

## *canescens*) nitoremediacios kapacitasanak novelesere

Gyulai Gábor<sup>1</sup> – Bittsánszky András<sup>1,2</sup> – Gullner Gábor – Tóth Zoltán – Kiss József<sup>1</sup> – Kátay György<sup>2</sup> – Szabó Zoltán<sup>1</sup> – Kőmíves Tamás<sup>2</sup> – Heszky László<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Szent István Egyetem, Genetika és Biotechnológia Intézet, Gödöllő

<sup>2</sup>MTA Növényvédelmi Kutatóintézet, Budapest

E-mail: Gyulai.Gabor@mkk.szie.hu

### Összefoglalás

A szürkenyár (*Populus x canescens*) *gst* (glutathion S-transzferáz) génextpresszióját növeltük meg DHAC-indukált (5,6-dihidro-5'-azacitidin hidroklorid) DNS-demetilációval. Három klónt vizsgáltunk, a természetes (WT) és két glutation-túltermelő 35S-*gshI* nyárfaklont (11*ggs*, 6*lgl*) RT-qPCR elemzésben. A *gst* gén megemelt expressziós szintje a DHAC-kezelt kontroll növényekben 4,9-szeresre emelkedett, amely tovább nőtt paraquat stresszben (11,2-szeres), amely eredmény azt bizonyítja, hogy a DNS demetilációjával az endogén gének expressziós szintje nagyságrendekkel emelhető meg. Ismert, hogy a DNS demetiláció a vegetatív klónokban öröklődik (*epigenetikus memória*), ezért a demetilációs eljárás (gén up-reguláció) új lehetőséget ad stressztűrő nyárfaklónok előállítására.

### Summary

In the study presented *gst* (glutathione S-transferase) gene expression levels of poplar (*Populus x canescens*) were analyzed in response to the DNA demethylating agent DHAC (5,6-dihydro-5'-azacytidine hydrochloride). Aseptic leaf discs cultures of wild type (WT) and two *gshI*-transgenic clones (6*lgl* and 11*ggs*) clones were analyzed by RT-qPCR. High expression levels of DHAC treated control plants (4.9-fold increment, and a further 11.2-fold increment after paraquat treatment) proves that DNA demethylation provides powerful tools in gene-upregulation. As DNA methylation patterns are inherited ('*epigenetic memory*') novel poplar plant sources are provided with increased *gst* gene expression levels.

### Bevezetés

Az ontogenezis során a különböző fejlődési szakaszokban expresszálódó gének ki vannak téve a gén-csendesítés (*gene silencing*) hatásának, amely elsősorban a DNS metilációján keresztül megy végbe a DNS metiltranszferáz (CMT) enzimek katalízisével (WOLFFE & MATZKE, 1999). A DNS citozin nukleotidjának metilációja 5-metil-citozinná (5-mC) egyben a növények természetes molekuláris védekezési mechanizmusa (LINN et al., 1990), valamint kromoszóma szerveződési folyamata (ld. hiszton metiltranszferázok) (CHANVIVATTANA et al., 2004). Az ellentétes irányú folyamatokban, a CMT-inhibitor kezeléseknél, a növények metilációs szintje csökken, új metilációs mintázat alakul ki, és az elhallgattatott gének reaktivációja megy végbe

(FINNEGAN et al., 1998; FINNEGAN & KOVAC, 2000; GOFFIN & EISENHAEUER, 2002; HORVATH et al., 2003).

Vizsgálatainkban a *gst* gén aktivációját (up-reguláció) érték el a DNS metiltranszferáz (CMT) enzim gátlásán keresztül ható DHAC (5,6-dihidro-5'-azacitidin hidroklorid) (SHEIKHNEJAD et al., 1999) alkalmazásával. Három nyárfaklont vizsgáltunk, a *11ggs* és *6lgl* 35S-*gshI* klónokat (GULLNER et al., 2005; GYULAI et al., 2005; BITTSÁNSZKY et al., 2007), valamint a természetes (WT) klónt. A génexpresszió mérésére reverz transzkripció kvantitatív PCR-t (RT-qPCR) alkalmaztunk.

