

Doktori (PhD) értekezés

## Trehalóz anyagcsere vizsgálata gomba- és növény fajokban

Czövek Pálma Tünde

Biológia Doktori Iskola  
Iskolavezető: Dr. Erdei Anna  
egyetemi tanár, akadémikus

Kísérletes növénybiológia doktori program  
Programvezető: Dr. Szigeti Zoltán  
egyetemi tanár, az MTA doktora

Témavezető: Dr. Király István  
adjunktus, PhD



Eötvös Loránd Tudományegyetem Biológiai Intézet  
Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék

Budapest

2011

*„Felfedezni valamit annyit tesz,  
mint látni, amit mindenki lát,  
és közben arra gondolni,  
amire még senki.”*

*/Szent-Györgyi Albert/*

*Családomnak, Akik hisznek bennem:  
Édesapámnak, Édesanyámnak,  
Férjemnek és Kisfiamnak*

# Tartalomjegyzék

Jelölések, rövidítések jegyzéke	I-II
<b>1. Bevezetés</b>	1
<b>2. Irodalmi áttekintés</b>	3
2.1. A trehalóz	3
2.2. A trehalóz bioszintézise	12
2.3. A trehalóz transzportja	19
2.4. A trehalóz katabolizmusa	20
2.5. A trehalóz anyagcsere transzgenikus manipulációja	26
2.6. A trehalóz alkalmazási területei	29
2.7. Trehalóz intolerancia	33
2.8. Vizsgálati objektumok jellemzése	34
2.8.1. <i>Morchella</i> fajok	34
2.8.2. <i>Populus</i> és <i>Quercus</i> fajok jellemzése	39
2.8.2.1. <i>Populus</i> genus	39
2.8.2.2. <i>Quercus</i> genus	42
<b>3. Célkitűzések</b>	47
<b>4. Anyagok és módszerek</b>	48
4.1. Vizsgálati objektumok I.	48
4.1.1. Tenyészetek létrehozása	48
4.1.2. Kísérleti összeállítások	49
4.1.2.1. Trehalóz anyagcsere vizsgálata <i>Morchella steppicola</i> életciklusának vegetatív szakaszában	49
4.1.2.2. <i>Morchella steppicola</i> és <i>Morchella conica</i> törzsek trehaláz enzim indukciója szilárd és folyadékkultúrában	50
4.1.2.3. <i>Morchella steppicola</i> szárazságstressz-toleranciájának vizsgálata folyadékkultúrában	51
4.1.2.4. Trehalóz-6-foszfát szintáz és trehaláz gének keresése <i>M. steppicola</i> és <i>M. esculenta</i> genomális DNS állományában	51
4.2. Vizsgálati objektumok II.	51
4.2.1. Mikroszaporított növényi anyag tápoldatos nevelése	52
4.2.1.1. Biotikus stressz hatásának vizsgálata a növények SOD, POD és trehaláz enzim aktivitására	53
4.2.1.2. Kifejlett levelek trehaláz enzim indukciója	54

4.2.1.3.	Trehalóz-6-foszfát szintáz és trehaláz gének keresése <i>Populus glauca</i> L.var <i>Kopeczkii</i> genomialis DNS állományában	54
4.2.2.	Természetben gyűjtött növényi minták vizsgálata	55
4.2.2.1.	Különböző fenológiai fázisú <i>Populus canescens</i> virágrügyek trehaláz enzimaktivitásának meghatározása	55
4.2.2.2.	Trehalóz-6-foszfát szintáz és trehaláz gének keresése <i>P. canescens</i> és <i>Quercus robur</i> genomialis DNS állományában	55
4.3.	A vizsgálatok során alkalmazott klasszikus és modern élettani és molekuláris biológiai módszerek	55
4.3.1.	Enzimpreparátumok készítése	55
4.3.1.1.	Trehaláz enzimkivonat készítése	55
4.3.1.2.	Extracelluláris trehaláz enzimpreparátum készítése	56
4.3.1.3.	SOD és POD izoenzimek kinyerése	56
4.3.2.	Összfehérje-tartalom meghatározása	57
4.3.3.	Enzimaktivitás meghatározása	57
4.3.3.1.	Trehaláz izoenzimek aktivitásának meghatározása	57
4.3.3.2.	SOD és POD izoenzimek aktivitásának meghatározása	58
4.3.3.2.1.	Aktivitási festés	59
4.3.3.2.2.	Gélek kiértékelése	60
4.3.4.	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> és H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> tartalom meghatározása	60
4.3.5.	A száraz súly meghatározása	61
4.3.6.	Malondialdehid tartalom meghatározása	61
4.3.7.	Klorofill tartalom meghatározása	62
4.3.8.	Össz-karotinoid tartalom meghatározása	62
4.3.9.	Antocián tartalom meghatározása	62
4.3.10.	Glükóz és trehalóz tartalom meghatározása	63
4.3.10.1.	Minták előkészítése	63
4.3.10.2.	Vékonyréteg kromatográfia	63
4.3.10.3.	A kifejlesztett kromatogram előhívása és kiértékelése	64
4.3.11.	Genomi DNS kivonása	64
4.3.12.	Primer tervezés	65
4.3.13.	PCR	66
4.3.14.	Fragment izolálás, szekvenálás	69
4.3.15.	Szekvenciák ellenőrzése, analízise	70
4.3.16.	Statisztika és grafikus ábrázolás	71
4.3.17.	Digitális képfeldolgozás	71

<b>5.     <b>Eredmények és értékelésük</b></b>	72
I. <i>Morchella</i> fajok vizsgálata	72
5.1.   Trehalóz anyagcsere vizsgálatok <i>Morchella steppicola</i> vegetatív életciklusában	72
5.1.1.   Oxidatív stressz kitartóképlet indukáló hatásának vizsgálata	72
5.1.2.   Trehaláz izoenzim-aktivitás változásának vizsgálata	79
5.2.   Trehaláz izoenзимek indukciója <i>M. conica</i> és <i>M. steppicola</i> vegetatív micéliumában	84
5.2.1.   Szilárd kultúrák <i>M. steppicola</i> tenyészetek vizsgálata	84
5.2.2. <i>M. conica</i> és <i>M. steppicola</i> folyadékkultúrák vizsgálata	89
5.3. <i>M. steppicola</i> szárazságstressz-tűrőképesség vizsgálata	93
II.    Növényi minták vizsgálata	99
5.4.   Trehaláz izoenzim-indukció <i>P. glauca</i> L. var <i>Kopeczkii</i> kifejtett leveleiben	102
5.5.   Biotikus stressz <i>P. glauca</i> L. var <i>Kopeczkii</i> növényekre gyakorolt hatásának vizsgálata	108
5.6.   Természetben gyűjtött <i>Populus canescens</i> virágrügyek trehaláz izoenzim aktivitásának meghatározása	118
5.7.   Trehalóz-6-foszfát szintáz és trehaláz gének keresése <i>M. esculenta</i> , <i>M. steppicola</i> , <i>P. glauca</i> L. var <i>Kopeczkii</i> és <i>Quercus robur</i> genomialis DNS állományában	120
<b>6.     <b>Következtetések</b></b>	123
<b>7.     <b>Összefoglalás</b></b>	125
<b>8.     <b>Summary</b></b>	126
<b>9.     <b>Köszönetnyilvánítás</b></b>	127
<b>10.    <b>Irodalomjegyzék</b></b>	128
<b>Függelék</b>	
<b>Publikációs jegyzék</b>	

## Jelölések, rövidítések jegyzéke

AA	akrilamid
ABC transzporter	ATP-binding cassette (ATP-kötő kazetta) transzporter
APS	ammónium-peroxi-diszulfát
APX	aszorbát-peroxidáz
AsA	aszorbát
BBCH	Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie
BisAA	N,N'-metilén-biszakrilamid
BRFK	brómfenolkék
CAT	kataláz
Chl, Chlid	klorofill, klorofillid
CTAB	cetil-trimetil-ammóniumbromid
ddH <sub>2</sub> O	bidesztillált víz
DHAR	dehidroaszorbát-reduktáz
dNTP	dezoxiribonukleotid-trifoszfát(ok)
EDTA	etilén-diamin-tetraacetát
EBI	European Bioinformatics Institute
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
GMO	genetically modified organisms
GR	glutation-reduktáz
GSH	redukált glutation
GST	glutation-S-transzferáz
HOG, Hog	high osmolarity glycerol
HPTLC	high performance thin layer chromatography (nagy felbontású vékonyréteg kromatográfia)
HSP	heat shock proteins (hő sokkfehérjék)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
IUBMB	The International Union of Biochemistry and Molecular Biology
JA	jazmonát(ok)
LEA	late embryogenesis abundant proteins (késői embriogenezis során felhalmozódó fehérjék)
MA	maláta-agar táptalaj (malt-agar)
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
MDA	malondialdehid
MDHAR	monodehidro-aszorbát-reduktáz
MPS	mikropszeudoszklerócium(ok)
MS	Murashige-Skoog táptalaj
MS*, MS**, MSK	MS táptalaj variánsok

mtsai	munkatársai
NBT	nitro-blue-tetrazolium (p-nitro-tetrazolium-blue-chloride)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PCR	polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció
PDA	burgonya-dextróz táptalaj (potato dextrose agar)
PEG	polietilén-glikol
PEP	phosphoenolpyruvate (foszfoenolpiruvát)
pH <sub>opt</sub>	pH optimum
POD	peroxidáz
PS	pszeudoszkleróciüm(ok)
PSI	képződő pszeudoszkleróciüm (pseudosclerotia initials)
PSD	fejlődő pszeudoszkleróciüm (pseudosclerotia developing)
PSM	érett pszeudoszkleróciüm (mature pseudosclerotia)
PTS	phosphotransferase system (foszfofotranszferáz rendszer)
PVP	polivinil-pirrolidin
Ras	receptor associated sygnal (receptorhoz kapcsolt szignál)
ROS	reactive oxygen species (reaktív oxigénformák)
RU	relative unit (relatív egység)
SD	standard deviation, normál szórás
SDS	sodium dodecyl sulfate (nátrium-dodecil-szulfát)
SOD	szuperoxid-dizmutáz
sp.	species (faj)
spp.	fajok
ssp.	subspecies (alfaj)
SSF	solid-state fermentation (szilárd fázisú fermentáció)
STRE	stress responsive elements (stressz rezponzív szabályozó elemek)
T6P	$\alpha, \alpha$ -trehalóz-6-foszfát
TPS	trehalóz-6-foszfát szintáz enzim
TAE	trisz-acetát-EDTA gélelektroforézis puffer
TBA	tiobarbitursav
TCA	triklórecetsav
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etiléndiamin
TLC	thin layer chromatography (ld. VRK)
T <sub>opt</sub>	hőmérsékleti optimum
var.	varietas (változat)
VRK	vékonyréteg-kromatográfia
↓, ↑	csökken, nő

# 1. BEVEZETÉS

A globális felmelegedés következtében fellépő szélsőséges időjárási viszonyok és a változás gyors üteme különösen nagymértékű megterhelést jelentenek az élővilág számára. A természetben az élettelen környezeti tényezők folyamatos, eltérő mértékű változása figyelhető meg; amikor az adott fajra jellemző optimum tartományon kívül eső értékeket érnek el (vízhiány, szélsőséges hőmérsékleti értékek, ozmotikus terhelés, kedvezőtlen fényviszonyok, kiegyenlítetlen ásványi táplálkozás), az az élőlények számára stresszhelyzetet jelent. Az ehhez való alkalmazkodás a sikeres túlélés záloga, melynek hátterében különféle védelmi mechanizmusok húzódnak meg. A stressz által kiváltott védekező reakciók hatékonysága szerint stresszel szemben érzékeny (szenzitív) és stressztűrő (rezisztens) élőlényeket különböztethetünk meg.

A prognózisok alapján a csapadékviszonyok kedvezőtlen változása jelenti az egyik legfőbb problémát, mely hazánk növénytermesztésbe vont területeit is jelentős mértékben érinti: az időszakosan szárazságstressz sújtotta területek kiterjedése várható. Ugyanakkor időszakosan a szélsőségesen megnövekedett csapadékmennyiség a kórokozók fokozott kártételét idézheti elő.

A vízhiány okozta stresszhelyzet az egyik legnagyobb kihívás a homeosztázis megőrzése szempontjából. Az élőlények ozmotikus egyensúlyának fenntartása esszenciális, kedvezőtlen körülmények között különféle védelmi mechanizmusok aktiválódnak.

Mikroorganizmusok és gombák körében jól ismert válasz a bioprotektív anyagok szintézise és felhalmozása, a stressz mértékének fokozódásakor ezzel összefüggésben spórák, kitaróképletek képzése és ebben a nyugalmi állapotban a kedvező feltételek kivárása.

A helyhez kötött életmódú szárazföldi növények fejlődését, növekedését és produktivitását a környezeti tényezők egyaránt befolyásolják, a fellépő különféle stresszhatásokat eltérő mértékben képesek tolerálni, az egyedek, a populáció és a faj szintjén jellemző potenciáljuk függvényében. A szárazság kedvezőtlen hatásai erőteljesen érintik őket, tűrőképességük szerint nagyfokú különbségeket figyelhetünk meg az azonos élőhelyeken élő egyes fajok között is. Törzsféjlődésük során számos eredményes stratégia alakult ki a transzpiráció szabályozásától a metabolikus és struktúrát érintő válaszokon át egészen az extrém anhidrobiotikus állapot kialakulásáig. Nagyfokú illetve extrém toleranciával jellemezhető típusokban ozmoprotektív anyagok felhalmozása jellemző.



Külön említést érdemel a növényi reprodukcióban fellépő vízvesztés során a pollen és az embrió túlélését biztosító szacharóz alapú biológiai üveg állapot.

A bioprotektív molekulák jellemzően kisméretűek, speciális tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyek képessé teszik őket a különféle stresszhatások okozta negatív hatások kivédésére, a károsodások mértékének lehető legnagyobb mértékű csökkentésére a biomolekulák szerkezetének stabilizálása révén.

A trehalóz a természet alkotta legeredményesebb bioprotektív molekula, kivételes sajátságait fiziko-kémiai tulajdonságainak köszönheti. Vízmegvonás hatására képes helyettesíteni a biomolekulák szerkezetét stabilizáló hidratációs réteg vízmolekuláit. Eredményes biológiai üveg képzőként hosszú ideig képes megőrizni a biopolimerek képességét arra, hogy a kedvező körülmények beköszöntekor visszanyerjék eredeti szerkezetüket.

A trehalóz szintézisében és lebontásában résztvevő enzimek genetikai hátterének, kifejeződésük, aktiválódásuk szabályozásának részletes megismerése a baktériumok és az eukarióták világában egyaránt jelentőséggel bír az alap- és alkalmazott kutatás számára, lehetőséget nyújt például arra, hogy a gazdasági haszonnövények stressztűrő képességét a trehalóz anyagcsere-génekkal történő transzformációval fokozzák.

Doktori munkám fókuszában a trehalóz anyagcsere vizsgálata áll. Eredményeim egyfelől a tömlősgombák között élekciklus tekintetében különleges helyet elfoglaló *Morchellák* egyedfejlődését leíró modellek pontosítását, igazolását segítik elő, másrésről az ökológiai, természetvédelmi és ipari szempontból jelentős *Populus* fajokkal elvégzett kísérletek új ismeretekkel járulnak hozzá a magasabbrendű növényekben leírt tudományos eredményekhez, a trehalóz anyagcsere növényi metabolikus hálózatokban betöltött szerepének tisztázásához.

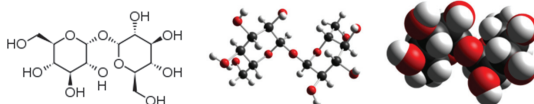
## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. A trehalóz

A trehalóz ( $\alpha$ -D-glükopiranozil- $\alpha$ -D-glükopiranozid) a természetben előforduló nem redukáló sajátságú homodiszacharid, mely szénhidrát szerkezeti sajátsága a benne  $\alpha,\alpha'$ -1,1'-glikozid kötéssel összekapcsolt két  $\alpha$ -D-glükóz egység (Hudson 1916, Taga és mtsai 1972, Jain és Roy 2009). A trehalóz IUPAC elnevezése: 2-(hidroximetil)-6-[3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropirán-2-il]oxi-tetrahidro-pirán-3,4,5-triol. A szerves vegyületek biogenetikai rendszerében a trehalóz a Szacharidok anyag törzsébe, a Glikozidok anyagosztályába és a Holozidok (oligoszacharidok) anyagrendjébe tartozik.

A trehalóz számos kiemelkedő és páratlan tulajdonsággal rendelkezik, melyek mind a molekula kémiai szerkezetének és fiziko-kémiai tulajdonságainak köszönhetőek (Birch 1963, Elbein 1974, Iturriaga és mtsai 2009). Zárt gyűrű formában tartja kémiai kötése, így nem tartalmaz szabad aldehid vagy keto csoportot, ezáltal nem lép reakcióba a fehérjék szabad amino-csoportjaival (Chen és Haddad 2004). Az  $\alpha,\alpha'$ -1,1'-glikozid kötés alacsony energiájú (1 kcal/mol), ennek köszönhetően szerkezetét extrém nagy stabilitás jellemzi, összevetve a szacharózzal, mely cukormolekulában nagyenergiájú (27 kcal/mol) kötés található (Iturriaga és mtsai 2009). Glikozidos kötését nem hasítja a glikozidáz enzim, savas hidrolízissel szemben még magas hőmérsékleten is jelentős mértékben ellenáll (Chen és Haddad 2004). Nem redukáló szénhidrát, így nem vesz részt a Maillard (nem enzimátikus glikoziláció) reakcióban (Maillard 1912, Hodge 1953, Iturriaga és mtsai 2009).

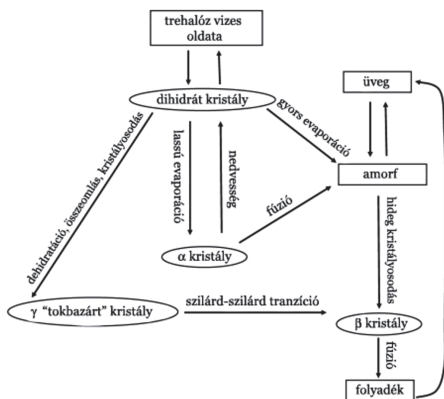
A trehalóz D(+)-trehalóz-dihidrát ( $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot 2H_2O$ ,  $M_w$ : 378.33 [g/mol]) és D(+)-trehalóz ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ,  $M_w$ : 342.30 [g/mol]) anhidrikus formában fordul elő. Az anhidrikus forma nedvesség jelenlétében könnyen hidratálódik. A D(+)-trehalóz molekula 8 H-híd donor és 11 akceptor hellyel rendelkezik. A trehalóz szerkezetét az 1. ábra mutatja be.



1. ábra A trehalóz molekula szerkezeti képlete klasszikus, gömb-pálcika és térkitöltős megjelenítésben. (Forrás: Wikipedia® <http://en.wikipedia.org/wiki/Trehalose>)

A trehalóz fizikai sajátságait tekintve is kivételes diszacharid: fajlagos optikai forgatóképessége  $[\alpha]_D^{20} +178^\circ$ , olvadási folyamata különleges. A D(+)-trehalóz-dihidrát olvadáspontja  $97^\circ\text{C}$ , további hő hatására távozik a dihidrát forma víztartalma és  $130^\circ\text{C}$ -on megszilárdul, majd a vízmentes trehalóz  $203^\circ\text{C}$ -on lép folyadék fázisba (Chen és Haddad 2004). Oldékonysága  $68.9 \text{ g}/100 \text{ g}$  oldat vízben  $20^\circ\text{C}$ -on, oldódik etanolban, dietil-éterben, de benzolban nem (Lide 2005, Higashiyama 2002).

A trehalóz polimorf vegyület, kristályos és amorf állapotot egyaránt képes felvenni. Az egyetlen cukor, amely magas hőmérsékleten is stabil amorf, nem-higroszkópos kristályokat képez (Crowe és mtsai 1998). Ez a tulajdonsága lehetővé teszi, hogy üvegszerű állapotot hozzon létre és így extrém hőmérsékleten is más cukroknál hosszabb ideig intakt maradjon (Iturriaga és mtsai 2009). Két teljes kristályos formája, egy jól meghatározott amorf forma, valamint az amorf és kristályos formák között számos átmeneti állapota ismert (2. ábra; Taga és mtsai 1972, Sussich és mtsai 2001, Nagase és mtsai 2002, McGarvey és mtsai 2003, Cesaro és mtsai 2008, Jain és Roy 2009).



**2. ábra** A polimorf trehalóz molekula állapotátmenetei.

(Forrás: Jain és Roy 2009 – „Effect of trehalose on protein structure” tudományos cikk 1. ábrája)

Az általános előfordulású trehalóz-dihidrát rombold kristályai szobahőmérsékleten stabilak (Taga és mtsai 1972). A D(+)-trehalóz-dihidrát és  $\alpha$  kristályok átalakulása reverzibilis folyamat, a vízmentes  $\alpha$  kristály abszorbeálja a nedvességet és visszaalakul a kristályos dihidrát formába (Sussich és mtsai 2001). A lassú ütemű vízvesztés (fokozatos felmelegítés hatására) azt eredményezi, hogy a kristályrács nem degenerálódik,

az  $\alpha$  vízmentes és dihidrát kristály formák átalakulásakor a kristályszerkezet végig megőrzi integritását (Jain és Roy 2009).

A hőmérséklettől és a vízvesztés sebességétől függően a dihidrát kristály átalakulhat amorf illetve  $\gamma$  kristályformába. Az amorf trehalóz anhidrikus  $\beta$  kristályt vagy üveg-állapotot képes létrehozni. A vízmentes  $\beta$  kristály meghatározott körülmények között, lassú dehidratálás során alakul ki (Jeffrey és Nanni 1985).  $\alpha$  kristály akkor jön létre, amikor a hőmérsékletet lassan és fokozatosan emelik 85°C-ig (Nagase és mtsai 2003).

A trehalóz ismert elnevezései:  $\alpha,\alpha$ -trehalóz,  $\alpha$ -trehalóz, 1,1-trehalóz, D-trehalóz, mikóz, tremalóz, 'anyarozs cukor' (ergot sugar). Ez utóbbi elnevezés H.A.L. Wiggers felfedezésének állít emléket, aki 1832-ben anyarozsból izolálta, egy fitopatogén tömlősgombából (*Claviceps purpurea* (Fr.)Tul), amely a gabonafélék, elsősorban a rozs megbetegedését okozza: a kalászban a virágokat megfertőzve elpusztítja a termőt. 1858-ban Marcellin Berthelot 'trehala'-ból, *Larinus maculatus* báb burkából vonta ki és nevezte el ezt a diszacharidot trehalóznak<sup>[21]</sup> (Berthelot 1858, Hanbury 1859, Gültekin 2008).

A trehalóz az élővilágban széles körben elterjedt különleges diszacharid, az 1970-es években jelenléte már több mint 80 fajban, baktériumokban, gombákban, növényekben, rovarokban és más gerinctelen állatokban ismert (Elbein 1974). Felfedezése óta folyamatosan bővül az ismeretünk az előfordulásáról és a különböző organizmusokban betöltött szerepéről. Kezdetben ritka előfordulású cukornak tartották, mivel csupán néhány élőlényből sikerült izolálni: reszurrekciós (a teljes dehidratálásból újraéledő) növényekből, élesztőből és egyes rovarok lárváiból (Iturriaga és mtsai 2009).

Napjainkra számos adat gyűlt össze az előfordulásáról: a baktériumok, gombák és gerinctelen állatok körében előfordulása általános, szintűgy a növényekben is – viszont bennük néhány kivételtől eltekintve mennyisége a kimutathatósági határ alatt marad (Streeter 1985, Müller és mtsai 1995, Garg és mtsai 2002, Nelson 2002, Barra és mtsai 2003, Breeuwer és mtsai 2003, Vázquez-Ortiz és Valenzuela-Soto 2004, Chen és Haddad 2004, Bolling és Fiehn 2005, Avonce és mtsai 2006, May és mtsai 2008, Paul és mtsai 2008). Az utóbbi évtizedben a műszeres analízis fejlődésének köszönhetően az érzékenységi tartomány kibővülésével megteremtődött a lehetősége az olyan anyagok kimutatásának, mint például a növényekben előforduló trehalóz (Schluepmann és Paul 2009).

---

<sup>[21]</sup> A trehalóz ezáltal érdekes kapcsolódási pontot képvisel a különféle tudományterületek – a zoológia, botanika, kémia és biokémia között (Tillequin 2009).

Biológiai szerepe sokrétű, az élőlények különböző csoportjaiban eltérő funkciókat lát el, megjelenik mint szénforrás, raktározott tápanyag, strukturális komponens, és védőmolekula különféle stresszhatásokkal szemben (Richards és mtsai 2002, Jain és Roy 2009).

A trehalóz természetes előfordulását és szerepét az élővilágban érdemes részletesebben a főbb rendszertani csoportokra lebontva is áttekinteni, mivel az egyes csoportok között jelentős eltéréseket találunk. Az áttekintést megelőzően érdemes szót ejtenünk az élővilág felosztásában az 1990-es években történt jelentős változásról: az öt ország elméletet felváltotta a genetikai eredmények alapján kialakított „három domén” elmélet, mely szerint az élővilág fő csoportjai az archeák, a valódi baktériumok és az eukarióták doménjei (Woese és mtsai 1990). A továbbiakban az új taxonómiai besorolásnak megfelelően rendszerezve szerepel a trehalóz biológiai funkcióinak alakulása az élőlények különböző csoportjaiban.

Az archea és a valódi baktériumok doménbe tartozó élőlények (prokarióták) körében a trehalóz hasznosul, mint szén és energiaforrás (raktározott anyag), részt vesz a felépítésükben mint strukturális komponens (glikolipid), jelen van oldott anyagként (cianobaktériumok, fotoszintetizáló baktériumok), és érvényesül mint stresszprotektor molekula (ozmoreguláció) (Whatmore és Reed 1990, Lippert és mtsai 1993, Strom és Kaasen 1993, Crowe és mtsai 1994, Helfert és mtsai 1995, Kempf és Bremer 1998, Arguelles 2000, Rueda és mtsai 2001, Murphy és mtsai 2005, Carpinelli és mtsai 2006, Jain és Roy 2009). A trehalóz bakteriális létformákban ellátott funkciói közül a prokarióták egyes csoportjaiban (nemzetség, faj szinten) olykor csak egy-egy szerepet tölt be, például *Escherichia coli* baktériumban magas ozmolaritás hatására szintetizálódik, míg *Bacillus subtilis* ozmoregulációjában nem játszik szerepet, csupán szénforrásként hasznosul (Whatmore és Reed 1990, Helfert és mtsai 1995, Kempf és Bremer 1998). Számos más baktérium faj szintén képes a trehalózt metabolizálni, közéjük tartozik a fogszuvasodásért elsősorban felelős *Streptococcus mutans* is (Ajdić és Pham 2007). Több más baktériumfajban szintén jelen van – közéjük tartoznak a *Streptomyces* fajok is, ahol a trehalóz, mint raktározott szénhidrát fordul elő a spórákban (Rueda és mtsai 2001). Számos baktériumfaj ismert melyek trehalóz-glikolipideket tartalmaznak, ilyenek a *Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp., *Rhodococcus* spp., *Corynebacterium* spp. (Desai és Banat 1997, Murphy és mtsai 2005, Carpinelli és mtsai 2006). Ezek a fajok a felületaktív anyagok komplex keverékét állítják elő, melyek főkomponensei a trehalóz-mikolátok (Lang és Philp 1998). Nitrogén szegény körülmények között anionos trehalóz-tetraésztereket szintetizálnak (Lang és Philp 1998).

A trehalóz szerepe az eukarióták körében is többretű, hasonlóan a prokariótákban betöltött funkcióihoz. Az eukarióták közül eleinte főként a gombák és állatok országának<sup>[2]</sup> képviselőiben, a növények esetén az anhidrobiózis képességével rendelkező reszurrekciós fajokban írták le jelenlétét (Iturriaga és mtsai 2009).

Az alga és apicomplexa fajokban (protisták országa) igazolták a trehalóz bioszintézis útvonal meglétét, néhány fajban trehalózt is sikerült kimutatni (Takenaka és mtsai 1997, Porchia és mtsai 1999, Yu és mtsai 2010). Körükben a trehalóz hasznosulhat szénforrásként, és mint ozmoprotektáns molekula – *Euglena gracilis* Z. só és ozmotikus stressz hatására trehalózt akumulál (Takenaka és mtsai 1997, Porchia és mtsai 1999, Yu és mtsai 2010).

A gombák anyagcseréjében a trehalóz kiemelkedő fontosságú: élettani szerepe kettős, egyrészt, mint tartalék tápanyag biztosítja a kitartóképletek, spórák csírázásának energetikai hátterét (a legnagyobb mennyiségben képződő raktározott szénhidrát), másrészt, mint bioprotektáns molekula védi a sejtstruktúrákat számos stresszhatással szemben (Hammond és Nichols 1976, Crowe és mtsai 1987, Panek 1995, De Araujo 1996, Hounsa és mtsai 1998, Sano és mtsai 1999, Arguelles 2000, Secks és mtsai 2000, Wisser és mtsai 2000, Elbein és mtsai 2003, Garre és Matallana 2009). A gombák anyagcseréjében stresszhatásra indukálódó anyagcserefolyamatok között kiemelkedő jelentőségű a trehalóz szintézise. A mikológiai szakirodalomból jól ismert, hogy ozmotikus-, hő-, hideg- és fagy-stresszre különféle ozmoprotektív anyagok szintézise megy végbe, melyek szerepe a sejtstruktúrák védelme. Élesztők és fonalas gombák vizsgálataiból származó eredmények kiemelkedő fontosságúnak találták a trehalóz akumulációt, mely azon túl, hogy a stressz-védelemben esszenciális, a legfőbb raktározott szénhidrát (Thevelein 1984, De Virgilio és mtsai 1990, Eleutherio és mtsai 1993, Van Dijck és mtsai 1995, De Araujo 1996, Jorge és mtsai 1997, Hounsa és mtsai 1998, Sano és mtsai 1999, Plourde-Obwobi és mtsai 2000, Secks és mtsai 2000, Al-Bader és mtsai 2010). A kitartóképletek (pl. szkleróciumok) és a spórák képzése általában egybeesik a trehalóz szintézisével (Hammond és Nichols 1976, Thevelein 1984, Van Dijck és mtsai 1995, Wisser és mtsai 2000). A nagygombák közül néhány ehető és egyúttal gyógyhatású gombafajban igazolták jelenlétét és kimérték mennyiségét, mely a száraz súlyra vetítve 1-17 % között változott (shiitake – *Lentinula edodes* (Berk.)Pegler, maitake – *Grifola fondosa* (Dicks.)Gray, nameko – *Pholiota nameko* (T. Ito)S. Ito et Imai, júdásfüle gomba – *Auricularia auricula-judae* (Bull.ex Fr.)Wettst).

---

<sup>[2]</sup> Az eukarióta doménbe 4 ország tartozik: a protisták, gombák, növények és állatok országa (Woese és mtsai 1990).

A növényekben hosszú ideig néhány extrém szárazságtűrő csoport (*Selaginella spp.*, *Bryophyllum spp.*, *Botrychium lunaria* (L.)SW.) kivételével a trehalóz szintézise nem volt bizonyított (Kandler és Senser 1965, Adams és mtsai 1990). Az elmúlt években ismerték fel, hogy az élőlények népes csoportja tartalmazza a trehalóz szintézis funkcionális génjeit, viszont nem akumulálnak trehalózt – ebbe a csoportba tartozik a növények jelentős többsége is néhány trehalózt felhalmozó kivételtől eltekintve (Iturriaga és mtsai 2009). Napjainkban az a tudományos álláspont, hogy a növények körében is széles körben elterjedt a trehalóz szintézis képessége (Avonce és mtsai 2006, Iturriaga és mtsai 2009), ám a trehalóz akumuláció mértéke többnyire nem éri el a különféle mérési módszerek érzékenységi határát, mivel a képződő- és akumulálódó trehalózt a citoplazmatikus trehaláz enzim az aktuális celluláris homeosztázis igényeihez igazodva bontja (Wingler 2002). Éppen ezért csak kevés esetben (rezurrekciós növényfajok, néhány spermatozita) sikerült kimutatni (Cegla és Bell 1977, Adams és mtsai 1990, Bianchi és mtsai 1993, Drennan és mtsai 1993, Albini és mtsai 1994, Zentella és mtsai 1999). A napraforgó mag trehalóz tartalmára vonatkozó eredmények érvényességét Kandler és Hopf (1980) megkérdőjelezte, véleményük szerint az eredmény műtermék, mely a napraforgó gombás fertőzéséből adódott (Kendall és mtsai 1990).

A növények anyagcsere- és fejlődésélettani folyamatainak (például embriófejlődés, virágzás) szabályozásában a  $\alpha,\alpha$ -trehalóz-6-foszfátnak (T6P, intermedier a trehalóz szintézis folyamatában) igazoltan szerepe van (Rolland és mtsai 2002, Eastmond és mtsai 2003, Rolland és mtsai 2006, Satoh-Nagasawa és mtsai 2006, Paul 2007, Ramon és mtsai 2007, Paul és mtsai 2008, Iturriaga és mtsai 2009, Smeekens és mtsai 2010). Az utóbbi években felismerték a trehalóz anyagcsere szerepét a növény-mikroorganizmus interakciókban (López és mtsai 2007, Iturriaga és mtsai 2009).

Az állatok országában a trehalózt elsőként a rovarok hemolimfájában mutatták ki (Elbein és mtsai 2003, Chen és Haddad 2004). A trehalóz a repülő rovarokban (egyenesszárnyúak-, lepkék és hártýásszárnyúak rendje) biztosítja a mozgáshoz szükséges gyors energiaellátást, mivel a trehaláz enzim egy lépésben két glükóz molekulát szabadít fel (Elbein és mtsai 2003). A trehalóz szintézis képessége a gerinctelen állatok számos csoportjában megőrzött, stresszhelyzetben akumulációja jellemző (Arguelles 2000, Nelson 2002, Sakurai és mtsai 2008, Iturriaga és mtsai 2009). A gerinctelen állatok körében előfordulása általános, fontos diszacharid a rovarok osztályán kívül különféle férgekben, és a medveállatkák törzsében is (Ramlöv és Westh 1992, Behm 1997, Arguelles 2000, Benaroudj és mtsai 2001, Jönsson 2007, Sakurai és mtsai 2008, Iturriaga és mtsai 2009).

Gerinces állatokban nem fordul elő (hiányzó bioszintézis útvonal) (Chen és Haddad 2004, Yu és mtsai 2010), viszont a trehalóz bontásához szükséges trehaláz enzim az emlősök különböző fajaiban – így az emberben is – megtalálható kis mennyiségben a vékonybélben és más szervekben (Mercer és mtsai 1990, Sasai-Takedatsu és mtsai 1996, Richards és mtsai 2002, Jain és Roy 2009).

Ozmotikus és oxidatív stressz hatására trehalóz akkumuláció figyelhető meg baktériumokban, különféle élesztőtörzsekben, a gombák körében, nematoda- és rovarfajokban, alacsonyabbrendű és reszurrekciós növényekben (Adams és mtsai 1990, Bianchi és mtsai 1993, Leprince és mtsai 1993, Albini és mtsai 1994, Behm 1997, Hounsa és mtsai 1998, Arguelles 2000, Dardanelli és mtsai 2000, Benaroudj és mtsai 2001, Kandror és mtsai 2002, Barra és mtsai 2003, Breeuwer és mtsai 2003, Wolf és mtsai 2003). Ismereteink jelentős része az ipari felhasználás tekintetében kiemelkedő fontosságú élesztőtörzsek vizsgálati eredményein alapul. A legkülönbözőbb stresszhelyzetek hatására – úgymint anoxia, tápanyaghiány, sóstressz, hősokk, fagystressz, etanol-stressz, ártalmas kemikáliák jelenléte – a *Saccharomyces cerevisiae* L. törzsek trehalózt akkumulálnak integritásuk védelmében (Eleutherio és mtsai 1993, Hottiger és mtsai 1994, Hazell és mtsai 1995, Panek 1995, De Araujo 1996, Pavia és Panek 1996, Hazell és mtsai 1997, Nwaka és Holzer 1998, Sano és mtsai 1999, Pereira és mtsai 2001, Garre és Matallana 2009).

Az élő organizmusok ozmotikus egyensúlyának fenntartása esszenciális, stresszhelyzetben komplex védelmi mechanizmus aktiválódik, melynek részét képezi a kisméretű molekulák, egyszerű cukrok, úgymint a trehalóz bioszintézise és akkumulációja. Szerepük a membránok és makromolekulák szerkezetének stabilizálása a dehidratáció során.

A trehalóz kiváló ozmotikum, védi a sejtstruktúrákat: dehidratáció hatására egyrészt kapcsolódik a membránok hidrofíli felületéhez, így azok nem válnak rigiddé, és rehidratálódáskor védettek a sérüléstől, feldarabolódástól, másrészt akkumulációja növeli a citoplazma viszkozitását, ezáltal meggátolja a fehérje domének elmozdulását (Crowe és mtsai 1987, Panek 1995, Sano és mtsai 1999, Secks és mtsai 2000, Sampedro és Uribe 2004). *In vitro* vizsgálatok eredményei igazolták, hogy izolált enzimek szerkezetét és aktivitását egyaránt megőrizte (Sampedro és Uribe 2004).

A trehalóz kivételes bioprotektív sajátságát fiziko-kémiai tulajdonságainak köszönheti, melyek között az egyik legfontosabb, hogy számos polimorf (kristályos és amorf) állapotba létezik (2. ábra), és a reverzibilis dehidratáció-rehidratáció folyamatában a diszacharid három-dimenziós szerkezete nem változik (Jain és Roy 2009).



A trehalóz molekulát nagy flexibilitás jellemzi – összevetve a többi diszachariddal – a két  $\alpha$ -D-glükóz egység közötti glikozidos kötésének köszönhetően, amely tulajdonsága lehetővé teszi, hogy kölcsönhatásba lépjen különböző makromolekulák szabálytalanul elhelyezkedő poláris csoportjaival (Donnamaria és mtsai 1994, Iturriaga és mtsai 2009). A trehalóz a stresszhelyzet elmúlását követően gyors ütemben, egy lépésben a trehaláz izoenzim család (EC 3.2.1.28.) közreműködésével 2 db glükóz molekulára bomlik, így a megnövekedett viszkozitás által előidézett enzimaktivitás gátlás megszűnik (Sampedro és Uribe 2004).

A trehalóz bioprotektív képessége három lehetséges mechanizmussal magyarázható: víz-helyettesítés, biológiai üveg képzés és kémiai stabilizálás (Iturriaga és mtsai 2009, Jain és Roy 2009). Feltételezhetően a három mechanizmus együttesen eredményezi a trehalóz kivételes hatékonyságát a biomolekulák védelmében (Iturriaga és mtsai 2009).

A víz-helyettesítés teóriájának alapállítása, hogy a biomolekulák körül a víz réteget képez és H-híd kötésekkel stabilizálja a szerkezetüket (Jain és Roy 2009). Vízmegvonás hatására (dehidratáció, fagy) a trehalóz helyettesíti a hidratációs réteg vízmolekuláit, így megátalja a biomolekulák irreverzibilis denaturációját (Clegg 1986, Iturriaga és mtsai 2009). Ezt erősíti meg Crowe és mtsai által, a trehalóz hatásmechanizmusát felderíteni célzó infravörös spektroszkópiai vizsgálat, mely eredménye szerint a molekula H-híd kötésekkel létesít a saját hidroxil-csoportjai és a fehérjékben lévő poláris gyökök között, így helyettesítve a szerkezet-stabilizáló vízburkot (Crowe és mtsai 1992). A strukturális stabilizálásban a trehalóz molekula glikozidos kötésének köszönhető nagy flexibilitása is szerepet játszik (Donnamaria és mtsai 1994, Iturriaga és mtsai 2009).

A trehalóz amorf, nem higroszkópos kristályai magas hőmérsékleten és vízmentes állapotban egyaránt stabilak, ez a sajátosága teszi lehetővé, hogy biológiai üveg képződjön (Crowe és mtsai 1998, Iturriaga és mtsai 2009, Jain és Roy 2009). A biológiai üveg amorf, üvegszerű tulajdonságokkal rendelkező túltelített cukoroldat, amely kialakításában az alkotó szénhidrátoknak, illetve az alkotó cukormolekulák arányának tulajdonítanak szerepet (Koster 1991, Buitink és Leprince 2008). A biomolekulák ebben az üveg-állapotban hosszabb ideig, akár hónapokig vagy évekig megőrzik képességüket arra, hogy rehidatációkor visszanyerjék eredeti szerkezetüket (Green és Angell 1989, Iturriaga és mtsai 2009).

A trehalóz a természetben széles körben elterjedt biológiai üveg képző molekula. Különleges sajátosságai együttesen teszik lehetővé szélsőséges környezeti körülmények között, extrém stresszhelyzetben az organizmus integritásának megőrzését, ezáltal biztosítva

a kedvezőtlen állapot túlélését és a kedvező feltételek újbóli fennállásakor a fiziológiás állapot gyors elérését.

Extrém mértékű stressz hatásakor a túlélést biztosító igen sajátos stratégia a kriptobiózis. A vízhelyettesítés és biológiai üveg képződés teszi lehetővé, hogy élő organizmusok a kriptobiózis állapotában képesek túlélni a különböző szélsőséges környezeti behatásokat (Sola-Penna és Meyer-Fernandes 1998, Sakurai és mtsai 2008, Iturriaga és mtsai 2009). A kriptobiózis az élő organizmus nyugalmi állapota, melyben az anyagcsere-tevékenység szünetel, s e látszólagosan felfüggesztett életműködés idején a sejtek integritásának megőrzését üvegszerű struktúra biztosítja. A kriptobiotikus állapot kialakulása során a biomolekulák védelmében a két mechanizmus (vitifikáció és vízhelyettesítés) kombináltan érvényesül (Sola-Penna és Meyer-Fernandes 1998, Sakurai és mtsai 2008). A kriptobiózis öt típusát különböztetjük meg: anhidrobiózis (extrém dehidratáció), kriobiózis (nagyon alacsony hőmérséklet), ozmobiózis (szélsőséges ozmotikus hatás), kemobiózis (toxikus anyagok) és anoxibiózis (oxigénhiány). A legtöbb ismerettel az anhidrobiózis és kriobiózis állapotokról rendelkezünk. A kedvezőtlen körülmények elmúlását követően az organizmus anyagcsereje aktiválódik és visszaáll a normál működés.

