L. szuszpenziós tenyészetben.  
Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIII. Budapest, 2006. 05. 25-27.

**5. N. Orbán, I. Boldizsár, K. Bóka**  
Events of dedifferentiation during callus induction from *Rubia tinctorum* L. leaves.  
XVII. International Botanical Congress Wien, 2005. 07. 18-23.

**6. Orbán Norbert, Boldizsár Imre, Szűcs Zoltán, Dános Béla**  
Különböző elicitorok hatása a *Rubia tinctorum* L. in vitro sejttenyészetek színanyag termelésére.  
PhD Tudományos Napok Semmelweis Egyetem Budapest, 2005. 04. 14-15.

**7. Orbán Norbert**  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelődés dinamizmusának és topológiájának vizsgálata elicított növényi szuszpenziós tenyészetben.  
PhD Tudományos Napok Semmelweis Egyetem Budapest, 2004. 04. 8-9.

**8. Boldizsár Imre, Orbán Norbert, Szűcs Zoltán, Dános Béla**  
*Rubia tinctorum* L. sejttenyészetében a színezékek termelésének befolyásolása gombapoliszacharid elicítással. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XII. Budapest, 2003. 05. 8-10.

#### A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények

**Orbán N, Kiss A, Drávucz M, Gál L, Orbán S (2006)** Comparative study on selected polyphenol content in red wines of Eger (Hungary). *Acta Alimentaria*, 34(4):465-477 (IF 2006: 0.253)

**Orbán N, Kozák IO, Drávucz M, Kiss A.** LC-MS Method development to evaluate major triterpenes in skins and cuticular waxes of grape berries. *International Journal of Food Science and Technology* (közlésre elfogadva; doi:10.1111/j.1365-2621.2008.01902.x). (IF 2007: 0.941)

#### Posztterek

**1. Péter Forgó, János Petrusán, Norbert Orbán, Attila Kiss:** "HPLC-MS studies on revealing unique triterpene saponin components in skins and cuticular waxes of grape and wine, XIII Italian-Hungarian symposium on Spectrochemistry and Environmental Contamination and Food Safety, Bologna, Italy, 20-24 April, 2008.

**2. Forgó Péter, Orbán Norbert, Kiss Attila, Virág Diána.** Módszerfejlesztési kísérletek és egyedi triterpén-szaponin komponensek analízise szőlő növényben finomanalitikai

eljárásokkal, XVI. Élelmiszer Minőségellenőrzési Tudományos Konferencia, Tihany, 2008. április 24-25.

**3. Orbán Norbert,** Kozák Imre Olivér, Drávucz Mónika, Kiss Attila. Fő triterpénkomponensek vizsgálata szőlőbogyó héj és kutikula mintákban LC-MS módszerrel.  
Budapesti Corvinus Egyetem "Lippay János- Ormos Imre - Vas Károly" Tudományos Ülésszak (2007. november 7-8.).

**4. Orbán N,** Kozák IO, Drávucz M, Kiss A. Evaluation of major triterpenes in skins and cuticular waxes of grape berries by LC-MS.  
7<sup>th</sup> Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods In Memoriam Szabolcs Nyiredy, Siófok, 2007. 09. 05-07.

## 10. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Böddi Béla professzor úrnak az ELTE Biológiai Intézet Növénysszervezettani Tanszék vezetőjének, hogy lehetőséget biztosított számomra tudományos munkám elvégzéséhez.

Köszönöm Dr. Bóka Károly egyetemi docens úrnak, témavezetőmnek, hogy munkám során végig kiemelt figyelmet, támogatást és segítséget nyújtott minden felmerülő szakmai és nem szakmai probléma esetében.

Köszönöm Dr. Dános Béla egyetemi docens úrnak, hogy a Tanszéken töltött időm alatt mindig számíthattam szakmai tanácsaira, támogatására.

Köszönettel tartozom Dr. Gyurján István professzor úrnak az állandó értékes konzultációkért, és azért, mert mindig készségesen hozzájárult, hogy egyes munkákat laboratóriumában elvégezhessenek.

Köszönöm Perlné Dr. Molnár Ibolya professzor asszonynak a HPLC és GC-MS mérésekben nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Boldizsár Imrének, Dr. Kovács M. Gábornak, Dr. Kristóf Zoltánnak, Dr. Solymosi Katalinnak, Dr. Szűcs Zoltánnak és Dr. Vági Pálnak, hogy bizalommal fordulhattam hozzájuk minden felmerülő kérdés esetén.

Köszönöm Jancsek Anikónak, Jónás Csillának, Kasnya Ilonának, Kálmán Ágnesnek és Takács Juditnak, hogy az elmúlt évek során laboratóriumi munkámhoz segítséget nyújtottak.

Köszönetet szeretnék mondani családomnak a kitartó, folyamatos támogatásért.