### Anyag és módszer

**Növényanyag:** A vizsgálatokhoz a szürkenyárhibrid (*Populus tremula* × *Populus alba* = *Populus* × *canescens*) klónjait alkalmaztuk (INRA N<sup>o</sup> 717-1-B4) (ARISI et al., 1997; NOCTOR et al., 1998). A klónok felnevelését *in vitro* végeztük (KISS, 1999). A levélkorong tenyészetet GYULAI et al. (1995, 2005) módszere szerint végeztük 2 % szacharózzal kiegészített WPM táptalon. A paraquat kezelést  $4 \times 10^{-7}$  M koncentrációban, a DHAC-kezelést  $10^{-4}$  M-ban alkalmaztuk (BITTSÁNSZKY et al., 2005a, b; 2006; 2007a, b). A tenyészeteket  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  -on, 16 h fény ( $40 \mu\text{Em}^2\text{s}^{-1}$ ) / 8 h sötét fotoperiódus mellett, 7 napon keresztül inkubáltuk.

***In vitro* táptalajok:** A nyárnövények *in vitro* fenntartásához, mikro-szaporításához, valamint a stressz kísérletekhez WPM (*Woody Plant Media*) táptalajt (LLOYD & MCCOWN, 1980) használtunk. A hajtásregeneráláshoz, valamint a levélkorong-tesztekhez a táptalajt növényi hormonokkal egészítettük ki: 1 mg/l benziladenin, 0,2 mg/l naftilecetsav. A táptalajok pH értékét 5,6-5,8 közé állítottuk be, autoklávozással sterilizáltuk (GYULAI, 2007; GULLNER et al., 2005).

**Molekuláris módszerek.** **DNS-izolálás:** Genomikus DNS izolálást 0,1 g friss levélszövetből végeztük CTAB (cetil-trimetilammónium-bromid) extrakciós pufferrel. **RNS izolálás, cDNS szintézis:** Az RNS izolálást Absolutely RNA Miniprep Kit-tel (# 400800, Stratagene, USA – Biomedica, Hungary) végeztük. A kivont RNS minták minőségét és mennyiségét (2  $\mu\text{l}$  RNS) NanoDrop ND-1000 UV-Vis spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies, Montchanin, DE, USA – BioScience, Budapest, Hungary) határoztuk meg. **cDNS szintézis.** Az egyszálú cDNS-t az mRNS templáton reverz transzkripcióban oligo(dT)<sub>18</sub> primer alkalmazásával szintetizáltuk (Fermentas – Biocenter (Szeged, Hungary; # K1622)). A reakciót 20  $\mu\text{l}$  végtérfogatban végeztük, a reakcióelegy tartalma a következő volt: 3  $\mu\text{g}$  totál RNS; 0,5  $\mu\text{g}$  oligo(dT)<sub>18</sub> primer;  $1 \times$  puffer; 2 mM dNTP mix; 20 egység RiboLock ribonukleáz inhibitor; 200 egység RevertAid M-MuLV reverz transzkriptáz. A cDNS szintézist  $42^\circ\text{C}$ -on 60 percig végeztük, majd a reakciót  $70^\circ\text{C}$ -on 10 perces reakcióidővel állítottuk le. **Primerek:** A cDNS (2,5  $\mu\text{l}$ ) minták génexpressziós analíziséhez gén-specifikus primereket