Az anhidrobiotikus állapotra való képesség az élővilág mindhárom doménjében előfordul (Iturriaga és mtsai 2009). Az anhidrobiózis, a „víz nélküli élet” állapotát számos mikroorganizmus – eubacteria, archea és élesztő fajok –, néhány gomba faj, a gerinctelen élőlények közül a kerekesek- (*Rotifera* phylum) és fonalféreg (*Nematoda* phylum), a medveállatkák (*Tardigrada* phylum), az *Artemia salina* (sórák, sófereg) petéi, a *Polypedilum vanderplanki* árvaszúnyog lárvája, valamint a reszurrekciós növények képesek túlélni (Behm 1997, Nelson 2002, Sakurai és mtsai 2008, Iturriaga és mtsai 2009). Csodálatra méltó ellenállóképességük hátterében a prokarióták, élesztőfajok, medveállatkák és fonalféreg esetében, valamint a sófereg petéiben és a *P. vanderplanki* lárváiban a trehalóz felhalmozódása áll.

Az újjáéledő növények között nem általános a trehalóz előfordulása mint akkumulált protektív molekula. Igazoltan a *Selaginella lepidophylla*, a *Myrothamnus flabellifolius* és a *Sporobolus stapfianus* akkumulálnak trehalózt (Adams és mtsai 1990, Bianchi és mtsai 1993, Drennan és mtsai 1993, Albini és mtsai 1994, Zentella és mtsai 1999).

A növényi szénhidrát-anyagcsere jellegéből fakadóan a reszurrekciós növények integritásuk védelmében eltérő anyagokat mozgósítanak: jellemző protektív molekula a szacharóz, melynek

akkumulációja *Ramonda* és *Haberlea* fajokban, a *Craterostigma plantagineum*<sup>623</sup>, illetve a védőhatását elősegítő-erősítő raffinózzal történő együttes felhalmozódása a *Xerophyta viscosa* növényekben figyelhető meg (Müller és mtsai 1997, Norwood és mtsai 2000, Scott 2000, Bartels és Salamini 2001, Peters és mtsai 2007). A szacharóz képes helyettesíteni a dehidratáció során kilépő vizet, és így stabilizálni a biomolekulák szerkezetét (Crowe és mtsai 1987, Ingram és Bartels 1996). A raffinóz szerepe a szacharóz kikristályosodásának megelőzése, ezáltal a vitrifikáció elősegítése (Koster 1991, Lin és Huang 1994, Peters és mtsai 2007).

A vegetatív kiszáradástűrés a zuzmók és mohák körében általános tulajdonság, a szövetes növények (*Tracheophyta*) csoportjában széles körben, de egyenetlen eloszlásban fordul elő (Kappen és Valladares 1999, Tuba 2001). A *Tracheophyta*-k között 2000. körül az ismert kiszáradástűrő fajok száma ~350, ez a szám napjainkban is tovább bővül (Porembski és Barthlott 2000, Tuba 2001, Proctor és Pence 2002, Proctor és Tuba 2002). A reszurrekciós növények száma csekély, viszont a szövetes növények világában a kiszáradástűrés képessége mégis általánosnak tekinthető, mivel a spórák, a pollen és a magvak deszikkáció-toleránsak (Oliver és mtsai 2000). Anhidrobiotikus állapotban a pollen és embrió túlélését jelentős mennyiségű szacharóz akkumulációja biztosítja, ezt a biológiai üveg állapotot mutatták ki csiraképes kukoricaszemekben is (Hoekstra és mtsai 1989, Williams és Leopold 1989, Black és mtsai 1996).

Az élőlények a trehalózt többféle úton képesek előállítani, a prokarióták és eukarióták között fontos eltérés mutatkozik: a sejtmag nélküliekben több, az eukariótákban egy típusú folyamat jellemző.

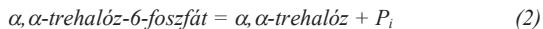
## 2.2. A trehalóz bioszintézise

A trehalóz szintézis képessége az élővilágban széles körben elterjedt, mindhárom doménben általánosan előfordul, a prokarióták (archea, eubacteria), gombák, növények és gerinctelen állatok körében egyaránt jellemző (Avonce és mtsai 2006).  $\alpha,\alpha$ -trehalóz hét bioszintézis útvonalon keletkezhet, melyek közül az eukariótákban egy, a prokariótákban további 6 útvonal fordul elő (Avonce és mtsai 2006).

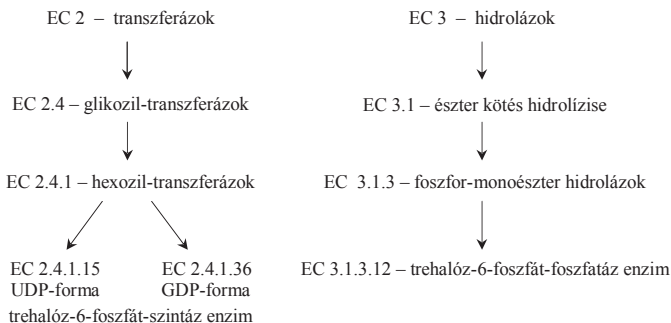
Az  $\alpha,\alpha$ -trehalóz bioszintézise eukariótákban a trehalóz-6-foszfát-szintáz/trehalóz-6-foszfát-foszfátáz enzimkomplex (EC 2.4.1.15, EC 3.1.3.12) közreműködésével, két lépésben történik (3. ábra; Francois és Parrou 2001, Avonce és mtsai 2006).

A trehalóz-6-foszfát-szintáz (TPS) enzim a transzferáz csoportba, a trehalóz-6-foszfát-foszfátáz (TPP) enzim a hidrolázok közé tartozik, részletes besorolásukat a 4. ábra mutatja be.

<sup>623</sup> A *Craterostigma plantagineum* szacharóz akkumulációja különleges. Normál körülmények között, hidratált állapotban egy ritka szénhidrátot tartalmaz a 2-oktulozt (szárazanyagtartalom 50%-a), melyet dehidratáció során szacharózzá alakít át, majd a kedvező körülmények beköszöntével visszaalakítja 2-oktulozzá (Norwood és mtsai 2000, Scott 2000, Bartels és Salamini 2001).



**3. ábra** A trehalóz bioszintézise I. A folyamat (1) lépésében az  $\alpha, \alpha$ -trehalóz-6-foszfát (T6P) kialakulását az  $\alpha, \alpha$ -trehalóz-6-foszfát-szintáz, a (2) reakcióban az  $\alpha, \alpha$ -trehalóz képződését az  $\alpha, \alpha$ -trehalóz-6-foszfát-foszfátáz katalizálja. \*: II. bioszintézis útvonal: a TPS szubsztrája ADP-D-glükóz. III. bioszintézis útvonal: GDP-D-glükóz a kiindulási molekula, ennek függvényében az EC 2.4.1.36 trehalóz-6-foszfát szintáz enzim katalizálja a folyamatot.



**4. ábra** A trehalóz-6-foszfát-szintáz (TPS) és a trehalóz-6-foszfát-foszfátáz (TPP) enzimek besorolása a IUBMB enzim nevezéktan szerint.

A *Saccharomyces cerevisiae* enzimkomplexe négy egységből épül fel: Tps1p<sup>634</sup> szintáz (56 kDa), Tps2p<sup>634</sup> foszfátáz (102 kDa), Tps3p és Tsl1p regulátor egységek (115 kDa és 123 kDa) (Bell és mtsai 1992, De Virgilio és mtsai 1993, Thevelein és Hohmann 1995, Winderickx és mtsai 1996, Parrou és mtsai 1997, Reinders és mtsai 1997, Bell és mtsai 1998, Noubhani és mtsai 2009). A regulátor egységek biztosítják az enzimkomplex integritását és szabályozzák a T6P szintézisét (Vuorio és mtsai 1993, Parrou és mtsai 1997, Bell és mtsai 1998). A trehalóz-6-foszfát-szintáz/foszfátáz és a szabályozó egységek kódoló génjei: TPS1, TPS2, TPS3 és TSL1 (Winderickx és mtsai 1996, Francois és Parrou 2001, Noubhani és mtsai 2009).

A TPS1 gén működése hatással van a glükóz-anyagcserére, általános glükóz-szenzor funkcióval bír, amely élesztőknél a Ras-cAMP szignáltranszdukciós úttal összefüggésben valósul meg (Hazell és mtsai 1995, 1997, Hoffmann és mtsai 1997, Winderickx és mtsai 1996).

<sup>634</sup> A Tps1p a TPS, a Tps2p a TPP szinonim megnevezése a kódoló gének (TPS1 és TPS2) alapján.

A TPS1 gén termékének hiánya a sejtben pleiotrop hatású: indukálódik a cAMP szintézise és a glikolízis enzimeit, aktiválódik a kation transzport és fokozódik a  $H^+$ -ATP-ázok működése, miközben gátlódik a glükoneogenezis (Thevelein és Hohmann 1995). *S. cerevisiae* élesztőben a trehalóz szintézis a mitokondriális folyamatokra is hatással van (Noubhani és mtsai 2009).

A glükóz represszálja a TPS1 gént, a gátló hatás mértéke a glükóz koncentrációjától és a trehalóz szintézisét katalizáló enzimkomplex aktivációs állapotától függ (Panek és Mattoon 1977, Hottiger és mtsai 1987, Lutfiyya és mtsai 1998). Az  $\alpha$ -D-glükóz-6-foszfát és az UDP-D-glükóz indukálják a trehalóz szintézisét (Vandercammen és mtsai 1989).

A trehalóz szintáz gének, így a TPS1 gén indukciója a hő sokk- és stressztolerancia gének expressziójához is szorosan kapcsolódik, hasonlóan számos más szabályozó régióban STRE elemeket tartalmazó génekhez. Indukciós tényezők a hő, ozmotikus stressz és a tápanyaghiány (Vuorio és mtsai 1993, Winderickx és mtsai 1996, Parrou és mtsai 1997, Bell és mtsai 1998, Parrou és mtsai 1999). Az enzimkomplex géneinek expressziója összehangolt, működésüket represszálja a Ras-cAMP jelátviteli út vonal (Winderickx és mtsai 1996). A Tps1p monomer formában is előfordul, a stressz-indukált expresszió ebben az esetben is jellemző, miként a Ras-cAMP út vonal általi represszió is (Vuorio és mtsai 1993, Parrou és mtsai 1999, Bell és mtsai 1998).

A TPS enzim produktuma a T6P, kis mennyiségben fordul elő a citoplazmában, számos élőlényben szabályozó szerepet tölt be a glikolízisben valamint a trehalóz szintézisben egyaránt a hexokináz enzimreakció gátlása révén: a hexokináz II enzim erős-, a hexokináz I enyhe inhibitora (Blazquez és mtsai 1993, Thevelein és Hohmann 1995, Hohmann és mtsai 1996, Bell és mtsai 1998, Panneman és mtsai 1998, Boy-Marcotte és mtsai 1999, De Silva-Udawatta és Cannon 2001, Voit 2003, Noubhani és mtsai 2009). A hexokináz enzimre érvényesülő gátló hatás nem mutatható ki a *Tuber borchii* (késői szarvasgomba) fajban, miképpen a T6P az *Arabidopsis thaliana* AtHXK1 és AtHXK2 valamint a spenót (*Spinacia oleracea*) hexokináz enzimeit sem gátolja (Wiese és mtsai 1999, Agostini és mtsai 2001, Eastmond és mtsai 2002). A hexokináz enzim katalizálja az  $\alpha$ -D-glükóz-6-foszfát képződését, amely molekula szubsztrátja mind a TPS-nek, mind a glikolízis glükóz-6-foszfát-izomerázának.

Növényekben a T6P fontos szabályozó szerepet tölt be a szénhidrát-anyagcserében (cukor-hasznosítás, keményítő és szacharóz anyagcsere), a növekedésben és fejlődésben, kölcsönhatásban áll jelátviteli út vonalakkal – beleértve a növényi hormonokhoz kapcsolódóakat is (Rolland és mtsai 2002, Eastmond és Graham 2003, Paul 2007, Paul és mtsai 2008,

Iturriaga és mtsai 2009, Smeekens és mtsai 2010). A T6P szabályozó szerepének háttérében meghúzódó mechanizmus az élesztőkben és a növényekben alapvető eltérést mutat – az élesztőkben jellemző hexokináz enzim gátlás a növényekben nincs meg, a T6P eltérő sejtbeli targetekre hat, úgymint az SnRK1 protein kinázra (Eastmond és mtsai 2002, Eastmond és mtsai 2003, Schluepmann és Paul 2009). A T6P növekedésre és fejlődésre gyakorolt hatásának elsődleges oka feltételezhetően az SnRK1 gátlás (Schluepmann és Paul 2009). A T6P bizonyítottan részt vesz a kloroplasztisz redox-folyamatainak szabályozásában, miként például a NADPH/NADP aránytól független AGPáz aktiválásban, aminek hatására fokozódik a keményítő bioszintézise (Schluepmann és Paul 2009). *Arabidopsis thaliana* 11 transzkriptálódó TPS génje közül négy (AtTPS1 – AtTPS4) a 'Class I' csoportba, az AtTPS5 – AtTPS11 szintáz és foszfatáz aktivitást mutató enzimeket kódoló hét gén pedig a 'Class II' csoportba tartozik (Chary és mtsai 2008). Mutáns *A. thaliana* növényekkel végzett vizsgálatok eredményei alapján a 'Class I' TPS géntermékeknek a keményítő raktározás-, a szárazságstresszel szembeni rezisztencia és a virágok szerkezeti felépítésének szabályozásában van szerepe. A 'Class II' gének közül az AtTPS6 fontos szerepet tölt be a sejtszintű morfogenezis kontrolljában, szabályozza az epidermisz sejtek formáját és a trichomák elágazását (Chary és mtsai 2008).

A baktériumok között jól ismert az *Escherichia coli* törzsek trehalóz szintézise, mely a 3. ábrán ismertetett I. bioszintézis útvonalon zajlik. A szintézis két lépését katalizáló enzimeket az Ots gén-csoport kódolja: az otsA – a TPS, az otsB – a TPP enzimnek felel meg (Gibson és mtsai 2002). Ezek a gének hasonlóak az élesztő TPS1 és TPS2 génjeihez. A regulátor egység génje az rpoS (Wolf és mtsai 2003). Az otsA és otsB gének expressziójára az ozmotikus stressz illetve a sejtek stacionárius fázisa aktiváló, míg a szabályozó rpoS gén inaktivációja gátló hatású (Giaever és mtsai 1988, Hengge-Aronis és mtsai 1991, Kaasen és mtsai 1992). *E. coli* csak abban az esetben akumulál trehalózt ozmotikus stresszhelyzetben, amikor gátoltak az elsődleges védelmi mechanizmusai ( $K^+$ -ion, glicin-betain akumuláció) és így a stresszhatással szemben védtelenné válik (Larsen és mtsai 1987). Az ozmotikus stresszhelyzetben túltermelt trehalóz egy részét a periplazmatikus térbe választja ki, ahol a periplazmatikus trehaláz enzim lebontja (ld. trehaláz bontás II.), így tartva fenn a megfelelő citoplazmatikus trehalóz koncentrációt (Styrvoid és Strom 1991).

A II.-VII. bioszintézis útvonalak prokarióta szervezetekre jellemzőek.

A II. útvonalon a TPS szubsztrátja az ADP-D-glükóz, egyébként a folyamat azonos módon zajlik le, amint az a 3. ábrán látható.

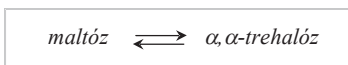
Az *Actinobacteria* törzsbe tartozó *Mycobacterium* fajokban és egy mutáns élesztőtörzsben mutatták ki. A mutáns élesztőben nem volt UDP-D-glükózt preferáló enzim, helyette a TPS szubsztrátja az ADP-D-glükóz (Paschoalin és mtsai 1989). A *Mycobacterium smegmatis* és a *Mycobacterium tuberculosis* fajokból preparált TPS enzim képes mind az öt nukleozid-difoszfátot (ADP-, CDP-, GDP-, TDP-, UDP-) glikozil-donorként használni (Pan és mtsai 1996, Pan és mtsai 2002).

A III. útvonalon a 3. ábrán bemutatott szintézis megy végbe azzal a különbséggel, hogy a TPS (EC 2.4.1.36) szubsztrátja a GDP-D-glükóz. Ez a bioszintézis útvonal az *Actinobacteria* törzsben jellemző, megléte számos *Streptomyces* és *Mycobacterium* fajban bizonyított (Elbein 1967a, 1967b, 1968). A szintetizálódott trehalóz a spórákban raktározódik, a nyugvó spórákban védelmi funkciót is ellát - dehidratáció során helyettesíti a biomolekulák szerkezetét stabilizáló vízburkot (Hey-Ferguson és mtsai 1973, Rueda és mtsai 2001).

Számos mikroorganizmus képes trehalózt szintetizálni glükóz-6-foszfát/T6P jelenléte nélkül közvetlenül maltózból, közülük néhányban ez az egyetlen bioszintézis útvonal, míg más élőlényekben, mint pl. a *Mycobacterium*-okban és a *Corynebacterium glutamicum*-ban számos trehalóz-bioszintézis útvonal van jelen együttesen (De Smet és mtsai 2000, Wolf és mtsai 2003).

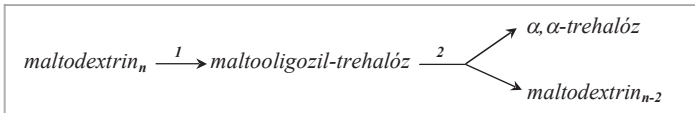
A IV. bioszintézis útvonalon a trehalóz molekulán belüli átrendeződéssel képződik: a maltóz  $\alpha$ -1,4 kötése alakul át  $\alpha$ -1,1 kötéssé (5. ábra; Koh és mtsai 2003). A maltóz- $\alpha$ -D-glukoziltranszferáz enzim katalizált folyamat többféle módon mehet végbe, melléktermékként képződhet glükóz és/vagy  $\alpha,\beta$ -trehalóz, más esetekben – például *Pseudomonas stutzeri*-ben – kizárólag trehalóz keletkezik (Lee és mtsai 2005).

*Corynebacterium glutamicum* baktériumban a IV. bioszintézis útvonal fordított irányban is működik (kompenzálja a trehaláz enzim hiányát), ekkor a folyamatban trehalózból maltóz képződik, ami lehetővé teszi a trehalóz, mint C-forrás hasznosítását (5. ábra; Wolf és mtsai 2003).



**5. ábra IV. bioszintézis útvonal.** A maltóz- $\alpha$ -D-glukoziltranszferáz enzim (EC 5.4.99.16) által katalizált  $\alpha,\alpha$ -trehalóz szintézis (Nishimoto és mtsai 1995, Nishimoto és mtsai 1996).

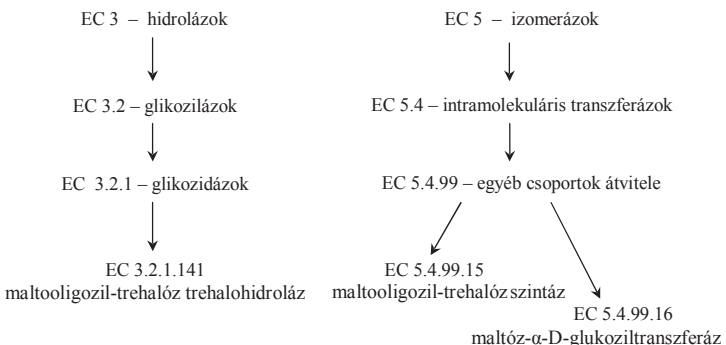
Az V. útvonalon a IV. bioszintézis folyamathoz hasonlóan foszfát-vegyületek jelenlététől függetlenül valósul meg a trehalóz bioszintézise. A kiindulási molekula maltodextrin, melyből első lépésben maltooligozil-trehalóz, majd a maltooligozil-trehalóz trehalohidroláz (EC 3.2.1.141) enzim katalízise során maltodextrin és  $\alpha,\alpha$ -trehalóz képződik (6. ábra). Maltooligozil-trehalóz a maltooligozil-trehalóz szintáz enzim (EC 5.4.99.15) által katalizált folyamatban intermolekuláris transzglukozilációval keletkezik. A maltodextrin a folyamatban két glukozil-egységgel rövidül a kiindulási molekulához képest (Maruta és mtsai 1996).



**6. ábra** V. bioszintézis útvonal. Maltodextrinből a maltooligozil-trehalóz szintáz (EC 5.4.99.15) enzim közreműködésével képződik malto-oligozil-trehalóz (1), melyet a (2) második lépésben a maltooligozil-trehalóz trehalohidroláz (EC 3.2.1.141) hasít el  $\alpha,\alpha$ -trehalóz és két glukozil egységgel rövidebb maltodextrin molekulákra.

A *Corynebacterium glutamicum* fajban, mely három különböző útvonalon is képes trehalózt előállítani, az elsődleges ez a maltodextrinből kiinduló trehalóz bioszintézis útvonal. Maltodextrin a keményítő molekulák részleges hidrolízise során keletkezik, tagszáma:  $2 < n < 20$ . A *Rhizobiaceae* családban gyakori az V. trehalóz szintézis útvonal (Streeter és Bhagwat 1999).

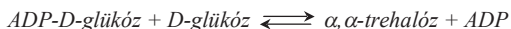
A IV. és V. útvonalak bioszintetikus folyamataiban közreműködő enzimek részletes besorolását a 7. ábra foglalja össze.



**7. ábra** A IV. és V. trehalóz bioszintézis-folyamatokat katalizáló enzimek IUBMB enzim nevezéktan szerinti besorolása.



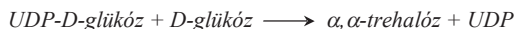
A trehalóz bioszintézise egy lépésben a hexozil-transzferázok (EC 2.4.1) közé tartozó  $\alpha,\alpha$ -trehalóz-szintáz (EC 2.4.1.245) közreműködésével is végbemehet. Az  $\alpha,\alpha$ -trehalóz-szintáz enzim a hipertermofil archeonokban katalizálja a trehalóz speciális szintézisét (Qu és mtsai 2004, Ryu és mtsai 2005). Az  $\alpha,\alpha$ -trehalóz-szintáz enzimkatalizált reakció a TPS által katalizált reakciótól eltérően reverzibilis (8. ábra; Qu és mtsai 2004).



**8. ábra** VI. bioszintézis útvonala. Az  $\alpha,\alpha$ -trehalóz-szintáz enzim által katalizált  $\alpha,\alpha$ -trehalóz szintézis.

A hipertermofil *Thermococcus litoralis*  $\alpha,\alpha$ -trehalóz-szintáz enzime ADP-t (Qu és mtsai 2004), a *Pyrococcus horikoshii* enzime ADP-, UDP- és GDP-glükózt is azonos mértékben preferál (Ryu és mtsai 2005). Fordított irányban az  $\alpha,\alpha$ -trehalóz-szintáz szubsztrát-specifitása szigorú, a katalízis csak az  $\alpha,\alpha$ -trehalóz molekulára terjed ki (Qu és mtsai 2004).

A VII. trehalóz bioszintézis útvonala a *Thermoproteus tenax* hipertermofil archeon mikroorganizmusra jellemző. A 9. ábrán látható módon, egy lépésben képződik a trehalóz, hasonlóan a VI. útvonala folyamatához.



**9. ábra** *Thermoproteus tenax* trehalóz bioszintézise – VII. bioszintézis útvonala.

A *T. tenax* trehalóz szintáz enzime azonban két sajátágban is eltér a *T. litoralis* és *P. horikoshii* fajokban leírt enzimtől (Kouril és mtsai 2008):

1. UDP-D-glükóz szubsztrátot részesít előnyben
2. a katalizált enzimreakció egyirányú

A rendelkezésre álló ismeretanyag összehasonlító elemzése alapján az irreverzibilis VII. útvonala számos archea és néhány valódi baktérium fajban jellemző (Kouril és mtsai 2008).

### 2.3. A trehalóz transzportja

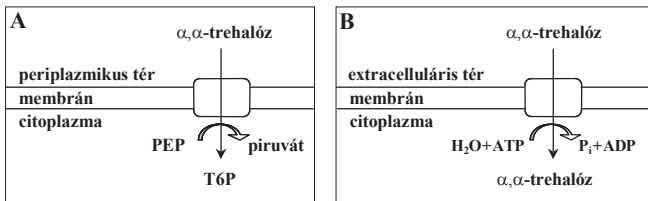
A trehalózt hasznosítani képes élő szervezetek számára két lehetőség adott:

1. az extracelluláris forrás felvétele és citoplazmatikus bontása,
2. sejten kívüli lebontást követően a keletkezett glükóz molekulák transzportja.

Az extracelluláris trehalóz felvétele élőlénytől függően történhet permeáz típusú transzporterén keresztül, ekkor a trehalóz változatlan formában jut be a citoplazmába, illetve a foszfortranszferáz rendszeren (PTS) keresztül, amely az extracelluláris mono- és diszacharidok felhasználásában játszik szerepet, a transzportfolyamat eredménye  $\alpha$ -D-mono-/diszacharid-foszfát – jelen esetben T6P.

A trehalóz transzport három lehetséges módon valósulhat meg:

- A. elsődleges aktív transzport,
- B. másodlagos aktív transzport és
- C. passzív transzport útján.



**10. ábra** Az extracelluláris trehalóz felvételében szerepet játszó elsődleges aktív transzportfolyamatok. **A:** PEP-függő PTS transzport-mechanizmusa, **B:** ABC transzporter közvetített transzport (EC 3.6.3.18). (Forrás: MetaCyc - Caspi és mtsai 2010)

Az elsődleges aktív transzport során a magas affinitású ABC-transzportereken keresztül (oligoszaccarid-transzporter ATPáz, EC 3.6.3.18) és a PTS részvételével történhet a trehalóz felvétele (10. ábra; Diederichs és mtsai 2000, Andersson és mtsai 2001, Elferink és mtsai 2001, Goodner és mtsai 2001, Wood és mtsai 2001, Jensen és mtsai 2002, Schiefner és mtsai 2002, Andre és mtsai 2003, Lee és mtsai 2003, Silva és mtsai 2005).

A másodlagos aktív transzporthoz szükséges energiát, azaz a szükséges elektrokémiai potenciál gradienst az elsődleges transzportfolyamatok hozzák létre. A másodlagos transzport során a magas affinitású  $H^+$ -trehalóz szimportereken keresztül zajlik a felvétel (Xavier és mtsai 1996, Stambuk és mtsai 1999, Jones és mtsai 2000, Wassenberg és mtsai 2000,

Stambuk és De Araujo 2001, Elferink és mtsai 2001, Jorge és mtsai 2008). A szimport mechanizmus  $pH_{opt}=5.0$ , a folyamatot a glükóz gátolja.

A trehalóz felvétele passzív transzport útján alacsony affinitású karrier fehérjékkel valósul meg, amely konstitutív trehalóz-transzporterek működését a diffúzió segíti elő (De Araujo 1996, Stambuk és mtsai 1996, Plourde-Obwobi és mtsai 2000, Stambuk és De Araujo 2001, Brambl és Marzluf 2004).

## 2.4. A trehalóz katabolizmusa

A trehalóz molekula katabolizmusa számos alternatív útvonalon valósulhat meg. Két fő irányt rajzol ki a trehalóz állapota, azaz attól függően, hogy módosítás nélküli vagy foszforilált formában van-e jelen, eltérő lebontó folyamatok működnek közre. Az extracelluláris trehalóz hasznosítása történhet a trehalóz molekula transzportját (ld. 2.3 alfejezet) követő enzimatikus folyamat által, illetve a sejten kívüli térben történő hidrolízis eredményeképpen keletkező glükóz molekulák felvételével (Francois és Parrou 2001, Jules és mtsai 2004). Az  $\alpha,\alpha$ -trehalóz illetve a T6P forma jelenléte jellemzően az organizmus felvételi mechanizmusától függ (permeáz, PTS transzport).

A módosítatlan trehalóz molekulát az  $\alpha,\alpha$ -trehaláz izoenzimek (EC 3.2.1.28) és a trehalóz-foszforiláz enzimek (EC 2.4.1.64 és EC 2.4.1.231) bontják (trehalóz degradáció II, IV, V és VI), míg a foszforilált trehalóz, a T6P hasítását az  $\alpha,\alpha$ -foszfórtrehaláz (trehalóz-6-foszfát-hidroláz, EC 3.2.1.93) illetve a trehalóz-6-foszfát-foszforiláz (EC 2.4.1.216) enzimek katalizálják (trehalóz degradáció I, III) (1. táblázat).

Katabolikus folyamat	Enzimekatalízis szubsztrátja	Organizmus
Trehalóz bontás I.	T6P	baktériumok
Trehalóz bontás II.	$\alpha,\alpha$ -trehalóz	az élővilágban széles körben elterjedt
Trehalóz bontás III.	T6P	Gram <sup>+</sup> - baktériumok
Trehalóz bontás IV.	$\alpha,\alpha$ -trehalóz	valódi baktériumok, protisták ( <i>Euglenozoa</i> spp.), gombák
Trehalóz bontás V.	$\alpha,\alpha$ -trehalóz	gombák (főként bazídiomycetes gombák)

**1. táblázat** A trehalóz anyagcsere lebontó folyamatai. (MetaCyc - Caspi és mtsai 2010)

Az I. lebontó folyamat szubsztrátja a T6P, melyből az  $\alpha,\alpha$ -foszfórtrehaláz (EC 3.2.1.93) enzimekatalízis során  $\beta$ -D-glükóz és  $\beta$ -D-glükóz-6-foszfát képződik (11. ábra). A folyamatban a  $\beta$ -D-glükóz szabályozó szerepet tölt be (negatív feed back). A  $\beta$ -D-glükózt

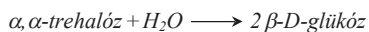
a glukokináz enzim (EC 2.7.1.2) foszforilálja, ezt követően a keletkezett két molekula  $\beta$ -D-glükóz-6-foszfát belép a glikolízisbe (Rimmele és Boos 1994, Klein és mtsai 1995). Az  $\alpha,\alpha$ -foszfothrehaláz enzim aktivitását gátolja a  $\beta$ -D-glükóz, D-fruktóz és a D-mannitol jelenléte (Caspi és mtsai 2010).

Az I. folyamat a baktériumok világában jellemző, számos fajban igazolták létét (Gram<sup>+</sup> és Gram<sup>-</sup> fajokban egyaránt) (Bhumiratana és mtsai 1974, Rimmele és Boos 1994, Helfert és mtsai 1995). A folyamatot kiterjedten a Gram<sup>-</sup> *E. coli* baktériumban vizsgálták. Az *E. coli* kizárólag ozmotikus stresszhelyzetben akumulál trehalózt (ld. 2.2. alfejezet), alacsony ozmolaritás mellett nincs trehalóz bioszintézis, a jelen lévő extracelluláris trehalóz jut be a sejtekbe a PTS transzportfolyamat útján (ld. 2.3. alfejezet), a keletkezett T6P lebontása pedig a 11. ábrán bemutatott folyamat szerint zajlik le (Rimmele és Boos 1994, Klein és mtsai 1995).



**11. ábra** Trehalóz katabolizmusa I. Az  $\alpha,\alpha$ -foszfothrehaláz (EC 3.2.1.93) enzim által katalizált trehalóz bontás.

A II. folyamatban az  $\alpha,\alpha$ -trehaláz izoenzim család<sup>625</sup> (EC 3.2.1.28) enzimek katalizálják a trehalóz bontását (App és Holzer 1989, Singer és Lindquist 1998). A folyamatban az  $\alpha,\alpha$ -trehaláz hidrolízisét követően egy lépésben szabadul fel két  $\beta$ -D-glükóz molekula (12. ábra).



**12. ábra** Trehalóz katabolizmusa II. Az  $\alpha,\alpha$ -trehaláz (EC 3.2.1.28) enzimkatalízis folyamata.

Az  $\alpha,\alpha$ -trehaláz izoenzim család az élővilágban széles körben elterjedt, a trehalózt szintetizáló, és a trehalózt csak hasznosítani képes organizmusokban egyaránt jelen vannak ezek a specifikus  $\alpha$ -glükózid-hidrolázok (Avigad 1990). A trehaláz izoenzimeket az enzimreakció pH optimuma és a lokalizációjuk alapján csoportosíthatjuk, e szerint beszélhetünk neutrális és savas izoformákról, illetve citoplazmatikus és extracelluláris (periplazmatikus) enzimformákról (Crowe és mtsai 1984, Thevelein 1984, Parrou és mtsai 2005, He és mtsai 2009).

<sup>625</sup> Hermann Emil Fischer Nobel-díjas kémikus 1895-ben mutatta ki először élesztőben az  $\alpha,\alpha$ -trehaláz enzim trehalázbontó aktivitását. Fischer, H.E. (1895) *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **28**: 1429-1438.

A citoplazmatikus izoformák feladata az intracelluláris trehalóz hidrolízise, normál körülmények között a trehalóz sejtbeli koncentrációjának fiziológiás szinten tartása, illetve részvétel a különféle stresszorok hatására akkumulálódott trehalóz lebontásában (Thevelein 1984, Kopp és mtsai 1993, Jules és mtsai 2004, Jules és mtsai 2008, Panni és mtsai 2008, Garre és Matallana 2009). Az enzimreakciót semleges  $pH_{opt}$  jellemzi (Thevelein 1984, Avigad 1990, De Mesquita és mtsai 1997).

Élesztőkben a citoplazmatikus izoformák a kódoló gének alapján elnevezett Nth1p és Nth2p (Jules és mtsai 2008). Az Nth2p fehérjéről egy ideig azt feltételezték, hogy az Nth1p működésének szabályozásában játszik szerepet, míg Jules és mtsai genetikai és biokémiai úton egyaránt igazolták, hogy önállóan is aktív izoforma, és a két enzim együttesen vesz részt a citoplazmatikus trehalóz hasznosításában (Jules és mtsai 2008). A két izoforma aktivitása ellentétes trend szerint alakul: az Nth1p aktivitása az élesztősejtek növekedésének exponenciális fázisában maximális és a stacionárius fázisban csökken, míg az Nth2p aktivitási szintje alacsony az exponenciális fázisban, növekszik a késői exponenciális fázisban és maximumot ér el a stacionárius fázisban (Francois és mtsai 1987, Nwaka és mtsai 1995a, b, Parrou és mtsai 1999, Jules és mtsai 2008). Az eltérő aktivitási profil hátterében a két izoforma szabályozásának különbözősége áll (Nwaka és Holzer 1998).

Az Nth1p aktivitásának szabályozásában a cAMP-függő szignáltranszdukciós foszforilációs kaszkád mellett részt vesznek a 14-3-3 proteinek<sup>6</sup> és az endogén  $Ca^{2+}$ -kalmodulin rendszer (De Mesquita és mtsai 1997, Franco és mtsai 2003, Panni és mtsai 2008). Az Nth1p a cAMP-függő protein kináz által foszforilált formában aktív (Avigad 1990, De Mesquita és mtsai 1997, Nwaka és Holzer 1998, Panni és mtsai 2008). A teljes aktivitás eléréséhez szükséges a 14-3-3 proteinek kötődése a foszforilált izoforma N-terminális régiójához és  $Ca^{2+}$  vagy  $Mn^{2+}$  jelenléte (Londesborough és Varimo 1984, Amaral és mtsai 1997, Franco és mtsai 2003, Panni és mtsai 2008). Az enzimfehérje N-terminális részén egy erőteljesen konzervatív EF-típusú motívum található, ez a terület a  $Ca^{2+}$  kötőhelye (Amaral és mtsai 1997, Eck és mtsai 1997, Soto és mtsai 1998, d'Enfert és mtsai 1999).

Az Nth1p aktivitását gátolja a kalmodulin ligand-protein és az EDTA – az aktivitáshoz szükséges  $Ca^{2+}$  ionok kötődésének megakadályozásával (Londesborough és Varimo 1984, Amaral és mtsai 1997, De Mesquita és mtsai 1997, Franco és mtsai 2003).

---

<sup>6</sup>A 14-3-3 proteinek az eukariótákban expresszálandó, biológiai folyamatok széles körében szabályozó szerepet betöltő fehérjék (Panni és mtsai 2008).

Az Nth1p és Nth2p különféle stresszhelyzetekben indukálódik, ilyen hatást váltanak ki a tápanyaghiány, a hő-, ozmotikus és oxidatív stressz, a toxikus kemikáliák jelenléte (Nwaka és Holzer 1998, Zähringer és mtsai 1997, Zähringer és mtsai 2000). A citoplazmatikus trehaláz enzimek stresszinduktivitását a promoter régióban STRE jelenléte eredményezi (Zähringer és mtsai 2000).

Élesztő mutánsokkal végzett vizsgálatok rávilágítottak, hogy a sejtekben akkumulált trehaláz lebontásában a citoplazmatikus izoformák mellett az extracelluláris izoformának is szerepe van, természetesen ehhez szükséges az endogén diszacharid exportja (Jules és mtsai 2008, Garre és Matallana 2009).

Az extracelluláris trehaláz izoformák az exogén trehaláz hasznosításában vesznek részt (Thevelein 1984, Kopp és mtsai 1993, Jules és mtsai 2004). Az enzimreakció savas pH tartományban optimális (*S. cerevisiae*  $\text{pH}_{\text{opt}}=4.5$ ) (Crowe és mtsai 1984, Thevelein 1984, Destruelle és mtsai 1995). Szubsztrátaffinitásuk és hőstabilitásuk magasabb, mint a citoplazmatikus izoformáké. Indukálható glikoproteinek, expressziójuk és aktivitásuk a külső trehaláz mennyiséggel korrelál (pozitív feed-back). A membránkötött extracelluláris trehaláz izoformák működését gátolja a glükóz-6-foszfát jelenléte.

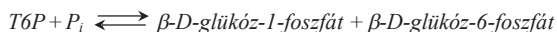
A savas trehalázok vakuoláris és membránkötött sejt felszíni elhelyezkedésük lehetnek, molekuláris biológiai és fluoreszcens technikákkal is igazolták mindkét típus létét<sup>627</sup> (Keller és mtsai 1982, Crowe és mtsai 1984, Nwaka és mtsai 1995a, Alizadeh és Klionsky 1996, Jules és mtsai 2004, Pedreno és mtsai 2004, Swaim és mtsai 2008, He és mtsai 2009). A külső trehaláz forrás hasznosításában a sejt felszíni trehaláz aktivitásnak, míg a vakuoláris trehaláz izoenzimeknek az éhezés indukálta önemésztési folyamat (autofágia) során az endogén trehaláz bontásában van szerepe (Jules és mtsai 2004, Jules és mtsai 2008).

Az élesztők savas trehaláz enzim génjének (ATH1) indukált transzkripciója a HOG-MAPK szignáltranszdukciós útvonal Hog1 protein kinázának közreműködésével valósul meg (Garre és mtsai 2009).

Az exogén trehaláz a sejt felszín morfogenetikai jellemzőire is kihat, indukálja az enzimfunkcióhoz megfelelő struktúra kialakulását (Lucio és mtsai 2000). A trehaláz hidrolízis terméke, a  $\beta$ -D-glükóz különféle glükóz-transzportereken keresztül jut be a citoplazmába (Avigad 1990, De Araujo 1996, De Mesquita és mtsai 1997, Jorge és mtsai 1997, Plourde-Obwobi és mtsai 2000, Wisser és mtsai 2000, Jorge és mtsai 2008).

<sup>627</sup> A napjainkban javasolt csoportosítás (citoplazmatikus és extracelluláris trehaláz izoformák) a vakuoláris trehaláz izoformák léte okán nem fedi le teljesen az enzim típusokat, így a gyakran alkalmazott, az aktivitás  $\text{pH}_{\text{opt}}$  tartományát kihangsúlyozó neutrális és savas trehaláz felosztás alkalmazása szükségeszerű.

*E. coli* sejtekben az akkumulált trehalózt a stresszhelyzet elmúltával a citoplazmatikus trehaláz izoenzimek hidrolizálják a II. útvonal szerint (Horlacher és mtsai 1996), az extracelluláris trehaláz hasznosításában pedig magas ozmotikus körülmények között a VI. lebontó folyamat periplazmatikus trehaláz enzimei működnek közre (12. ábra; Boos és mtsai 1987). A periplazmatikus térben lebontott trehalózból felszabaduló  $\beta$ -D-glükóz molekulák glükóz-PTS transzpor mechanizmus segítségével jutnak be a sejtbe (Styvold és Strom 1991).



**13. ábra** Trehaláz degradációs útvonal III. A T6P-foszforiláz enzim (EC 2.4.1.216) által katalizált folyamat.

A Gram<sup>+</sup>-baktériumokban (*Firmicutes* phylum) jellemző a reverzibilis III. trehaláz bontó útvonal (Andersson és mtsai 2001). A trehaláz PTS transzportot követően T6P formában van jelen a citoplazmában, ahol a T6P-foszforiláz enzim közreműködésével P<sub>i</sub> jelenlétében  $\beta$ -D-glükóz-6-foszfát és  $\beta$ -D-glükóz-1-foszfát molekulák képződnek (13. ábra). *Lactococcus lactis* baktériumban pH<sub>opt</sub>=6.3 T<sub>opt</sub>=35°C jellemzi a T6P-foszforiláz enzimet (Andersson és mtsai 2001). A  $\beta$ -D-glükóz-1-foszfátot a  $\beta$ -specifikus foszoglukomutáz enzim (EC 5.4.2.6) alakítja át  $\beta$ -D-glükóz-6-foszfát formába, és így a katabolikus úton továbbhaladhat a glikolízisbe (Maréchal és mtsai 1984, Levander és mtsai 2001, Dai és mtsai 2006).

A IV. és V. lebontó útvonal kulcsenzime a trehaláz-foszforiláz (TP) enzim. A két útvonalon eltérő,  $\alpha$ - és  $\beta$ -specifikus formája katalizálja az anabolikus/katabolikus folyamatot, melyekben ennek megfelelően a D-glükóz  $\alpha$  vagy  $\beta$  anomer módosulata van jelen; ennek fényében a IV. és V. útvonal jól elkülönül egymástól.

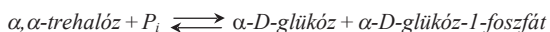


**14. ábra** Trehaláz bontás IV.  $\beta$ -specifikus trehaláz-foszforiláz enzim (EC 2.4.1.64) által katalizált reverzibilis folyamat.

A IV. katabolikus útvonal a baktériumok, az eukarióta Euglenozoa és gombák trehaláz anyagcseréjében fordul elő (Belocopitow és Maréchal 1970, Maréchal és Belocopitow 1972, Aisaka és Masuda 1995, Yoshida és mtsai 1995, Aisaka és mtsai 1998, Page-Sharp és mtsai 1999, Inoue és mtsai 2002). A folyamatot a  $\beta$ -specifikus TP enzim katalizálja (14. ábra).

A keletkező  $\beta$ -D-glükóz-1-foszfátot a további katabolikus anyagcserében való részvételhez az előzőekben említett  $\beta$ -foszoglukomutáz enzim (EC 5.4.2.6) alakítja át  $\beta$ -D-glükóz-6-foszfát formába.

Az V. folyamat a gombák, legfőképpen a bazídiumos gombák körében jellemző. Az  $\alpha$ -specifikus TP enzimet az *Agaricus bisporus* (Lange)Imbach, *Flammulina velutipes* (Curtis)Singer, *Grifola frondosa* (Dicks.)Gray, *Lentinus sajor-caju* (Fr.)Fr., *Pleurotus ostreatus* (Jacq.)P.Kumm. és *Schizophyllum commune* Fr. fajokból izolálták (Kitamoto és mtsai 1988, Saito és mtsai 1998, Wannet és mtsai 1998, Eis és Nidetzky 1999, Han és mtsai 2003). A  $\alpha$ -TP enzim katalizált  $\alpha,\alpha$ -trehalóz szintézis és lebontás  $pH_{opt}$  a neutrális tartományba esik, szubsztrátspecifitása az enzimreakció résztvevőire korlátozódik (Wannet és mtsai 1998). A szintetikus aktivitást a  $P_i$ , a lebontó folyamatot az ATP és a trehalóz analógok gátolják (Wannet és mtsai 1998). Az enzimreakció során a 15. ábrán látható módon  $\alpha$ -D-glükóz és  $\alpha$ -D-glükóz-1-foszfát keletkezik az  $\alpha,\alpha$ -trehalóz degradációja során.



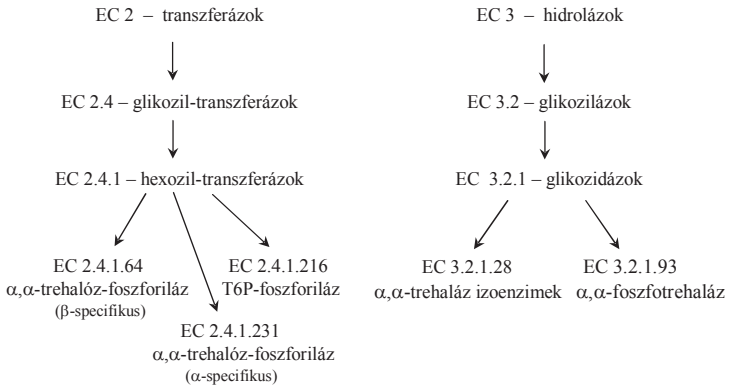
**15. ábra** Trehalóz bontás V. A folyamatot az  $\alpha$ -specifikus trehalóz-foszforiláz enzim (EC 2.4.1.231) katalizálja.

A glikolízis folyamatába  $\beta$ -D-glükóz-6-foszfát forma képes belépni, ezért a képződött  $\alpha$ -D-glükóz és  $\alpha$ -D-glükóz-1-foszfát molekulák átalakítása szükséges. Az  $\alpha$ -D-glükóz  $\beta$  anomer átalakulást az aldóz-1-epimeráz (EC 5.1.3.3) enzim katalizálja, a  $\beta$ -D-glükóz-6-foszfát képződésében a IV. típusú hexokináz enzim (glukokináz, EC 2.7.1.2) működik közre. Az  $\alpha$ -D-glükóz-1-foszfát  $\longrightarrow$   $\alpha$ -D-glükóz-6-foszfát reakciót az előzőekben már említett foszoglukomutáz enzim  $\alpha$ -specifikus változata (EC 5.4.2.5) katalizálja, az  $\alpha \longrightarrow \beta$  átalakulás pedig végbemehet spontán illetve a glükóz-6-foszfát 1-epimeráz enzim (EC 5.1.3.15) részvételével (Graille és mtsai 2006).

A VI. trehalóz bontó útvonal (exogén trehalóz bontás) a 12. ábra szerint megy végbe (Caspi és mtsai 2010). A II. és a VI. folyamatban a részt vevő enzim izoformák különbözőek, a VI. enzimreakcióban a baktériumok periplazmatikus illetve az eukarióták extracelluláris trehaláz izoenzimei katalizálják a trehalóz hidrolízisét (Caspi és mtsai 2010).

A 2.4 alfejezetben bemutatott trehalóz katabolizmus hat lehetséges útvonalán közreműködő enzimek besorolását a 16. ábra foglalja össze.





**16. ábra** A trehalóz lebontásában szerepet játszó enzimek besorolása a IUBMB enzim nevezéktan alapján.

## 2.5. A trehalóz anyagszere transzgenikus manipulációja

A napjainkra óriási méreteket öltött és töretlenül folytatódó népességnövekedés a globális klímaváltozással együttesen a környezet számára számos területen nagymértékű terhelést jelent (pl. élelmezés, ivóvízkészletek, környezetvédelem). Az élelmezés kérdéskörében a növénytermesztés jelentős nyomás alá került, a humán populáció ilyen ütemben zajló növekedésével a mezőgazdasági termelésnek szükségszerűen lépést kell tartania. Becslések szerint a jelenlegi szint megduplázására lenne szükség, elsősorban a búza, kukorica és rizs termesztésében (Rajaram 2001, Almeida és mtsai 2007). A szükséges szint eléréséhez egyrészt újabb területeket kell bevonni a termesztésbe, másrészt olyan produktív fajtákra van szükség, melyek magas hozama akár kedvezőtlen körülmények között is biztosított (Almeida és mtsai 2007).

Jelenleg a művelés alá vont területek 10 %-a érintett a só- és szárazságstressz által, a termőterületek kiterjesztése és a globális felmelegedés kedvezőtlen hatásai együttesen ennek további növekedését eredményezik (Miranda és mtsai 2007).

Az abiotikus környezeti tényezők a legmeghatározóbbak, s köztük a víz az egyik legfontosabb paraméter a megfelelő terméshozam elérésében, így a szárazságstressz toleráns fajták kifejlesztése az egyik legfelkapottabb kutatási terület – a növénynevelők ellenálló, magas terméshozamú fajták előállításán fáradoznak, elsősorban a gabonanövények körében (búza, rizs és kukorica) (Almeida és mtsai 2007, Miranda és mtsai 2007).

A legfőbb abiotikus stresszorok, úgymint a szárazság, alacsony és magas hőmérséklet eltérő mértékű sejtkárosodásokat és másodlagos stresszhatásokat (ozmotikus és oxidatív stressz) idéznek elő. A stresszor hatását követően jelátviteli útvonalak és transzkripció faktorok közreműködésével különféle válaszreakciók aktiválódnak (detoxifikáció, chaperonok, oszmotikus védelem, víz és ion mozgások), melyek a sejtek homeosztázisát hivatottak helyreállítani a fehérjék és membránok védelmezésével illetve károsodásaik javításával. Ezen folyamatok összessége eredményezi az organizmus stressztűrő képességét (Almeida és mtsai 2007).

A vízhiány okozta stresszhelyzetben számos gén – közreműködői a biokémiai, sejtes és molekuláris mechanizmusoknak – részvétele járul hozzá a komplex biológiai válaszreakció kialakulásához (Almeida és mtsai 2007).

A stressz hatására indukálódó gének három fő csoportba sorolhatóak (Wang és mtsai 2003):

1. jelátviteli útvonalak és transzkripció szabályozás folyamataiban részt vevő gének (foszfolipázok, MAP kinázok és transzkripció faktorok)
2. membrán és fehérjekomponensek védelmében szerepet játszó bioprotektív molekulákat illetve ezek szintézisében részt vevő enzimeket kódoló gének (HSP, LEA fehérjék, szabadgyökfogók és ozmoprotektáns molekulák)
3. víz- és ion felvétel, valamint transzport mechanizmusokban közreműködők (pl. aquaporinok).

Genetikai módszerek alkalmazása a növénynemesítésben, transzgenikus növények előállítása kezdetben számos nehézségbe ütközött, napjainkban azonban eredményes útja a stresszrezisztencia fokozásának. A növények vízhiány okozta stresszel szembeni tűrőképességének fokozása genetikai módosítás eredményeképpen elért ozmoprotektáns molekulák akkumulációjával az egyik legjobban kutatott terület (Apse and Blumwald 2002, Almeida és mtsai 2007).

Az oszmotikus védelemben szerepet játszó molekulák több vegyületcsoportba tartoznak: glicin-betain, prolin és ektoin (aminosavak), mannitol, szorbitol és D-ononitol (poliolok), fruktánok, szacharóz [raffinóz] és a trehalóz (cukrok) (Almeida és mtsai 2007, Peters és mtsai 2007).

A trehalóz kivételes bioprotektív sajátosságainak felhasználása a szárazságstresszel szembeni tűrőképesség fokozásában ígéretes. A legtöbb növényben a trehalóz mennyisége a kimutathatósági határ körüli, melynek hátterében a trehaláz izoenzimek aktivitása áll (Goddijn és Smeekens 1998, Vogel és mtsai 2001, Schlupepmann és Paul 2009), ennek ismeretében trehalóz akkumuláció a trehaláz enzimműködés gátlása illetve a trehalóz túlermeltetése útján érhető el.

Transzformáns, trehalózt felhalmozó növények különböző eredetű trehalóz-szintáz gének bevitelével állíthatók elő. Kezdetben a genetikailag módosított növények (GMO növények) normális működésében zavarok léptek fel, egyrészt a 35S konstitutív promoter alkalmazása, másrészt az *E. coli* és *S. cerevisiae* TPS génjének transzformánsbeli működése miatt (anyagcserezavarok, alacsony méret) (Iturriaga és mtsai 2009). *S. cerevisiae* TPS1 génnel transzformált dohány, paradicsom és burgonya esetén egyaránt fokozódott a szárazságstressz tolerancia, viszont minden esetben megjelentek a morfológiai és növekedésbeli defektusok (Pilon-Smits és mtsai 1998, Yeo és mtsai 2000, Cortina és Culiñez-Maciá 2005). A problémát feltehetően a bevitt gének kifejeződésekor nagy mennyiségben termelődő, a növényi anyagcserében és a növekedési-fejldési folyamatokban szabályozó szerepet betöltő T6P okozta (Garg és mtsai 2002, Iturriaga és mtsai 2009). Ennek kiküszöbölése érdekében különböző megoldásokat alkalmaztak: előállítottak olyan transzformáns géneket (OstA és OstB fúziós *E. coli* gén, TPS1-TPS2 kiméra élesztő gén), melyek expressziója TPP aktivitást is eredményez, így nem dúsul fel a T6P, valamint stressz-indukált promotert alkalmaztak (Garg és mtsai 2002, Miranda és mtsai 2007, Iturriaga és mtsai 2009, Suárez és mtsai 2009).

Az OstA és OstB fúziós génnel transzformált rizs növények ellenállóak lettek szárazság-, só és hidegstresszel szemben, miközben megőrizték normál fenotípusos sajátásaikat (Garg és mtsai 2002). Hasonló eredményt értek el *Arabidopsis thaliana* élesztő TPS-TPP kiméra génnel transzformált növényekkel: morfológiai eltérések nélküli, szárazság-, só-, fagy és hőstressz toleranciát értek el (Miranda és mtsai 2007). A TPS-TPP génkonstrukció alfalfa (*Medicago sativa*) növényekben szintén többszörös abiotikus stressztűrő képességet eredményezett. 35S promoter alkalmazásakor a kedvezőtlen fenotípusos hatások kismértékben megjelentek, ennek elkerülésére megoldást jelentett stressz-indukált promoter használata (Suárez és mtsai 2009).

A trehalóz anyagcsere genetikai manipulációja okozta kedvezőtlen hatások kiküszöbölésében további megoldást jelent GMO növények előállítása TP génnel. *Pleurotus sajor-caju* TP génnel transzformált dohány növények a szerzett szárazságstressz rezisztencia

mellett anyagcsere és növekedési zavaroktól mentesek (Han és mtsai 2005). Han és mtsai (2005) munkájában külön kiemelendő, hogy magasabbrendű eukariota génnel (*P. sajor-caju*) végezték a genetikai módosítást, miként Gómez-Escobedo és mtsai (2004) is, amikor az alfalfa trehaláz génnel (antiszenz módon) hoztak létre csökkent trehaláz aktivitást mutató transzformáns dohány növényeket.

Van Dijck és mtsai (2010) olyan GMO növényeket állítottak elő, amelyek szárazság és sóstressz-toleranciáját a trehaláz gén túlexpressziója fokozta, emellett a növények helyreállási képessége is javult. A jelentős mértékben megnövekedett tolerancia hátterében a trehaláz gén specifikus, sztóma zárósejtekben bekövetkező túlexpressziója húzódik meg, melynek hatására a sztómák nyitvatartása és ezzel összefüggésben a vízvesztés limitált, ez pedig szárazságstressz rezisztenciát eredményez. Élelmiszeripari szempontból előnyös következményként tapasztalták, hogy a trehaláz-túlexpresszálo fejes saláta és spenót növények a betakarítást követően hosszabb ideig voltak eltarthatóak (Van Dijck és mtsai 2010).

Napjainkra több kiváló stressztoleráns GMO növényfajtát állítottak elő, melyek normál körülmények között és stresszhelyzetben egyaránt kedvező tulajdonságokkal rendelkeznek. A transzformációs kísérletek eredményeként magas szintű toleranciát értek el só-, szárazság- és alacsony hőmérsékleti stresszel szemben.

## 2.6. A trehalóz alkalmazási területei

Az  $\alpha,\alpha$ -trehalóz felhasználása széleskörű, a biomolekulák szerkezet stabilizálásában nyújtott kivételes tulajdonsága révén fontos szerepet tölt be a biotechnológiában, egyedi megoldásokat tesz lehetővé az élelmiszer-, gyógyszer és kozmetikai iparban, és ígéretes résztvevője orvosi terápiás megoldásoknak (Colaço és mtsai 1992, Jain és Roy 2009).

A trehalóz kiterjedt felhasználásának lehetőségét a költséghatékony, ipari méretekben történő előállításának megoldása teremtette meg. Kezdetben trehalózt költséges és bonyolult módon, természetes anyagokból (élesztők, *Selaginella lepidophylla*) történő kivonással állítottak elő. Jelentős fordulatot hozott a Hayashibara Company Ltd. (Okayama, Japan) szabadalmaztatott technológiája: a 90-es években kidolgozták a trehalóz nagy mennyiségű és olcsó előállítását (Trehaoze™, Treha™), amely búza és kukorica szirup keményítő tartalmának enzim-alapú konverzióján alapul. 4 bakteriális enzimet<sup>□8</sup> alkalmaznak a folyamat során: maltooligozil-trehalóz szintáz enzim (EC 5.4.99.15, *Arthrobacter ramosus*),

<sup>□8</sup> Az enzimeket termelő mikroorganizmusok egyike sem genetikailag módosított.

maltooligozil-trehalóz trehalohidroláz (EC 3.2.1.141, *Arthrobacter ramosus*), izoamiláz (EC 3.2.1.68, *Pseudomonas amyloideramosa*) és ciklodextrin-glukanotranszferáz (EC 2.4.1.19, *Bacillus stearothermophilus*) (Morimoto és mtsai 1979, Nakada és mtsai 1995a,b, Abbott és Chen 2000). A folyamat eredményeképpen nagy tisztaságú trehalóz áll rendelkezésre.

Hasonlóan eredményes technológia Tsuchida és mtsai szabadalmaztatott eljárása (US Patent US5484714), melyben *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Micobacterium* illetve *Arthrobacter* nemzetségekbe tartozó baktérium törzsekkel folyadékkultúrában termeltetik ipari mennyiségben a trehalózt (Tsuchida és mtsai 1996). Szénforrásként szacharózt vagy maltózt alkalmaznak, ekkor a tápközegben figyelemre méltó mennyiségben akkumulálódik trehalóz, javítva a kitermelés hatékonyságát. A trehalóz felhalmozás mértéke fokozható egyrészt a tápközeg ozmotikus nyomásának beállításával (1671-3974 mmol/kg tartomány), másrészt mutáns baktériumok alkalmazásával (UV, N-nitrozamin mutagenézis) melyeknek fokozódott a trehalóz-termelő képességük (Tsuchida és mtsai 1996).

A trehalóz biotechnológiai alkalmazása jellemzően az általánosan használt DNS polimeráz-, restrikciós és DNS ligáz enzimek, fehérjék, antitestek (pl. monoklonális antitestek: Herceptin<sup>®</sup>, Avastin<sup>®</sup> és Lucentis<sup>®</sup>) és más komplex molekulák védelmét szolgálja, szerkezetüket stabilizálja a szobahőmérsékleten illetve 37°C-on végzett dehidratáció során is (Colaço és mtsai 1992, Roser és Colaço 1993, Arakawa és mtsai 2001). A génexpresszió analízis technikák között élenjáró qPCR (quantitative real-time PCR) hatékonyságát a reakció-közeg jelentős mértékben befolyásolja, így fontos a megfelelő PCR mix megválasztása. Horáková és mtsai (2011) rövid ampikonokat eredményező qPCR esetén 0.2 M trehalóz és 1.0 M 1,2-propándiol együttes (PT) alkalmazásának kedvező hatásáról számolnak be, amely enhancer ráadásul különféle DNS festésekkel együtt is megőrzi hatékonyságát. A PT enhancer kiemelkedő tulajdonságainak köszönhetően különféle DNS templátok esetén egyaránt alkalmazható, beleértve azokat is amelyek GC-gazdagok, valamint durva kivonatokban, amelyekben más enhancerek, úgymint a DMSO (dimetil-szulfoxid) vagy a betain nem működnek.

A krioprezervációs technikákban kiemelkedő szerepet tölt be, általánosan használják sejtek (pl. humán fibroblaszt, petesejt), szövetek és szervek, vírusok és baktériumok akár hosszú idejű eltarthatóságának biztosítására (Bieganski és mtsai 1998, Eroglu és mtsai 2000, 2002, Guo és mtsai 2000). Sejt és szövetkultúrákkal végzett kísérletes munkák során a natív állapot védelmében, és az érzékeny foszfolipid-réteg modellek stabilitásának megőrzésében is alkalmaznak trehalózt (Crowe és mtsai 1983, Crowe és mtsai 1996).

A szervtranszplantációs eljárások során is alkalmazzák a szervek natív állapotának megőrzésére.

A trehalóz természetes módon megtalálható a pék-, sör és borélesztők közreműködésével előállított élelmiszerekben, az éhető gombákban, a mézben, a homárban és a garnélarákban (Kidd és Devorak 1994).

A trehalóz nem adja a Maillard-reakciót ('nem-enzimes barnulás'), dihidrát formája savas pH tartományban és 94% relatív páratartalom mellett is stabil, ezek az ipari felhasználás szempontjából igen kedvező tulajdonságok (Iturriaga és mtsai 2009). A hétköznapi cukor édes ízének 45%-át éri el, így édesítőszerként való alkalmazása kevésbé elterjedt, bár hosszantartó energiát biztosít ( $cal_{\text{trehalóz}} = 90\% cal_{\text{szacharóz}}$ ) és csupán enyhe inzulin választ vált ki (Higashiyama 2002, Iturriaga és mtsai 2009). A trehalóz számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik, amit az élelmiszeriparban jól tudnak hasznosítani: megőrzi az íz- és zamatanyagokat, az alkotó tápanyagokat és fontos biomolekulákat, a színt és az állagot – szárított, fagyasztott és feldolgozott élelmiszerekben<sup>[29]</sup> egyaránt, így hozzájárul minőségük megőrzéséhez, eltarthatóságukhoz (Roser 1991, Kidd és Devorak 1994, Traynor és mtsai 2006, Galmarini és mtsai 2011). Alkalmazása kedvező a nyers, feldolgozatlan élelmiszerek esetén (pl. húsok, csomagolt termékek), mivel ezek szagát képes elnyomni, miként a nyers, keserű és fanyar ízeket is. A zsírt tartalmazó élelmiszerek élelmi értékének megőrzését elősegíti azáltal, hogy a könnyen oxidálódó zsírsavak károsodásának és ennek eredményeképpen kellemetlen ízanyagok felszabadulásának folyamatát képes korlátozni. Mérsékelt édes íze is jótékony hatású az élelmiszerekben történő alkalmazásakor, mivel képes más ízeket kiemelni.

A kozmetikai ipar a trehalóz élelmiszerek körében történő alkalmazásánál már említett kedvező tulajdonságait használja fel: a kellemetlen testszagot 70%-ban képes csökkenteni, így dezodorok, testkrémek hatékony adalékanyagaként alkalmazzák, a vízvisszatartó képességét pedig számos alapvető piperecikkekben (fürdőolajok, krémek, hajnövesztő tonik) használják eredményesen (Higashiyama 2002).

Említést érdemel a trehalóz kertészeti alkalmazása; a vágott virágok eltarthatósága jelentősen növelhető: 50-100 mM közötti trehalóz mellett a tulipánok és kardvirágok hosszabb ideig frissek maradnak (Otsubo és Iwaya-Inoue 2000, Iwaya-Inoue és Tataka 2001).

---

<sup>[29]</sup> Zöldség és gyümölcs alapú készítményekben, kekszokban, reggeli gabonapelyhekben, csipszokban, a fehér csokoládében, állati eredetű ételekben és különféle italokban.

A gyógyszeriparban aggregációgátló és dehidratációval szembeni védőhatásait használják ki vakcinák (tetanusz, diftéria toxoidok), liposzómák stabilizálásában (Crowe és mtsai 1994, Schwendeman és mtsai 1995, Jain és Roy 2008).

A gyógyászatban többféle kórkép terápiájában bizonyult eredményesnek a trehalóz alkalmazása a sejt, szövet-kultúrákkal végzett vizsgálatsorozatokban illetve állatkísérletekben, amely eredmények felvetik a humán gyógyászatban való alkalmazásának lehetőségét.

Sejtkultúras modellrendszerben megelőzte a humán cornea epitéliális sejtek elhalását – mely jellemző velejárója a xerophthalmia, xeroderma megbetegedéseknek, ezen eredmények alapján a 'száraz-szem szindróma' terápiájában ígéretesnek bizonyult egy új szemcsepp kifejlesztésében (Matsuo 2001). Luyckx és Baudouin (2011) egérmodell kísérletének eredményei igazolták a várakozásokat: mesterségesen fenntartott alacsony páratartalom mellett a Thealoz<sup>®</sup> trehalóz tartalmú szemcsepp hatékony védelmet nyújtott a szemek érzékeny felszíni sejtrétegeinek, a kötő- és szaruhártyának (conjunctiva és cornea).

A trehalóz alkalmazása reménytelenül súlyos betegség terápiájában, hatékonysága a fehérje-aggregáció gátló sajátosságán alapul. Sejtvonalakkal végzett kísérletek biztató eredménnyel szolgálták az oculopharyngealis izomdystrophia (OPMD: oculopharyngeal muscular dystrophy) autoszomális dominánsan öröklődő genetikai kórkép kezelésében, a hibás fehérje-aggregátumok számának csökkentésével (Davies és mtsai 2006). Az Alzheimer kór kialakulásáért felelős béta-amyloid (Abeta) 40 fehérjék aggregációját is gátolta, ez jó kiindulási alapot jelent a trehalóz alkalmazására a humán terápiában (Liu és mtsai 2005). Prion-fertőzött sejtekben megfigyelték, hogy az újonnan képződő aggregátumok méretét csökkentette és megváltoztatta a sejten belüli elhelyezkedésüket, viszont a hibás fehérjék proteáz-rezisztenciáját nem módosította. A beteg sejtek oxidatív stresszel szemben nagyfokú érzékenységet mutatnak, mely sajátságot a trehalóz képes csökkenteni az oxidatív stresszel szembeni jelentős védelem által (Béranger és mtsai 2008).

Egér-modell állatkísérletekben szintén a fehérjék aggregációjának gátlásában betöltött szerepe szolgált biztató eredménnyel. Az egyik tisztán genetikai okokra visszavezethető rendellenesség, a Huntington kór terápiájában a trehalóz alkalmasnak bizonyult a betegség előrehaladásának megfékezésében (Katsuno és mtsai 2004, Tanaka és mtsai 2004). A Huntington kórkép első jelei általában 30-50 éves kor között jelentkeznek, kezdetben enyhe értelmi képességromlás, érzelmi, gondolkodási és mozgási változások tapasztalhatóak. Idővel a tünetek fokozódnak, súlyos depresszió, hallucinációk, végtárgángás figyelhető meg, majd hosszú szenvedést követően a beteg halálához vezet. A betegség hátterében egy huntingtin nevű fehérje termeléséért felelő gén mutációja áll

(túlzott mértékű CAG ismétlődés), melynek következtében a megváltozott szerkezetű fehérjék aggregálódnak, és ezek a fehérje-aggregátumok nagy mennyiségben felhalmozódnak az idegsejtekben, ami idővel a neuronok és ezáltal egyes agyterületek pusztulását okozzák. A trehalóz a már kialakult aggregátumokra nem volt hatással, viszont a további aggregációt gátolta (Katsuno és mtsai 2004, Tanaka és mtsai 2004).

Egerekkel végzett vizsgálatsorozatban a trehalóz hatásosnak bizonyult a petefészkek eltávolítását követően fellépő ösztrogén hormonhiány következtében kialakuló csontritkulás megelőzésében (Nishizaki és mtsai 2000, Arai és mtsai 2001, Higashiyama 2002).

## **2.7. Trehalóz intolerancia**

A szénhidrátok, köztük a diszacharidok felszívódási zavarait, a velük szemben mutatott intoleranciát bemutató szakirodalmi ismeretanyag az 1960-as évekre nyúlik vissza (Dahlqvist 1966, Peternel 1968, Bayless és Christopher 1969, Alpers és Isselbacher 1970). Már a 70-es években felismerték, hogy a trehalóz felszívódási zavara az egyik lehetséges oka lehet a gombák fogyasztásával járó rosszulleteknek (puffadás, erős hasmenés) (Bergoz és Righetti 1970, Bergoz 1971).

A különféle cukrok felszívódási zavara, és így a trehalóz intolerancia hátterében számos ok állhat: genetikai hiba, katabolikus enzimek hiánya, a bélflóra egyensúlyának zavara, bélsérülés és különböző betegségek. A cukoranyagcsere felszívódási zavara többféle módon károsíthatja a szervezetet, súlyosabb esetekben másodlagos betegségeket okozhatnak (ételallergiát, coeliakiát és egyéb az emésztőrendszert érintő kórt). A cukrok emésztési problémái eredetüket tekintve jelen lehetnek veleszületett módon és kialakulhatnak a későbbiekben is az élet során, fennállásuk pedig attól függően, hogy mi áll a kórkép hátterében lehet időszakos vagy állandósult.

A trehaláz izoenzimek az emberi szervezetben és a legtöbb vizsgált gerinces állatban több helyen előfordulnak: a vékonybél nyálkahártyájában, a vesében, májban és a vérplazmában (Garland 1989, Abbott és Chen 2000). Érdekeség, hogy a macskák vékonybélében nincs trehaláz enzimaktivitás (Garland 1989). Az enzimatikusan nem emésztett trehalóz mennyiség körülbelül 0.5%-a képes más diszacharidokhoz hasonlóan passzív diffúzióval felszívódni (Van Elburg és mtsai 1995), az így felszívódott trehalózt képes a szervezet metabolizálni  $\beta$ -D-glükózzá a májban vagy a vesékben, illetve ki tudja választani a vizeletbe változatlan formában (Demelier és mtsai 1975). A bél mikro flórája képes a fel nem szívódott trehalózt fermentálni, rövid-láncú zsírsavakat (acetát, propionát és



butírárt) képeznek (Abbott és Chen 2000). A trehalóz és a laktóz emésztési zavara hasonló emésztőrendszeri tüneteket okoz (Arola és mtsai 1999).

A diagnosztikai eljárás során trehalóz orális bevitelét követően a légzési gázok hidrogén és metán tartalmának alakulását, a vérplazma valamint a duodénum trehaláz aktivitását monitorozzák (Arola és mtsai 1999). A légzési gázok hidrogén és metán tartalmának változása fordított arányban áll a duodénum és a szérum trehaláz aktivitásával, valamint a patkóbél trehaláz:szukráz aktivitás arányával (Arola és mtsai 1999).

Három tényező felelős a tünetek kialakulásáért (Arola és mtsai 1999):

1. alacsony vagy hiányzó trehaláz enzimaktivitás a vékonybélben, így az emésztetlen trehalóz továbbhalad az emésztőtraktusban
2. a vastagbélbe jutott trehalóz ozmotikus vízáramlást idéz elő, aminek következtében hasmenés lép fel
3. a vastagbél mikroflórájának egyes tagjai képesek a trehalózt metabolizálni, a közben felszabaduló gázok alhasi puffadást eredményeznek

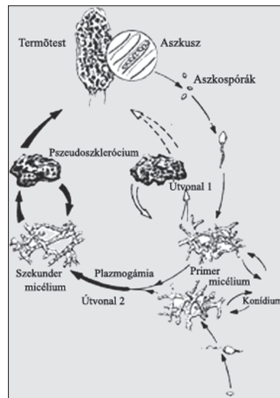
A széles körben elvégzett vizsgálatok során találtak olyan személyeket, akiknek teljes mértékben hiányzottak a trehaláz izoenzimeik (Arola és mtsai 1999). A trehaláz izoenzimek hiánya autoszómális recesszív sajátság. Ushijima és mtsai átfogó vizsgálatot végeztek, melyben a vizsgálatok alanyai három emberi rasszba (europid, mongolid, negrid) tartoztak. Trehalóz emésztési zavart a személyek felénél figyeltek meg, a mongolid típusba tartozó emberek körében szignifikánsan nagyobb számban fordultak elő az emésztőrendszeri tünetek (Ushijima és mtsai 1995). Intolerancia esetén a gombák fogyasztását el kell hagyni az étrendből.

## **2.8. Vizsgálati objektumok jellemzése**

### **2.8.1. *Morchella* fajok**

A trehalóz anyagcsere vizsgálatát két, hazánkban szabadon termő kucsragomba faj, *Morchella conica* Pers. és *Morchella steppicola* Zer. (*Ascomycota*, *Pezizales*, *Morchellaceae*) bevonásával kezdtem meg. Választásom hátterében az állt, hogy e figyelemreméltó, a tömlősgombák rendjébe tartozó *Morchella* nemzetség természetbeni előfordulása, termés időszaka és életciklusa különleges, mely során többoldalú összefüggés volt feltételezhető a trehalóz anyagcserével.

A *Morchella* fajok mind táplálkozásuk, mind egyedfejlődésük, mind pedig evolúciós helyzetük tekintetében különleges helyet foglalnak el a gombák között. Életciklusuk komplex, aktív szakasza koratavasztól a nyár közepéig terjedő időszakra esik. Széleskörű citológiai vizsgálatok eredményei szolgálták alapul összetett életciklus-diagrammjuk elkészítéséhez (17. ábra; Volk és Leonard 1990). A *Morchella* fajok életciklusára jellemző, hogy a vegetatív micélium (pszeudo)szkleróciumokat képez és ezekből a túlélő képletekből csíráznak ki tavasszal termőtestet vagy vegetatív micélium formájában (Volk és Leonard 1990).



17. ábra *Morchella* fajok életciklus-diagramja.  
(Forrás: Volk és Leonard 1990)

A szkleróciumok fontos szerepet töltenek be életciklusukban, biztosítják az áttelelést illetve a kihajtó micélium termőtestet is képezhet, miként megfigyelték a szkleróciumok és termőtestek előfordulási gyakorisága közötti összefüggést (Ower 1982, Miller és mtsai 1994). Felépítésükre jellemző, hogy bennük differenciálatlan vegetatív micélium azonosítható, izodiametrikus elrendezésben.

A mikológia talán legrészletesebben ismert fejezete a vegetatív micélium fiziológiája (Volk és Leonard 1990). Összehasonlító vizsgálatok igazolták, hogy a *Morchella* fajok vegetatív micéliuma strukturális és funkcionális tekintetben egyaránt megfelel az általános sémának. A *Morchellák* vegetatív hifáinak átmérője relatív nagy, 5-10  $\mu\text{m}$  (Volk és Leonard 1990). Korábbi tanulmányok beszámolnak arról, hogy hifa-szakaszaik sokmagvúak, átlagosan 10-15 sejtmagot tartalmaznak random elrendezésben (Greis 1940, Volk és Leonard 1990). Vegetatív micéliumuk gyors növekedésű, ez *in vitro* tenyészetekben jól

megfigyelhető: egy 10 cm átmérőjű Petri-csészében, a szilárd táptalajt 23°C-on átlagosan 8-10 nap alatt kolonizálják.

A PS felépítésükben térnek el a szkleróciumoktól, szerkezetük homogén, míg a szkleróciumokban jól elkülönül két réteg a medulla és a cortex (Willettts és Bullock 1992). A *M. steppicola* PS képez, ezek az ismertebb szkleróciumokkal egyenértékű túlélőképletek (energia és szénforrások), amelyeket differenciálatlan vegetatív micélium alakít ki (Volk és Leonard 1990, Georgiou és mtsai 2006). A *M. conica* szklerócium képzésének háttere, laboratóriumi körülmények között a táptalaj összetételének hatása a folyamatra alaposan feltárt (Guler és Ozkaya 2008). Jellegzetes fejlődési folyamaton haladnak keresztül az érett állapot eléréséig (Georgiou és mtsai 2006). Képződésüket különféle stresszhatások, mint pl. az oxidatív stressz indukálja (Georgiou és Petropoulou 2001, Georgiou és mtsai 2006). A táptalajon és más szilárd közegeken (gabonaszem, dúsított fűrészpor) előbb apró színes túlélőképletek (mikropszeudoszklerócium) jelennek meg, később ezek nagyobb méretű szkleróciumokká egyesülnek.

A PS két típusát különböztethetjük meg morfogenetikai, biokémiai és fiziológiai jellemzők alapján: az egyik az aszkokarpiumok képzésében szerepet játszó alacsony, 10-20°C közötti hőmérsékleten képződő EES (early encrusting sclerotia), a másik a 20°C feletti hőmérsékleten képződő LIS (late isolated sclerotia), mely képletek az áttelelésben játszanak szerepet, belőlük termőtest nem képződik (Buscot és Bernillion 1991, Buscot 1993, Buscot és mtsai 2000). A EES képletekben és a fiatal termőtestekben az előforduló mikosporinok típusa és mennyisége hasonló, ez megerősíti azt az elgondolást, hogy az EES a termőtestképzés korai fejlődési állapota (Buscot és Bernillion 1991, Buscot 1993). A LIS képzés mesterséges körülmények között a tenyészetek korával mutatott összefüggést (Buscot 1993).

Stott és Mohammed 2004-ben megjelent tudományos közleményében egy ettől kissé eltérő felosztást olvashatunk, mely nem fed át teljes mértékben az EES – LIS csoportokkal. ST1 és ST2 kitaróképleteket különböztetnek meg, melyeket a kucsmagomba baktériumokkal való asszociációja esetén képez. Az ST1 időben előbb jelenik meg, viszont nem a tenyészetek szélén, mint az EES képletek, az ST2 a LIS kitaróképletekhez hasonló tulajdonságokkal jellemezhető (Stott és Mohammed 2004).

Termőtestképzés iniciációjához ideálisnak tűnik az EES típusú kitaróképletek vizes mosást követő talajba helyezése, majd 18°C-on történő inkubálása (Buscot és mtsai 2000). Termőtestképzésükhöz elengedhetetlen számos környezeti paraméter között a talaj

átlaghőmérsékletének 8-10°C körüli értéke, a talaj megfelelő nedvességtartalma, sőt egyes terepi megfigyeléseink szerint a rövid ideig tartó elárasztás kedvező hatását.

A *Morchellák* föld feletti (epigeikus) termőtestjeit steril és aszkogén hifák építik fel: az aszkuszkokat tartalmazó kucsma rész steril hifákból felépülő nyélen fejlődik ki. A termőréteg az ivaros folyamat eredményeként létrejött számtalan aszkuszból és a köztük elhelyezkedő steril haploid hifákból, a parafizisekből áll. Az aszkuszkok aktívan fedővel nyílnak fel, faluk egyrétegű (operkulátus, unitunikátus típus). A tömlők képződését nem előzi meg ivarszervek kialakulása, vagyis szomatogámia jellemző. Tömlőnként 8 aszkospóra fejlődik ki. Méretük 16-25 x 11-14 µm, (elérhetik az 50-70 µm-t is), elliptikusak, olajcseppet nem tartalmaznak. Csírázásuk megfelelő körülmények között különösen gyors, hifáik egy napon belül megjelennek.

A kucsmagombák<sup>□10</sup> üreges termőtestjei gasztronómiai szempontból értékes, jellegzetes fűszeres ízük miatt kedvelt és keresett fajok. Elterjedésükre általánosan jellemző, hogy meszes talajú nedves élőhelyeken, kőrises-, kőrissel elegyes liget- és lomberdőkben fordulnak elő.

A *Morchella* fajok jellemzően szaprotróf életmódot folytatnak, bár a szakirodalomban számos feltevés utal szimbiotikus kapcsolataikra (Dahlstrom és mtsai 2000). Martin Goldway és munkatársai például 2000-ben beszámolnak egy hegyes kucsmagomba (*Morchella conica*) populációról, mely 6-8 hónapon át termett. Hasonló hosszán termő *Morchella* populációt írtak le Masaphy és munkatársai (*Morchella rufobrunnea* Guzmán & F. Tapia; Masaphy és mtsai 2009). Ezekben az esetekben feltételezik két ökotípus, a rövidebb ideig termő szaprotróf és a hosszabb ideig jelen lévő mikorrhiza típus létét, életciklusukban félévenkénti váltakozással (Buscot és Roux 1987, Buscot 1989, Buscot és Bernillon 1991, Dahlstrom és mtsai 2000, Goldway és mtsai 2000, Masaphy és mtsai 2009). A szaprotróf fázis, nyáron és ősszel a tápanyag raktározás és szklerócium képzés időszaka, míg tavasszal a mikorrhiza fázisban a kitartóképletekből csírázó micélium kolonizálná a gyökereket (Dahlstrom és mtsai 2000). Dahlstrom és mtsai megfigyeltek *Morchella* hifákat a vizsgált *Pinaceae* fenyőfajok gyökérsajtjeiben, mely az előző kutatások eredményeivel összhangban – Wipf és mtsai beszámolója *M. esculenta*(L.)Pers. *Fraxinus excelsior* L. gyökér sejtben belüli penetrációjáról – ektendomikorrhiza kapcsolatra utalnak (Wipf és mtsai 1997, Dahlstrom és mtsai 2000). Ektendomikorrhizát néhány gombafaj, például a

---

<sup>□10</sup> A kucsmagomba megnevezés a *Verpa*-, *Mitrophora*-, *Ptychoverpa*- és *Morchella* nemzetségbe tartozó fajokat illeti.

jellemzően felégett területeken növvő tömlősgombák rutinszerűen képeznek, miként számos ektomikorrhiza partner növényfaj is képes kialakítani (Danielson 1984, Egger és Paden 1986, Molina és mtsai 1992, Smith és Read 1997).

Néhány *Morchella* fajról igazolódott fakultatív mikorrhiza sajátosságuk (Buscot és Kottke 1990, Buscot 1992a, 1992b és 1994, Wipf és mtsai 1997). *Morchella rotunda* (Pers.)Boudier és *Morchella esculenta* (L.)Pers. *Picea abies* (L.)Karst. fenyőfajjal *in vivo* lehetséges ektomikorrhiza kapcsolatot alakítottak ki (Buscot és Kottke 1990, Buscot 1992a,b). J. L. Dahlstrom és kutatócsoportja 2000-ben beszámol arról, hogy *Morchella rotunda* és *M. esculenta* fajok négy általuk vizsgált fenyőfajjal *in vitro* ektomikorrhiza képleteket hoztak létre (köpeny és Hartig-háló). Természetes eredetű *Morchella* mikorrhizát mindezideig nem találtak – *in vivo* szimbiotikus kapcsolataikra nincs egyértelmű bizonyíték, a Buscot által feltételezett mikorrhiza kapcsolatra csak olyan köpenyszerű képletek utaltak, melyeket gyakran képeznek tipikus szaprotróf gombafajok is.

A *Morchella* fajok képessége mikorrhiza-szerű kapcsolatok kialakítására ökológiai jelentőséggel bír: hozzájárul a rizoszféra mikroorganizmus közösség szén-körforgalom dinamikájának feltérképezéséhez, szerepet játszik a növények által fixált C-készlet egy részének hatékony megszerzése révén a szén-körforgásban mint mikorrhiza gomba, valamint az előregedett növényi részek, beleértve a finom gyökerek lebontásában (Dahlstrom és mtsai 2000).

A tavaszi enyhülés a mikroorganizmusok feléledését, egyedszámuk robbanásszerű növekedését és fokozott szerves anyag termelést eredményez. A mikrobiális életciklus jellemző szakaszát, a log-fázist követően nagy számban pusztulnak el és lizálnak a sejtek, így ezek anyagai hozzáférhetővé válnak, könnyen hasznosítható tápanyagforrást biztosítanak más mikroorganizmusok számára. A kevés koratavasszal megjelenő nagygombák között a legjelentősebbek a kucsagombák, melyek fajtól függően kora tavasztól nyár elejéig teremnek, átfedő terméshullámokkal. Számos tekintetben eltérnek az ismert nagygombáktól és tömlősgomba rokonaiktól: kétfázisú életciklusuk látható része tavasszal zajlik, növekedésük rendkívül gyors, élőhelyeik speciálisak (herbicid kezelt-, felégett területek, beteg erdőrészek), sokszor nehezen azonosíthatók (Dahlstrom és mtsai 2000).