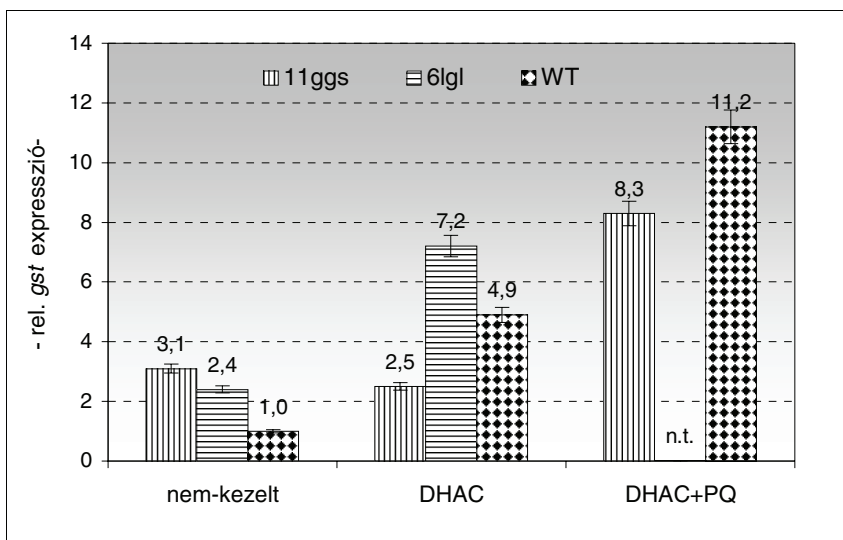
terveztünk a „Primer3” program segítségével ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)). A *gst* génszakaszra (232 nt): az 5'-aca aga aag agc c(a/g) ttc c -3' / 5'-agc tcc cag ttc agc ttt ga-3' primerpárt alkalmaztuk. Belső kontrollnak a konstitutívan expresszálódó *a-tubulin* gén expresszióját mértük az 5'-taa ccg cct tgt ttc tca gg-3' / 5'-cct ggg gta tgg aac caa gt-3' primer-pár alkalmazásával. *Ct értékek (threshold cycle)*: A vizsgált gének expressziós szintjeit a  $2^{-\Delta Ct}$  módszerrel határoztuk meg (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). *Ct értékek*: A felszaporított PCR termék küszöbérték ciklusszámát (threshold) fluoreszcencia értékeit (Ct) manuálisan határoztuk meg.  *$\Delta Ct$  értékek*: Minden cDNS reakció  $\Delta Ct$  értékeit a  $(Ct_{gst} - Ct_{a-tubulin})$  képlet alapján kalkuláltuk, majd a  $\Delta Ct$  értékek átlagait (átl.  $\Delta Ct_{gén}$ ) határoztuk meg.  *$\Delta \Delta Ct$  értékek*:  $\Delta \Delta Ct$  értékek meghatározása során a kezelt minták (átl.  $\Delta Ct_{gén-kezelt}$ ) értékeit a kezeltetlen kontrollhoz (átl.  $\Delta Ct_{gén-kezeletlen}$ ) normalizáltuk (átl.  $\Delta Ct_{gén-kezelt} - \text{átl. } \Delta Ct_{gén-kezeletlen}$ ). Mind a reakció kalibrációjához, mind a kvantifikálásához a cDNS-ből tízszeres hígítási sorozatot ( $1, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$ ) készítettünk, és NTC-t (nem-DNS templát kontroll) alkalmaztunk.

*A GST enzimaktivitás mérése*: A GST enzimaktivitás méréséhez a fagyasztott levélmintákhoz 1:6 arányban 0-4°C-os 0,2 M TRIS/HCl puffert (pH 7.8) adtunk, amely 3% oldható polivinil-pirrolidont és 0,1 mM EDTA-Na<sub>2</sub>-t is tartalmazott, majd a mintákat előhűtött dörzsmozsárban eldörzsöltük. Az így kapott szuszpenziót centrifugáltuk (10 000 g, 20 perc, 4°C). A felülúszó aliquot mennyiségeit használtuk az oldható fehérjetartalom és az enzimaktivitás méréséhez. A GST enzimaktivitásokat spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg. A mérés során szubsztrátumként 1-klór-2,4-dinitrobenzolt használtunk, és az enzimreakcióban keletkező termék (konjugátum) abszorbanciáját követtük 340 nm-en (GULLNER et al., 2005).