A *Morchella conica* és *Morchella esculenta* általánosan ismert, széles körben elterjedt, míg a *Morchella steppicola* a Kárpát-medencében endemikus ritka faj (Zerova 1941, Häffner és Lukács 1995/1996). Környezeti igényük jelentősen eltér egymástól: a *M. conica* és *M. esculenta* az üde, rendszerint lomb-, fenyő- és ligeterdővel borított meszes talajú területeket kedveli, míg a *M. steppicola* száraz, füves nyílt területeken (jellemzően

pusztagyepekben) virul, sok esetben kitett, zavart területeken, agyagkibúvásokon nő (pl. erősen erodált lejtők, bolygatott területek, felhagyott almáskertek). Terméshullámaik jellemzően egymást követik, a hegyes kucsmagomba koratavasztól (március) képez termőtesteket, a sztyeppei kucsmagomba melegebb időben április-májusban.

A *Morchella* nemzetség tagjainak a gyógyászatban és fermentációs iparban betöltött szerepéről a Függelék F1. alfejezete<sup>[11]</sup> nyújt áttekintést.

## 2.8.2. *Populus* és *Quercus* fajok jellemzése

A *Populus* és *Quercus* genus közismert, és széles körben alkalmazott fajokat foglal magába. Az élettani vizsgálatokat mikroszaporított és természetben gyűjtött *Populus* növényekkel (*Populus glauca* L. var *Kopeczkii*, szürke nyár - *Populus canescens* (Aiton)Sm.) végeztem el, a genetikai analízisbe a fenti fajok mellett a kocsányos tölgyet (*Quercus robur* L.) vontam be.

### 2.8.2.1. *Populus* genus

A *Populus* nemzetségbe olyan puhafák tartoznak, melyek fa és papíripari szempontból, valamint ökológiai és környezetvédelmi területen egyaránt jelentős értékkel bírnak.

A 'nyár' megnevezés eredetét tekintve urali gyökerekre vezethető vissza: nor = mocsár, mely a nyárfák jellemzően vizes élőhelyeken történő előfordulására utal (Benkő és mtsai 1967-1984). A nyárfák számos kultúrában fontos szereppel bírnak. Szépségüket és az emberek hozzájuk fűződő viszonyát megörökítik írásos emlékek és művészeti alkotások az ókortól egészen napjainkig, melyek közül a legismertebbeket az F2. alfejezetben foglaltam össze.

A *Populus* nemzetség mintegy 40 fajt foglal magába, melyek többsége a Föld északi féltékéjén honos, azaz holarktikus fászfárú növények. Jellemzően nagyméretű, 15-50 méteres fák tartoznak a nemzetségbe, növekedésük gyors. Kérgük sima, néhány esetben idősebb korra barázdálttá válik. Általános jelenség a nyárfák körében, hogy egy egyed lombzatán belül a levélméret változatosságot mutat (heterofillia): a kisebb méretű levelek az oldalágakon, a nagyobb méretűek pedig az erősebb ágakon nőnek (Bartha 2004). Levélállásuk szórt, a nemzetségen belül az egyszerű levelek alakja a kerekdedtől a deltoidig változik, formagazdag tagoltság és hosszú levélnyel jellemző. Kétlaki (dioikus) növények, az egyivaráú (diclin) virágok laza, lecsüngő barkavirágzatba tömörülnek, murvaleveleik rojtosak.

<sup>[11]</sup> A Függelékben elhelyezett alfejezeteket, ábrákat és táblázatokat a sorszámukat megelőző F betű jelöli.

Lombfakadás előtt nyíló virágaik szélmegporzásúak (anemofilia). Termésük sokmagvú tok, a magvak repítőszőrökkel terjednek.

<b>Szekciók</b>	
<i>Leuce</i> Duby ( <i>Populus</i> Linné)	Szőke nyárok
<i>Aigeros</i> * Duby ( <i>Aigeiros</i> Duby)	Fekete nyárok
<i>Tacamahaca</i> Spach	Balzsamos nyárok
<i>Leucoides</i> Spach	Nagylevelű nyárok
<i>Turanga</i> Bunge	Szubtrópusi nyárok
<i>Abaso</i> Eckenwalder	Mexikói nyárok

**2. táblázat** *Populus* nemzetség szekció-felosztása.

\* Bartha szerinti szekció megnevezés (Bartha 2004).

A *Populus* nemzetség 6 szekcióra osztható fel (2. táblázat; Bartha 2004, Yousefi és Modir-Rahmati 2004, Dickmann és Kuzovkina 2008, Yousefi és mtsai 2008).

A nyár nemzetségben belül a hagyományos taxonfelfogás alkalmazása számos nehézségbe ütközik a fajok közötti gyakori spontán hibridizálódás és a génáramlás (introgresszió) következtében (hálózatos evolúció), valamint az egyes fajok egyedei közötti illetve az egyedek életkorának függvényében tapasztalható jelentős mérvű levél-alaktani különbségek okán (Bartha 2004, Hamzeh és Dayanandan 2004).

Magyarországon őshonos nyárfajok a *Leuce* szekcióba sorolható fehér nyár (*P. alba*) és rezgő nyár (*Populus tremula* L.), valamint az *Aigeros* szekcióba tartozó fekete nyár (*P. nigra*) (Bartha 1999, 2004). A sűrke nyár (*Populus x canescens*) gyakori előfordulását hibrid faj (spontán hibrid), a fehér nyár és a rezgő nyár természetes kereszteződése során jött létre. Az őshonos fajok mellett jelentősek az ipari felhasználásra és környezetvédelmi céllal ültetett nemesített fajták (nemes nyárok), melyek az alkalmazkodóképesség, a fertőzésekkel szembeni ellenállóképesség, a növekedés intenzitása és a faanyag minősége szempontjából optimalizált tulajdonságokkal rendelkeznek (Bartha 2004).

A hazai őshonos *Populus* fajok a folyóparti füzesek – *Salicetea purpureae* társuláskötői, a puhafaligetek – *Salicion albae* jellemző fái (Borhidi 2003). A puhafaligetek azonális higrofil szálerdők, a bokorfüzes társulások mögötti zónában folyóink partját övezik. Három társulás sorolható ebbe a csoportba, melyek elnevezése az uralkodó fajok szerint: fehérnyárligetek – *Senecioni sarracenicis-Populetum albae*, feketenyárligetek – *Carduo crispis-Populetum nigrae* és fűzligetek – *Leucoje aestivi-Salicetum albae* (Borhidi 2003).

A puhafaligeteken kívül további előfordulásuk jellemző: a láperdők és lápcserjések – *Alnetea glutinosae* kettő-, a mezofil lombos erdők – *Quercus-Fagetea* hét-, a szubmediterrán és szubkontinentális xerotherm erdők – *Quercetia pubescentis* hat növénytársulásának alkotói (Borhidi 2003). Az őshonos *Populus* fajok előfordulását hazánk növénytársulásaiban részletesen az F1. táblázat tartalmazza.

A *Populus* fajok akár 300 évig is élhetnek. Hazánkban számos éltés korú nyárfa egyedet tartanak nyilván, a törzskörméret számos regisztrált esetben meghaladja a 6 métert, sőt ismerünk 10 méteres törzskörfogató egyedeket is (F3. alfejezet; Bartha 1992, Pósfai 2005, <http://www.dendromania.hu>, <http://www.nevezetesfak.hu>, <http://oregfak.emk.nyme.hu>).

A nyárfák ipari felhasználása szempontjából a törzs fáteste<sup>[12]</sup> jelentős értéket képvisel. A *Populus* fajok gyors növekedésű szórtlikacsú puhafák, melyek között hazai viszonylatban a *P. alba*, *P. nigra* és *P. x canescens*, valamint a nemes nyárak közül az óriásnyár (*P. x euramericana* 'Robusta'), a korai és kései nyárak (*P. x euramericana* (Dode)Guinier cv. *Marilandica* és cv. *serotina*) színes gesztűek, míg az őshonos *P. tremula*, a nemes olasznyár (*Populus x euramericana* (Dode)Guinier cv. I. 214) és pannónia nyár (*P. x euramericana* *Pannonia*) szíjácsfák. Faanyaguk alacsony sűrűségű (400-470 kg/m<sup>3</sup>) és szilárdságú, kellő mértékben rugalmas, megfelelő favédelem nélkül nem tartós.

Magyarországon az ültetvényes fatermesztésen belül a nyártermesztés részaránya a legnagyobb – a jellemzően gyors tökemegtérülés háttérében a nyárak intenzív növekedése, jó minőségű faanyaguk és a hektáronként elérhető magas fatömeg áll. Ipari felhasználásuk az egyes fajok és nemesített fajták faanyagának minőségétől függően eltérő területeken lehetséges a cellulóz és papírgyártástól kezdve a forgácslap, farostlemez és rétegelt lemez gyártáson át a gyufagyártásig, rakodólap és gyümölcsláda készítésig. A faipari vonatkozások mellett napjainkban reneszánszát éli a különösen dekoratív csomoros<sup>[13]</sup> fekete nyár (topolya) törzsekből egyedi kültéri és beltéri bútorok, egyetlen törzsből faragott (monolit) bútorok készítése.

Nemesnyár ültetvények környezet- és természetvédelmi alkalmazása egyre elterjedtebb hazánkban (energiaültetvények, környezetbarát szennyvízkezelés, fitoremediáció; Bitsánszky és mtsai 2005, Bíró és Takács 2007, Szajkó és mtsai 2009, Gockler 2010a,b, Gyulai 2010). A nemesnyár ültetvények alkalmazási lehetőségeit részletesen az F5. alfejezet tartalmazza.

<sup>[12]</sup> A fatest felépítését az F4. alfejezet mutatja be.

<sup>[13]</sup> A csomoros törzs a feketenyárak jellemzője, az alvó rügyek és/vagy vízajtások benövésének következménye.



A hazai *Populus* fajok ökológiai és természetvédelmi szerepe sokrétű. A fehér nyárak a száraz élőhelyi viszonyokat jól tolerálják, így az Alföld fásítási projektjeiben szerepük számottevő. A *Populus* fajok endo- és ektomikorrhiza gombák szimbionta partnerei, ezáltal a talaj rizoszférajának összetételére és szukcessziójára kedvező hatásúak (Kovács és Szigetvári 2002, Jakucs 2001, Jakucs és mtsai 2005).

Az őshonos fehér és fekete nyárak területfoglalása az elmúlt évszázadokban jelentős mértékben lecsökkent hazánkban – a természetes élőhelyeik átalakítása (folyószabályozás, lecsapolás), a nemes nyárak egyre nagyobb területen történő telepítése és a spontán hibridizáció miatt állományaik visszaszorultak, helyzetük aktív védelmi eljárások, speciális génmegőrzési stratégia (génrezervátumok, magtermesztő ültetvények) alkalmazását kívánja meg (Bordács és mtsai 2002a).

A molekuláris növénybiológia, ezen belül a molekuláris fa-biológia kedvelt modellnövényei a *Populus* fajok, mivel széles körben elterjedt, gyors növekedésű növények, továbbá a nemzetség fajszáma kevés. A *Populus* fajok genomja kisméretű, *Agrobacterium* közvetítette transzformációra alkalmas (Sterky és mtsai 2004). A lágycsős és fás szárú növények közötti morfológiai és fiziológiai különbségek genetikai hátterének megismerésére irányuló törekvés szükségesszerűvé tette egy fás szárú modellnövény teljes genetikai állományának megszekvenálását és funkcionális elemzését (Sterky és mtsai 2004, Tuskan és mtsai 2006).

Az első fás szárú növény melynek elkészült a teljes genom szekvenciája a *Tacamahaca* szekcióba tartozó *Populus trichocarpa* Torr. & Gray (Tuskan és mtsai 2006). A funkcionális genomanalízis alapján az *Arabidopsis thaliana* genommal összevetve nagymértékű hasonlóságot találtak, kivételt képeznek ez alól a lignocellulóz bioszintézis útvonallal, a merisztéma fejlődéssel, a betegségekkel szembeni rezisztenciával és az anyagcseretermékek transzportjával kapcsolatos gének (Tuskan és mtsai 2006).

A közismerten allergén *Populus* fajok a népi orvoslásban jól ismert gyógyhatású növények. Jellemzésük humán-egészségügyi szempontból az F6. alfejezetben olvasható.

### **2.8.2.2. *Quercus* genus**

A *Quercus* nemzetségbe tartozó fajok értékes ipari haszonfák, mindamellett ökológiai és környezetvédelmi szempontból is jelentős értékkel bírnak.

A *Quercus* nemzetségénél a kelta *quer* = szép + *cuez* = fa szavakból eredeztethető (Bartha 2002, Barna és mtsai 2005). Számos kultúrában az ősök tiszteletének és a

rendületlen kirtás jelképei (Jankovics 1991). Az erdészcsillag (az erdészek jelképe) is a tölgyfák ötlevelű, ilyenformán csillagot kirajzoló csemetéire vezethető vissza.

Az európai kultúrák szinte mindegyikében a tölgyek az istenek fái, kivételesen mély tisztelettel viseltettek irántuk a skandináv népek, az ógörögök, az etruszkok, a kelták, a germánok és a poroszok. Az egyik leghíresebb Dodona tölgyfája (Észak-Görögország), mely a legrégebbi hellén orákulum – a jövőt a papok a lombok suhógásából vélték kihallani (Barna és mtsai 2005).

A *Quercus* nemzetség népes, mintegy 450 fajt foglal magába. A *Quercus* fajok – néhány kivételtől eltekintve – holarktikus fásszárú növények. Méretüket nagy változatosság jellemzi, cserje termetű és nagyméretű (> 30 méter) fajok egyaránt előfordulnak köztük. A mérsékeltöbven honos tölgyfajok lombhullatók, egyszerű leveleikre jellemző a tagoltság, az örökzöld mediterrán fajok levelei általában tagolatlanok. Kérgük jellemzően repedezett. Egylaki (monoikus) növények, egyivarú (diclin) virágokkal. A termős virágok rügyszerűek, tetejükön kilógó bibeszállal, porzós virágai barkavirágzatba tömörülnek (laza szerkezetű, szakadozott barka). Anemofil virágaik lombfakadás előtt vagy azzal egyidőben nyílnak. Az ovális, tojásdad makktermést változatos arányban és strukturáltságban is eltérő (pikkelyes, bozontos) makkcsésze takarja.

500 évig igazoltan élélnék - az egyik legöregebb ismert tölgyfa az 500 éves kort meghaladó kálnoki tölgy (kocsányos tölgy, Székelyföld). Magyarországon is számos éltes egyed tartanak számon, közülük több fa vált nevezetessé, melyek mindegyike védelem alatt áll (F7. alfejezet; <http://www.dendromania.hu>, <http://www.nevezetesfak.hu>, <http://oregfak.emk.nyme.hu>, Pósfai 2005). A legidősebb mindközül a >600 éves hédervári Árpád fa (kocsányos tölgy).

Magyarországon nyolc tölgyfaj és egy alfaj honos (18. ábra). További adventív tölgyfajok előfordulása szintén jellemző – közéjük tartozik a hazánkban jelentősebb példányszámban élő vörös tölgy [*Quercus borealis* Michx. (*Quercus rubra* L.)]. A vörös tölgy mellett más idegen eredetű fajokkal elsősorban mint parkfákkal találkozhatunk, miként a tölgyfák kulturális értékének és impozáns megjelenésének köszönhetően természetes típusaikat és nemesített változataikat is szívesen ültetik parkokba, emlékhelyeken.

A *Quercus* nemzetség 3 alnemzetséget foglal magába: *Cyclobalanopsis*, *Lepidobalanus* és *Erythrobalanus* subgenus. A *Lepidobalanus* csoportba tartoznak a vastag kérgű tölgyek (*Robur*) és a csertölgyek (*Cerris*), az *Erythrobalanus* alnemzetségbe pedig a vörös tölgyek (*Rubrae*).

<i>Quercus cerris</i> L.	Csertölgy
<i>Quercus frainetto</i> Ten.	Magyar tölgy
<i>Quercus palustris</i> Munchh.	Mocsártölgy
<i>Quercus petraea</i> (Matt.)Liebl.	Kocsánytalan tölgy
<i>Quercus polycarpa</i> Schur.	Erdélyi kocsánytalan tölgy
<i>Quercus pubescens</i> Willd.	Molyhos tölgy
<i>Quercus robur</i> L.	Kocsányos tölgy
<i>Quercus robur ssp. slavonica</i> (Gáyer)Mátyás	Szlavón tögy
<i>Quercus x turneri</i> Willd.	Turner tölgy*

**18. ábra** Magyarországon honos tölgyfajok.

\* A magyaltölgy (*Quercus ilex*) és a kocsányos tölgy (*Quercus robur*) hibridje.

A *Quercus* nemzetség hazai fajállományait tekintve is megállapítható, hogy jelentős mértékű változatosság jellemzi őket, ezek alapján az erdészeti szakemberek már nem is fajokról, hanem fajkonglomerátumokról beszélnek, úgymint kocsányos tölgy-, kocsánytalan tölgy-, molyhos tölgy-, csertölgy fajkonglomerátum. A *Quercus robur* két változata ismert, az egyik a koránfakadó kocsányos tölgy – *Q. robur var. praecox*, melynek virágzása megelőzi a lombfakadást, a másik későnfakadó változat – *Q. robur var. tardiflora* lombfakadással egyidőben virágzik.

A tölgyek a középső-eocén (Kainozoikum, Paleogén) földtörténeti korban jelentek meg, amikor a kontinensvándorlás és az éghajlat jelentős mérvű átalakulása következtében átalakult ökológiai fiúkék (niche) teremtették meg a lehetőségét az ezeket elfoglaló tölgy populációk alkalmazkodása során különféle tölgyfajok kialakulásának (Kremer és mtsai 1991). A megjelenő fajok géncseréjének folyamatosságát (introgresszió) támasztja alá, hogy számos fajuk máig megőrizte kereszteződési képességét, melynek eredményeképpen természetes hibridek jönnek létre (Bordács és mtsai 2002b, Petit és mtsai 2002).

Hazánkban a tölgyfélék, közülük is elsősorban a kocsányos (*Quercus robur* L.) és kocsánytalan tölgy (*Quercus petraea* (Matt.)Liebl.) a legfontosabb állományalkotó fafajok. Az őshonos tölgy fajok – a *Q. robur* és *Q. petraea* mellett a *Q. pubescens* és *Q. cerris* – változatos erdőtársulások, a Mezofil lombos erdők – *Quercus-Fagetea* és a Szubmediterrán és szubkontinentális xerotherm erdők – *Quercetia pubescentis* társulás-osztályok csoportjainak alkotói (F2. táblázat; Borhidi 2003). Magyarország erdeinek 13 százalékát kocsánytalan tölgy (dombvidék és középhegységek), közel 10 százalékát kocsányos tölgy és 11 százalékát csertölgy (sík és dombvidékek) borítja.

A *Quercus* nemzetség fajai gyűrűslikacsú, színes gesztű kemény lombosfák. Hazánkban az ipari felhasználás szempontjából, a faanyag jelentős mértékben eltérő tulajdonságai alapján elkülönítik a barna színezetű, jó minőségű, magas csersavtartalmú és ennek köszönhetően igen ellenálló nemes tölgyeket (*Q. robur*, *Q. petraea* és *Q. pubescens*), a vöröses színezetű, széles szíjácsú és alacsony csersavtartalmú, ezáltal nem tartós csertölgytől.

A nemes tölgyek közül a *Quercus robur* és *Quercus petraea* fajok szép rajzolatú, értékes fatestét hasznosítják széles körben. Jó termőhelyi adottságok mellett a kimagasló éves átlagos jövedelmet biztosító állományok közé tartoznak. Kemény, rugalmas faanyaguk nagy sűrűségű (~690 kg/m<sup>3</sup>) és szilárdságú. Gesztjük igen magas csersavtartalmának (10-13 %) köszönhetően a legtartósabb gesztű fajok közé tartoznak. A faanyag szárításakor körültekintően kell eljárni (lassú, kíméletes szárítás), a fatest széles bélsugarai és korai pásztaik vékonyfalú nagy edényei mentén könnyen bekövetkező repedezés elkerülése érdekében.

A *Q. robur* és *Q. petraea* faanyagát széles körben hasznosítják az építőiparban, a közlekedés és bányászat ágazataiban, az élelmiszeriparban, bútorok és használati tárgyak készítésére. A nemes tölgyek és a csertölgy faanyagának felhasználásáról részletesen az F8. alfejezet ad számot.

A kocsányos tölgy további alkalmazási lehetőségeit főként kiemelkedően magas (kéreg 13-15 %) és gazdag cseranyag tartalmának köszönheti – a bőripar, a textilipar és a gyógyászat is eredményesen alkalmazza különböző részeit, és az azokból előállított készítményeket (F9. alfejezet; Kuliev és mtsai 1997).

A tölgyek ökológiai, erdészeti és természetvédelmi jelentősége számottevő a természeti értékek megőrzése, a biológiai sokféleség (biodiverzitás) kialakulásának elősegítése, a klímavédelem, valamint a fenntarthatóság jegyében az élhető környezet és az alternatív földhasználat szempontjából (kültéri gombatermesztés, szarvasgomba ültetvények) egyaránt. Mindemellert nem elhanyagolható a tölgyerdők alkotta társulásokban a makktermés szerepe sem, mely számos állat, köztük sok erdőlakó gerinces faj egyik meghatározó késő őszi élelme.

Magyarország erdőültetése az ország területének 20 százaléka – ebből közel 80 % a gazdasági erdők, 16 % a védérdők és 4.0 % körüli a parkerdők részaránya, az egy főre jutó erdőterület 0.18 ha. Hazánk erdővel borított területének mérete messze elmarad az európai

átlagtól (32 % erdőterület). Kedvező ökológiai feltételek és az önellátó fagzdálkodás megteremtéséhez szükségeszerű újabb erdők telepítése az ideális 0.4-0.5 ha/fő arány eléréséig.

A mezőgazdasági művelés alá vont területek növelése, a folyószabályozások és a talajvízszint erőteljes csökkenése, az egyre fokozódó faanyag felhasználás a természetes erdőterületeink jelentős mértékű csökkenéséhez vezetett. Tovább súlyosbitja a helyzetet az idegen fajokkal történő erdőfelújítás, a szélsőséges időjárási viszonyok kedvezőtlen hatásai, a csapadékhiány, a vadkár és a környezetszennyezés, melyek együttesen járulnak hozzá erdeink állapotának leromlásához. A fenti hatások a legsúlyosabb mértékben a kocsányos tölgy állományainkat érintik.

A tölgyerdők felújítása és telepítése hazánk erdővel borított területeinek jelentős mértékű növelésében meghatározó szereppel bír. Erdők telepítésekor szükségeszerű kedvezőtlen adottságokkal (tápanyagszegény, rossz vízellátottság, sérült mikroflóra, szennyezett talaj) rendelkező területek bevonása (F10. alfejezet). A sikeres erdősisítés záloga elsősorban mikorrhizált facsemetek telepítésében rejlik. A tölgy fajok ektomikorrhiza-képző sajátsága ökológiai, erdészeti és agrár szempontból egyaránt jelentős, lehetőséget teremt környezetbarát eljárások alkalmazásával végezhető eredményes gazdálkodásra (F10. alfejezet). A mikorrhiza szimbiózis természet- és környezetvédelmi előnyei számottevőek az erdők felújításában, különböző anyagokkal (nehézfémek, szerves ágensok) szennyezett talajokon kivitelezett erdőtelepítésekben – ezáltal a terület rekultivációjában is.

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám során a trehalóz anyagcsere vizsgálatait fungális modellrendszerben kezdtem meg: szintézis eredetű trehalóz jelenléte biztosan várható volt, a trehalóz anyagcsere átfogó vizsgálatára nyílt lehetőségünk. Ideális objektumnak bizonyultak a *Morchella steppicola* izolált törzsei, mely gombafaj arid és zavart élőhelyeken nő, a Petricészéiben nevelt tenyészteti jól reprodukálható módon és rövid idő alatt képeznek pszeudoszkeróciúmkokat, amely kitaratóképletekben trehalózt akkumulál.

Doktori munkámban a következő célokot fogalmaztam meg:

- Az oxidatív stressz induktív szerepének igazolása *Morchella steppicola* kitaratóképlet (pszeudoszkeróciúmk, PS) képzésében, az oxidatív stressz, a PS képzés és a trehalóz szintézis és akkumuláció közötti összefüggések feltárása.
- A trehalóz bioprotektív szerepének igazolása *M. steppicola* kivételes szárazságstressz-toleranciájában.
- A trehalóz bontását katalizáló trehaláz izoenzimek aktivitásának meghatározása, induktív sajátágaik feltérképezése *Morchella conica* és *M. steppicola* vegetatív micéliúmkában.
- A trehalóz anyagcsere-folyamatok (szintézis, akkumuláció, degradáció) változásának követése *M. steppicola* teljes vegetatív életciklusában.
- Trehaláz izoenzimek aktivitásának meghatározása *Populus glauca L. var Kopeczkii* és *Populus canescens* különböző fenológiai fázisban lévő vegetatív és reprodukatív szerveiben, az izoformák induktív sajátóságainak felderítése.
- Biotikus stressz hatásának feltérképezése *P. glauca* levél SOD, POD és trehaláz izoenzim aktivitására.
- Trehalóz anyagcsere-gének izolálása *M. steppicola*, *M. esculenta*, *P. glauca L. var Kopeczkii* és *Quercus robur* fajokból, ehhez a molekuláris biológiai adatbázisokban (NCBI, EMBL-EBI) fellelhető trehaláz és trehaláz-szintáz enzimkomplex szekvenciák alapján primerek tervezése.

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1. Vizsgálati objektumok I.

#### 4.1.1. Tenyészetek létrehozása

Tavasszal *Morchella conica* Pers., *Morchella esculenta* (L.)Pers. és *Morchella steppicola* Zer. termőtesteket gyűjtöttem természetes élőhelyeken, az izolálás helyét és időpontját regisztráltam<sup>[14]</sup>. Steril körülmények között kettévágtam a fiatal és ép aszkokarpiumokat és a belső csíramentes felületükről 3-4 mm<sup>2</sup>-es micélium darabokat vágtam ki, melyekből szilárd PDA (potato dextrose agar; burgonya-dextróz agar) vagy maláta agar (MA) táptalajra<sup>[14]</sup> Petri-csészéknént három inokulumot helyeztem el a rendelkezésre álló térben arányosan elrendezve. A tenyészeteket naponta ellenőriztem és 3-5 nap elteltével a fertőzésmentes, tiszta részekből átoltottam friss, fenntartó módosított Murashige-Skoog (MS) – MSK táptalajra<sup>[14]</sup> (Murashige és Skoog 1962). Az inokulumot, egy-egy 4-6 mm<sup>2</sup>-es beszótt darabot a Petri-csészékben centrálisan helyeztem el. A tenyészeteket 23°C-on tartottam. A fenntartás során a néhány átoltást követően is megfelelően tiszta és stabil tenyészeteket törzsgyűjteménybe is kioltottam. A törzstenyészeteket (ferde-agaron kémcsőben vagy Petri-csészében) parafilmmel lezárva, 8-10°C hőmérsékleten helyeztem el.

Indítottam tenyészeteket aszkospórákkal is, ehhez az érett termőtesteket Petri-csészébe, fényre 22-25°C hőmérsékletre helyeztem. A spórák kiszóródásának előfeltétele az összetett nyelese apotéciumok víztartalmának csökkenése, ezért – s a fertőzések elkerülése érdekében, mivel a termőtestek felülete nem steril – megfelelő légcserét biztosítottam a sporulálásig. Az összegyűjtött aszkospórákat parafilmmel lezárt edényekben, fény- és hőhatástól védetten, hűvös helyen (8-10°C) tároltam. Szilárd kultúra létrehozásához az így eltárolt spórákból steril desztillált vízzel szuszpenziót készítettem, 10°C-on 4000 g-n 5 percig centrifugáltam. A felülúszó elöntését követően steril desztillált víz hozzáadásával a fentieket még öt ízben megismétltem. Miután így az aszkospórák csíraszámát kiméletesen lecsökkentettem, a szuszpenzióból steril körülmények között felszintetikus agarlemezre szélesztettem. Különböző hígításokat alkalmaztam, hogy a kifejlődő telepek egymástól jól elkülönüljenek (monospóra tenyészetek).

---

<sup>[14]</sup> A *Morchella* fajok taxonómiai besorolását az F1. ábra, a táptalajok összetételét az F3. táblázat tartalmazza.

#### 4.1.2. Kísérleti összeállítások

Szilárd és folyadékkultúrában nevelt gombaanyagot használtam a különböző vizsgálatokhoz. Folyadékkultúrát a fenntartó szilárd kultúras tenyészetekből hoztam létre, 15 darab 3 mm átmérőjű steril dugófúróval kivágott koronggal inokuláltam a felszintetikus tápoldatokat (150 ml tápoldat/Erlenmeyer lombik, gézborítású vattadugóval lezárva). A folyadékkultúrákat rázógépen növesztettem (a rázatás fordulatszáma 150/perc), így biztosítva a megfelelő légcserét és a tápanyagok egyenletes eloszlását.

Szilárd kultúrát MSK táptalajon nevelt fiatal tenyészetekből kiindulva indítottam a 4.1.1. pontban leírt módon. Az agarlemezek felszínére sterilizált celofánkorongot helyeztem, erre történt centrálisan a micéliummal beszótt táptalajból steril dugófúróval kivágott 3 mm átmérőjű agarkorongok oltása. A tenyészeteket 23°C-on neveltem. A kísérleteket egymástól független három alkalommal végeztem el, vizsgálatonként 3-5 párhuzamos mintát dolgoztam fel.

##### 4.1.2.1. Trehalóz anyagcsere vizsgálata *Morchella steppicola* életciklusának vegetatív szakaszában

A trehalóz akkumuláció, az oxidatív stressz és a kitartóképletek képzése közötti összefüggések vizsgálatát szilárd kultúrában nevelt micéliumon végeztem el. A Petri-csészében agarlemezen képződő kisméretű kitartóképletek (mikropszeudoszkléróciumok) a fenntartó táptalajon is rendszeresen képződtek, így kontroll táptalajnak ezt az MSK táptalajt választottam. Kiinduló tenyészet: fenntartó táptalajon növekedett 5 napos fiatal micélium.

A kísérleti összeállításban a különböző táptalajvariánsok malátá tartalmukban tértek el egymástól – a kontroll 5.00 g/l, a variánsok: 3.75, 2.50, 1.25 és 0.00 g/l malátát tartalmaztak 5.00 g/l glükóz mellett. Mintát az inokulálást követő 10. és 15. napon vettem. Meghatároztam a micélium friss és száraz súlyát, a glükóz és trehalóz tartalmát, a szuperoxid-dizmutáz (SOD, EC. 1.15.1.1.) enzimaktivitást, a malondialdehid- (MDA), az intra- és extramicéliális hidrogénperoxid ( $H_2O_2$ ) és szuperoxid anion ( $O_2^{\bullet -}$ ) tartalmát.

*M. steppicola* életciklusának vegetatív szakaszában vizsgáltam a trehalóz bontását katalizáló trehaláz izoenzim (EC. 3.2.1.28) aktivitásának változását az askospórák illetve mikropszeudoszkléróciumok (MPS) csírázásától kezdve a kitartóképletek képződéséig valamint ezek fejlődésének, érésének főbb szakaszaiban (PSI, PSD, PSM és nyugvó állapot). A MPS képzés szempontjából kedvező táptalaj-összetételt (5.00 g/l glükóz és 2.50 g/l malátá tartalmú MS táptalaj – MS\*) alkalmaztam.



#### 4.1.2.2. *Morchella steppicola* és *Morchella conica* törzsek trehaláz enzim indukciója szilárd és folyadékkultúrában

A trehaláz izoenzimek induktív sajátosságait különböző koncentrációban trehalózt tartalmazó MS\*\* (módosított MS) szilárd és folyadékkultúrában nevelt micéliumban vizsgáltam.

Szilárd kultúrában a kontroll és indukciós táptalajok hasznosítható C-forrás tekintetében azonosak a trehaláz  $\xrightarrow{\text{trehaláz}}$  2 glükóz enzimreakció alapján (3. táblázat).

Táptalaj	Glükóz tartalom g/l	Trehaláz tartalom g/l
<i>Kontroll</i>	10.00	0.00
<i>Indukciós 1</i>	7.50	1.25
<i>Indukciós 2</i>	5.00	2.50
<i>Indukciós 3</i>	0.00	5.00

**3. táblázat** A trehaláz enzim indukciós szilárd táptalajok glükóz és trehaláz tartalma (g/l). A táptalajok malátatartalma egységesen 3.00 g/l.

A szilárd és a folyadékkultúrák kísérleti összeállításoknál egyaránt a 10. napon történt a mintavétel. A trehaláz izoenzimek aktivitásváltozásának követeése mellett a külső trehaláz forrás stressz-életteni hatását is monitoroztam, a micélium friss és száraz súlyának, MDA tartalmának és SOD aktivitásának meghatározásával.

*M. conica* és *M. steppicola* trehaláz enzim indukciójának vizsgálatához beállított kísérleteket a 4. táblázatban foglaltam össze.

Faj	Szilárd kultúra	Folyadékkultúra
<i>M. conica</i> (MPS képző törzs)	–	✓
<i>M. steppicola</i> MPS képző törzs	✓	✓
MPS-t nem képző törzs	✓	–

**4. táblázat** *M. conica* és *M. steppicola* micélium trehaláz enzim indukciójához alkalmazott tápközegek.

#### **4.1.2.3. *Morchella steppicola* szárazságstressz-toleranciájának vizsgálata folyadékkultúrában**

*M. steppicola* tenyészeteket polietilén-glikol (PEG) tartalmukban különböző MSK folyadékkultúrában neveltem 10 napig: kontroll 0.0 % (<sup>m</sup>/<sub>v</sub>) PEG; szárazságstressz szimuláció: 8.0 %, 10.0 %, 12.0 %, 15.0 %, 18.0 % és 21.0 % (<sup>m</sup>/<sub>v</sub>) PEG.

A tíz napos mintákból meghatároztam a micélium friss és száraz súlyát, SOD enzimaktivitását, glükóz-, trehalóz és MDA tartalmát.

#### **4.1.2.4. Trehalóz-6-foszfát szintáz és trehaláz gének keresése *Morchella steppicola* és *Morchella esculenta* genomialis DNS állományában**

Kontroll körülmények között MSK szilárd táptalajon nevelt fiatal (6 napos) micéliumot használtam a genomialis DNS kivonásához. A micéliumot frissen tártam fel, a kinyert DNS-t a mennyiségi meghatározást követően a PCR reakciónak megfelelő kisebb adagokban lefagyasztottam és -20°C-on tároltam. A DNS preparátum készítésének részletes leírása a 4.3.11. alfejezetben szerepel.

A trehalóz-6-foszfát szintáz és trehaláz gének kereséséhez szükséges saját primerek tervezését adatbázisokban fellelhető szekvenciák elemzése alapján végeztem el (NCBI, EMBL-EBI). A primerek tervezése a gomba minták esetében azonos módon történt, a módszer leírása részletesen a 4.3.12. pontban szerepel.

## **4.2. Vizsgálati objektumok II.**

A trehalóz anyagcserével szoros összefüggést mutatnak különféle stresszhatások, a növényi szénhidrát anyagcsere szabályozása, az egyedfejlődés néhány szakasza és a szimbiotikus kapcsolatok összetett világa.

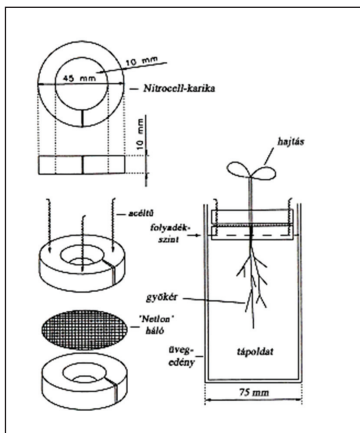
A stresszhatások, így a közvetett és a közvetlen eredetű oxidatív stressz mértékének követésére alkalmas indikátorok kiválasztása és tesztelése jelentőséggel bír a trehalóz anyagcsere vizsgálatában. Doktori munkám során kooperációs projektek résztvevőjeként lehetőségem nyílt egyszikű (*Triticum aestivum* L. - közönséges búza, *Aegilops biuncialis* Vis. - kecskebúza, *Hordeum vulgare* L. - árpa) és kétszikű növényeken (PeMa [*Prunus persica* x *Prunus amygdalus*] - barack alany, *Phaseolus vulgaris* L. - közönséges bab, *Populus alba* L. - fehér nyár és *Populus glauca* L. var *Kopeczkii*) végzett stresszélettani vizsgálatok során potenciális stresszindikátorok keresésére és hatékonyságuk tesztelésére. Ezen kísérletek részletes leírását a doktori értekezésem nem tartalmazza, mivel a

stresszhatások leírására alkalmas indikátorok kiválasztása és tesztelése a munkám kezdeti szakaszában, a trehalóz anyagcsere vizsgálatában a kísérletek tervezéséhez nyújtottak megfelelő alapot, és az értekezés szűkebben a trehalóz anyagcsere sajátosságait feltáró eredményekre koncentrált.

A trehalóz anyagcsere vizsgálatát mikroszaporított nyár (*Populus glauca* L. var *Kopeczkii*) növényekkel, természetben gyűjtött *Populus canescens* (Aiton)Sm. (Szürke nyár) és *Quercus robur* L. (Kocsányos tölgy) mintákkal végeztem<sup>[215]</sup>.

#### 4.2.1. Mikroszaporított növényi anyag tápoldatos nevelése

A mikroszaporított *P101* nyár növényeket az Érdi Gyümölcs- és Dísznövénytermesztési Kutató Fejlesztő Kht. biztosította számunkra. A növénykéket 4-5 centiméteres szárhossz elérését és a gyökerek megjelenését követően átültettem szilárd MS táptalajról ¼-es Hoagland tápoldatra (Hoagland és Arnon 1950). A tápoldat összetétele: 1.25 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1.25 mM  $\text{KNO}_3$ , 0.50 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.08  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ , 11.56  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 4.60  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$ , 0.19  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 0.12  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 10.00  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}(\text{III})\text{-EDTA}$ .



**19. ábra** *Populus glauca* L. var *Kopeczkii* növények hidroponikus neveléséhez használt eszközök. (Forrás: A víz- és ionháztartás témakör növényélettani gyakorlati bevezető. A kísérleti összeállításnak megfelelően saját kezűleg átdolgozott szemléltető ábra. Az eredeti ábra az ELTE Biológiai Intézet, Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék gyakorlati oktatóanyagának részét képezi.)

<sup>[215]</sup> A *Populus* fajok és a *Quercus robur* rendszertani besorolása a Függelékben szerepel (F2. és F3. ábrák).

A hidroponikus növényneveléshez sötétített falú üvegedényeket (7.50 cm átmérő, 10.00 cm magasság), nitrocell karikából és netlon hálóból acéltüvel összeállított helyben készített 'úszkát' használtam (19. ábra).

Az átültetést követően a növénykéket növénynevelő-kamrában neveltem 12/12 órás fény/sötét periódust választva (hőmérséklet és relatív páratartalom: 20/18°C és 70/75%, fényintenzitás 150  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). A tápoldatot kétnaponta cseréltem, így biztosítva a gyökerek optimális  $\text{O}_2$ -ellátását.

A vizsgálatokat 7 levélemelettel rendelkező növényekkel kezdtem meg, a kísérleteket három független alkalommal, 3-5 párhuzamos mintával végeztem el.

#### 4.2.1.1. Biotikus stressz hatásának vizsgálata a növények SOD, POD és trehaláz enzim aktivitására

A növényeket két csoportra osztottam, a kontroll és kezelt növényeket egymástól elkülönítve, a biotikus stresszor (*Tetranychus urticae* Koch - közönséges vagy kétfoltos takácsatka) áterjedését meggátolva neveltem. A kezelésre kiválasztott növények között egyenletesen elhelyezett fertőzött növényekkel idéztem elő a takácsatka fertőzést. A kontroll és kezelt növényeket azonos körülmények között, a 4.2.1. pontban ismertetett módon neveltem. A fertőzés kialakulását követően, a tünetek megjelenésétől a hajtás teljes inváziójáig a fertőzöttség különböző stádiumaiban vettem mintát, azonos levélemeletekről.

A fertőzés előrehaladtával a tünetegyüttes alapján 4 egymástól jól elkülöníthető szintet határoztam meg (5. táblázat).

Minta	Minta rövid jellemzése
Kontroll	Kontroll fiziológias állapot
A1	A fertőzés kezdeti szintje: klorotikus foltok megjelenése, 'szívó helyek' nyomai
A2	A fertőzés terjedése: fokozódó klorózis, antocián tartalmú foltok megjelenése
A3	Előrehaladt fertőzés: antocián tartalom $\uparrow$ , apró nekrotikus foltok megjelenése
A4	Súlyos fertőzés: maximális antocián tartalom, fokozódó nekrosis

5. táblázat Kétfoltos takácsatka fertőzés hatásának vizsgálata során vett növényi minták.

Meghatároztam a levelek friss és száraz súlyát, Chl-, karotin-, antocián és MDA tartalmát, a SOD-, POD (EC. 1.11.1.) és trehaláz enzimek aktivitását.

#### 4.2.1.2. Kifejlett levelek trehaláz enzim indukciója

Kontroll körülmények között nevelt *Populus glauca L. var Kopeckii* növények kifejlett, fiatal leveleit (5. levélemelet) a levéalapjuknál roncsolódásmentesen leválasztottam és Erlenmeyer lombikokba 1/4-es Hoagland tápoldatba helyeztem úgy, hogy csak a levélnyelük került a tápoldatba, a levéllemezek a tápoldat szintje felett maradtak. Folyamatos megvilágítást  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $20^\circ\text{C}$  hőmérsékletet és 70 % relatív páratartalmat alkalmaztam. A trehaláz enzim aktivitását 3 mM trehalóz 1/4-es Hoagland oldathoz történő hozzáadásával indukáltam. Mintát rendszeres időközönként vettem mind a trehalóz-mentes tápoldatban tartott kontroll, mind pedig az indukciós közegben inkubált levelek esetében (6. táblázat).

Idő (perc)	Minta	
	Kontroll	Indukált
0	✓	–
60	✓	✓
90	✓	✓
180	✓	✓
360	✓	✓
720	✓	✓
1080	✓	✓

6. táblázat Mintavétel időpontjai a trehaláz enzim-indukciós levélkísérletben.

A kísérlet során mértem a levelek friss és száraz súlyának, Chl-tartalmának, SOD és trehaláz enzimaktivitásának változását.

#### 4.2.1.3. Trehalóz-6-foszfát szintáz és trehaláz gének keresése *Populus glauca L. var Kopeckii* genomiális DNS állományában

Kontroll körülmények között nevelt fiatal *Populus glauca L. var Kopeckii* leveleket használtam a genomiális DNS kivonásához. Frissen tartam fel a növényi anyagot, a kinyert DNS mennyiségét meghatároztam, a PCR reakcióban történő felhasználáshoz előkészítve több részletben lefagyasztottam és  $-20^\circ\text{C}$  hőmérsékleten tároltam. A genomiális DNS extrakciójának részletes leírása 4.3.11. pontban szerepel.

Saját primereket terveztem a trehalóz-6-foszfát szintáz és trehaláz gének kereséséhez, ehhez az adatbázisokban fellelhető szekvenciákat elemeztem (NCBI, EMBL-EBI). A tervezés menetét a 4.3.12. alfejezet tartalmazza.

## 4.2.2. Természetben gyűjtött növényi minták vizsgálata

A természetben gyűjtött *Populus canescens* és *Quercus robur* mintákat minden esetben frissen (a lehető leggyorsabban) feldolgoztam, a szállítás során folyékony nitrogénnel és jéggel hűtött termoszban tároltam.

### 4.2.2.1. Különböző fenológiai fázisú *Populus canescens* virágrügyek trehaláz enzimaktivitásának meghatározása

A begyűjtött virágrügyekből trehaláz enzimpreparátumokat készítettem. Mintavétel szempontjából 5 típust különböztettem meg a fenológiai fázisokkal összehangoltan (7. táblázat).

Minta	Fenológiai fázis
F0	Zárt, nyugalmi állapotban lévő rügyek
F1	Rügyduzzadás fázisa
F2	Rügyattanás fázisa
F3	Rügyfakadás fázisa
F4	Virágzás fázisa

7. táblázat A fenológiai fázisok szerint meghatározott szürke nyár virágrügy mintatípusok.

### 4.2.2.2. Trehalóz-6-foszfát szintáz és trehaláz gének keresése *Populus canescens* és *Quercus robur* genomális DNS állományában

Fiatál, egészséges leveleket gyűjtöttem a genomális DNS izoláláshoz. A DNS izolálás és primer tervezés során a 4.2.1.3. pontban leírtak szerint jártam el.

## 4.3. A vizsgálatok során alkalmazott klasszikus és modern élettani, és molekuláris biológiai módszerek

### 4.3.1. Enzimpreparátumok készítése

#### 4.3.1.1. Trehaláz enzimkivonat készítése

A friss micéliumot, kitaróképleteket és növényi szöveteket jégben hűtött dörzsmoszársban, kvarchomok jelenlétében tartam fel. A micéliumot kétszeres, a kitaróképleteket és a növényi mintákat háromszoros mennyiségű kinyerő puffer jelenlétében homogenizáltam. A savas pH optimummal jellemzett és a neutrális trehaláz izoformák kinyeréséhez kismértékben eltérő puffert alkalmaztam (8. táblázat).

Az extraktumokat 6000 g-n, 4°C-on 10 percig centrifugáltam<sup>16</sup>. A savas trehaláz enzimpreparátum készítésének folyamatában a centrifugálást megelőzően 10 percig jégben tartottam a mintákat. Az enzimet a felülúszó tartalmazza.

A	B
0.1 M Trisz	0.1 M Trisz
5.0 mM EDTA (pH=8.0)	0.5 mM EDTA (pH=8.0)
0.1 % ( <sup>m</sup> / <sub>v</sub> ) n-dodecil-β-D-maltozid	25.0 g/l PVP 25
25.0 g/l PVP 25	

**8. táblázat** Trehaláz izoenzim kinyerő puffer összetétele. **A:** savas izoformákhoz használt puffer. **B:** neutrális izoformák esetén alkalmazott puffer. *A puffer végtérfogatát ddH<sub>2</sub>O hozzáadásával 100 ml-re egészítjük ki. A puffer pH-ját a használat előtt 7.50-re be kell állítani.*

#### 4.3.1.2. Extramacéliális trehaláz enzimpreparátum készítése

Az extramacéliális trehaláz aktivitás meghatározásához a tápoldatokból kiindulva készítettem enzimpreparátumot. 10 nap nevelést követően a kontroll és a trehaláz tartalmú tápoldatokat átszűrtem 3 réteg gézen, majd nagyméretű (átmérő: 20 cm) Petri-csészékbe öntve -20°C-on lefagyasztottam. A fagyott mintákat liofilizáltam Jencons freeze dryer készülékkel (Bedfordshire, England) -40°C-on, 10<sup>5</sup> Pa nyomáson 48 órán át. A liofilizátumokat 25.0 mM trisz-HCl pufferben (pH=7.50) szuszpendáltam. Az így előkészített mintákat aktivált dialízis hüvelyekbe töltöttem (Dialysis tubing cellulose membrane, Sigma) és 10.0 mM trisz-HCl pufferben (pH=7.50) dializáltam folytonos kevertetés mellett 4°C-on egy éjszakán át.

#### 4.3.1.3. SOD és POD izoenzimek kinyerése

A növényi és gomba mintákban fennálló oxidatív stressz mértékét és változását a szuperoxid-dizmutáz enzimaktivitás mérésével monitoroztam. A biotikus stressz *Populus glauca L. var Kopeckii* növényekre gyakorolt hatásának vizsgálatában a SOD aktivitás mellett a peroxidáz (POD) enzimek aktivitását is meghatároztam.

A micélium feltárásához kétszeres-, a kitaróképletek és a növényi minták homogenizálásához háromszoros térfogatnyi kinyerő puffert alkalmaztam, mely 25.0 mM Sörensen-féle foszfát puffert (pH= 8.00), 1.00 mM EDTA-t (pH= 8.00) és 20.0 g/l PVP<sub>25</sub>-t

<sup>16</sup> A szobahőmérséklettől (23-25°C) eltérő hőmérsékletet igénylő centrifugálásokat SIGMA 3K15 és 3K10 asztali centrifugákkal végeztem el.

tartalmazott. A mintákat jégben tartottam a centrifugálásig (10000 g, 4°C, 15 perc). Az enzimet tartalmazó felüliszót tiszta Eppendorf edényekbe öntöttem át és -20°C-on tároltam a mérések elvégzéséig.

### 4.3.2. Összfehérje-tartalom meghatározása

Az enzimpreparátumok aktivitásának összehasonlíthatóságához elengedhetetlen a kivonatok fehérjetartalmának ismerete. A minták összfehérje-tartalmát Bradford módszerével határoztam meg (Bradford 1976).

A Bradford reagens törzsoldata 50 ml 95 %-os ( $V/V$ ) etanolban oldott 100 mg *Coomassie Brilliant Blue G-250* és 100 ml 85%-os ( $V/V$ ) foszforsav keveréke, melyet ddH<sub>2</sub>O hozzáadásával 1.0 literre hígítunk. Az elkészített reagenst szűrést követően 8°C-on tároltam.

A minták fehérjetartalmának meghatározását ismert koncentrációjú BSA (bovine serum albumin, borjú szérum albumin) oldatsorozattal felvett kalibráló görbe alapján végeztem el. 100 µg/ml BSA törzsoldatból 10, 20, 40, 60, 80, 100 µl mennyiségeket mértem Wassermann-csövekbe (a térfogatot 100 µl-re kiegészítettem ddH<sub>2</sub>O hozzáadásával), majd ehhez mértem hozzá az 5.0 ml Bradford reagenst. A mintákat alaposan összekevertem (vortex, BioVortex V1 BIOSAN), 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltam, és ezt követően 595 nm-en megmértem az elnyeléseiket<sup>[17]</sup>.

### 4.3.3. Enzimaktivitás meghatározása

#### 4.3.3.1. Trehaláz izoenzimek aktivitásának meghatározása

A trehaláz aktivitás meghatározása a kivonatokban jelen lévő izoformák által az inkubáció során elbontott trehalózból keletkezett glükóz mennyiségének spektrofotometriás detektálásán alapul. Az abszorbancia értékek és a minták glükózkoncentrációjának függését ismert glükóz-koncentrációsorozat mérésével határoztam meg (F4. ábra). Az enzimaktivitást nkat/g protein egységekben fejeztem ki, ahol 1 nkat (nanokatal) trehaláz aktivitás alatt azt az enzim mennyiséget értjük, amely 1 nmol trehalóz 1 másodperc alatt történő hidrolízisét katalizálja a beállított kísérleti körülmények között.

A trehaláz enzimpreparátumok összfehérje-tartalmának a 4.3.2. pontban leírt módon történő meghatározását követően kimértem mindkét izoforma enzimaktivitásának pH és hőmérsékleti optimumát minden kísérleti objektum esetén. 25–45°C hőmérsékleti és 3.50–8.00 pH tartományban teszteltem a nyers kivonatokat.

<sup>[17]</sup> Minden összfehérjetartalom méréshez szükséges a méréssel egyidejűleg új kalibráló görbét felvenni.



A reakcióelegy 20.0 µl enzimpreparátumot, 100.0 µl foszfát-citrát puffert (pH<sub>opt</sub> az adott méréshez beállítva) és 30.0 µl 250.0 mM-os trehalóz oldatot tartalmazott. A trehalózmentes kontroll összeállítás esetén a térfogatot foszfát-citrát pufferrel egészítettem ki. A mintákat az optimális hőmérsékleten 30 percig inkubáltam (BIOSAN TS-100 Thermo Shaker). Az enzimreakciót triklórecetsav (TCA) hozzáadásával állítottam le, a reakcióközegben a TCA 20% (v/v) koncentrációt ért el.

Az elegy 20.0 µl-ét 0.5 ml **A** és 0.5 ml **B** reagensoldatot tartalmazó edényekbe pipettáztam. Az **A** oldat összetétele: 4.0% (m/v) vízmentes Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.6% (m/v) glicin és 0.045% (m/v) CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (Reanal). A **B** oldat 0.12% (m/v) neocuproine-HCl (Fluka, Sigma-Aldrich, Suisse). A mintákat 5 perc 100°C-on történő inkubálást (BIOSAN TS-100 Thermo Shaker) követően jégben lehűtöttem.

Az inkubálást követően a minták 300 µl-éhez 1200 µl desztillált vizet adtam, és a glükóz koncentrációval arányos sárga színű termék abszorbanciáját 455 nm-en, szobahőmérsékleten mértem. A méréseket Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS spektrofotométeren végeztem.

#### **4.3.3.2. SOD és POD izoenzimek aktivitásának meghatározása**

A SOD és POD izoformákat tartalmazó kivonatok összfehérje-tartalmát Bradford módszerével meghatároztam (4.3.2. pont). Az izoformákat poliakrilamid gélelektroforézissel (PAGE) elválasztottam. A szeparálást követően aktivitási festést végeztem, így téve láthatóvá, és ez által kvantifikálhatóvá és összehasonlíthatóvá a minták enzimaktivitását.

A SOD izoformákat módosított SDS\* gradiens PAGE<sup>□18</sup>-sel választottam el, gúngális enzimkivonatok esetén 8-15 %, a növényi minták futtatásához 9-12 % akrilamid (Sigma-Aldrich, Suisse) gradienst alkalmaztam az eltérő izoformaösszetétel miatt (F4. táblázat; Veiga és mtsai 2000; Radko és mtsai 2002). A gélek a klasszikus denaturáló PAGE-nél (Laemmli 1970) használt lapoktól eltérően csupán minimális mennyiségű SDS-t tartalmaztak (0.75 g/l, Reanal), ez a detektálható SOD aktivitást nem befolyásolta, miközben az elválasztás hatékonysága jelentős mértékben fokozódott. A szuperoxid-dizmutáz enzimes család tagjai stabilak, főként a CuZn proszitetikus csoportot tartalmazó izoenzimek: viszonylag széles pH tartományban (5.8 – 9.0 pH) és egyes detergens kezelések (2% SDS vagy 8.0 M urea) mellett is megőrzik aktivitásukat (Wojtek 1996, Lin és mtsai 2001).

---

<sup>□18</sup> A törzsoldatok összetételét az F6. és F7. táblázatok tartalmazzák.

A MnSOD izoformák kevésbé toleránsak, aktivitásukat 30 perc 2% SDS mellett történő inkubálás már gátolja (Wojtek 1996).

A POD izoformákat 10%-os homogén natív PAGE<sup>EM18</sup>-sel választottam el (F5. táblázat).

A géskomponensek bemérési sorrendjüknek megfelelően az F4. és F5. táblázatokban szerepelnek. Az oldatokat összemérés után gázmentesítjük vízlégszivattyúval, így kiküszöbölhető az oxigén jelenléte által okozott polimerizáció gátlás, buborékképződés. A 6 gállapot BioRad<sup>TM</sup> kádban öntöttem meg, a koncentráció gélt egy éjszakán át szobahőmérsékleten hagytam polimerizálódni.

A elektroforézis során alkalmazott puffereket a szeparáló gélek trisz-glicin pufférének 4-szeres hígításával állítjuk elő. A SOD minták elválasztásakor a kádpuffer a gállapok által közrezárt térben (– elektródpuffer) 0.075% (m/v) SDS-t tartalmazott, a + elektródpuffer detergens mentes (a BioRad MINI PROTEAN II<sup>TM</sup> futtatókád külső tere). POD izoenzimek elválasztásakor mindkét puffer SDS mentes.

A gélelektroforetoqram kifejlesztése 8°C-on, állandó feszültségen történt: a gyűjtő gél határáig 80 V-on, a szeparáló gélbe lépést követően SOD izoenzimek esetén 120 V-on, POD izoenzimek elválasztásakor 100 V-on. Az elektroforézis iránya a – pólustól a + pólus felé. A minták elválasztása befejeződött, amikor a jelzőfesték (BRFK) a gélen végigfutott. Az enzimpreparátumok párhuzamos vizsgálatához a gállapokra a minták azonos fehérjekoncentrációban kerültek felvitelre.

#### **4.3.3.2.1. Aktivitási festés**

A futtatást követően a géleket megfestettem. Az aktív SOD izoformák negatív festést követően, a POD izoformák pozitív festéssel válnak láthatóvá.

Negatív festés során az aktív enzim izoformák a gélen homogén háttérben szintelen sávokként láthatóak. A SOD gélek aktivitási festése háromlépéses eljárás, mely a NBT (nitro-blue-tetrazolium, Fluka) riboflavin jelenlétében történő fotokémiai redukcióján és ennek gátlásán alapul (Beauchamp és Fridovich 1971, Dhindsa és mtsai 1981).

A három festőoldatban egymást követően inkubáljuk a gállapokat. Az **I.** festőoldat tartalmazza a NBT-t, a **II.** oldat a riboflavint és a TEMED-et, mely vegyületek bediffundálnak a gállapokba. Az inkubálási időket betartása fontos, hogy a fotoaktív molekulák megfelelő arányban maradjanak jelen, egyenletes és erős háttérszint érzünk el. A **III.** festőoldat és a megvilágítás a színreakció megindításához szükséges. Az intenzív fény szerepe közvetve a ROS generálásában van, melyek gyökképződési reakciókban

keletkeznek: a riboflavin az erős megvilágítás hatására leukoflavinná alakul át, és a TEMED gyökképződését indukálja. A NBT fotokémiai redukciója során formazán képződik, s ez kék színű háttérrel eredményez. Ahol a gélben aktív SOD izoformák találhatók, ott a szuperoxid anionok eliminálódnak, így nem következik be az elszíneződés. A megfestődött géllapokról előntjük a III. festőoldatot és Sørensen félé foszfát pufferben (pH=8.04) tároljuk a digitalizálásig (szkenelés). A festőoldatok összetételét és az inkubálás időtartamát az F8. táblázat tartalmazza.

Az elválasztott aktív POD izoenzimek pozitív festést követően jelennek meg a géllapokon. Pozitív aktivitási festésről akkor beszélünk, amikor az aktív izoformák szintelen háttérben színes sávokként rajzolódnak ki. A festődést követően a festőoldatot leöntjük, és ddH<sub>2</sub>O-be helyezük a géllel a denzitometriás adatfeldolgozás megkezdéséig. A festőoldat összetétele az F9. táblázatban szerepel.

#### 4.3.3.2.2. Gélek kiértékelése

A megfestett géleket nagyfelbontású szkenneléssel digitalizáltam (HP ScanJet<sup>®</sup> 7400C; Hewlett-Packard, Palo Alto, California, USA). A denzitometrást és a denzitogramok kiértékelését Phoretix<sup>™</sup> 1D programmal végeztem el (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, England).

#### 4.3.4. O<sub>2</sub><sup>•-</sup> és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tartalom meghatározása

Az intra- és extracelluláris H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és szuperoxid anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) mennyiségét fluoreszcens módszerrel határoztam meg. A hidrogénperoxidot 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetát, a O<sub>2</sub><sup>•-</sup> mennyiségét dihidroetidium hozzáadásával tettem mérhetővé (Belinky és mtsai 2003).

A fluoreszcens indikátorok oldataiból a friss 'natív' micélium-mintákhoz külön-külön hozzámértem annyit, hogy a tápoldatokban 30 µM koncentrációban legyenek jelen. A mintákat rázógépből (500 rpm) 37°C-on 30 percig inkubáltam (BIOSAN TS-100 Thermo Shaker). Az inkubációt követően a gombamintákat bidesztillált vízzel átmostam, 5% (v/v) TCA-val homogenizáltam, majd 20 percig jégben tartottam. A kivonatokat 20000 g-n, 4°C-on 15 percig centrifugáltam. A mintákhoz tartozó tápoldatokat mérést megelőzően 20 percig jégen inkubáltam.

Az extracelluláris közegben (inkubációs tápoldat) és a micélium kivonatokban képződő 2',7'-diklorofluoresceint és etidiumot FlouoroMax-2 fluoreszcens spektrofotométerrel mértem (FlouoroMax-2 Jobin Yvon-Spex ISA Inc.). A 2',7'-diklorofluorescein excitációs és

emissziós hullámhosszai 520 nm és 590 nm, az etidium esetén 501 nm és 521 nm. Az eredményeket  $\text{RU} \cdot \text{g}^{-1}$  protein egységben adtam meg (RU: relative unit, relatív egység).

A micélium eltérő  $\text{O}_2^{\cdot -}$  tartalmának összehasonlítására a fenti, a szuperoxid anion meghatározására nem specifikus módszert alkalmaztam, mely reakcióban első lépésben 2-OH-etidium, majd etidium képződik (melléktermék) – a két termék excitációs és emissziós spektruma hasonló (Zhao és mtsai 2003, Georgiou és mtsai 2005).

#### **4.3.5. A száraz súly meghatározása**

A száraz súly adatokat  $50^\circ\text{C}$ , a súlyállandóság eléréséig szárítószekrényben történő inkubálást követően regisztráltam. A növényi és gombaminták száraz súlyának meghatározásánál ugyanúgy jártam el.

#### **4.3.6. Malondialdehid tartalom meghatározása**

A növényi és gombaminták 0.10 grammját 500  $\mu\text{l}$  0.1 %-os triklórecetsav (TCA) és kvarchomok jelenlétében homogenizáltam. A mintákat a centrifugálásig (10000 g,  $4^\circ\text{C}$ , 10 perc) jégben tartottam.

A MDA a centrifugálás során a felülúszóba kerül, melyből 250  $\mu\text{l}$  mennyiséget adunk 1.0 ml MDA reagenshez. A reakcióelegyet  $100^\circ\text{C}$ -on 30 percig inkubáljuk, ezt követően az oldatokat lehűtjük, a mérést szobahőmérsékleten végezzük. Inkubáláshoz BIOSAN TS-100 Thermo Shaker-t használtam.

A reagens 0.5 % ( $\text{m}/\text{v}$ ) tiobarbitursavat (TBA) tartalmazó 20.0 %-os ( $\text{V}/\text{V}$ ) TCA oldat (a TBA maradéktalan feloldódásához az oldatot  $50^\circ\text{C}$ -on kevertetni kell 10-15 percig). A reagensben feleslegben lévő TBA savas közegben a kivonatokban jelenlévő MDA-del reagál, sárgás-vöröses kromogén képződik. A színes végtermék 532 nm-nél elnyelési maximummal rendelkezik (Placer és mtsai 1966).

A méréseket Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS spektrofotométeren (Perkin Elmer, Shelton, CT 06484 USA) végeztem. Az 532 nm-nél kapott abszorbanciaértékeket a 600 nm-en mért elnyeléssel és egy csak a kinyerőpuffert és reagenst tartalmazó „vak” mérési adataival korrigáltam. A 600 nm-en mért abszorbancia-korrekciónak azért szükséges, mert ezen a hullámhosszon van a fényszórást okozó lebegő szennyezések elnyelési maximuma (Heath és Packer 1968; Gossett és mtsai 1994; González és mtsai 1996). A kromogén moláris extinkciós koefficiense ( $\epsilon=156000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). A MDA tartalmat nmol/g friss illetve száraz súly egységekben adtam meg.

### 4.3.7. Klorofill tartalom meghatározása

A fotoszintetizáló növényi minták Chl tartalmát spektrofotometriás módszerrel határoztam meg (Porra és mtsai 1989, Porra 2002). A mintákat 100-szoros térfogat 80%-os acetonban homogenizáltam, 10000 g-vel, 4°C-on, 3 percig centrifugáltam (a mintákat a meghatározás folyamán végig sötétben tartjuk).

A felülúszó Chl tartalmának meghatározásához 646.6 nm és 663.6 nm-en, a fényszórásból eredő artefaktum kiküszöbölésére 730 nm és 800 nm-en megmértem az abszorbanciát, mely értékek alapján a mennyiségek az alábbi egyenletek segítségével számolhatóak:

$$\text{Chl}_a \text{ (}\mu\text{g/ml)} = 12.25 * A_{663.6} - 2.55 * A_{646.6}$$

$$\text{Chl}_b \text{ (}\mu\text{g/ml)} = 20.31 * A_{646.6} - 4.91 * A_{663.6}$$

$$\text{Chl}_a + \text{Chl}_b \text{ (}\mu\text{g/ml)} = 17.76 * A_{646.6} + 7.34 * A_{663.6}$$

A = abszorpció az indexben jelzett hullámhosszon mérve.

A méréseket Shimadzu UV-2101PC, Tokió, Japán és Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS spektrofotométereken végeztem. A Chl tartalmat  $\mu\text{g/g}$  protein egységben adtam meg.

### 4.3.8. Össz-karotinoid tartalom meghatározása

A Chl tartalom meghatározása mellett - a biotikus stressz hatásának vizsgálatában - a levelek össz-karotinoid tartalmát is meghatároztam spektrofotometriás módszerrel (Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS). A mintákat hideg 80%-os acetonban homogenizáltam (0.1 g szövet/5.0 ml 80%-os aceton), majd 8800 g-n, 4°C-on, 10 percig centrifugáltam. A felülúszók abszorbanciáját 663.6 nm, 646.6 nm és 470 nm hullámhosszokon mértem. Az össz-karotinoid tartalmat egységnyi fehérjemennyiségre vonatkoztattam ( $\mu\text{g/g}$  protein).

Az össz-karotinoid tartalmat Arnon (1949) szerint, Lichtenthaler és Wellburn (1983) módosítását figyelembe véve határoztam meg a következő összefüggés alkalmazásával:

$$\text{karotinoid tartalom (}\mu\text{g/ml)} = [1000 * A_{470} - (3.27 * \text{Chl}_a) - (104 * \text{Chl}_b)] / 227$$

A = abszorpció az indexben jelzett hullámhosszon mérve.

### 4.3.9. Antocián tartalom meghatározása

A *T. urticae* biotikus stresszor hatásainak vizsgálatában a fertőzés előrehaladtával a levelek antocián tartalma jelentős mértékben változott. Az antocián tartalmat Sims és Gamon (2002) szerint mértem. A levélminták 0.1 grammját 10-szeres térfogat 79:20:1 arányú metanol:ddH<sub>2</sub>O: HCl eleggyel homogenizáltam.

A centrifugálásig (10000 g, 4°C, 10 perc) az extraktumokat jégen és sötétben tartottam. Az antociánokat tartalmazó felülúszó abszorbanciáját Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS spektrofotométer segítségével detektáltam 529 nm és 650 nm hullámhosszokon. A mennyiségeket a következő egyenlőség szerint és a Lambert-Beer törvény alkalmazásával [ $A = \epsilon c l$ ,  $\epsilon = 30000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ] számolhatjuk:

$$\text{Antocián korrigált abszorbancia} = A_{529} - (0.228 \cdot A_{650})$$

A = abszorpció az indexben jelzett hullámhosszon mérve.

A levelek antocián tartalmát  $\mu\text{mol/g}$  protein egységekben adtam meg.

### 4.3.10. Glükóz és trehalóz tartalom meghatározása

#### 4.3.10.1. Minták előkészítése

A glükóz és trehalóz tartalom vizsgálatához a *Morchella steppicola* mintákat dörzsmoszárban kvarchomok jelenlétében háromszoros térfogat 80 %-os etanollal homogenizáltam, és Eppendorf edényekbe gyűjtöttem. A mintákat 10°C-on, 5000 g-n, 15 percig centrifugáltam. A felülúszó tartalmazza a mono- és diszacharidokat.

#### 4.3.10.2. Vékonyréteg kromatográfia

A szilárd állófázisú vékonyréteg kromatográfia (TLC/VRK) nagyteljesítményű változatát (HPTLC) használtam a minták szénhidrát tartalmának elválasztásához. A HPTLC technológiában speciális szorbenseket alkalmaznak (a HPLC fejlesztése során tökéletesített álló fázis), ezek eredményeképpen a rétegek felbontása, az elválasztás hatékonysága megnőtt, és a kifejlesztés ideje lecsökkent. Az elválasztás hatékonyságát tovább fokozza még a gyűjtő-zóna kifejlesztése és alkalmazása is.

A mono- és diszacharidok elválasztásában a szilikagél hordozó használata általánosan elterjedt. Amorf, nagy felületű anyag, előállítása vízüveg kolloid oldatból történik kicsapással. A szilikagél számos előnyös tulajdonsággal rendelkező szorbens: szemcsemérete könnyen és tág határok között változtatható, vegyi behatásokkal, és a magas hőmérséklettel szemben nagymértékben ellenálló. A kifejlesztett réteg előhívásakor nem lép kölcsönhatásba az általunk alkalmazott meglehetősen agresszív előhívó reagenssel (módosított Antron® reagnes).

A kromatogramok  $R_f$  értékei alapján – standard cukoroldatok együttes felvitelével – az egyes foltok azonosíthatóak, denzitometrált követően a komponensek mennyisége kellő pontossággal meghatározható.

$$R_f = \frac{\text{az adott komponens távolsága a starttól}}{\text{az eluens front távolsága a starttól}}$$

Az  $R_f$  dimenzió nélküli számérték.

A kromatogrammot normál légköri nyomáson és szobahőmérsékleten, eluensként n-propanol és víz 85:15 arányú elegyét alkalmazva fejlesztettem ki. A rétegek futtatókádba helyezését megelőzően a gázteret 10 percen át telítettem az eluens gőzeivel (minőségi elválasztás, reprodukálhatóság). 20.0 x 10.0 cm HPTLC (60 F<sub>254</sub>, MERCK, Whitehouse Station, New Jersey, USA) rétegeket használtam. A minták elválasztása során polaritásgradiens elúció zajlik, oldószerszintek alakulnak ki, az eluens polárosabb komponensei haladnak elől.

#### 4.3.10.3. A kifejlesztett kromatogram előhívása és kiértékelése

A futtatást követően a rétegeket elszívófülke alatt tartottam a teljesen légszáraz állapot eléréséig; homogén csontfehér szín jelzi. A kromatogramm előhívásához saját módosítású Antron<sup>®</sup> reagenst használtam. A reagens törzsoldata 10.00 ml cc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-ban oldott 20.0 mg Antron<sup>®</sup> (Reanal), melyből 8-szoros hígítást (ddH<sub>2</sub>O) követően 10.00 ml mennyiséget egyenletesen porlasztottam a réteg felszínére, majd 90°C-on, 20 percig szárítószekrényben tartottam.

A kifejlesztett és előhívott kromatogramokat digitalizáltam (HP ScanJet<sup>®</sup> 7400C; Hewlett-Packard, Palo Alto, California, USA). A kvalitatív és kvantitatív analízishez (denzitogrammok kiértékelése) Phoretix<sup>™</sup> 1D programot alkalmaztam (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, England). A mennyiségi meghatározáshoz ismert koncentrációjú standard mintákból 2.0-2.0 µl-t vittem fel a réteglapokra (standard törzsoldatok: 5.0 mM, 10.0 mM és 15.0 mM). A minták felvitele 0.5 µl-es térfogat-egységenként történt.

#### 4.3.11. Genomi DNS kivonása

A teljes genomi DNS kivonását Gawel és Jarret (1991) módszere alapján végeztem el. Az extrakcióhoz fiatal, egészséges növényi és gomba anyagokat használtam fel.

100 mg mintát 300 µl 65°C-ra felmelegített CTAB lízis pufferrel (100 mM Tris-HCl [pH 8.00], 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA [pH 8.00], 2.0 % (<sup>m</sup>/v) CTAB és 0.2% (<sup>v</sup>/v) merkaptó-etanol) kvarchomok jelenlétében homogenizáltam. A merkaptó-etanolt közvetlenül a felhasználást megelőzően adjuk a DNS kinyerő pufferhez.

A minták feltártása során 2 óra 65°C-os inkubálást alkalmaztam (BIOSAN TS-100 Thermo Shaker), közben 15 percenként az extraktumokat vortex-el átkevertem (BIOSAN BioVortex V1). Ezt követően az RNS szennyeződést 1.0 µl 10 µg/ml RNáz hozzáadásával, 37°C-on 30 perc inkubálással csökkentettem le. A homogenátumokat szobahőmérsékleten centrifugáltam (1500 rpm, 1 perc; SIGMA 1-15), a felülúszót új Eppendorf edényekbe öntöttem át. A mintákhoz 300 µl kloroform : izoamil-alkohol (24:1) elegyet adtam, a mintákat erőteljesen összekevertem vortex-el és 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltam. A mintákat szobahőmérsékleten centrifugáltam (6500 g, 10 perc), majd a DNS-t tartalmazó felső vizes fázisból ~200 µl-t átpipettáztam új Eppendorf edényekbe, vigyázva, hogy az interfészből ne kerüljön bele szennyeződés. A DNS kicsapásához 200 µl jéghideg (-20°C) izopropanolt adtam a mintákhoz, mindet kézzel alaposan és egyben óvatosan átkevertem, majd ezt egy éjszakán át tartó -20°C-os inkubálás követte. A kicsapódott genomi DNS-t centrifugálással (10000 g, 10 perc) összegyűjtöttem, a felülúszót előntöttem. A csapadékot három ízben mostam 500 µl 70%-os etanol hozzáadásával és a pellet óvatos felkeverésével. Minden tisztítási lépést követően 6500 g-n 5 percig szobahőmérsékleten centrifugáltam a mintákat. A harmadik mosási lépés után az etanol előntését követően az Eppendorfokat szájjukkal lefelé fordítva papírvattára helyeztem, a megtisztított DNS pelletet levegőn szárítottam (cca. 20 perc). A DNS csapadékot 100 µl steril nukleáz-mentes desztillált vízzel szuszpendáltam, a folyamatot elősegítettem néhány perc 50°C-os inkubálással.

A minták össz-DNS mennyiségét spektrofotometriai módszerrel határoztam meg, 260 és 280 nm hullámhosszokon mérve az elnyelésüket. A kinyert DNS mennyiségéről az  $A_{260}$  értéke, tisztaságáról az  $A_{260}/A_{280}$  arány alapján kapunk információt. Az  $A_{260}/A_{280}$  arány a DNS tisztaságával arányos dimenzió nélküli szám. A polimeráz láncreakcióhoz (polymerase chain reaction, PCR) 1.8-2.0 arány jelent megfelelő tisztaságú DNS preparátumot.

*A = abszorpció az indexben jelzett hullámhosszon mérve.*

A minták DNS koncentrációját meghatároztam és ennek ismeretében a PCR reakcióhoz szükséges adagokban -20°C-on tároltam.

#### **4.3.12. Primer tervezés**

A vizsgált gomba és növényfajok trehalóz-6-foszfát szintáz és trehaláz génjeinek azonosításához saját primerek tervezése szükséges. A trehaláz anyagcsere kulcsenzimeinek adatbázisokban (NCBI, EMBL-EBI) tárolt DNS és fehérje szekvenciáit elemeztem, különös tekintettel a mintákkal közelebbi rokonsági körbe tartozó fajok ismert szekvenciáit.



Az elemzések alapján a fehérje és DNS szekvenciák illesztése a primer tervezéshez megfelelő eredményt adott: az ismeretlen gének kereséséhez a szekvenciákban azonosított konzervatív motívumok alapján lehetséges degenerált oligonukleotidok tervezése.

A degenerált primerek megalkotásában egyrészt a CODEHOP (consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers) programot alkalmaztam, mely segítségével a célunknak megfelelő lehetséges hibrid degenerált oligonukleotidokhoz jutunk. Az online alkalmazás alapbeállításainak nagy részét megtartottam, a kodon használati táblázatból az aktuális tervezésnek megfelelőt választottam.

A CODEHOP programmal tervezett degenerált primerek csak a növényi minták esetében működtek hatékonyan, ezért a vizsgált gomba mintákhoz taxonómiaileg közelálló fajokból leírt trehalóz-6-foszfát szintáz és trehaláz fehérje és DNS szekvenciákat ClustalW2 (EMBL-EBI) szekvenciaillesztő programmal illesztettem, aminek eredményeképpen több nagymértékben konzervatív motívumot azonosítottam, ezeket használtam fel degenerált oligonukleotid tervezéshez (Larkin és mtsai 2007).

A tervezett és eredményesen működő primerek a 9. táblázatban szerepelnek.

Primer megnevezése	Primer szekvenciája 5' → 3' irányban
PeTSF <sub>01</sub>	TGGTWWYGGHTGGCC
PeTSRe <sub>2</sub>	AGVACNAYYTTGCC
PeNTF <sub>01</sub>	TDTAYGGVTGGG
PeNTRe <sub>2</sub>	TGCTGHGGHGCCC
PTScFo <sub>3</sub> *	TGGCTAGCGGCCGAAMAYGGNATGTT
PTScRe <sub>1</sub> *	CCCAGGAAGTGACCAATACAGARNACRWARTC

**9. táblázat** CODEHOP programmal\* és kézzel tervezett oligonukleotidok trehalóz-6-foszfát szintáz (TS) és neutrális trehaláz (NT) gének kereséséhez.

### 4.3.13. PCR

A DNS preparátumok koncentrációját meghatároztam és a polimeráz láncreakciónak megfelelő optimális mennyiségekben a felhasználásig eltároltam (4.3.11. alfejezet).

BioCycler TC-S (BIOSAN) készüléket használtam az amplifikációhoz, amely 25 db (0.2 ml-es cső) illetve 16 db (0.5 ml-es cső) minta férőhellyel rendelkezik.

A PCR reakcióelegyek térfogatát a teszt-fázisban 25 µl-, az eredményes amplifikációt követően 50 µl-nek választottam.

A nagyobb mennyiségben jelenlévő termék megkönnyíti a fragmentek visszaizolálását. A reakcióelegyek összetételét a 10. táblázat tartalmazza.

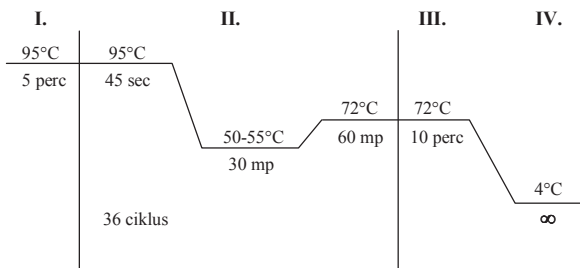
		Reakcióelegy összetétele (µl)	Master mix* összetétele (µl)
<b>Puffer</b>	10x	5.00	50.0
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25.0 mM	5.00	50.0
<b>dNTP mix</b>	2.0 mM**	5.00	50.0
<b>Primer<sub>1</sub></b>	10.0 µM	1.00	10.0
<b>Primer<sub>2</sub></b>	10.0 µM	1.00	10.0
<b>Steril ultratiszta víz</b>		7.75	77.5
<b>DNS templát oldat***</b>		25.00	--
<b>Taq polimeráz****</b>	5 U/ µl	0.25	2.5

**10. táblázat** PCR reakcióelegyek összetétele 50 µl végtérfogatban és a master mix.

A komponensek megnevezése mellett szerepel a törzsoldataik koncentrációja.

\*A master mix összeállítását 10 mintára vonatkozóan adtam meg. \*\*A dNTP mix 2.0 mM mind a 4 komponensre nézve. \*\*\*A DNS templát mennyisége a kiindulási koncentráció függvénye. A térfogatot steril ultratiszta vízzel egészítjük ki 25 µl-re. \*\*\*\*GoTaq<sup>®</sup> polimeráz (Promega Corporation, Madison, WI USA).

A reakcióelegy összemérések a PCR csövekbe a DNS templátot mértem be elsőnek – a térfogatot 25 µl-re kiegészítettem steril ultratiszta vízzel (Milli-Q), majd a master mixet (az aktuális mintaszámnak megfelelően) készítettem el, a Taq polimeráz enzim nélkül. A master mix az amplifikációhoz biztosítja a megfelelő reakció-körülményeket, amely paraméterek közül az egyik legfontosabb a Mg<sup>2+</sup> koncentrációja – ami jelen esetben 2.5 mM végső koncentrációban megfelelőnek bizonyult. A polimeráz enzimet közvetlenül a minták PCR készülékbe helyezését megelőzően mértem a master mixhez, alaposan elkevertem (vortex) és 25-25 µl mennyiségeket pipettáztam az egyes PCR csövekbe.



**20. ábra** A polimeráz láncreakcióban alkalmazott beállítások (hőmérséklet, időtartam). Az I.-IV. római számok az amplifikáció egyes szakaszait jelölik. Az I. az előzetes denaturáció, a II. az ismétlődő lépéseket jelöli, melyek a denaturáció (95°C), primerek kötődése (50-55°C) és a szintézis (72°C). A III. a lánchosszabbítás szakasza. A IV. a kész minták eltartása 4°C-on.

A PCR reakció négy szakaszból tevődik össze (20. ábra). Az I. szakaszban a GoTaq polimeráz enzim aktiválása és a genomi DNS nagyfokú denaturációja zajlik 95°C-on 5 percig. A II. szakaszban történik az amplifikáció, eredményes esetben a GOI (gene of interest, keresett gén) felszaporítása. A primerek olvadási hőmérsékletétől és a PCR optimalizálás eredményétől függően az oligonukleotidok kötődési hőmérséklete változó (50-55°C). A lánchosszabbítás időtartamát a várt termék mérete határozza meg az 1 kb/1 perc (kb= 1000 bp) tapasztalati összefüggés alapján. A III. szakasz a reakcióelegyben jelen lévő ampikonok szálszintézisének befejezését szolgálja.

A befejeződött PCR-t követően a mintákat rövid ideig 4°C-on, hosszabb távon -20°C-on tároltam. Az amplifikáció eredményességét 1.0 %-os (<sup>m</sup>/v) agaróz gélen teszteltem (100 V, 20 perc). A minták 5 µl mennyiségéhez 1 µl jelzőfestéket adtam (6xLoading Dye Solution, Fermentas Canada Inc., 830 Harrington Court, Burlington Ontario), pipettával átkevertem és az agaróz gél mintafelviteli zsebeibe juttattam.

A fragmentek izolálásakor is 1.0%-os agaróz gélben futtattam a PCR termékeket, ám ekkor a teljes mintamennyiséget géltre vittem. A DNS fragmentek 100 V feszültségen 20 percig vándoroltak a gélben.

Az agaróz gélelektroforézist Embi Tec RunOne™ típusú futtató rendszerben végeztem (EmbiTec RunOne™ Electrophoresis System, EmbiTec San Diego, CA USA). Az 1xTAE<sup>□19</sup> az elektroforézis puffere, futtató puffer és az agaróz gél komponense egyaránt. A TAE (tris-acetát-EDTA) általánosan használt puffer a nukleinsavak agaróz gélelektroforézisében (Ogden és Adams 1987, Sambrook és mtsai 1989). Az 50xTAE törzsolat<sup>□19</sup> 242.0 g trisz bázist, 57.10 ml jégecetet és 18.60 g EDTA-t tartalmaz 1.0 liter végtérfogatban.

A kifejlesztett elektroforetogramok kiértékeléséhez az agaróz géleket a DNS kimutatására használt etídium-bromid tartalmú festőoldatba<sup>□20</sup>helyeztem (100 ml festőoldathoz 12.0 µl 0.5 mg/ml törzsolat), melynek hatására a DNS fragmentek UV fényben láthatóvá válnak. Az ampikonok méretét és mennyiségét #SM0333 DNS létra (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas Canada Inc., Burlington Ontario, Canada) együttes futtatásával UV-asztalon ellenőriztem (TFP-M/WL, Vilber Lourmat Deutschland GmbH, D-88436 Eberhardzell, Germany) illetve UV-kabinban (Multi Image Light Cabinet, Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA USA) készített fotók alapján határoztam meg. Az UV-kabinban CCD-kamerával (RTE/CCD-1300-Y/HS Microscop,

<sup>□19</sup> 50xTAE – 50-szer tömény törzsolat; 1xTAE – az agaróz gélelektroforézishez alkalmazott hígított puffer.

<sup>□20</sup> Az etídium-bromid és az UV egészségre káros tulajdonságai miatt védőfelszerelés használata szükséges.

Princeton Instruments), 595 ± 50 nm-en áteresztő interferenciaszűrőt alkalmazva, WinView/32 kameravezérlő program (Princeton Instruments, Trenton, NJ USA) segítségével készítettem fotókat. A kvalitatív és kvantitatív analízishez a Phoretix™ 1D programot használtam (Nonlinear Dynamics).