## Eredmények és megvitatásuk

A növény számára mérgező exogén vegyületek lebontása három fő lépésben megy végbe. A mérgező anyag először aktiválódik, rendszerint hidrolitikus vagy redox folyamatok révén, majd a termékből konjugátum képződik, amely kiválasztódhat a sejt vakuólumba (illetve a sejtfalhoz kötődve immobilizálódik), vagy további katabolikus reakciók során elbomlik. A konjugátumképzés egyik legfontosabb komponense a tripeptid szerkezetű glutation (GSH). A GSH-toxin konjugátumok jóval vízzoldékonyabbak és sokkal kevésbé toxikusak, mint az eredeti molekulák (BARNA et al., 1993; KIRÁLY et al., 1997; KÖMÍVES et al., 1998; GULLNER et al., 2005). A konjugátum képzést a glutation S-transzferáz (GST, EC 2.5.1.18) izoenzimek katalizálják, melyek nagy számban vannak jelen a növényi szövetekben, a kukoricában (*Zea mays*) például 42, az *Arabidopsis thaliana*-ban 47 GST-izoenzim ismert (BOUCHEZ et al., 1989; EDWARDS et al., 2000).

Az expressziós vizsgálatokban technikailag a génről átíródó mRNA mennyiségét határozzuk meg egy cDNA szintézis lépést követően, génspecifikus PCR primerek alkalmazásával. A vizsgálatokban relatív expressziós mérést alkalmaztunk a konstitutívan expresszálódó *a-tubulin* gén kontrolljában, mert a kezelések hatékonysága pontosabban határozható meg relatív vizsgálati rendszerben, mint abszolút expressziós szintek meghatározásával (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). A mérések során ezért a *gst*-mRNS mennyiségét az *a-tubulin*-mRNS kontrolljában mértük, gén serkentésnek (DHAC-indukált DNS-demetiláció) és paraquat-stressznek kitett mintákban (1. ábra).



**1. ábra.** A szürkenyár (*P. x canescens*) *gst* (glutation S-transzferáz) gén relatív expressziója a DHAC ( $10^{-4}$  M, 7 nap) és kombinált DHAC - paraquat (PQ:  $4 \times 10^{-7}$  M) kezelés alatt, az *a-tubulin* gén kontrolljában, a természetes (WT) és két 35S-*gshI* (11ggs, 6lgl) klónban (n.t. - nem mért adat).

Számos eredmény ismert az egyes stressz-válasz gének expressziós szintjének növelésére abiotikus és biotikus stressz körülményekben. A *Brassica* (SCHAFFER et al., 1998; SUN et al., 2005) és *Arabidopsis* fajokban (XIANG & OLIVER, 1998) többszörösére emelkedett a *gsh*-mRNS mennyisége stresszhatás alatt. A *Physcomitrella patens* mohában 5,7 - 7,9-szeresére emelkedett a *gsh*-mRNS expressziós szintje nehézfém-stresszben ( $10 \mu\text{M Cd}^{2+}$ , 3 napos kezelés) (ROTHER et al., 2006).

**1. táblázat.** A *gst* (glutathion S-transzferáz) génextpressziójának növelése ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$  értékek) a DNS-demetilált (DHAC-kezelt) és a paraquat stressznek kitett természetes (WT) és két 35S-*gshI* (11*ggs*, 6*lgl*) szürkenyár (*P. x canescens*) klonban, az  $\alpha$ -*tubulin* gén kontrolljában.