#### 4.3.14. Fragment izolálás, szekvenálás

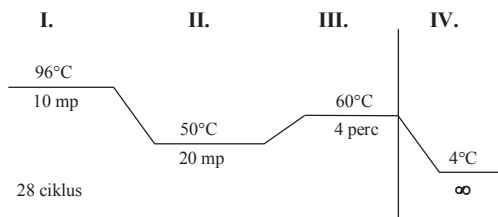
Az agaróz gélben látható fragmentek közül a várt mérettartományba tartozókat a gélből visszaizoláltam Promega Wizard® kit segítségével (SV Gel and PCR clean-up system, Promega Corporation, Madison, WI USA), a használati útmutatóban szereplő utasítások szerint. Az izolált fragmenteket steril, nukleáz-mentes ultratiszta vízben vettem fel.

A fragmentek szekvenciáját két főle módon határoztam meg. Kezdetben a megfelelő tisztaságú és koncentrációjú fragmenteket elküldtem az SZBK munkatársainak (MTA Szegedi Biológiai Központ, DNS Szekvenáló Laboratórium), akik elvégezték a közvetlen szekvenálást és az eredményt elektronikusan küldték vissza Chromas programmal (Chromas Lite 2.01, Technelysium Pty Ltd, Tewantin QLD 4565) olvasható kromatogram formájában. A későbbiekben saját magam végeztem a direkt szekvenálást BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit alkalmazásával (Applied Biosystems, Foster City, CA USA). A szekvenáló reakcióelegy összetételét a 11. táblázat tartalmazza.

	Bemérési mennyiségek
BigDye®	2.0 µl
Hígító puffer 5x	4.0 µl
Primer 1.0 µM	3.2 µl
DNS fragment	x µl
Milli-Q (steril)	[20-(9.2+x)]*

**11. táblázat** A direkt szekvenáláshoz használt reakcióelegy összetétele. \*A reakcióelegy végtérfogata 20.0 µl. A steril Milli-Q bemérési mennyisége a DNS fragment koncentrációjától és így bemérési térfogatától függően alakul.

A szekvenáló reakciót az Applied Biosystems 3.1 verzióhoz mellékelt protokoll alapján végeztem el. A szekvenáló csomag az összes szükséges komponenst tartalmazza: módosított Taq DNS-polimeráz enzimet, dNTP és fluoreszcensen jelölt ddNTP nukleotidok keverékét, és a hígító puffert. A szekvenáló reakció folyamatát a 21. ábra szemlélteti.



**21. ábra** A szekvenáló reakció folyamata a beállított körülményekkel (hőmérséklet, időtartam). Az **I.-IV.** római számok az egyes szakaszokat jelölik. Az **I.** a denaturáció, a **II.** a primerkötés (50°C) a **III.** a szintézis szakasza. A 28 ciklus kezdetét megelőzően volt egy 1 perces denaturáció 96°C-on. A **IV.** a reakcióelegy eltartása 4°C-on.

A szekvenáló reakcióban szintetizálódott fluoreszcensen jelölt DNS-t a leolvasást megelőzően tisztítottam. Első lépésben 55 µl 96%-os etanollal 1.5 ml-es Eppendorf edénybe átmostam a PCR cső tartalmát, hozzáadtam 2.0 µl 2.0 M nátrium-acetátot (pH 4.6-5.6) és 0.5 µl 0.5 M EDTA oldatot (pH 8.0), majd szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltam. A kicsapódott DNS-t centrifugáltam (20000 g, 4°C, 30 perc). A felülúszót elöntöttem, a csapadékot kétszer mostam 500-500 µl 70%-os etanollal. Az alkohol hozzáadása után a mintákat átkevertem (vortex). A tisztítási lépések között 15 percig 20000 g-n centrifugáltam. A második mosást követő centrifugálás után az alkohol elöntését követően az Eppendorf csöveket állítva szárítószekrényben 37°C hőmérsékletre helyeztem, a csapadékot ~20 perc alatt kiszáritottam. A mintákat ebben az állapotban küldtem el az SZBK DNS szekvenáló laboratóriumába, ahol a kapilláris gélelektroforézist ABI Prism 3100 Genetic Analyser készülékben (Applied Biosystems) végezték el. A leolvasott szekvenciákat (kromatogramok) elektronikusan, a fentebb leírt formában kaptam meg.

#### 4.3.15. Szekvenciák ellenőrzése, analízise

A kapilláris gélelektroforézis eredményeképpen kapott kromatogramokat a Chromas programmal (Chromas Lite 2.01, Technelysium Pty Ltd) megjelenítettem, a beolvasott szekvenciákat ellenőriztem. Kedvező esetben az adott szekvenáció 5' és 3' irányból is rendelkezésemre állt, ekkor a paralell eredményeket összevettem, ezzel elősegítve a nagyobb pontosságot.

A szekvenciák analízise során a nemzetközi adatbázisokban (GenBank [NCBI], EMBL) leköszölt, ismert trehalóz anyagcsere-gének és az ellenőrzött szekvenciák közötti hasonlóságot a BlastN 2.2.25 programmal kerestem (Altschul és mtsai 1990, Zhang és mtsai

2000). A DNS-szekvenciák közötti egyezőség meghatározásához ClustalW2 programmal végeztem pontos illesztéseket (Thompson és mtsai 1994, Lopez és Lloyd 1997, Larkin és mtsai 2007).

A doktori munkám során számos online adatbázist és alkalmazást használtam fel, melyek közül a jelentősebbeket a Függelék F10. táblázatában foglaltam össze.

#### **4.3.16. Statisztika és grafikus ábrázolás**

A kísérleteket 3 egymástól független alkalommal végeztem el. Minden kísérleti összeállításban 3 illetve 5 párhuzamos mintát dolgoztam fel méréstípusonként. A párhuzamos mérések valamint a három független kísérlet során nyert adatokat statisztikailag elemeztem (ANOVA), az eredményeket átlagoltam, az adathalmaz szórását feltüntettem (SD). Az egyes mintatípusok egymástól való szignifikáns eltérését Student t-próbával határoztam meg,  $p < 0.05$  statisztikai szignifikanciaszint figyelembevételével. A statisztikai adatelemzést és a grafikus megjelenítést Microsoft Office Excel™ 2007 (Microsoft, USA) és Origin™ 5.0 szoftver használatával végeztem el (Microcal Software Incorporated, Northampton, USA).

#### **4.3.17. Digitális képfeldolgozás**

A géleket nagyfelbontású szkennelrel digitalizáltam (HP ScanJet® 7400C; Hewlett-Packard, Palo Alto, California, USA). A digitális fotókat Lumix™ DMC-LZ5 (Panasonic, Tokyo, Japan) és Sony DSC-H10 (Sony Corporation, 1-7-1 Konan, Minato-ku, Tokyo 108-0075, Japan) digitális kamerákkal készítettem.

A képfeldolgozás során Adobe Photoshop® 8.0 (Adobe, San Jose, California, USA) programot alkalmaztam.

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

### I. *Morchella* fajok vizsgálata

#### 5.1. Trehalóz anyagcsere vizsgálatok *Morchella steppicola* vegetatív életciklusában

##### 5.1.1. Oxidatív stressz kitartóképlet indukáló hatásának vizsgálata

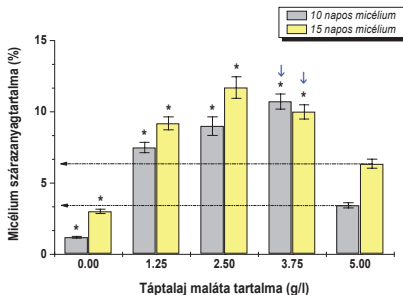
A *Morchella steppicola* alkalmazkodása a szárazabb élőhelyekhez a többi kucsmagomba fajjal összehasonlítva figyelemreméltó, e kivételes sajátosságának és a Kárpát medencére kiterjedő endemizmusának köszönhetően esett a választásom erre a fajra, így lett objektuma a *Morchella* fajok életciklusának részletesebb megismerését célzó kísérletsorozatnak. Vizsgálataim fókuszába az életciklus vegetatív micéliális- és PS képzés szakasza került, az élettani paraméterek változásainak követésével a kitartóképletek megjelenésének körülményeit derítettem fel.

Volk és munkatársa egy kucsmagomba faj, a *Morchella crassipes* (Vent.)Pers. esetében a tápanyaghiányt és a mechanikai gátlást említi, mint fő indukációs tényezőket (Volk és Leonard 1989b). Ennek ismeretében terveztem kísérletet *M. steppicola* PS képzés indukációjának vizsgálatára, stresszhelyzetet tápanyagmegvonással (tápközeg maláta-tartalmának változtatásával) idéztem elő.

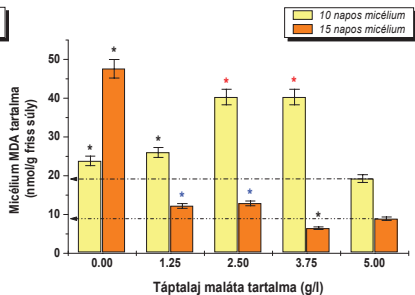
A maláta tartalmukban eltérő táptalajokon nőtt micélium szárazanyagtartalma optimum görbe szerint alakult, maximum értékek a 10 napos tenyészetekben 3.75 g/l, 15 nap nevelést követően 2.50 g/l maláta tartalom mellett mutatkoztak (22. ábra). A 15 napos micéliumban mért maximum egyben az összes mintatípus szárazanyagtartalmát tekintve is a legmagasabb érték (22. ábra).

A 10. és 15. napon a 3.75 g/l maláta tartalmú táptalajokon nevelkedett micélium szárazanyagtartalma nem tért el szignifikánsan egymástól, ez a táptalajösszetétel az első 10 napban fokozottabb szervesanyag termelést biztosított, mint a 2.50 g/l maláta koncentráció (22. ábra).

A 10 napos tenyészetekben az 1.25 – 5.00 g/l maláta tartalmú táptalajokon nőtt micélium MDA tartalma jelentős mértékben meghaladta a 15 napos mintákban meghatározott értékeket (23. ábra). A 10. napon 2.50 és 3.75 g/l maláta tartalom mellett, míg a 15 napos tenyészetekben a 0.00 g/l koncentrációnál maximális a MDA tartalom (23. ábra).



**22. ábra** *M. steppicola* vegetatív micélium szárazanyagtartalmának alakulása a táptalaj maláta tartalmának függvényében. A szaggatott vonalak a kontroll tenyészetekre (5.00 g/l maláta tartalom) jellemző átlagértékeket jelölik. A t-próba alapján a kontroll értékekhez viszonyított szignifikáns különbségeket ( $t_{0.05}$ )\*-gal jelöltem. Kék nyilak jelölik a két adatsor azon adatait, melyek között nincs szignifikáns különbség.



**23. ábra** *M. steppicola* vegetatív micélium MDA tartalmának változása a táptalaj maláta tartalmának függvényében. A szaggatott vonalak az 5.00 g/l maláta tartalom mellett nevelkedett (kontroll) tenyészetekben mért értékeket jelölik. A t-próba alapján a kontroll értékekhez viszonyított szignifikáns különbségeket ( $t_{0.05}$ )\*-gal jelöltem. Kék és piros csillagokkal jelöltem azokat az egy adatsorhoz tartozó pontokat, melyek között nincs szignifikáns különbség.

Az 1.25 és 0.00 g/l maláta tartalom mellett a micéliumot vékonyabb falú hifák alkotják, kevesebb elágazással, mint a tápanyagellátottság szempontjából dúsabb táptalajokon (2.50 – 5.00 g/l) látható sűrű elágazódási mintázat. Az elágazások száma a hifák tápanyagellátottságával pozitív korrelációban van, hasznosítható forrásokban bővelkedő környezetben a micélium így képes a lehető legnagyobb mértékben kihasználni növekedési lehetőségeit<sup>[21]</sup>.

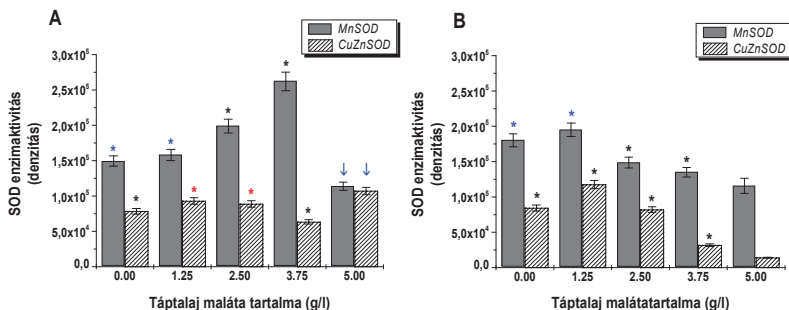
A szárazanyagtartalom és a MDA tartalom alakulása egyaránt jellemzi a micélium élettani folyamatait. A tenyészetek korával és a PS képzés során a nedvességtartalom csökken, a trofikus növekedés leállítását követően a hifák az idiofázisba lépnek, ekkor strukturális és fiziológiás változásokon mennek keresztül: faluk megvastagszik, pigmentáltságuk fokozódik, a tápanyagok raktározása és a PS képzés kerül előtérbe. A PS képzés során a tenyészetekben ROS akkumulációja figyelhető meg a mitokondriális elektrontranszport lánc intenzív működésének melléktermékeként, melyek eliminálása

<sup>[21]</sup> A felvett ionok és a glükóz megnövelik a citoplazma ozmotikus potenciálját, ennek következtében fokozódik a turgornyomás, mely fontos szerepet tölt be a hifa vízfelvételében, szállítási- és növekedési folyamataiban. Amikor a sejtfalanyagokat szállító Golgi-vezikulumok mennyisége kritikus értéket ér el, az apikális rész felé haladva feltorlódnak, ezeken a helyeken a hifa falán keresztül H<sup>+</sup> beáramlás indul meg, kijelölve az új hifacsúcs helyét, és elágazás jön létre.



esszenciális az élő organizmus számára, mivel a sejtekben különböző mértékű károsodásokat, a membránstruktúrák degradációját, kromoszóma aberrációt, súlyosabb esetben sejthalált idéznek elő (Wang és mtsai 2001). Az akumulálódott ROS jelentős mértékű lipidperoxidációt okoznak: a folyamat indikátormolekulája a MDA.

A 10 napos tenyészetekben szignifikáns eltérés figyelhető meg a mitokondriális lokalizációjú MnSOD izoformák aktivitásában, 3.75 g/l maláta tartalom melletti maximummal (24.A. ábra). A 3.75 és 2.50 g/l maláta tartalom érettebb és PS képzés kezdetén lévő micéliumot eredményezett a 10. napra, ezzel párhuzamosan a MnSOD izoformák aktivitása fokozódott (24.A. ábra). A döntően citoplazmatikus CuZnSOD izoformák aktivitása kiegyenlített, a tápanyagban szegényebb táptalajokon nevelkedett micéliumban mindenhol a kontroll értéknél alacsonyabb aktivitás tapasztalható (24.A. ábra).



**24. ábra** *M. steppicola* vegetatív micélium SOD izoenzim aktivitásának alakulása 10 nap (A) és 15 nap (B) nevelést követően a táptalaj maláta tartalmának függvényében. A *t*-próba alapján a kontroll értékekhez (5.00 g/l maláta tartalom) viszonyított szignifikáns különbségeket ( $t_{0,05}$ )\*-gal jelöltem. Színes (kék és piros) csillagokkal jelöltem azokat a egy adatsorhoz tartozó pontokat, kék nyilakkal a két adatsor azon pontjait, melyek között nincs szignifikáns különbség.

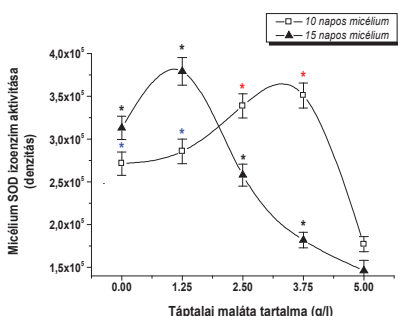
A 15. napon a 2.50 – 5.00 g/l maláta tartalmú agarlemezekeken nőtt tenyészetekben csökkenő SOD enzimaktivitás figyelhető meg (24.B. ábra). A micélium a nyugalmi állapot felé tart: a PS képletek érése dominál, egyre nő a PSM aránya. Az 1.25 g/l maláta tartalom mellett megfigyelhető CuZnSOD aktivitási maximum jelzi a stressz hatásának átterjedését a citoplazmára (24.B. ábra).

A SOD izoformák aktivitásváltozásának eredményei összhangban állnak azzal, hogy a ROS döntően a mitokondriumokban képződnek az energiaigényes folyamatok, úgymint például a PS képzés során.

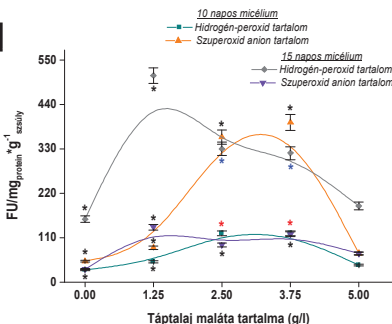
Az összesített SOD aktivitás grafikonján jól látható, hogy a 15. napon a maximum a 10 napos értékekhez képest (3.75 – 2.50 g/l) eltolódott a PS képzés során bekövetkező fiziológiás változások következtében: 1.25 g/l maláta tartalom mellett figyelhető meg (25. ábra).

10 nap nevelést követően a micélium  $O_2^{\cdot-}$  és  $H_2O_2$  tartalma hasonló tendenciát mutat 3.75 – 2.50 g/l maláta tartalom melletti maximum értékekkel, a szuperoxid anion tartalom pedig jelentős mértékben meghaladja a hidrogénperoxid mennyiségét (26. ábra).

A 15 napos tenyészetekben mért intramicéliális  $O_2^{\cdot-}$  és  $H_2O_2$  tartalomra jellemző az utóbbi jelentős mértékű megemelkedése – 1.25 g/l maláta tartalom melletti maximummal, míg a szuperoxid anion tartalom a 10 napos értékekhez képest jelentős mértékű visszaesést mutat (26. ábra).



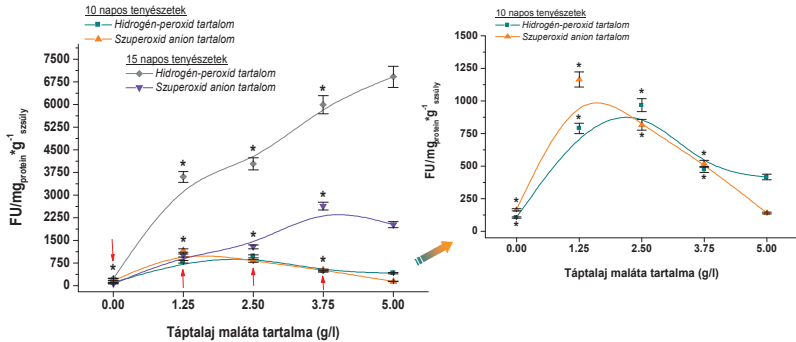
**25. ábra** *M. steppicola* vegetatív micélium SOD enzimaktivitásának alakulása a táptalaj maláta tartalmának függvényében. Az adatpontokra B-Spline görbét illesztettem (Origin™ 5.0). A t-próba alapján a kontroll értékekhez (5.00 g/l maláta tartalom) viszonyított szignifikáns különbségeket ( $t_{0.05}$ ) \*-gal jelöltem. Színes (kék és piros) csillagokkal jelöltem azokat az egy adatsorhoz tartozó pontokat, melyek között nincs szignifikáns különbség.



**26. ábra** *M. steppicola* intramicéliális hidrogénperoxid és szuperoxid anion tartalmának változása a táptalaj maláta tartalmának és a tenyésztési idő függvényében. Az adatpontokra B-Spline görbét illesztettem (Origin™ 5.0). A t-próba alapján a kontroll értékekhez (5.00 g/l maláta tartalom) viszonyított szignifikáns különbségeket ( $t_{0.05}$ ) \*-gal jelöltem. Kék illetve piros csillagokkal jelöltem azokat az egy adatsorba tartozó pontokat, melyek között nincs szignifikáns különbség.

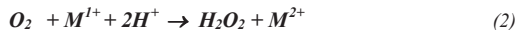
Az extramicéliális szuperoxid anion és hidrogénperoxid tartalom értékei a 10. napon igen hasonlóak, 1.25 g/l maláta tartalom melletti  $O_2^{\cdot-}$ -, 2.50 g/l maláta mennyiségénél  $H_2O_2$  maximummal (27. ábra). Az extramicéliális  $H_2O_2$  tartalom 15 nap nevelést követően

jelentősen meghaladja a 10. napon mért értékeket, maximális mennyisége a kontroll tenyészetekben mérhető (27. ábra). A 15 napos tenyészetekben intra- és extracellulárisan a  $H_2O_2$  tartalom egyaránt meghaladja a  $O_2^{\cdot-}$  mennyiségeket (26. és 27. ábrák).



**27. ábra** *M. steppicola* extracelluláris hidrogénperoxid és szuperoxid anion tartalmának változása a táptalaj malátá tartalmának és a tenyésztési idő függvényében. A kisméretű grafikonon a 10 napos tenyészetek extracelluláris hidrogén-peroxid és szuperoxid anion tartalmának változását külön is ábrázoltam a tendenciák jobb láthatósága végett. Az adatpontokra B-Spline görbét illesztettem (Origin™ 5.0). A *t*-próba alapján a kontroll értékekhez (5.00 g/l malátá tartalom) viszonyított szignifikáns különbségeket ( $t_{0,05}$ ) \* -gal jelöltem. A piros nyilak jelölik az adatok és a kontroll értékek közötti szignifikáns eltérés meglétét minden adatsorozatban.

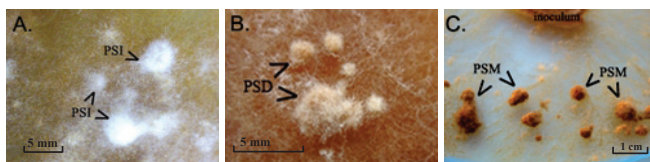
Normál körülmények között, kedvező anyagcsere-viszonyok mellett is jelen van mindkét ágens. A  $O_2^{\cdot-}$  és  $H_2O_2$  tartalom alakulása a SOD izoenzimek aktivitásváltozásával természetesen átfed, hiszen a SOD enzimes család a működésbe lépő, ROS eliminálását célzó antioxidáns védelmi rendszer kulcsfontosságú tagja. A ROS elleni védekezés összes enzime közül csak a SOD izoenzimek képesek károsodás nélkül közvetlenül reagálni a szuperoxid anionokkal, az alábbi két lépésben:



$M^{2+}$  az enzim katalitikus centrumában lokalizált prosztetik csoport (Cu, Zn, Mn, Fe). Izoformák lokalizációja: CuZnSOD - citoplazma, kloroplasztisz, sejtmag, lizozómák, MnSOD - mitokondrium, FeSOD - kloroplasztisz.

A SOD izoenzimiek által, a szuperoxid anionok dizmutációja során keletkező  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>[22]</sup> mennyisége jól jellemzi a stressz fokozódását és a védelmi rendszer aktivitását. A 10 napos micéliumban a kialakuló és erősödő oxidatív stressz a  $\text{O}_2^{\cdot-}$  mennyiségének emelkedését vonja maga után, mely eliminálása eredményesen valósul meg, így a 15. napon a szuperoxid anion tartalom jelentős mértékben visszaesett (26. ábra).

Az eddigiekben áttekintett paraméterek jól jellemzik a tápanyagmegvonás hatására a tenyészetek PS képzésben részt vevő zónáinak fiziológiás állapotában bekövetkező változásokat. A maláta megvonása 'fiatalító hatású': a *M. steppicola* micélium szárazanyag- és pigment (melanin) tartalma alacsonyabb, mint a malátát magasabb koncentrációban (2.50–3.75 g/l) tartalmazó táptalajokon nőtt telepeken. A tenyészetek korával összefüggésben a PS is időben később jelennek meg. 2.50 g/l maláta tartalom mellett a 8. napon jellemzően PSI képletek-, a 12. napra már PSD formák is megjelentek (28. ábra). 15 nap nevelést követően a PSD képletek uralkodó jelenléte figyelhető meg, és megjelennek a PSM formák is (28. ábra). 2.50 és 5.00 g/l közötti maláta mennyiség hatására a tenyészetek érettebbek, 2.50 és 3.75 g/l mellett időben korábban érnek a PS képletek.

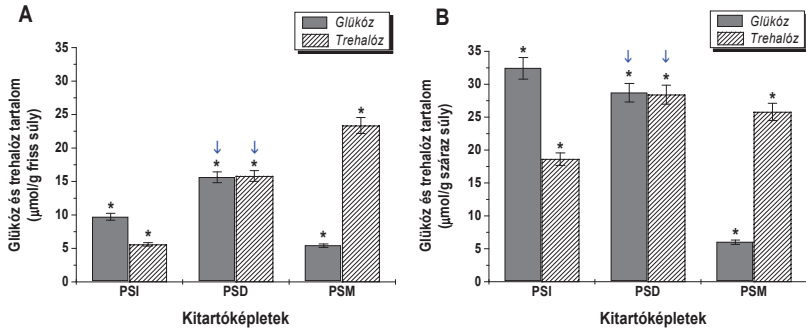


**28. ábra** *Morchella steppicola* PSI (A), PSD (B) és PSM (C) képletei. (Saját készítésű digitális fotók.)

A PS képződés és érés során vizsgáltam a gombák egyik legfőbb raktározott szénhidrátja, a trehalóz és a glükóz mennyiségének változását. A PS képző zónában *in situ* a PSI képletek megjelenésével együtt megindul a trehalóz szintézise (29. ábra). A micéliumban glükóz-gradiens figyelhető meg a PS képzés helyének irányába, kijelölve ezáltal a kitaróképletek megjelenésének helyét. A PS fejlődése és érése során a vegetatív micéliumra jellemző mono- és diszacharid profil jelentősen megváltozik, a trehalóz akkumulációja figyelhető meg, párhuzamosan csökkenő glükóz tartalom mellett (29. ábra).

<sup>[22]</sup> A SOD izoenzimiek mellett a ROS eliminálásában számos további enzim is részt vesz, ezek szerepe a sejtek számára toxikus  $\text{H}_2\text{O}_2$  eliminálása (katalázok, peroxidázok), és ennek során elhasznált redukciós regenerálása (Foyer-Halliwell-Asada ciklus enzimei; F5. ábra).

PSD képletekben a glükóz és trehalóz tartalom közel azonos mértékű, 26-30  $\mu\text{mol/g}$  száraz súly (29.B. ábra). A PSM maximális mennyiségű trehalózt tartalmaz (24-27  $\mu\text{mol/g}$  száraz súly), egy minimális, esszenciális glükóz tartalom (~6  $\mu\text{mol/g}$  száraz súly) mellett (29.B. ábra). A PS csírázásakor ez a minimális szabad glükóz tartalom szerepet játszhat az anyagcsere gyors aktivációjában.



**29. ábra** *M. steppicola* kitartóképlet érése során a glükóz és trehalóz tartalom változása a kitartóképletek friss (A) és száraz súlyának (B) függvényében. Az egyes adatsorok adatainak szignifikáns különbségét ( $t_{0.05}$ ) \*-gal jelöltem. Kék nyilakkal jelöltem a két adatsor azon értékeit, melyek között nincs szignifikáns különbség.

Jól látható, hogy a cukorprofil változása a PS érési folyamataival mutat összefüggést. A friss és száraz súlyra vetített trehalóz és glükóz tartalom alakulása eltérést mutat, összhangban a kitartóképletek érése során bekövetkező nedvességtartalom változással (29. ábra). A trehalóz tartalom PSM képletekben tapasztalt kismértékű visszaesése a glükóz- és trehalóz anyagcsere regulációja szolgálhat magyarázattal (29.B. ábra).

Az eredmények alapján elmondható, hogy a trehalóz akkumuláció, az oxidatív stressz és a kitartóképlet képzés közötti összefüggéseket egyértelműen sikerült igazolni: az oxidatív stressz indukálja a PS képződését, összefüggésben a tenyészetek érettségével, szárazanyag és trehalóz tartalmával. Vizsgálataimmal párhuzamosan Georgiou és munkatársai egyező következtetésre jutottak az oxidatív stressz induktív hatásáról fonalas gombák szklerócium képzésének folyamatában (Georgiou és mtsai 2006).

### 5.1.2. Trehaláz izoenzim-aktivitás változásának vizsgálata

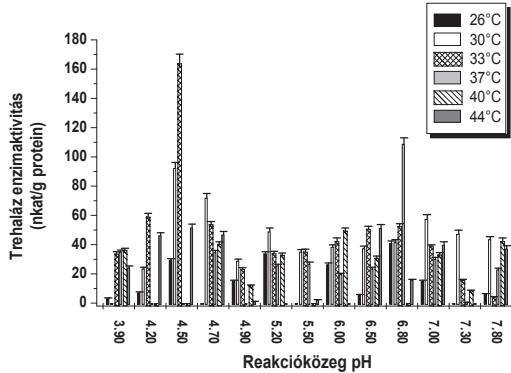
A PS szerkezeti és a biokémiai sajátosságainak köszönhetően képesek tolerálni az alacsony hőmérsékletet és a szárazságot. Tavasszal, amikor a környezeti paraméterek kedvezőekké válnak, a kitaratóképletek csírázásnak indulnak. A *Morchellák* életciklusának egyik specifikuma, hogy a csírázást követően fejlődésük két irányban haladhat a 2.8.1. alfejezet 17. ábráján látható módon (Volk és Leonard 1990). Az egyik irány a micéliális csírázás, melyre jellemző, hogy a téli, nyugalmi periódust követően vegetatív micélium alakul ki, és az újabb kedvezőtlen körülmények beköszöntéig ilyen formában él a telep. A másik, a termőtestképzés irányába történő közvetlen fejlődés, jellemzője egy igen rövid időtartamú vegetatív szakasz: az ekkor kifejlődő hifák alakítják ki a jellegzetes alakú és aromájú reprodukív képletet.

A két lehetséges irányt meghatározza a kitaratóképletek típusa: az alacsony hőmérsékleten képződő EES vesz részt az aszkokarpiumok képzésében, míg a LIS képletekből termőtest nem képződik, szerepük a telep áttelelésére korlátozódik, belőlük vegetatív micélium csírázik (Buscot és Bernillion 1991, Buscot 1993, Buscot és mtsai 2000). A termőtestképzés előfeltétele továbbá, hogy a kitaratóképlet elegendő raktározott tápanyaggal rendelkezzen, és a külső környezeti feltételek biztosítottak legyenek.

A kitaratóképletek képzése során a vegetatív micélium fiziológiája fokozatosan átalakul: fejlődése során strukturális változáson megy keresztül, előtérbe kerül a raktározás, PS képződnek és a nyugalmi állapot elérésének irányába tart. A PS képletekben a legfőbb raktározott szénhidrát a trehalóz, melynek szintézise a képzésben közvetlenül részt vevő micélium zónában lokalizált.

A micélium aktív életszakaszában a növekedési- és fejlődési folyamataihoz a glükózt használja fel, mint elsődleges szén- és energiaforrást. A vegetatív micélium glükózt és trehalózt szintje jól szabályozott a trehalózt szintézis intermedijerje, a T6P glükózanyagcserére gyakorolt hatása révén (glükózt-6-foszfát és trehalózt szintézis  $\Downarrow$ ), továbbá a citoplazmában jelen lévő trehalózt bontását katalizáló trehaláz izoenzimek katalizálják által.

A vegetatív micélium trehaláz enzimaktivitásának vizsgálata előtt meghatároztam az egyes izoformák hőmérsékleti és pH optimumát: savas izoformák  $pH_{opt}=4.50$ ,  $T_{opt}=33^{\circ}C$ , neutrális izoformák  $pH_{opt}=6.80$ ,  $T_{opt}=37^{\circ}C$  (30. ábra).



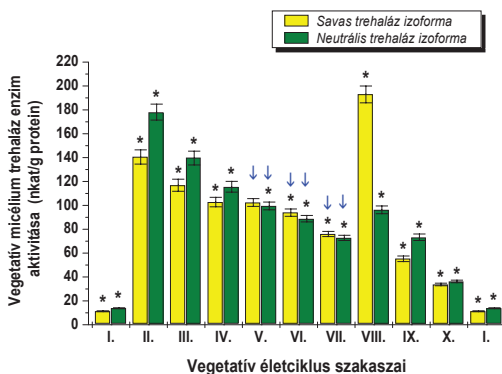
**30. ábra** *M. steppicola* vegetatív micélium trehaláz izoformák hőmérsékleti és pH optimumának meghatározása. A mérésorozatban 2.50 g/l trehalóz tartalmú tápközegen nevelt micéliumot használtam.

A PS csírázásakor a nyugalmi állapotban lévő képletek vizet vesznek fel, megduzzadnak, a metabolikus folyamatok aktiválódása jellemző. A Petri-csészékbe helyezett MPS csírázása egy napon belül megindul, a kitartóképlet felszínén és a környező táptalajon fiatal, vékony falú és gyors növekedésű trofikus hifák figyelhetőek meg. A telep növekedése ezt követően is fokozott ütemben zajlik, a csírázást követő második-harmadik napra kialakul az első micélium zóna. A telep fejlődése a továbbiakban az érett tenyészet kialakulásának irányába tart, mely állapot elérését követően PS képzés fázisába lép. A PS megjelenése és érése az 5.1.1. alfejezetben részletezett módon megy végbe, az alkotó hifák glükóz és trehalóz tartalmának jellegzetes átalakulása a 29. ábrán figyelhető meg.

A *Morchella* fajok életciklusában elsődleges és másodlagos vegetatív micéliumot különböztetünk meg. Primer micéliumnak egy aszkospóra csírázásakor képződő hifák összességét (monoaszkospórás tenyészet) nevezzük (Greis, H. 1940). A *Morchella* fajok jellemző vonása, hogy monoaszkospórás tenészeteikben két elsődleges micélium „találkozásakor” gyakran anasztomizálnak, és ez elősegíti a genetikailag kissé eltérő sejtmagvak keveredését (Volk és Leonard 1990). Két, párosodási típusát tekintve kompatibilis (nem testvér aszkospórákból származó) hifa között kialakuló anasztomózis által létrejött heterokariotikus formációt nevezzük szekunder micéliumnak. A heterokarion formáció jellemzője az, hogy a hifák szegmentumaiban a sejtmagok párba állnak (3-5 magpár/szegmentum) és sűrű, világos színű légmicéliumot – életciklus VIII. szakasza –

képeznek (Volk és Leonard 1989a). PS létrejöhetnek primer és szekunder micéliumból egyaránt.

A PS képletek – vegetatív micélium – PS képletek ciklusban (I.-X. vegetatív életciklus szakaszai) megvizsgáltam a trehaláz hasznosítását lehetővé tevő trehaláz izoenzimek aktivitásának változását, mely ciklusban szekunder micélium vesz részt a PS képzésében. Az aktiválódó MPS trehaláz aktivitása kimagasló, bennük a citoplazmatikus neutrális izoformák maximális értéke mérhető (31. ábra). Az aktivitásértékek az érett tenyészetek kialakulásáig folyamatosan csökkennek. A neutrális izoformák dominanciája a csírázó hifákban és az első micélium zónában meghaladja szignifikánsan a savas trehaláz aktivitást (31. ábra). Az V.-VI.-VII. szakaszokban a két izoforma aktivitása kiegyenlített (31. ábra). A teljes ciklus legmagasabb enzimaktivitási értéke (savas trehaláz izoforma) az érett tenyészetekben képződő légmicéliumban mérhető, majd a PS képletek fejlődése során egyre csökkenő aktivitás tapasztalható a neutrális izoformák dominanciájával (31. ábra).



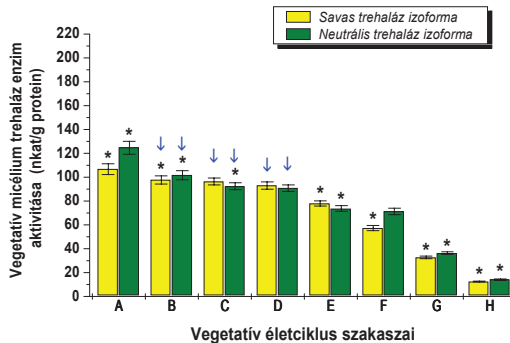
**31. ábra** *M. steppicola* termőest eredetű tenyészet trehaláz enzimaktivitásának változása vegetatív életciklusa szakaszaiban. A római számok a különböző szakaszokat jelölik, rendre: **I.** – PSM (nyugvó MPS), **II.** – aktív MPS, **III.** – csírázó hifák, **IV.** – első micélium zóna, **V.** – második micélium zóna, **VI.** – harmadik micélium zóna, **VII.** – érett micélium, **VIII.** – légmicélium, **IX.** – PSI, **X.** – PSD, **I.** – PSM. A *t*-próba alapján számított szignifikáns különbségeket ( $t_{0,05}$ ) \* -gal jelöltem. A kék nyilak jelölik a két izoforma aktivitásának értékei közötti szignifikáns eltérés hiányát.

A trehaláz aktivitás körültekintő értelmezéséhez szükséges a micélium glükóz- és trehaláz tartalmának ismerete is. Eredményeim alapján a fiatal (3-5 napos) micéliumban átlagosan 30  $\mu\text{mol}$ /gramm friss súly glükóz és 1-3  $\mu\text{mol}$ /gramm friss súly trehaláz tartalom



jellemző, míg az érett tenyészetekben, a PS képzésben részt vevő micélium átlagosan 45-50  $\mu\text{mol/gramm}$  friss súly glükózt és 4-5  $\mu\text{mol/gramm}$  friss súly trehalózt tartalmaz. A ciklus VIII. szakaszában a csökkenő tendenciából kiemelkedő neutrális izoforma aktivitás és a kiugróan magas savas trehaláz enzimaktivitás háttérében az érett micéliumban felhalmozódó trehalóz tartalom hasznosításában való együttes részvétel húzódhat meg (31. ábra).

A trehaláz enzimaktivitás alakulásának vizsgálatát monoaszkopórás tenyészetekben is elvégeztem (csírázó hifák – vegetatív micélium – PS képletek; A-H szakaszok), ebben az esetben a PS primer micéliumból jöttek létre (32. ábra).

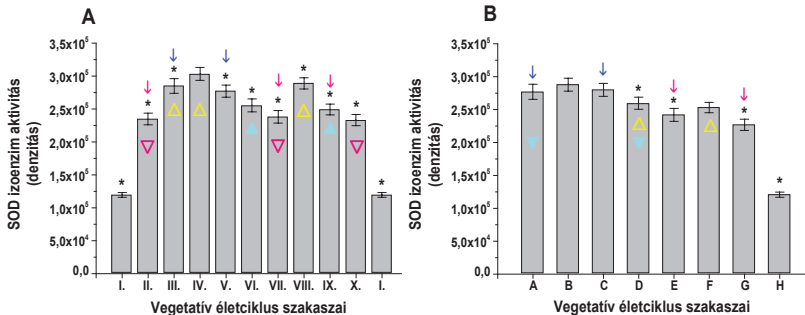


**32. ábra** *M. steppicola* monospóra tenyészet trehaláz izoenzim-aktivitásának változása vegetatív életciklusa szakaszaiban. A latin betűk a különböző szakaszokat jelölik, rendre: **A** – csírázó hifák, **B** – első micélium zóna, **C** – második micélium zóna, **D** – harmadik micélium zóna, **E** – érett micélium, **F** – PSI, **G** – PSD, **H** – PSM. A *t*-próba alapján számított szignifikáns különbségeket ( $t_{0,05}$ ) \*-gal jelöltem. A kék nyilak jelölik, hogy a két izoforma aktivitásának értékei nem térnek el szignifikánsan egymástól.

A spórák csírázásakor *in vivo* és *in vitro* helyzetben egyaránt egy rövid 'lag'-periódus jellemzi a hifák növekedését, majd a növekedés exponenciálisra fordul. Anyagszere szempontból ebben a trofofázisban az elsődleges folyamatok jellemzőek, amelyek a gyors növekedéshez és fejlődéshez biztosítanak megfelelő háttérrel. Az organizmus életében az idő előrehaladtával, döntően a felvehető tápanyagmennyiség csökkenése miatt lelassul a növekedés. Az idiofázisba jutott tenyészetekben megfigyelhető a másodlagos anyagszereutak aktiválódása és termékeik – döntően pigmentek és aromaanyagok – megjelenése, valamint a PS képzés.

Az aszkospórák jellemző raktározott tápanyaga a PS-hoz hasonlóan szintén a trehalóz, melynek egylépésben történő, energetikailag kedvező bontása a csírázás során a trehaláz izoenzimiek közreműködésével valósul meg. A spóra – vegetatív micélium – kitartóképlet képzés folyamatsorban a maximális aktivitás (neutrális izoforma) a csírázó hifákban mérhető (32. ábra). Az A-H szakaszokban fokozatos aktivitáscsökkenés figyelhető meg: a savas trehaláz izoenzim aktivitása az első – második – harmadik micélium zóna kialakulása során (B-C-D szakaszok), míg a neutrális trehalázé a C-D szakaszok között nem változott jelentősen (32. ábra). Egyetlen szakaszban, az érett micéliumban a savas izoenzim aktivitás szignifikánsan meghaladta a neutrális izoforma aktivitását (32. ábra). Az érett micélium és a PSI neutrális trehaláz aktivitása statisztikailag – hasonlóan a B-C-D peremhez – nem tér el egymástól (32. ábra).

Az életciklus szakaszaiban a trehaláz enzimaktivitás mellett vizsgáltam a micélium és PS képletek SOD aktivitását is. A SOD aktivitás a csírázás során jellemzően magasabb értékeket mutat, mely a PS raktározott anyagainak hasznosítása és a fokozott növekedéssel összefüggésben nagy intenzitással zajló anyagcsere folyamatokkal hozható összefüggésbe (33. ábra). Ebben az intenzív anyagcserével jellemezhető helyzetben a hifa redox állapota kismértékben oxidatív irányba tolódik el, ezzel tart egyensúlyt a SOD enzimaktivitás fokozódása (33. ábra).



**33. ábra** SOD enzimaktivitás változása *M. steppicola* termőtest eredetű (A) és monospóra (B) tenyészetek vegetatív életciklus szakaszaiban. A római számok és a latin betűk a különböző szakaszokat jelölik, rendre: **I.** – PSM (nyugvó MPS), **II.** – aktív MPS, **III.** – csírázó hifák, **IV.** – első micélium zóna, **V.** – második micélium zóna, **VI.** – harmadik micélium zóna, **VII.** – érett micélium, **VIII.** – légmicélium, **IX.** – PSI, **X.** – PSD, **I.** – PSM illetve **A** – csírázó hifák, **B** – első micélium zóna, **C** – második micélium zóna, **D** – harmadik micélium zóna, **E** – érett micélium, **F** – PSI, **G** – PSD, **H** – PSM. A *t*-próba alapján számított szignifikáns különbségeket ( $t_{0.05}$ )\*-gal jelöltem, az életciklus szakaszainak sorrendjében értelmezve. A színes nyilak és háromszögek jelölik azokat az adatpontokat, melyek között nincs szignifikáns eltérés.

A kép ezt követően is eltérő, a szekunder micéliumból képződő PS esetében a kialakuló légmicéliumban jelentős mértékű, a csírázáskori fiatal hifákban mérhető aktivitás jellemző. A légmicélium habitusát, növekedési és anyagcsere folyamatait tekintve egyaránt a csírázó, vékony falú hifákkal rokonítható, ez indokolja a megemelkedő enzimaktivitást (33.A. ábra). A primer micéliumból képződő kitaratóképletek képződésekor sokkal kiegyenlítettebb képet kapunk, a PSI képletekben mérhető maximummal, mely a PS nyugalmi állapota felé jelentős mértékben csökken párhuzamosan az élettani folyamatok aktivitásának alakulásával (33.B. ábra).

Mindkét esetben a legalacsonyabb SOD aktivitás értelemszerűen a nyugalmi állapotban lévő PS képletekben mérhető (33. ábra).

Az életciklus egyes szakaszaiban mért SOD aktivitás értékei között több pont esetében nem tapasztaltam szignifikáns eltérést, ezek minden esetben jól értelmezhetőek a micélium növekedési sajátságainak és anyagcsere aktivitásának hasonlóságával (33. ábra).

A trehaláz izoformák aktivitása jól tükrözi a trehalóz anyagcsere alakulását a vegetatív életciklus egészében. A két trehaláz izoforma aktivitása a trehalóz hasznosításában illetve a raktározás során az élettani állapotnak megfelelő trehalóz és glükóz szint szabályozásában egyértelműen látszik (31. és 32. ábrák). A raktározott trehalóz hasznosításában dominánsan a neutrális izoformáknak jut szerep, viszont nem elhanyagolható a savas trehalázok katalitikus aktivitása sem (31. és 32. ábrák). A raktározott források elapadásáig folyamatos bontás figyelhető meg, az intenzív hifanövekedés során a trehalóz a gyors ütemben kialakuló micélium zónákba transzportálódik és ott történik meg hidrolízise (31. és 32. ábrák).

A termőtest eredetű tenyészetekben az érett tenyészet kialakulását követően szekunder micélium jelenik meg (légmicélium), melyben igen meghatározó a savas trehaláz izoformák aktivitása: az érett tenyészetekben a fiatal micéliumban mért trehalóz tartalomhoz képest jelentősebb mennyiségek jellemzőek, melynek hasznosításában láthatóan a savas izoenzim aktivitása dominál (31. ábra).

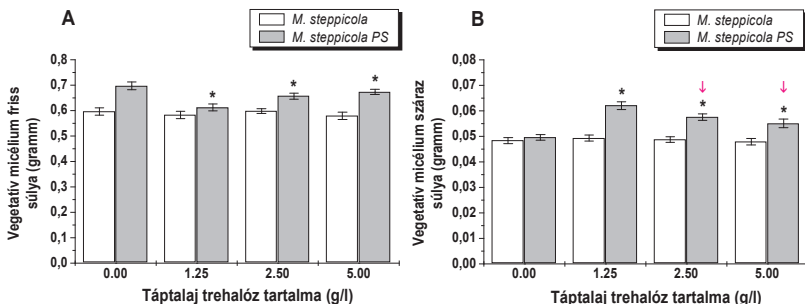
## **5.2. Trehaláz izoenzimek indukciója *M. conica* és *M. steppicola* vegetatív micéliumában**

### **5.2.1. Szilárd kultúrás *M. steppicola* tenyészetek vizsgálata**

Az 5.1.2. alfejezetben a *M. steppicola* vegetatív életciklusának micéliális és PS képző szakaszában a trehaláz enzimaktivitás alakulását eredményesen feltérképeztem. Ebben az alfejezetben a trehaláz izoenzimek induktív sajátságait célzó kísérlet sorozat eredményei

közül a *M. steppicola* két, a PS képzés szempontjából eltérő törzsével elvégzett vizsgálatok során nyert eredményeket mutatom be. A '*M. steppicola* PS' a kitaratóképleteket képző, míg a '*M. steppicola*' a MPS képleteket nem képző mutáns törzset jelöli.

A szilárd táptalajon nőtt vegetatív micélium friss és száraz súlya a két törzs tekintetében eltérő módon alakult (34. ábra).

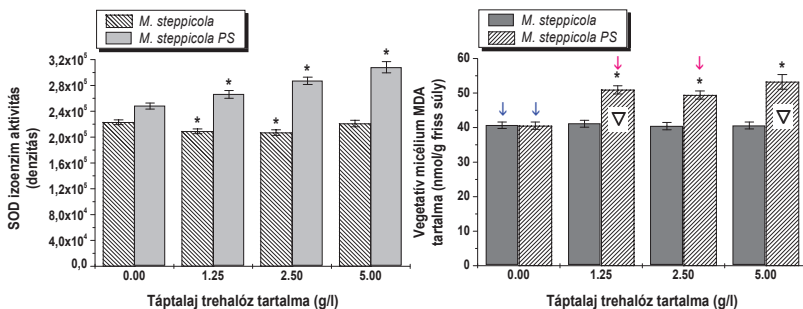


**34. ábra** *M. steppicola* és *M. steppicola* PS vegetatív micélium friss (A) és száraz (B) súlyának alakulása a táptalaj trehalóz tartalmának függvényében. A *t*-próba alapján a kontroll értékekhez (0.00 g/l trehalóz tartalom) viszonyított szignifikáns különbségeket ( $t_{0,05}$ )\*-gal jelöltem. Pink nyilakkal jelöltem azokat az adatpontokat, melyek között nincs szignifikáns különbség.

A tenyészetek friss súlya a PS képleteket nem képző törzs esetén kiegyenlített maradt, míg a PS képző törzsnél a táptalaj trehalóz tartalmának hatására jelentős mértékű eltérést mutatott (34.A. ábra). A PS képző törzs kontroll friss súly értékei szignifikánsan meghaladták a nem képző törzs tenyészeiben mért értékeket (34.A. ábra). A micélium száraz súly adatai esetében azonban a két törzs kontroll értéke között nincsen jelentős különbség, tehát a PS képző típus micéliuma magasabb nedvesség tartalommal rendelkezett (34.B. ábra). Továbbá a PS képző törzs kontroll körülmények mellett nevelt tenyészeiben és a kitaratóképleteket nem képző törzs adatsorai között nincs szignifikáns eltérés – a mutáns törzsben a száraz súly mindvégig kontroll közeli értéken maradt (34.B. ábra).

A PS képző törzs adatsorában tapasztalt érdekes tendencia magyarázata a kitaratóképletek időbeli megjelenésével és fejlődésével-érésével mutat összefüggést. Az 1.25 g/l trehalóz tartalom mellett nevelt tenyészetekben jelentek meg legkorábban a PS, fejlődésük és érésük is megelőzte a 2.50 illetve 5.00 g/l trehalózon nőtt tenyészetekben megjelenő kitaratóképleteket. A nevelési periódust követően az 1.25 g/l trehalózt tartalmazó táptalajokról származó mintákban a PSD és PSM képletek valamint érett és előregedő

micéliumzónák jellemzőek, ez magyarázza a kapott legalacsonyabb friss súly és legmagasabb száraz súly értékeket (34.B. ábra). A minták feldolgozásának időpontjában a 2.50 és 5.00 g/l trehalóz tartalmú táptalajokról származó tenyészetekben a trehalóz növekvő mennyiségével párhuzamosan nagyobb a képző micéliumzóna aránya, kisebb mennyiségben és dominánsan PSI és PSD jellemzőek, ez indokolja a magasabb nedvességtartalmat.



**35. ábra** *M. steppicola* vegetatív micélium SOD izoenzim aktivitásának változása a táptalaj trehalóz tartalmának függvényében. A *t*-próba alapján a kontroll értékekhez (0.00 g/l trehalóz tartalom) viszonyított szignifikáns különbségeket ( $t_{(0,05)}$ )\*-gal jelöltem.

**36. ábra** *M. steppicola* és *M. steppicola* PS vegetatív micélium MDA tartalmának alakulása a táptalaj trehalóz tartalmának függvényében. A *t*-próba alapján a kontroll értékekhez (0.00 g/l trehalóz tartalom) viszonyított szignifikáns különbségeket ( $t_{(0,05)}$ )\*-gal jelöltem. Kék nyilak jelölik a két adatsorhoz tartozó minták azon adatait, melyek között nincs szignifikáns különbség.

A trehalóz, mint külső tápanyagforrás *M. steppicola* vegetatív micéliumára gyakorolt hatását az oxidatív stressz jellemzésére eredményesen alkalmazható paraméterek, a SOD izoenzim aktivitásának és a MDA tartalom alakulásának követésével jellemezhető. A vegetatív életciklus szakaszaiban és ezáltal a micélium friss és száraz súlyában tapasztalt különbségeknek megfelelően eltérés tapasztalható a PS képző és nem képző törzs SOD aktivitásában és MDA tartalmában is (35. és 36. ábrák). A kitartóképleteket nem képző törzsben az 1.25 és 2.50 g/l trehalóz tartalom hatására kismértékű, szignifikáns különbség mérhető a kontroll értékekhez képest, majd az 5.00 g/l trehalóz mellett kontroll közeli értéket mutat (35. ábra). A PS képző tenyészetekben a táptalaj trehalóz tartalmával párhuzamosan fokozódó SOD aktivitást tapasztaltam (35. ábra).

A tenyészetek MDA tartalma a PS nem képző törzs esetén mindvégig kiegyenlített maradt (36. ábra). A kitartóképleteket képző tenyészetekben a külső trehalóz forrás hatására

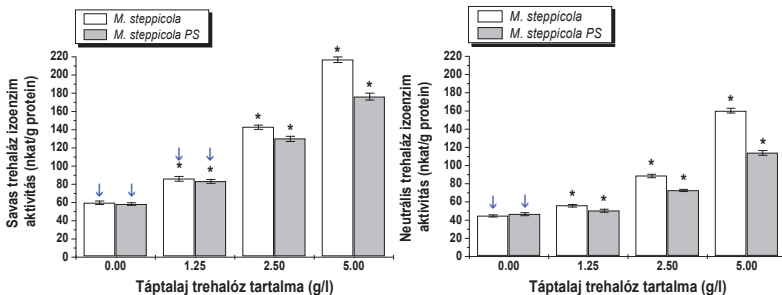
kialakuló oxidatív stressz folytán az MDA tartalom a kontroll értékeket szignifikánsan meghaladta (36. ábra). A három trehalóz tartalmú táptalajon nőtt mintatípusban a MDA tartalom nem tért el jelentősen egymástól, az 1.25 és 2.50 g/l valamint az 1.25 és 5.00 g/l trehalóz mellett páronként a szignifikáns eltérés határán belüli különbségek adódtak (36. ábra).

Az oxidatív stressz PS képzést indukáló hatása (5.1.1. alfejezet) valamint a ROS és a lipidperoxidáció közötti összefüggések fényében a PS képző *M. steppicola* törzs micéliumában mért SOD aktivitási és MDA tartalom értékek jól értelmezhetőek: a PS képződés kezdeti fázisában mérhető a legmagasabb SOD aktivitás és ezzel párhuzamosan a legmagasabb MDA tartalom (35. és 36. ábrák). A PS érése során a nyugalmi állapot felé tart a rendszer, ezzel párhuzamosan csökken az oxidatív stressz, így a SOD aktivitás (35. ábra). Az 1.25 g/l trehalóz tartalmú táptalajon nevelt micélium esetén tapasztalható magasabb, a 2.50 g/l trehalóz mellett nőtt tenyészetekben mért MDA tartalmat meghaladó értékekre magyarázattal a PS övező micéliumzóna szeneszcencia fázisba lépése szolgálhat (36. ábra).

A szeneszcencia fázisára a tenyészetek előregedése, degradálódása jellemző. A leépülés az öregedési zónában, a micélium csúcstól távol eső részeiben indul meg. Jellemző a még hasznosítható tápanyagok fiatalabb részekbe szállítódása, a másodlagos anyagcseretermékek felszaporodása, a pigmentképződés fokozódása. A pusztulásra ítélt szegmentumok pórusai elzáródnak, a membránrendszerek degradálódásának eredményeként megszűnik a kompartmentalizáció, s a korábban elkülönült enzimek aktiválódása egyes hifa szakaszok autolíziséhez vezet, mely folyamatok a MDA tartalom megemelkedését vonják maguk után (36. ábra). Az 5.00 g/l trehalóz tartalmú táptalajokon nevelkedett vegetatív micéliumban tapasztalt SOD aktivitásbeli maximum érték és a magas MDA tartalom összhangban áll a PS képzés kezdetét jellemző folyamatokkal: fokozott oxidatív stresszhelyzet, micélium differenciálódás figyelhető meg (35. és 36. ábrák).

A trehaláz izoenzim-aktivitás alakulása beszédes a trehaláz anyagcsere-folyamatok, és az ehhez szorosan kapcsolódó PS képzés szempontjából. A trehaláz izoenzimek, döntő mértékben a neutrális izoformák az organizmus aktuális élettani állapotához igazodva szabályozzák a citoplazmatikus trehaláz koncentrációt, a PS képződése során az optimális trehaláz tartalom kialakítását. A savas trehalázok katalizálják az extramicéliális trehalóz *in situ* hidrolízisét, a felszabaduló glükóz a micéliumba transzportálódik.

Az MPS-t nem képző és képző törzs trehaláz izoenzim-aktivitása külső trehalóz hatására egyaránt fokozódott. Mindkét törzs kontroll körülmények között a savas és neutrális izoformák esetén is azonos mértékű enzimaktivitást mutatott (37. és 38. ábrák).



**37. ábra** Vegetatív micélium savas trehaláz enzimaktivitása a táptalaj trehalóz tartalmának függvényében. A *t*-próba alapján a kontroll értékekhez (0.00 g/l trehalóz tartalom) viszonyított szignifikáns különbségeket ( $t_{0.05}$ )\*-gal jelöltem. Kék nyílal jelöltem, ahol a két adatsor adatai között nincsen szignifikáns eltérés.

**38. ábra** *M. steppicola* vegetatív micélium neutrális trehaláz enzimaktivitása a táptalaj trehalóz tartalmának függvényében. A *t*-próba alapján a kontroll értékekhez (0.00 g/l trehalóz tartalom) viszonyított szignifikáns különbségeket ( $t_{0.05}$ )\*-gal jelöltem. Kék nyílal jelöltem a két adatsor azon pontjait, melyek között nincs szignifikáns eltérés.

A savas trehaláz aktivitás minden esetben meghaladta a neutrális izoformák értékeit (37. és 38. ábrák). A táptalaj trehalóz tartalmának emelkedésével párhuzamosan a savas trehaláz izoformák aktivitása meredek, míg a neutrális izoformák aktivitása kisebb mértékű emelkedést mutat mindkét törzsben (37. és 38. ábrák).

A savas trehaláz izoformák magasabb aktivitási értékei szemléletesen mutatják, hogy a külső trehalóz forrás hasznosításában a membránkötött és a vakuoláris savas izoformák játszanak hangsúlyosabb szerepet. A membránkötött izoformák a trehalóz táptalajban történő hidrolízisét katalizálják, a vakuoláris savas trehalázok pedig a felvett trehalóz micéliumon belüli bontásában vesznek részt. A trehalóz a vakuolumba transzportfolyamatok közvetítésével kerül (Jules és mtsai 2004). A savas trehaláz enzimaktivitása e két micéliális izoforma között vélhetően egyenlőtlen megoszlást mutat, a membránkötött típusok nagyobb részarányával. A neutrális izoformák aktivitási értékeinek alakulása a külső trehalóz felvételét követő citoplazmában bekövetkező hidrolíziséről tanúskodik (37. és 38. ábrák).

A trehalóz hifákba történő felvétele többféle módon, elsődleges és másodlagos aktív transzport vagy passzív transzport útján valósulhat meg. A *Morchella* fajok trehalóz felvételére vonatkozóan nem állnak rendelkezésre adatok, feltehetően a transzport a *Saccharomyces cerevisiae* törzsekben részletesen feltérképezett módon megy végbe: döntően magas affinitású  $H^+$ -trehalóz szimportereken keresztül (másodlagos aktív transzport), illetve alacsony affinitású karrier fehérjék közvetítésével (passzív transzport).

Fontos kiemelni, hogy a kitartóképleteket nem képző *M. steppicola* törzs trehaláz izoenzim aktivitása a *M. steppicola* PS vegetatív micéliumban mért értékeket szignifikánsan meghaladja (37. és 38. ábrák). A jelentős mértékben kisebb savas trehaláz enzimaktivitása *M. steppicola* PS vegetatív micéliumában jól korrelál a PS képzés folyamatával: a külső trehaláz nagyobb mértékben kerül felvételre, mint a kitartóképleteket nem képző törzsben és ezzel párhuzamosan a citoplazmatikus neutrális izoformák aktivitása is szignifikánsan alacsonyabb (37. és 38. ábrák). A *M. steppicola* PS trehaláz izoformák aktivitása a külső trehaláz felvételét és kitartóképletekbe történő közvetlen raktározását támasztja alá.

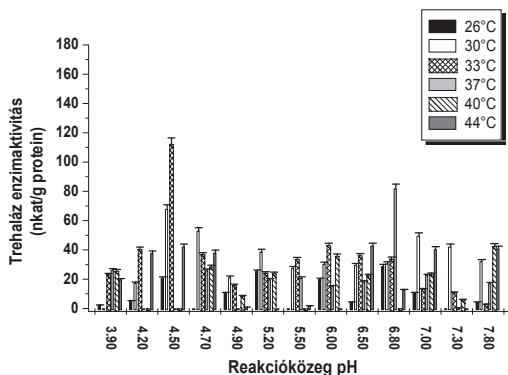
Összességében a kitartóképlet képzés szempontjából eltérő két, trehaláz tartalmukban különböző táptalajokon nevelt *Morchella steppicola* törzs vizsgálatának eredményei alapján elmondható, hogy a külső trehaláz induktív hatású a PS képzés folyamatában: a trehaláz tartalmú táptalajokon nőtt *M. steppicola* PS vegetatív micélium időben előbb képez PS, mint a kontroll tenyészetek. A friss- és száraz súly adatok mellett a SOD aktivitás és MDA tartalom értékek jól kiemelik a trehalózt tartalmazó táptalajokon nevelkedett *M. steppicola* PS tenyészetekben kitartóképlet képzés szempontjából mutatózó éles különbségeket. Mindezekkel jól harmonizál a két törzs párhuzamos tenyésztéseiben mért trehaláz izoenzim aktivitásbeli eltérése.

Az egyes variánsok a PS képzés szempontjából a nevelés időtartama során eltérő fázisba kerülnek: a legkorábban az 1.25 g/l trehaláz tartalom mellett jelennek és érnek meg a kitartóképletek, a 2.50 és 5.00 g/l trehalázon nevelt tenyészetekben rendre később. Az időbeliség háttérében a micélium energetikai helyzetének finom különbözősége állhat: glükóz-egységekre vetítve azonos, ám glükóz-trehaláz arány szempontjából eltérő tápanyagforrás állt rendelkezésre. A trehaláz PS indukáló hatása így más ütemben jutott érvényre: nagy mennyiségű szabad glükóz mellett a jelen lévő 1.25 g/l trehaláz döntően gyors, közvetlen raktározást váltott ki, míg a szabad glükóz mennyiségének csökkenésével a trehaláz hidrolízise került előtérbe.

### **5.2.2. *M. conica* és *M. steppicola* folyadékkultúrák vizsgálata**

A vizsgálatsorozatban a trehaláz izoenzim aktivitásváltozásának meghatározását megelőzően azok pH és hőmérsékleti optimumát meghatároztam mindkét faj esetén (30. és 39. ábrák). A savas izoformákra jellemző  $pH_{opt}=4.50$ ,  $T_{opt}=33^{\circ}C$ , a neutrális izoformákra  $pH_{opt}=6.80$ ,  $T_{opt}=37^{\circ}C$  mindkét faj vegetatív micéliumában.





**39. ábra** *M. conica* vegetatív micélium trehaláz izoenzimiek hőmérsékleti és pH optimumának meghatározása. A méréssorozatban 2.50 g/l trehalóz tartalmú tápközegen nevelt micéliumot használtam. A *M. steppicola* vegetatív micélium trehaláz izoenzimiek hőmérsékleti és pH optimumának meghatározását bemutató 30. ábra az 5.1.2. alfejezetben található.

A trehaláz tartalmukban különböző tápoldatokban nevelt *M. conica* és *M. steppicola* vegetatív micéliumának friss- és száraz súlyát 10 nap nevelést követően határoztam meg (12. táblázat).

Táptalaj trehaláz tartalma (g/l)	Vegetatív micélium friss súlya (g) ± SD	Vegetatív micélium száraz súlya (g) ± SD
<i>Morchella conica</i>		
0.00	3,664 ± 0,102	0,3241 ± 0,0081
1.25	3,642 ± 0,103	0,3186 ± 0,0076
2.50	3,754 ± 0,067	0,3237 ± 0,0074
5.00	3,611 ± 0,109	0,3142 ± 0,0089
<i>Morchella steppicola</i>		
0.00	4,113 ± 0,116	0,3702 ± 0,0101
1.25	4,121 ± 0,122	0,3742 ± 0,0105
2.50	4,186 ± 0,130	0,3798 ± 0,0113
5.00	4,164 ± 0,119	0,3742 ± 0,0103

**12. táblázat** Vegetatív micélium friss- és száraz súlyának alakulása *Morchella conica* és *M. steppicola* trehaláz enzim indukció kísérleti összeállításban. Az adatsorok értékei szignifikáns eltérést nem mutatnak.

*M. conica* és *M. steppicola* esetén egyaránt elmondható, hogy a kontroll, azaz 0.00 g/l trehalózt tartalmazó összeállításokban nőtt micéliumhoz képest a trehalózt tartalmazó tápoldatokból származó minták friss- és száraz súlya szignifikáns eltérést nem mutatott (12. táblázat).

A trehaláz enzim indukció során a tenyészetek SOD izoenzim aktivitása és MDA tartalma jelentős mértékben nem változott, a friss- és száraz súly adatokhoz hasonlóan nem térnek el szignifikáns mértékben a kontroll értékektől (13. táblázat).

Táptalaj trehalóz tartalma (g/l)	SOD izoenzimaktivitás (denzitás) ± SD	Vegetatív micélium MDA tartalma (nmol/g friss súly) ± SD
<i>Morchella conica</i>		
0.00	1,73×10 <sup>5</sup> ± 3861	42,07 ± 0,96
1.25	1,65×10 <sup>5</sup> ± 3772	42,14 ± 1,00
2.50	1,63×10 <sup>5</sup> ± 4285	42,41 ± 1,06
5.00	1,74×10 <sup>5</sup> ± 5048	42,55 ± 1,01
<i>Morchella steppicola</i>		
0.00	2,01×10 <sup>5</sup> ± 4423	40,77 ± 0,88
1.25	1,97×10 <sup>5</sup> ± 4366	41,04 ± 0,92
2.50	2,12×10 <sup>5</sup> ± 4473	41,33 ± 1,04
5.00	2,16×10 <sup>5</sup> ± 5187	41,16 ± 1,00

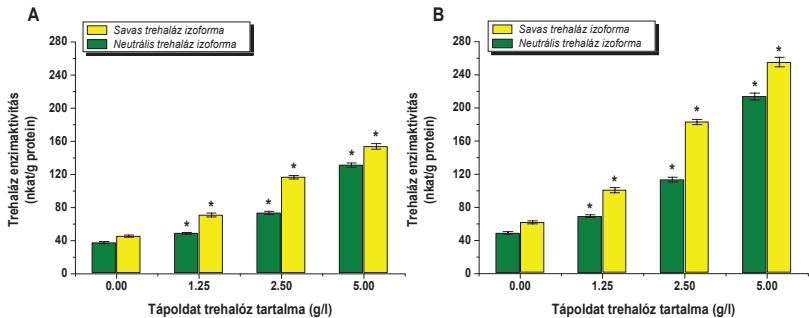
**13. táblázat** Vegetatív micélium SOD aktivitásának és MDA tartalmának alakulása *Morchella conica* és *M. steppicola* trehaláz enzim indukciójának vizsgálatában. Az adatsorok értékei szignifikáns eltérést nem mutatnak.

A tenyészetek SOD izoenzim aktivitása *M. conica* vegetatív micéliumban 1.25 és 2.50 g/l, míg *M. steppicola* vegetatív micéliumban 1.25 g/l trehalóz tartalom mellett enyhe visszaesést mutatott, az eltérés azonban nem ért el szignifikáns mértéket (13. táblázat). A kismértékű csökkenést követően a SOD enzimaktivitás emelkedése figyelhető meg *M. conica* 5.00 g/l és *M. steppicola* 2.50-5.00 g/l trehalózt tartalmazó tápoldatokban nevelt vegetatív micéliumában (13. táblázat).

A friss- és száraz súly, a SOD enzimaktivitás és az MDA tartalom alakulása alapján elmondható, hogy a tenyészetek élettani szempontból egységes képet mutatnak, a külső trehalóz, mint tápanyagforrás nem okoz a kontroll állapottól eltérő mértékű oxidatív stresszállapotot.

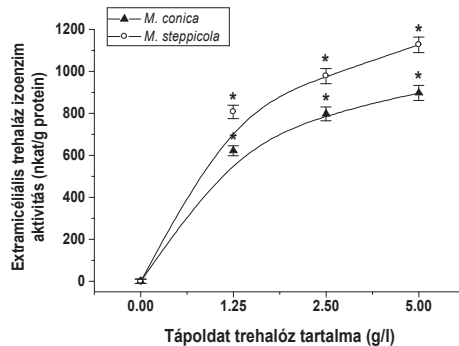
A tápoldatok trehalóz tartalmának emelkedésével párhuzamosan a trehaláz izoenzimek aktivitásának fokozódása figyelhető meg *Morchella conica* és *M. steppicola* vegetatív

micéliumában egyaránt (40. ábra). A micéliális savas és neutrális trehalázok aktivitása külső trehaláz hatására meredeken változik, azonban a savas izoformák aktivitása mindvégig szignifikánsan meghaladja a neutrális izoformákét (40. ábra). *M. steppicola* micéliális trehaláz izoenzim aktivitása mindkét izoforma tekintetében szignifikáns mértékben meghaladja a *M. conica* vegetatív micéliumában mért értékeket (40. ábra).



**40. ábra** *M. conica* (A) és *M. steppicola* (B) vegetatív micélium trehaláz izoenzimaktivitása a táplódat trehalóz tartalmának függvényében. A *t*-próba alapján a kontroll értékekhez (0.00 g/l trehalóz tartalom) viszonyított szignifikáns különbségeket ( $t_{0,05}$ )\*-gal jelöltem. Az adatsorok elemzése alapján minden adatpont szignifikáns eltérést mutat egymáshoz képest is.

Az extramicéliális (exkréciós savas izoforma) aktivitása a külső trehaláz hatására jelentős mértékben fokozódott (41. ábra).



**41. ábra** *M. conica* és *M. steppicola* extramicéliális trehaláz enzim aktivitása a táplódat trehalóz tartalmának függvényében. Az adatpontokra B-Spline görbékét illesztettem (Origin™ 5.0). A *t*-próba alapján a kontroll értékekhez (0.00 g/l trehalóz tartalom) viszonyított szignifikáns különbségeket ( $t_{0,05}$ )\*-gal jelöltem.

*M. steppicola* tenyészetek indukciós tápoldataiból meghatározott aktivitási értékek szignifikánsan meghaladják *M. conica* párhuzamos mérési eredményeit (41. ábra).

Fontos kiemelni, hogy az extramicéliális savas trehaláz enzimaktivitás már 1.25 g/l külső trehaláz koncentráció hatására is több mint kétszeres aktivitást mutat a micéliális izoformák *M. steppicola* mintákban mért maximális, 5.00 g/l trehaláz mellett mért savas trehaláz aktivitási értékéhez képest (40.B. és 41. ábrák).

A mérési eredményeim fényében egyértelműen kirajzolódik *M. conica* és *M. steppicola* savas és neutrális trehaláz izoformáinak együttes szerepe a külső trehaláz forrás hasznosításában. Az extramicéliális trehaláz jelentős része már a tápoldatban az extramicéliális savas trehaláz izoformák által hidrolízisen esik át, és a keletkezett glükóz kerül felvételre a micéliumba – ezt támasztja alá az extramicéliális savas izoformák aktivitásának alakulása és dominanciája a micéliális izoformákhoz képest (40. és 41. ábrák).

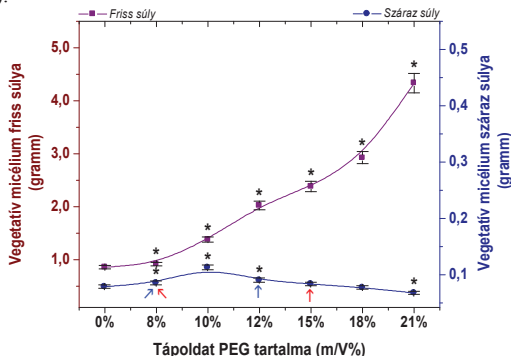
A külső trehaláz hasznosításában azonban a micéliális trehaláz izoenzimek is jelentős szerephez jutnak: egyrészt a membránkötött savas trehalázok aktivitása révén, másrészt pedig a citoplazmában lokalizált neutrális valamint a vakuoláris savas izoformák által katalizált folyamatban – a hifákba felvételre kerülő trehaláz bontásával. A trehaláz micéliális felvétele a *Morchella* fajokban az 5.2.1. alfejezetben részletezett módon valósulhat meg, feltehetően másodlagos aktív és passzív transzport útján.

Összességében elmondható, hogy a mérési eredmények a trehaláz hasznosításában a savas és a neutrális trehaláz izoformák együttes szerepéről tanúskodnak. A micéliális és extramicéliális trehaláz izoformák aktivitása egyaránt fokozódik a tápoldat trehaláz tartalmának hatására. Az extramicéliális savas trehaláz enzimaktivitás dominál, amely azt támasztja alá, hogy a trehaláz hasznosításában a tápoldatban történő bontás a meghatározó folyamat.

### **5.3. *M. steppicola* szárazságstressz-tűrőképesség vizsgálata**

Élőhelye adottságainak ismeretében a *M. steppicola* kivételes stressztűrő képességgel rendelkezik. A *Morchella* nemzetség fajai között a sztyeppei kucsmagomba az átlagtól eltérő környezeti igényű – kifejezetten száraz, kitett élőhelyeken, meszes-dolomitos talajok lágyszárú társulásaiban fordul elő, míg a nemzetség többi tagja, így a *M. conica* is kifejezetten üde élőhelyeken virul. Jelen kísérleti összeállításban a szárazságstresszel szemben mutatott válaszreakcióit, a tolerancia hátterében meghúzódó mechanizmusokat vettem górcső alá.

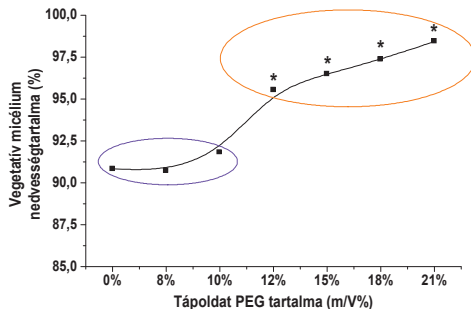
A *M. steppicola* vegetatív micélium friss súlya a szárazságstressz mértékével párhuzamosan növekedett (42. ábra). A 0% PEG koncentrációnak megfelelő kontroll értékekhez képest a 8 és 10% kismértékű, míg 12% PEG koncentráció esetében már jelentős emelkedést tapasztalunk, majd a 12-18% között további fokozatos emelkedés figyelhető meg (42. ábra). A 18-21% PEG koncentráció emelkedésnél ugrásszerűen megnövekedett a friss súly (42. ábra).



**42. ábra** *M. steppicola* vegetatív micélium friss- és száraz súlyának változása a tápanyag PEG tartalmának függvényében. Az adatpontokra illesztett görbék típusa B-Spline (Origin™ 5.0). Az *t*-próba alapján a kontroll értékekhez (0% PEG tartalom) viszonyított szignifikáns különbségeket ( $t_{0,05}$ ) \* -gal jelöltem. A piros és kék nyilak az érintett adatpontok közötti szignifikáns különbség hiányát jelölik.

A száraz súly adatok kiegyenlítettebb képet mutatnak, a PEG kezelt tenyészetekből származó vegetatív micélium értékei a 8-12% PEG kezelés hatására szignifikánsan meghaladják a 0% PEG kezelt mintákban mért értékeket, míg a 21% PEG mellett jelentős mértékben elmaradnak a kontroll adatoktól (42. ábra). A 15 és 18% (m/v%) PEG tartalmú tápanyagokban nevelkedett vegetatív micélium száraz súlya kontroll közeli érték, statisztikai eltérést nem mutatnak (42. ábra).

Ha a fenti adatok alapján származtatott nedvességtartalom százalékos adatait áttekintjük, akkor jól kirajzolódik, hogy az adatpontok két fő csoportra oszthatóak (43. ábra). A kontroll és a 8-10% PEG kezelt minták nedvességtartalma kiegyenlített, a mért értékek szignifikáns eltérést nem mutatnak (kék ellipszis), míg a 12-21% PEG tartalmú tápanyagokban nőtt vegetatív micélium minták a kontroll szinttől jelentős mértékű eltérést mutatnak; ezen a csoporton belül (narancssárga ellipszis) azonban az enyhe emelkedő tendencia ellenére szignifikáns eltérést nem mutatkozik (43. ábra).



**43. ábra** *M. steppicola* vegetatív micélium nedvességtartalmának változása a táplódat PEG tartalmának hatására. Az illesztett görbe B-Spline (Origin™ 5.0). A t-próba alapján a kontroll értékekhez (0% PEG tartalom) viszonyított szignifikáns különbségeket ( $t_{0,05}$ )\*-gal jelöltem. A kék és a narancssárga ellipszisek az adatpontok két olyan csoportját foglalják magukba, melyek adatai között nincs szignifikáns különbség.

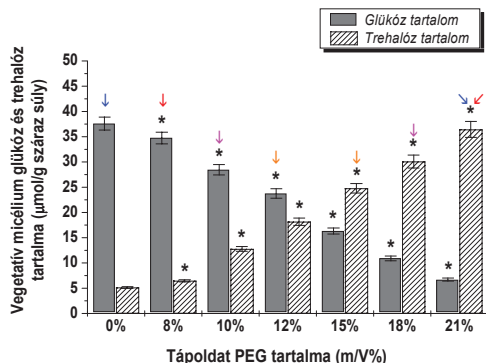
Az eredmények alapján elmondható, hogy a kezelés hatására 12-21% PEG tartalom hatására párhuzamosan egyre fokozódó mértékben tart vissza vizet a vegetatív micélium, a legerősebb stresszhatást jelentő 21% koncentráció melletti maximum értékkel (43. ábra).

Normál körülmények között a vegetatív micéliumot átlagosan 90% körüli nedvességtartalom jellemzi, ezt mutatják a kontroll és a 8-10% PEG kezelt minták (43. ábra). Az egyre fokozódó szárazságstressz situációban a friss súly alakulása és a fokozódó nedvességtartalom arra utal, hogy a vegetatív micélium jelentős mennyiségű vizet tart vissza (42. és 43. ábrák).

A növekvő víztartalommal párhuzamosan növekedett a micélium trehalóz tartalma is (44. ábra). A kontroll tenyészetek szénhidrát-profiljában a glükóz aránya a többi szénhidrátforma mellett magas, míg a szárazságstressz fokozódásával – a bioprotektív trehalóz tartalom növekedése mellett – a glükóz részaránya jelentősen csökkent (44. ábra).

A kontroll körülmények között nevelt tenyészetekre jellemző szénhidrát-profil a stressz fokozódásával megváltozott, az arány az ozmoaktív trehalóz irányába tolódott el a homeosztázis fenntartására irányuló törekvés igényeihez igazodva. A trehalóz tartalom mellett feltehetően más ozmoaktív szénhidrátformák is jelen vannak, úgymint mannóz vagy ramnóz – ezek mennyiségének meghatározására ebben a szárazságstressz-modellkísérletben nem végeztem vizsgálatokat, mivel az előkísérletekben a minták glükóz- és trehalóz

tartalmához mérten az összes többi mono- és diszacharid csupán elhanyagolható mennyiségben volt jelen.

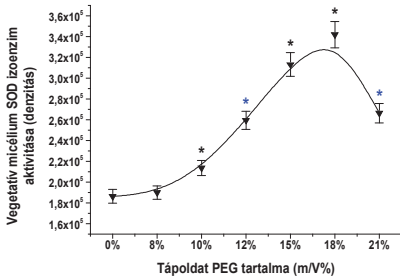


**44. ábra** *M. steppicola* vegetatív micélium glükóz és trehalóz tartalmának alakulása a tápanyag PEG tartalmának függvényében. A *t*-próba alapján a kontroll értékekhez (0% PEG tartalom) viszonyított szignifikáns különbségeket ( $t_{0,05}$ )\*-gal jelöltem. Az adott szénhidrát típusra nézve az összes érték egymástól szignifikáns eltérést mutat. A színes nyilak az érintett adatpontok közötti szignifikáns különbség hiányát jelölik.

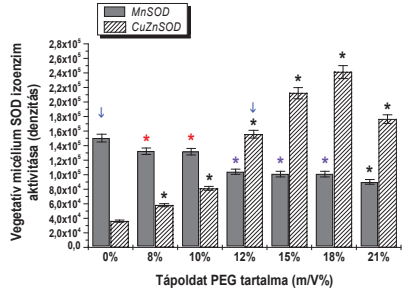
A glükóz- és trehalóz tartalom, a friss súly és a nedvességtartalom alakulása együttesen jól jellemzi az alkalmazott PEG, mint stresszor különböző koncentrációinak hatását *M. steppicola* vegetatív micéliumára, mely adatokat a SOD izoenzimaktivitás változása valamint a MDA tartalom alakulása tesz teljessé, körvonalazva az előidézett stresszállapot mértékét.

A SOD aktivitás a 10% PEG koncentráció alkalmazása mellett már szignifikánsan meghaladja a kontroll értékeket és meredeken emelkedik egészen a 18% PEG tartalmú tápanyagban nevelkedett micéliumban mért értékig, majd jelentős mértékű visszaesést mutat (45. ábra). Az össz-SOD aktivitás mellett érdemes áttekinteni a lokalizáció és élettani szerep szempontjából is elkülönülő két izoforma (MnSOD és CuZnSOD) aktivitásának alakulását a változó PEG koncentráció hatására.

A mitokondriális lokalizációjú MnSOD izoformák aktivitásváltozása fordított tendenciát mutat a döntően citoplazmatikus előfordulású CuZnSOD izoformák aktivitásához mérten (46. ábra). Kontroll körülmények között maximális MnSOD aktivitás tapasztalható. A 8-10% PEG tartalom mellett a MnSOD izoformák aktivitásának kismértékű csökkenése figyelhető meg (46. ábra). 12-18% PEG mellett a MnSOD aktivitás kiegyenlített maradt, majd 21% PEG hatására kismértékben csökkent (46. ábra).

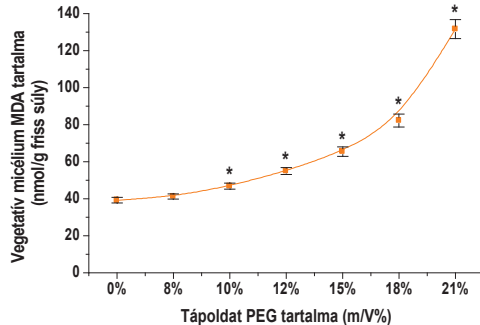


45. ábra *M. steppicola* vegetatív micélium SOD enzimaktivitása változása a tápotlat PEG tartalmának függvényében. Az illetett görbe B-Spline (Origin™ 5.0). A *t*-próba alapján a kontroll értékekhez (0% PEG tartalom) viszonyított szignifikáns különbségeket ( $t_{0,05}$ )\*-gal jelöltem. Kék csillaggal jelöltem azokat az adatpontokat, melyek között nincs szignifikáns különbség.



46. ábra *M. steppicola* vegetatív micélium MnSOD és CuZnSOD izoformáinak aktivitás-változása a tápotlat PEG tartalmának függvényében. A *t*-próba alapján a kontroll értékekhez (0% PEG tartalom) viszonyított szignifikáns különbségeket ( $t_{0,05}$ )\*-gal jelöltem. Piros és lila csillaggal jelöltem azokat az adatpontokat, melyek között nincs szignifikáns különbség. A kék nyilak a két adatsor adatpontjai közötti szignifikáns különbség hiányát jelölik.

A citoplazmatikus lokalizációjú CuZnSOD izoformák alacsony aktivitása jellemző a kontroll és 8-10% PEG tartalmú tápotlatokban, majd a 12-18% PEG tartományban meredek emelkedést mutat, 21% PEG mellett pedig az aktivitás jelentős mértékben csökken (46. ábra).



47. ábra *M. steppicola* vegetatív micélium MDA tartalmának alakulása a tápotlat PEG tartalmának függvényében. Az adatpontokra illetett görbe típusa B-Spline (Origin™ 5.0). A *t*-próba alapján a kontroll értékekhez (0% PEG tartalom) viszonyított szignifikáns különbségeket ( $t_{0,05}$ )\*-gal jelöltem. A 8% PEG adatponttól kezdődően az összes MDA tartalom érték között egymáshoz viszonyítva is szignifikancia áll fenn.