(a) nem-kezelt növények										
klónok	Ct ( <i>gst</i> )		Ct ( <i>a-tubulin</i> )		Ct különbség		$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$		
	#	SD	#	SD	$\Delta Ct$	SD		átlag	-	+
WT	18,53		20,92		-2,39					
	18,8		20,92		-2,12					
	18,83		21,2		-2,37					
átlag	18,72	0,17	21,01	0,16	-2,29	0,15	0	<b>1,00</b>	0,90	1,11
11 <i>ggs</i>	17,91		21,91		-4					
	18,11		22,02		-3,91					
	18,13		22,12		-3,99					
átlag	18,05	0,12	22,01	0,11	-3,96	0,05	-1,67	<b>3,19</b>	3,08	3,30
6 <i>lgl</i>	17,5		21,23		-3,73					
	17,65		21,29		-3,64					
	17,78		21,23		-3,45					
átlag	17,64	0,14	21,25	0,03	-3,60	0,14	-1,31	<b>2,49</b>	2,25	2,74
(b) kezelés: $10^{-4}$ M DHAC, 0 M PQ										
WT	16,19		21,01		-4,82					
	16,62		21,24		-4,62					
	16,87		21,19		-4,32					
átlag	16,56	0,34	21,14	0,12	-4,58	0,25	-2,29	<b>4,90</b>	4,12	5,84
11 <i>ggs</i>	17,64		21,39		-3,75					
	17,87		21,49		-3,62					
	17,96		21,52		-3,56					
átlag	17,82	0,17	21,46	0,07	-3,64	0,10	-1,35	<b>2,55</b>	2,38	2,73
6 <i>lgl</i>	16,6		21,93		-5,33					
	16,82		21,97		-5,15					
	16,89		21,89		-5					
átlag	16,77	0,15	21,93	0,04	-5,16	0,17	-2,86	<b>7,29</b>	6,50	8,18
(c) kezelés: $10^{-4}$ M DHAC, $4 \times 10^{-7}$ M PQ										
WT	16,4		22,34		-5,94					
	16,6		22,44		-5,84					
	16,75		22,34		-5,59					
átlag	16,58	0,18	22,37	0,06	-5,79	0,18	-3,49	<b>11,3</b>	9,96	12,7
11 <i>ggs</i>	16,21		21,81		-5,6					
	16,48		21,79		-5,31					
	16,73		21,88		-5,15					
átlag	16,47	0,26	21,82	0,05	-5,35	0,23	-3,06	<b>8,34</b>	7,12	9,77

A három fő növényi *gst* géntípus (*gst* multigén géncsaládok) elkülönítése is expressziós vizsgálatokhoz kötődik. A három exonos *gst*-I típusú gének herbicid detoxifikációban indukálódnak. A két exonos *gst*-III típusba tartozó *gst* gének auxin-induktívak. A *gst*-II típus génei közel állnak az emlős *gst* gének felépítéséhez és 10 exont tartalmaznak (EDWARDS et al., 2000). A *gst* gének ősi jellegére utal, hogy számos tagjuk *ocs* (*octopin synthase gene*) -típusú enhancereket is tartalmaz, amelyet először az oktopin szintáz gén promóter régiójában azonosítottak (BOUCHEZ et al., 1989).

Vizsgálatainkban a nyárfa *gst* gén expressziós szintjét (*gst*-mRNA) közel ötszörösére növeltük a DHAC kezeléssel (1. táblázat), amely expressziós szint tovább nőtt a paraquat stressznek is kitett mintákban (11,2-szeres növekedés). Az eredmények igazolják, hogy a DHAC-indukált DNS-demetiláció igen hatékony módszere a gének aktivációjának, a génexpresszió növelésének (GYULAI et al., 2008). Egyben bizonyítják, hogy a *gst* gén promótere stressz induktív. Ismert, hogy a DNS demetiláció a vegetatív klónokban öröklődik (*epigenetikus memória*), ezért a demetilációs eljárásunk (gén up-reguláció) új lehetőséget ad stressztűrő nyárfaklónok előállítására és ezek fitoremediációs alkalmazására.

### Következtetések

A DNS demetilációjával serkentett gének és transzgének új molekuláris eszközei a biotechnológiai növénynemesítésnek. Az eljárás továbbfejlesztésével (génspecifikus demetiláció) forradalmi áttörés várható az irányított növénytermesztésben és talajvédelemben.

### Irodalomjegyzék

- ARISI, A. C. M., NOCTOR, G., FOYER, C. H. & JOUANIN, L. (1997): Modification of thiol contents in poplars (*Populus tremula* x *P. alba*) overexpressing enzymes involved in glutathione synthesis. *Planta* **203**. 362-372.
- BARNA, B., ÁDÁM, L. & KIRÁLY, Z. (1993): Juvenility and resistance of a superoxide-tolerant plant to diseases and other stresses. *Naturwissenschaften* **80**. 420-422.
- BITTSÁNSZKY, A., GYULAI, G., KISS, J., GULLNER, G., CSINTALAN, Z., SZABÓ, Z., LÁGLER, R. & KÖMÍVES, T. (2005a): Stress tolerance and in vitro phytoremediation of poplar (*Populus* sp.). *Hungarian Agricultural Research* **14**. 13-15.
- BITTSÁNSZKY, A., KÖMÍVES, T., GULLNER, G., GYULAI, G., KISS, J., HESZKY, L., RADIMSZKY, L. & RENNENBERG, H. (2005b): Ability of transgenic poplars with elevated glutathione content to tolerate zinc<sup>(2+)</sup> stress. *Environment International* **31**. 251-254.
- BITTSÁNSZKY, A., GYULAI, G., HUMPHREYS, M., GULLNER, G., CSINTALAN, Z., KISS, J., SZABÓ, Z., LÁGLER, R., TÓTH, Z., RENNENBERG, H., HESZKY, L. & KÖMÍVES, T. (2006): RT-PCR analysis and stress response capacity of transgenic gshI-poplar clones (*Populus x canescens*) in response to paraquat exposure. *Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* **61**. 699-730.

- BITTSÁNSZKY, A., GYULAI, G., MALONE, R. P., GULLNER, G., KISS, J., CZAKÓ, M., MÁRTON, L., HESZKY, L. & KÖMÍVES, T. (2007a): Triggering of a plant molecular defense mechanism; gene expression levels of transgene *gshI* and poplar gene *gshI* (*Populus x canescens*) in response to the DNA demethylating drug DHAC – an qRT-PCR analysis. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* **42**. 235-243.
- BITTSÁNSZKY, A., GYULAI, G., KISS, J., GULLNER, G., HESZKY, L. & KÖMÍVES, T. (2007b): Feketenyár (*Populus nigra*) gametoklónok mikroszatellita változatossága; (TTCTGG)<sub>5</sub> delécia a WPMS-20 lokuszon. *Agrártudományi Közlemények* **27**. 60-67.
- BOUCHEZ, D., TOKUHISA, J. G., LLEWELLYN, D. J., DENNIS, E. S. & ELLIS, J. G. (1989): The ocs-element is a component of the promoters of several T-DNA and plant viral genes. *EMBO Journal* **8**. 4197-4204.
- CHANVIVATTANA, Y., BISHOPP, A., SCHUBERT, D., STOCK, C., MOON, Y.-H., SUNG, Z. R. & GOODRICH, J. (2004): Interaction of Polycomb-group proteins controlling flowering in *Arabidopsis*. *Development* **131**. 5263-5276.
- EDWARDS, R., DIXON, D. P. & WALBOT, V. (2000): Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Science* **5**. 193-198.
- FINNEGAN, E. J. & KOVAC, K. A. (2000): Plant DNA methyltransferases. *Plant Molecular Biology* **43**. 189-201.
- FINNEGAN, E. J., GENDER, R. K., KOVAC, K., PEACOCK, W. J. & DENNIS, E. S. (1998): DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**. 5824-5829.
- GOFFIN, J. & EISENHAEUER, E. (2002): DNA methyltransferase inhibitors - State of the art. *Annals of Oncology* **13**. 1699-1716.
- GULLNER, G., GYULAI, G., BITTSÁNSZKY, A., KISS, J., HESZKY, L. & KÖMÍVES, T. (2005): Enhanced inducibility of glutathione S-transferase activity by paraquat in poplar leaf discs in the presence of sucrose. *Phyton - Annales Rei Botanicae* **45**. 39-44.
- GYULAI, G., KISS, J., JEKEL, Z., KISS, E. & HESZKY, L. E. (1995): A selective auxin and cytokinin bioassay based on root and shoot formation *in vitro*. *Journal of Plant Physiology* **145**. 379-382.
- GYULAI, G., HUMPHREYS, M., BITTSÁNSZKY, A., SKØT, K., KISS, J., SKØT, L., GULLNER, G., HEYWOOD, S., SZABÓ, Z., LOVATT, A., RADIMSZKY, L., RODERICK, H., RENNENBERG, H., ABBERTON, M., KÖMÍVES, T. & HESZKY, L. (2005): AFLP analysis and improved phytoextraction capacity of transgenic *gshI*-poplar clones (*Populus x canescens* L.) for copper *in vitro*. *Zeitschrift für Naturforschung C* **60**. 300-306.
- GYULAI, G. (2007): DHAC-indukált transzgén-reaktiváció a 35S-*gshI* GMO szürkenyárban (*Populus x canescens*). *Agrártudományi Közlemények* **27**. 78-83.
- GYULAI, G., TÓTH Z., BITTSÁNSZKY, A., SZABÓ, Z., GULLNER, G., KISS, J., KÖMÍVES, T. & HESZKY, L. (2008): Gene up-regulation by DNA demethylation in 35S-*gshI*-transgenic poplars (*Populus x canescens*). In: *Genetically Modified Plants: New Research Trends*. Chapter 8. (Eds.: WOLF T., KOCH J.) 1-22. Nova Science Publisher, Inc. USA.
- HORVATH, D. P., ANDERSON, J. V., CHAO, W. S. & FOLEY, M. E. (2003): Knowing when to grow: Signals regulating bud dormancy. *Trends in Plant Science* **8**. 534-540.



- KIRÁLY, Z., EL-ZAHABY, H. M. & KLEMENT, Z. (1997): Role of extracellular polysaccharide (EPS) slime of plant pathogenic bacteria in protecting cells to reactive oxygen species. *Journal of Phytopathology* **145**. 59-68.
- KISS, J. (1999): A nyárfa nemesítése biotechnológiai módszerekkel (PhD Disszertáció), Szent István Egyetem, Gödöllő, pp. 98.
- KÖMÍVES, T., GULLNER, G. & KIRÁLY, Z. (1998): Role of glutathione and glutathione-related enzymes in response of plants to environmental stress p. 251-258, In: Stress of life. from molecules to man Vol. 851. (Ed.: CSERMELY, P.). The New York Academy of Sciences, New York, USA.
- LINN, F., HEIDMANN, I., SAEDLER, H. & MEYER, P. (1990): Epigenetic changes in the expression of the maize A1 gene in *Petunia hybrida*: Role of numbers of integrated gene copies and state of methylation. *Molecular and General Genetics* **222**. 329-336.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408.
- LLOYD, G. & MCCOWN, B. H. (1980): Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proc Int Plant Prop Soc.* **30**. 421-427.
- NOCTOR, G., ARISI, A. C. M., JOUANIN, L. & FOYER, C. H. (1998): Manipulation of glutathione and amino acid biosynthesis in the chloroplast. *Plant Physiology* **118**. 471-482.
- ROTHER, M., KRAUSS, G. J., GRASS, G. & WESENBERG, D. (2006): Sulphate assimilation under Cd<sup>2+</sup> stress in *Physcomitrella patens* - Combined transcript, enzyme and metabolite profiling. *Plant, Cell and Environment* **29**. 1801-1811.
- SCHAFFER, H. J., HAAG-KERWER, A. & RAUSCH, T. (1998): cDNA cloning and expression analysis of genes encoding GSH synthesis in roots of the heavy-metal accumulator *Brassica juncea* L.: Evidence for Cd-induction of a putative mitochondrial γ-glutamylcysteine synthetase isoform. *Plant Molecular Biology* **37**. 87-97.
- SUN, X., SUN, X. M., YANG, Z. M., LI, S. Q., WANG, J. & WANG, S. H. (2005): Expression of *Brassica napus* L. γ-glutamylcysteine synthetase and low- and high-affinity sulfate transporters in response to excess cadmium. *Journal of Integrative Plant Biology* **47**. 243-250.
- WOLFFE, A. P. & MATZKE, M. A. (1999): Epigenetics: Regulation through repression. *Science* **286**. 481-486.
- XIANG, C. B. & OLIVER, D. J. (1998): Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**. 1539-1550.