A vegetatív micélium MDA tartalma a PEG alkalmazásával kiváltott szárazságstressz mértékével párhuzamosan, az 47. ábrán látható módon növekedett. 8% PEG koncentráció mellett a micélium MDA tartalma nem tér el szignifikánsan a kontroll értékektől (47. ábra). A 10-15% PEG tartalmú tápoldatokban növekedett tenyészetek MDA tartalma fokozatosan emelkedik, a 15-21% tartományban meredek változást mutat – különösen a 18-21% PEG koncentráció hatására (47. ábra).

A *M. steppicola* tenyészetek MDA tartalmának változása az emelkedő mennyiségű PEG-t tartalmazó tápoldatokban előidézett egyre kedvezőtlenebb ozmotikus viszonyok hatásfokozódását tükrözi.

A kontroll körülmények között mért maximális MnSOD aktivitás az intenzíven működő növekedési és membránátalakító alpanyagcsere-folyamatokkal mutat összefüggést. A 12-21% tartományban a stressz mértékének fokozódásával a MnSOD aktivitás szignifikáns mértékű csökkenése arra utal, hogy a folyamatokban keletkező ROS-al szembeni védelem már nem megoldott a kontroll szinten, a MnSOD védelmi rendszer a felfokozott igénybevétel miatt csökkent aktivitással képes csak működni.

Ezt támasztja alá a glükóz-trehalóz tartalom és a CuZnSOD izoformák aktivitásának változása, melyet kiegészít a tenyészetek pigmentáltságának fokozódása, jelezve, hogy a hangsúly az alpanyagcsere folyamatairól a védelmi rendszer működésének fokozására, másodlagos anyagcseretermékek képződésére helyeződik át.

A CuZnSOD izoformák aktivitás-változása jól jellemzi a citoplazma érintettségét, azaz a stressz mértékének fokozódásával a kedvezőtlen hatások organizmus egészére történő kiterjedését. A 8-10% PEG koncentráció mellett a citoplazma még csak kis mértékben érintett, a nem enzimikus és enzimikus antioxidáns védelmi mechanizmusok képesek mintegy egyensúlyt tartani a stresszhelyzetben, a 12-18% PEG tartományban azonban a CuZnSOD izoformák egyre fokozódó aktivitása hivatott kivédeni a kialakult oxidatív stressz káros hatásait és így biztosítani a micélium homeosztázisának fenntartását (46. ábra).

Az egyre nagyobb mértékű szárazságstressz-hatás az antioxidáns védelmi rendszert jelentős mértékben igénybe veszi, ezt jelzi a 21% PEG tartalom melletti nagymértékű aktivitás csökkenés (46. ábra).

A szárazságstresszre adott élettani válasz részét képező SOD izoenzimek aktivitás-változása jól tükrözi a micéliumot érintő stressz kifejeződését és a tolerancia hátterében meghúzódó egyik nagy hatékonyságú védelmi rendszer, a Foyer-Halliwell-Asada ciklus működését (F5. ábra).

A szárazságstressz kivédésében döntően a citoplazmában lokalizált CuZnSOD izoformák játszanak szerepet, mivel az alkalmazott abiotikus stresszor elsődlegesen a hifák citoplazmájának ozmotikus homeosztázisát érinti (46. ábra).

A 8-12% PEG tartalmú tápoldat a *M. steppicola* vegetatív micéliumban a stressz-szindróma vészreakció és kezdeti ellenállási szakaszát váltja ki, és mivel a micélium rezisztencia-potenciálja lehetővé tette, a 15 és 18% koncentráció-tartományoknál az ellenállás stádiumában maradt. A 21% PEG-t tartalmazó tápoldatokban nőtt micélium SOD izoenzimek által képviselt védelmi rendszerének a stressz-szindróma kimerülési fázisára jellemző jelentős aktivitás-csökkenése tapasztalható.

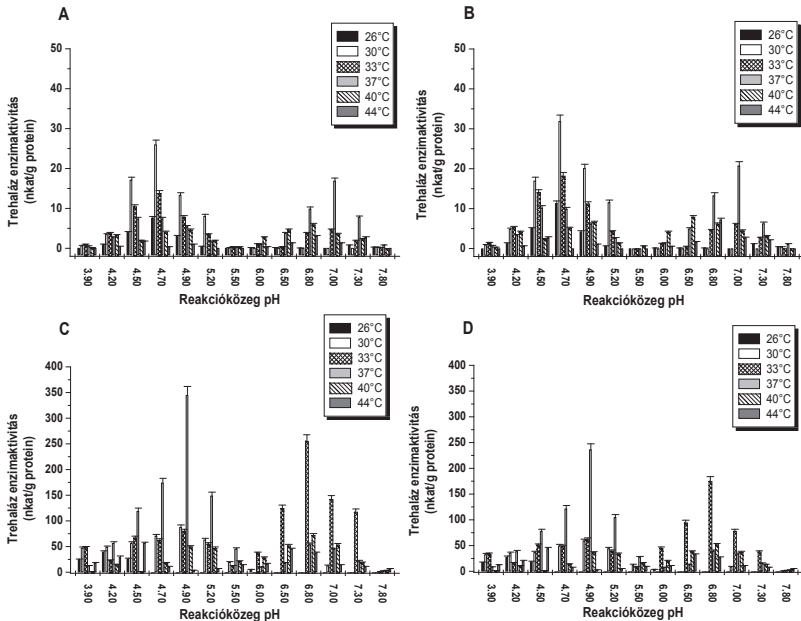
A stressz-szindróma egyes fázisait emeli ki a vegetatív micéliumban mért MDA tartalom alakulása is, jól érzékeltetve a stresszor egyre fokozódó hatását, kirajzolva a károsodás mértékét.

A *Morchella steppicola* szárazságstressz-tűrőképességére irányuló vizsgálati eredmények alapján - összhangban a természetben előfordulásával - szárazságstresszel szemben toleráns fajnak bizonyult. A száraz élőhelyekhez való sikeres adaptációban az egyik fő irányt jelenti a bioaktív molekulák akkumulációja. A lehetséges stressztűrési stratégiák közül az ozmoaktív trehalóz felhalmozása jellemzi ezt a fajt. A folyamat fokozott stressz-szituációban is hatékonyan működik – ez biztosítja a gomba számára a túlélést a sokszor szélsőségesen száraz élőhelyeken is.

## II. Növényi minták vizsgálata

A növényi minták trehaláz enzimaktivitás változásának vizsgálata előtt meghatároztam az egyes izoforma-csoportok hőmérsékleti és pH optimumát a gyökér- és levélmintákban, valamint az egyivarú barkavirágzatok nyers kivonatában egyaránt. Az egyes növényi részekben a trehaláz izoenzim aktivitás hőmérséklet és pH függése a 48. ábrán látható módon alakult: gyökér és levélminták esetén savas izoformák  $pH_{opt}=4.70$ ,  $T_{opt}=30^{\circ}C$ , neutrális izoformák  $pH_{opt}=7.00$ ,  $T_{opt}=37^{\circ}C$ , míg a porzós és termős barkavirágzatokban a savas izoformák  $pH_{opt}=4.90$ ,  $T_{opt}=37^{\circ}C$ , a neutrális izoformák  $pH_{opt}=6.80$ ,  $T_{opt}=33^{\circ}C$ .

A *Populus glauca* L. var *Kopeczkii* gyökér és levélmintáinak, illetve a *Populus canescens* porzós és termős barkavirágzatainak trehaláz enzimaktivitása jelentős mértékű eltérést mutat (48. ábra).



**48. ábra** *Populus glauca* L. var *Kopeczkii* és *Populus canescens* trehaláz izoenzim aktivitás hőmérsékleti és pH optimumának meghatározása *P. glauca* L. var *Kopeczkii* gyökér (A) és levélmintáiban (B), valamint *P. canescens* érett, virágzás fenológiai fázisában (F4) lévő porzós (C) és termős (D) barkavirágzatában.

Az F4 fenológiai fázisú reproduktív szervekben optimális hőmérsékleten és pH-n mért savas izoformák aktivitási értékei – ♀:  $236.06 \pm 9.75$  és ♂:  $344.65 \pm 14.16$  nkat/g protein – több mint tíz illetve tizenötszörösei a gyökérmintákban mért  $21.03 \pm 0.81$  nkat/g protein értéknek (48. ábra). A kifejlett levelek  $31.86 \pm 1.17$  nkat/g protein savas trehaláz enzimaktivitása a gyökerekre jellemző szintet  $34 \pm 5$  százalékkal haladja meg (48. ábra).

A neutrális trehaláz izoformák aktivitása esetén hasonló kép tárul elénk: a gyökérmintákban jellemző  $13.91 \pm 0.48$  legalacsonyabb értéknek több mint tizenkét illetve tizennyolcszorosai a barkavirágzatokban mért enzimaktivitások (♀:  $174.82_5 \pm 6.57$  és ♂:  $255.24_5 \pm 9.62$ ), a levelek  $20.76 \pm 0.76$  neutrális trehaláz enzimaktivitása pedig  $33 \pm 5$  százalékkal haladja meg a gyökérzetét (48. ábra).

*Populus canescens* levelek trehaláz izoenzim  $pH_{opt}$  és  $T_{opt}$  értékeit is meghatároztam, melyek a *P. glauca* L. var *Kopeczkii* levél trehaláz izoformák esetén mért értékekkel azonosnak bizonyultak.

A két *Populus* faj vegetatív és generatív növényi szerveiben a trehaláz izoenzim aktivitások szignifikáns mértékű eltérése összhangban áll Müller és mtsai (2001) *Arabidopsis thaliana* növényekkel végzett kísérletének eredményeivel, miszerint a vegetatív szervekben 50 nkat/g protein alatti-, míg a reprodukzív növényi részekben jelentős mértékben magasabb – 150-300 nkat/g protein és azt meghaladó aktivitás értékeket tapasztaltak.

A trehaláz izoenzim aktivitás vegetatív és generatív növényi részekben mutatkozó jelentős mértékű eltéréseinek hátterében a növényi trehaláz anyagcsere sajátosságai húzódnak meg. A trehaláz szintézis TPS/TPP enzimszisztéma izoformái a trehaláz izoenzimekkel együttesen alakítják a T6P és a trehaláz sejtbéli koncentrációját, ezáltal alapvető befolyással bírnak a növények fejlődési folyamataira éppúgy, mint a stresszhatásokra adott válaszaikra (Schleupmann és Paul 2009).

A T6P és a trehaláz hatásai különböző targetek révén érvényesülnek. A T6P központi fontosságú szabályozó molekula, szerepe a fotoszintézisben, a szénhidrát-anyagcserében, a növekedés és fejlődés folyamataiban jól ismert (Paul és mtsai 2008, Iturriaga és mtsai 2009, Schleupmann és Paul 2009, Smeekens és mtsai 2010).

*Arabidopsis* növényekkel Müller és mtsai (2001) által elvégzett vizsgálatok eredményei alapján feltételezhető a trehaláz izoenzim szerepe a reprodukciós folyamatokban: a virágokban és különösen a pollent tartalmazó portokokban (~700 nkat/g protein) tapasztaltak kiemelkedő mértékű aktivitást.

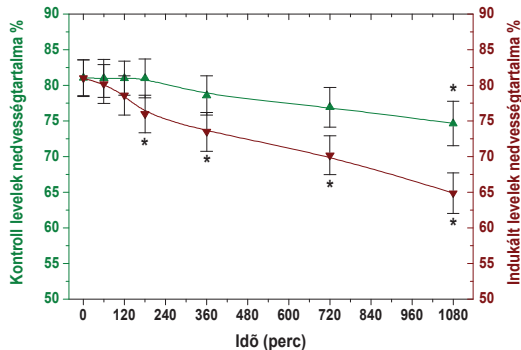
Gázkromatográfiás eljárások alkalmazásával sikerült a fiziológiás trehaláz mennyiségét meghatározni: *A. thaliana* vegetatív részeiben átlagosan 35 ng/g száraz súly, a virágokban >100 ng/g száraz súly trehaláz tartalom jellemző (Schleupmann és Paul 2009).

A szakirodalomban fellelhető, az előzőekben összefoglalt tudományos eredmények alapján összhangban a saját eredményeimmel joggal feltételezhető, hogy a *Populus* fajok barkavirágzatában a jelentős mértékű trehaláz enzimaktivitás egyfelől a virágrészek fejlődésében-érésében betöltött szerepére utal, másfelől pedig a generatív részek vélhetően magas trehaláz tartalmával hivatott fiziológiás egyensúlyt tartani.

A levelekben mért trehaláz izoenzim aktivitás a fotoszintézis és a szénhidrát-anyagcsere szabályozásával, továbbá a levélfejlődés folyamataival mutat összefüggést. A gyökerekben tapasztalható kismértékű trehaláz enzimaktivitás elsősorban a természetben a talajlakó mikroorganizmusok által termelt trehaláz bontásában, valamint a mikorrhiza kapcsolat kialakulásában játszhat szerepet.

#### 5.4. Trehaláz izoenzim-indukció *P. glauca* L. var *Kopeczkii* kifejlett leveleiben

A mikroszaporított *P. glauca* L. var *Kopeczkii* növények 5. levélemeletéről származó kifejlett, fiatal levelekben vizsgáltam a  $\frac{1}{4}$  Hoagland tápoldatban külsőleg adott trehalóz időbeli hatását a levelek egyes élettani paramétereire és trehaláz enzimaktivitásra. Trehalóz hatására a levelek nedvességtartalmában a kontroll mintákhoz képest 3 óra (180 perc) inkubációs időt követően már jelentős, majd a 6-18 órás (360-1080 perc) időintervallumban egyre fokozódó mértékű eltérés tapasztalható (49. ábra).



49. ábra *Populus glauca* L. var *Kopeczkii* excizált leveleinek nedvességtartalom-változása. A kísérleti összeállításban alkalmazott megnevezések: kontroll levelek –  $\frac{1}{4}$  Hoagland-, indukált levelek – trehalózt tartalmazó  $\frac{1}{4}$  Hoagland tápoldatban inkubált levelek. Az adatpontokra illesztett görbék típusa B-Spline (Origin<sup>TM</sup> 5.0). A t-próba alapján az adatpontok kiinduló értékekhez (0 perc) viszonyított szignifikáns eltéréseit ( $t_{0,05}$ )\*-gal jelöltem.

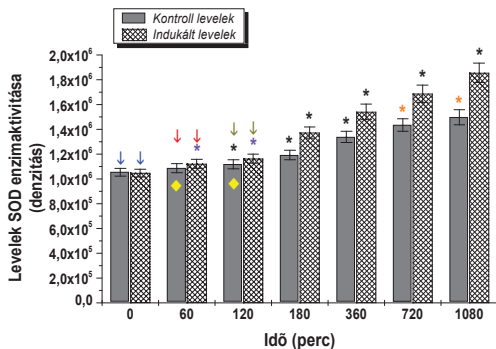
Kontroll levelekben a kiindulási értékekhez viszonyítva csupán 18 óra inkubáció hatására figyelhető meg szignifikáns nedvességtartalom csökkenés (49. ábra).

A tápoldat trehalóz tartalmának hatása a SOD enzimaktivitás alakulásában is tükröződik, a kiinduló értékekhez képest már 1 óra elteltével jelentős mértékű aktivásemelkedés tapasztalható (50. ábra). Az indukált levelekben az 1 és 2 óras (60 és 120 perc) időintervallumban további jelentős mértékű változás nem következett be, majd 3 óra után a SOD izoenzimek aktivitása meredek emelkedést mutat (50. ábra).

A párhuzamos kontroll levélmintákban, az indukált levelekben tapasztaltakhoz hasonlóan a SOD aktivitási értékekben 1 és 2 óra inkubációt követően szignifikáns különbség nem adódott (50. ábra).

A SOD enzimaktivitás 2 óra elteltével kismértékű, szignifikáns eltérést mutat, majd a 3-12 órás (180-720 perc) időintervallumon belül tapasztalható fokozott emelkedést követően a 12-18 óra (720-1080 perc) inkubáció hatására ismét kiegyenlített (50. ábra).

Az inkubáció első két órája során a kontroll és trehalóz tartalmú tápoldatban inkubált párhuzamos levélminták SOD enzimaktivitásában szignifikáns eltérés nem tapasztalható (50. ábra).

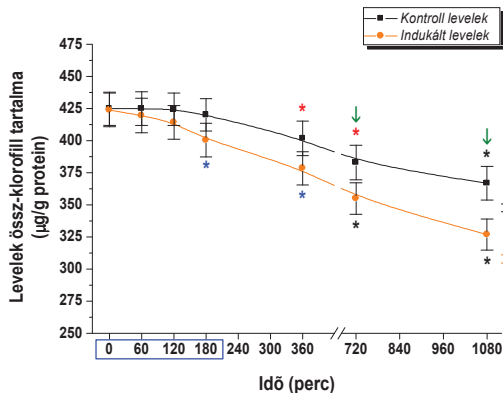


**50. ábra** *Populus glauca* L. var *Kopeczkii* levelek SOD enzimaktivitásának időbeli változása 18 óra (1080 perc) inkubációs időintervallumban. A kontroll leveleket trehalóz-mentes-, az indukált leveleket trehalózt tartalmazó tápoldatban inkubáltam. A *t*-próba alapján az adatpontok kiinduló értékekhez (0 perc) viszonyított szignifikáns eltéréstét ( $t_{0,05}$ ) \* -gal jelöltem. A lila és narancssárga csillagok, valamint a citromsárga rombuszok azokat az egy adatsorhoz tartozó adatpontokat jelölik, melyek között szignifikáns különbség nem áll fenn. Színes nyilakkal jelöltem a párhuzamos adatsorok azon adatpárjait, melyek nem térnek el szignifikáns mértékben egymástól.

A Chl tartalom alakulása a levelek nedvességtartalmában és SOD aktivitásában bekövetkező változásokkal összhangban jelentős mértékű eltérést mutat a 18 órás inkubáció során. 3 óra inkubációt követően a trehalóz tartalmú tápoldatokból származó mintákban már megfigyelhető a Chl-tartalom csökkenése, melynek mértéke a 3-18 óra inkubáció során tovább fokozódott (51. ábra).

A kontroll körülmények között tartott levelek Chl-tartalmában szignifikáns eltérés az első 3 órában nem tapasztalható, jelentős változás 6 óra inkubációt követően figyelhető meg, majd a 6-18 óra időintervallumban további csökkenés jellemző (51. ábra).

Az inkubációs periódus kezdetén (0-180 perc) a kontroll körülmények között és trehalózt tartalmazó tápoldatban tartott párhuzamos levélminták össz-Chl tartalmában szignifikáns eltérés nem tapasztalható (51. ábra).



**51. ábra** *Populus glauca L. var. Kopeczkii* levelek össz-klorofill tartalmának alakulása 18 óra (1080 perc) inkubációs időintervallumban. Az inkubáció során trehalóz-mentes (kontroll levelek) és trehalózt tartalmazó (indukált levelek) tápoldatot alkalmaztam. A *t*-próba alapján az adatpontok kiinduló értékekhez (0 perc) viszonyított szignifikáns eltérését ( $t_{0,05}$ ) \* -gal jelöltem. Piros, kék csillagokkal és olivazöld nyilakkal jelöltem azokat az egy adatsorhoz tartozó értékpárokat melyek szignifikáns mértékben nem térnek el egymástól. Az *x* tengelyen kék kerettel jelölt időintervallumban a kontroll és az indukált levelek (páronként összehasonlítva) össz-klorofill tartalmukban szignifikáns eltérést nem mutattak.

A *P. glauca L. var. Kopeczkii* levelek tápoldatban történő inkubációjának első két órájában (0-120 perc) a levelek nedvesség- és Chl-tartalma jelentős eltérést nem mutat, a SOD izoenzim-aktivitás kismértékű, de szignifikáns emelkedése mellett (49., 50. és 51. ábrák). A SOD izoenzimek aktivitása már az enyhe stresszhatásokra is érzékenyen reagál, így természetes, hogy fokozódása megelőzi a levelek Chl tartalmának szignifikáns változását.

A leválasztott levelek trehalóz-mentes tápoldatban történő inkubációja során 2 óra elteltével már enyhe, majd a 3-18 órás (180-1080 perc) időintervallumban egyre fokozódó stresszhelyzet alakul ki, melyet a SOD aktivitás növekedése mellett a 6 óra (360 perc) elteltével megfigyelhető jelentős mértékű Chl-tartalom csökkenés jól szemléltet (50. és 51. ábrák).

A kontroll levelek Chl tartalmának csökkenése a 6-18 órás (360-1080 perc) inkubációs periódusban kevésbé fokozott, mint a trehalózt tartalmazó tápoldatokból származó mintákban, erre utal az egymást követő adatpontok közötti szignifikáns eltérés hiánya (51. ábra).

A levelek nedvességtartalmában bekövetkező jelentős mértékű változást a trehalóz tartalmú tápoldatban inkubált levelekben tapasztaltam, mely arra utal, hogy a trehalóz jelen esetben, mint ozmotikus stresszor számottevő hatást gyakorol a levelek vízállapotára, mintegy szárazságstressz helyzetet idézve elő (49. ábra).

A növényeket érő különféle stresszhatások, így az ozmotikus állapotot érintő kedvezőtlen behatások következtében jellemzően oxidatív stresszhelyzet is kialakul: a ROS sejtbéli koncentrációja  $\uparrow$ , ezzel a celluláris antioxidáns védelmi rendszer már nem tud fiziológiás szinten egyensúlyt tartani – ez végső soron a károsodások közvetlen oka. Ezzel összhangban áll a SOD enzimaktivitás fokozott mértékű emelkedése és a Chl tartalom nagymértékű csökkenése (50. és 51. ábrák).

A kontroll levelek Chl tartalmának csökkenése a szenescencia (öregedés) jelenségével magyarázható, a levágott levelek a jelenség vizsgálatának átlánosan alkalmazott modelljei.

A Chl degardációja meghatározó a levelek öregedési folyamataiban, szerepet játszik a nitrogén körforgalomban és nem utolsó sorban védelmet biztosít a növények számára a fototoxikus köztitermékek felszaporodásának megakadályozásával (Eckardt 2009). A Chl lebontása többlépcsős folyamat, melynek kezdeti lépései a központi Mg atom és a fitol oldallánc eltávolítása, aminek köszönhetően a további termékek vízőldékonysága megnő (Schelbert és mtsai 2009). A Chl degradáció folyamatában általánosan elfogadott a klorofilláz enzim szerepe, mely a Chl  $\longrightarrow$  Chlid átalakulást katalizálja (fitol oldallánc lehasítása), ekkor a Chlid a feoforbid képződés köztes molekulája.

A közelmúltban napvilágott látott számos tudományos eredmény, melyek megkérdőjelezzik a klorofilláz enzimek szerepét a levelek öregedési folyamataiban. *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. vad típusú és mutáns növényekkel végzett vizsgálatok rávilágítottak, hogy a klorofilláz enzim nem található meg a kloroplasztiszokban, ugyanakkor az enzimre nézve hiánymutáns növények is mutatják a szenescencia jelenségét (Schenk és mtsai 2007, Schelbert és mtsai 2009).

A levelek öregedésekor a Chl eltávolítódik a tilakoid membránból és a lebontás során képződő szintelen termékek a vakuolomokba szállítódnak (Schelbert és mtsai 2009). Schelbert és mtsai azonosítottak egy kloroplasztiszban lokalizált és szenescencia-indukált enzimet, a hidrolázok közé tartozó feofitinázt, melynek közreműködésével feoforbid képződik a lúdfű leveleinek öregedése során (Schelbert és mtsai 2009). A központi Mg atom eltávolítása megelőzi a fitol oldallánc lehasítását, így az új tudományos eredmények



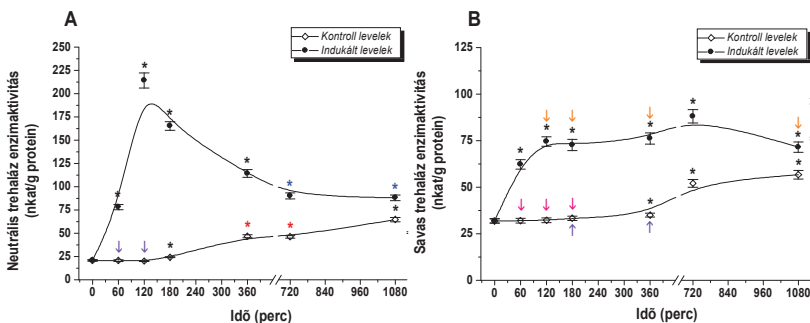
fényében a Chl lebontásának kezdeti lépései a következőképpen alakulnak (Schelbert és mtsai 2009):



Mindezek alapján a *P. glauca L. var Koepeczkii* kontroll leveleiben a Chl lebontásában feltehetően szintén a Schelbert és mtsai (2009) által leírt feofitínáz enzim működik közre. Az indukált levelekben az öregedési folyamathoz társul a trehalóz ozmotikus hatása, ami a kontroll mintákban tapasztalt változásokhoz képest jelentős mértékben felgyorsította a lebontó folyamatok aktiválódását, a pigmentek lebomlását. Az indukált levelekben a Chl bontásában a kialakult stresszhelyzet következtében vélhetően a feofitínáz és klorofilláz enzimek együttesen vesznek részt (Schelbert és mtsai 2009, Saha és mtsai 2010).

A tápoldat trehalóz tartalmának hatására a levelek trehaláz izoenzim-aktivitásának alakulását az 52. ábrán követhetjük végig. A neutrális izoformák aktivitása a 18 órás inkubációs periódusban az indukált levelekben meredek aktivitásemelkedést követően határozott maximum értéket mutat 2 óránál, majd elnyújtott lecsengés jellemző a párhuzamos kontroll értéket közelítve (52. ábra).

A kontroll levelekben a neutrális trehaláz aktivitás kezdetben kiegyenlített, majd kismértékű és fokozatos emelkedés tapasztalható 3 óra inkubációt követően, mely során 6 és 12 óránál szignifikáns eltérés nem tapasztalható (52. ábra).



**52. ábra** *Populus glauca L. var Koepeczkii* neutrális (A) és savas (B) trehaláz izoenzim-aktivitásának alakulása excizált levelekben. A kísérleti összeállításban alkalmazott megnevezések: kontroll levelek – ¼ Hoagland-, indukált levelek – trehalózt tartalmazó ¼ Hoagland tápoldatban inkubált levelek. Az adatpontokra illesztett görbék típusa B-Spline (Origin™ 5.0). A t-próba alapján az adatpontok kiinduló értékekhez (0 perc) viszonyított szignifikáns eltérést ( $t_{0,05}$ ) \*-gal jelöltem. A színes csillagok és nyilak azokat az adatokat jelölik melyek között szignifikáns eltérés nem áll fenn.

A savas trehaláz izoformák esetében az indukált levelekben ettől eltérő tendencia figyelhető meg: egy kezdeti, az első két órában bekövetkező meredekebb emelkedést követően az aktivitás 2-6 óra között jelentős mértékben nem változik, majd 12 óra inkubációig további enyhe emelkedést mutat, és 18 óra múltán az aktivitás visszaesése tapasztalható (52. ábra). A kontroll levelekben a savas trehaláz izoenzim-aktivitás kezdetben kiegyenlített, jelentős mértékben először 6 óra inkubációt követően tér el a kiinduló értéktől (52. ábra).

A trehaláz enzimaktivitás alakulása a levelekben lokalizált izoformákra a trehalóz induktív hatását támasztja alá. A trehaláz enzimaktivitás alakulásának figyelemre méltó vonása a különböző izoformák aktivitásában mutatkozó jelentős eltérés – mely a tendenciában éppúgy megjelenik, mint az aktivitási értékekben. A neutrális trehaláz enzimaktivitás 1 óra inkubációt követően már jelentős mértékben fokozódott – a kiindulási érték 4-szeresére, a maximális aktivitás pedig a kiinduló érték több mint 10-szerese (52. ábra). Az indukált levelek savas trehaláz enzimaktivitása összességében sokkal kisebb mértékben változott, mint a neutrális trehaláz izoformáké, a 2-3 órás intervallumban szignifikáns eltérést nem tapasztaltam (52. ábra).

A trehalóz anyagcserében közreműködő trehaláz izoenzimek stressz-induktív sajátosága jól ismert (Nwaka és Holzer 1998, Zähringer és mtsai 2000, Garre és mtsai 2009). A kezelt minták esetében az első három órában a trehalóz induktív hatása érvényesült döntő mértékben, ezt követően azonban már a trehaláz izoformák stressz hatására valamint az öregedési folyamatokkal összefüggésben bekövetkező aktivitás-változásával is számolnunk kell (52. ábra). A kontroll levelekben bekövetkező statisztikailag számottevő mértékű változás az excizált levelekben zajló öregedési folyamatokkal hozható kapcsolatba (52. ábra).

A trehalóz induktív hatása feltételezi a trehalóz levelekbe jutását a levélnyélén át. A trehalóz több sejten belüli kompartmentben megtalálható, a transzport folyamata azonban részleteiben nem felderített (Schluepmann és Paul 2009). Feltételezhető, hogy módosítatlan formában szállítódik, a szacharózhoz és más egyszerű molekulákhoz hasonlóan. A trehalóz hatással van a szénvegyületek transzportjára: *Arabidopsis* csíránövények trehalóz táplálása megváltoztatta a szénvegyületek eloszlását, és a sziklevelekben valamint a levelekben erőteljes keményítő akkumulációt eredményezett. Az exogén trehalóz hatására T6P akkumuláció figyelhető meg, melynek sokrétű hatása érvényesül a növekedésben, a

fejlődésben és a szénhidrát-anyagszere szabályozásában egyaránt (Paul és mtsai 2008, Iturriaga és mtsai 2009, Schluepmann és Paul 2009, Smeekens és mtsai 2010).

Összességében elmondható, hogy a tápoldat trehalóz tartalma indukálta a *P. glauca L. var Kopeczkii* levelek trehaláz izoenzim-aktivitását, emellett azonban, mint ozmotikus stresszor is számottevő hatást gyakorolt. A trehaláz enzimaktivitás változása mindkét izoformatípus esetén megfigyelhető. Az excizált, kontroll körülmények között tartott *P. glauca L. var Kopeczkii* levelek a 18 óra inkubációs periódus alatt a szeneszcencia jelenségét mutatták. Trehalóz hatására a levelek öregedésével összefüggő lebontó folyamatok az inkubált levelekben fokozott mértékben jutottak érvényre.

### 5.5. Biotikus stressz *P. glauca L. var Kopeczkii* növényekre gyakorolt hatásának vizsgálata

Az élő organizmusokra ható stresszhelyzetek között egyaránt széleskörben vizsgált az abiotikus-, és az élővilág kölcsönhatásai során kialakuló biotikus stresszhelyzet.

A biotikus stressz tárgykörébe tartoznak a növényi kártevők által előidézett hatások, mint a jelen kísérleti összeállításban alkalmazott *Tetranychus urticae* Koch (közönséges vagy kétfoltos takácsatka) kártétele (53. ábra).

<u>Törzs</u>	<b>Arthropoda</b>	<b>Ízeltlábúak</b>
<u>Altörzs</u>	Chelicerata	Csápárgósok
<u>Osztály</u>	<b>Arachnida</b>	<b>Pókszabásúak</b>
<u>Alosztály</u>	Acari	Atkák
<u>Öregrend</u>	<b>Acariformes</b>	<b>Valódi atkák</b>
<u>Rend</u>	Trombidiformes	Bársonyatka-alakúak
<u>Alrend</u>	Prostigmata	Előllégnylásos atkák
<u>Öregcsalád</u>	Tetranychoidae	Takácsatkaszerűek
<u>Család</u>	<b>Tetranychidae</b>	<b>Takácsatkafélek</b>
<u>Nemzettség</u>	Tetranychus	Takácsatkák
<u>Faj</u>	<i>Tetranychus urticae</i> Koch	<i>Kétfoltos takácsatka</i>

53. ábra *Tetranychus urticae* – kétfoltos takácsatka taxonómiai besorolása.

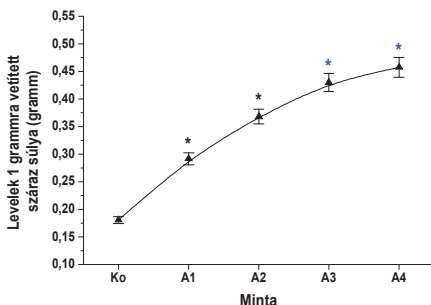
Az apró termetű, szűrő-szívó szájszervvel rendelkező *T. urticae* széleskörben elterjedt, polifág – azaz széles tápnövénykörrrel jellemezhető, a környezeti paraméterekkel szemben tág tűrőképességű levélfonákon táplálkozó növényi kártevő. A levelek párologtatásában a számtalan apró szúrásnyom hatására zavar keletkezik. Kezdetben a levelek márványozottá válnak, a fertőzés elhatalmasodásakor pedig lehullanak, sok esetben teljes defoliáció következik be, mely előidézhetheti a teljes növény pusztulását.

A biotikus stresszor, jelen esetben fitofág kártevő növényen történő megjelenését követő kártételének kezdetén a stresszhatás csupán lokálisan, a károsodást szenvedett szövetterület közvetlen közelében érinti a sejtek anyagcseréjét, majd a kártevő elterjedésével, az okozott károk mértékének fokozódásával és a növény védelmi rendszerének aktiválódása következtében hatása az egész növényre kiterjed. A növényi nedvek szívogatása következtében lényeges anyagcsere változások lépnek fel: a meglévő metabolikus hálózat működésének módosulása mellett indukált génműködéssel összefüggő alternatív biokémiai útvonalak aktiválódnak.

A *P. glauca* L. var *Kopeczkii* levelek fiziológiás nedvességtartalma *T. urticae* biotikus stresszor hatására a fertőzés elhatalmasodásával párhuzamosan jelentős mértékben csökkent, melyet a levelek száraz súlyának alakulása jól szemléltet (54. ábra).

A kontroll levelekhez viszonyítva már a kezdetektől (A<sub>1</sub> minta) szignifikáns eltérés tapasztalható, majd a fertőzés mértékének fokozódásával párhuzamosan a nedvességtartalom további csökkenése jellemző (54. ábra).

A változás üteme az A<sub>1</sub>–A<sub>4</sub> irányban egyre lassul, az A<sub>3</sub>–A<sub>4</sub> minták értékei között már szignifikáns különbség nem áll fenn (54. ábra). A meghatározott száraz súly adatokhoz tartozó százalékos nedvességtartalom értékeket a 14. táblázatban foglaltam össze.

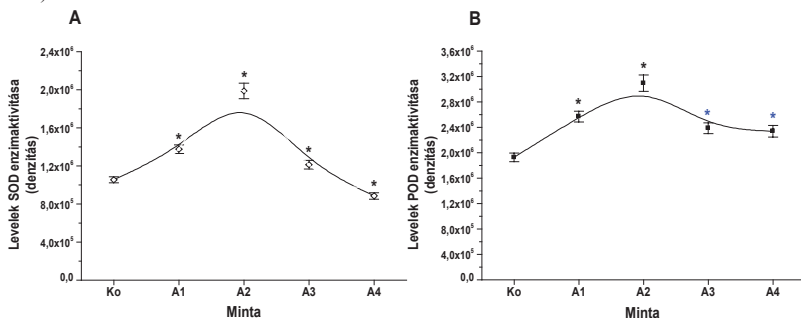


Minta	Levelek átlagos nedvességtartalma	
	%	± SD
Ko	81.94	± 2.87
A1	70.85	± 2.62
A2	63.19	± 2.27 <sub>5</sub>
A3	57.03	± 2.15
A4	54.27	± 2.11

**54. ábra** *Populus glauca* L. var *Kopeczkii* levelek száraz súlyának alakulása *T. urticae* fertőzés okozta biotikus stressz-helyzetben. Az illesztett B-Spline görbe kiemeli a tendenciát (Origin™ 5.0). A t-próba alapján az adatpontok kontroll értékekhez viszonyított szignifikáns elterését ( $t_{0,05}$ ) \* -gal jelöltem. Kék csillaggal jelöltem azokat az adatpontokat melyek között szignifikáns különbség nem áll fenn.

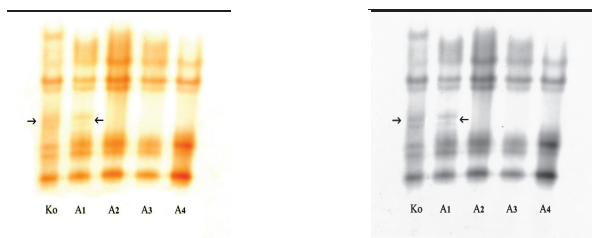
**14. táblázat** *Populus glauca* L. var *Kopeczkii* levelek átlagos nedvességtartalmának alakulása *T. urticae* fertőzés során. Az kontroll érték és az A<sub>1</sub>–A<sub>4</sub> adatsor értékei, valamint az adatsor minden tagja között egyaránt szignifikáns eltérés ( $t_{0,05}$ ) áll fenn.

A SOD enzimaktivitás az A<sub>1</sub> levélmintákban jelentős mértékben megemelkedett, majd további aktivitás-fokozódást követően az A<sub>2</sub> mintákban mutat maximum értéket (55.A. ábra). A *T. urticae* kártételének köszönhetően az A<sub>3</sub> mintákban a SOD aktivitás szignifikáns visszaesése tapasztalható, amely tendencia az A<sub>4</sub> levelek esetén tovább folytatódik (55.A. ábra).



**55. ábra** *Populus glauca L. var. Kopeczkii* levelek SOD (A) és POD (B) enzimaktivitásának változása *T. urticae* fertőzés kiváltotta biotikus stressz-szindrómában. Az illetett görbék típusa: B-Spline (Origin™ 5.0). A *t*-próba alapján az adatpontok kontroll értékekhez viszonyított szignifikáns elérését ( $t_{0,05}$ )-gal jelöltem. Kék csillaggal jelöltem azokat az adatpontokat melyek között szignifikáns különbség nem áll fenn.

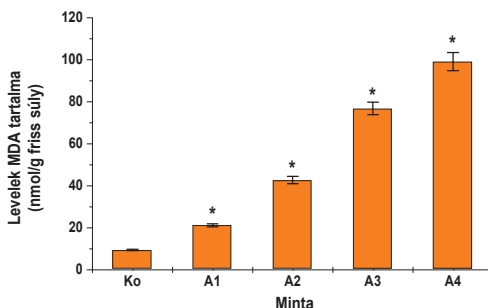
Az összesített POD enzimaktivitás meredek emelkedése tapasztalható a kontroll értékektől az A<sub>2</sub> fertőzöttségi szintig, ezt követően az A<sub>3</sub> levélmintákban jelentős mértékű visszaesést mutat – az aktivitás az A<sub>1</sub> levelekben mért értékek szintje alá csökken, majd az A<sub>4</sub> mintákban további szignifikáns változás nem következik be (55.B. ábra).



**56. ábra** *Populus glauca L. var. Kopeczkii* mikroszaporított növények levelében mérhető POD aktivitási mintázat *T. urticae* által előidézett biotikus stresszhelyzetben. Az A1-A4 a fertőzött növényi mintákat jelöli, ahol a számok rendre a tünetegyüttes fokozódását tükrözik. A nyílak a csupán a kontroll és a fertőzés kezdeti (A1) stádiumában megfigyelhető POD izoformákat jelzik. Az aktív izoformákat 10%-os PAGE elválasztással szeparáltam és pozitív aktivitási festéssel (o-dianizidin) tettem láthatóvá. A színes és a fekete-fehér kép ugyanarról a géllapról készült.

Az összesített POD aktivitásban az izoformák eltérő részaránya jellemző (56. ábra). A gélképen jól látható, hogy a kontroll és A<sub>1</sub> levélminták POD izoforma-profilja egyértelműen eltér az A<sub>2</sub>–A<sub>4</sub> minták esetén tapasztalt képtől, két POD sáv jelenléte figyelhető meg (⇒ ⇐), melyek a kártétel fokozódása során eltűnnek (56. ábra).

A MDA tartalom a biotikus stresszhatás fokozódásával párhuzamosan jelentős mértékű emelkedést mutat (57. ábra).



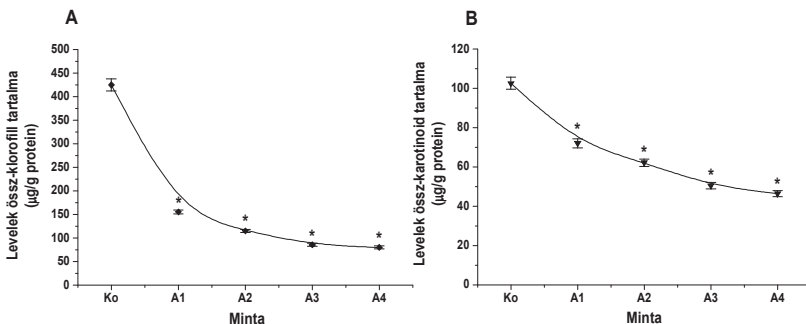
57. ábra *Populus glauca* L. var *Kopeckii* levelek MDA tartalmának változása *T. urticae* károsító hatásának következtében. A *t*-próba alapján az adatpontok kontroll értékekhez viszonyított szignifikáns eltéréseit ( $t_{0,05}$ )\*-gal jelöltem.

A *Populus glauca* L. var *Kopeckii* levelek Chl tartalma *T. urticae* fertőzés hatására jelentős mértékű változást mutat (15. táblázat, 58.A. ábra). A fertőzés kezdetén (K<sub>0</sub>–A<sub>1</sub>) tapasztalt drasztikus csökkenést követően az atkák terjedésével az A<sub>1</sub> és A<sub>2</sub> levélmintákban a Chl<sub>a</sub> és Chl<sub>b</sub> mennyisége egyaránt közel azonos mértékben – 26%-kal csökkent, erre utalnak a Chl<sub>a</sub>/Chl<sub>b</sub> arány szignifikancia szinten belüli értékei is (15. táblázat).

Minta	Chl <sub>a</sub>		Chl <sub>b</sub>		Chl <sub>a</sub> /Chl <sub>b</sub>	
	µg/g protein	± SD	µg/g protein	± SD	µg/g protein	± SD
Ko	332.43	± 10.30 <sub>3</sub>	92.45	± 2.87	3.596	± 0.111
A1	111.83 *	± 2.94	43.62 *	± 1.15	2.563 *	± 0.067
A2	82.65 *	± 2.04	32.29 *	± 0.80	2.560 *	± 0.063
A3	57.84 *	± 2.20	27.81 *	± 1.06	2.080 *	± 0.080
A4	52.26 *	± 2.09	27.74 *	± 1.11	1.884 *	± 0.075

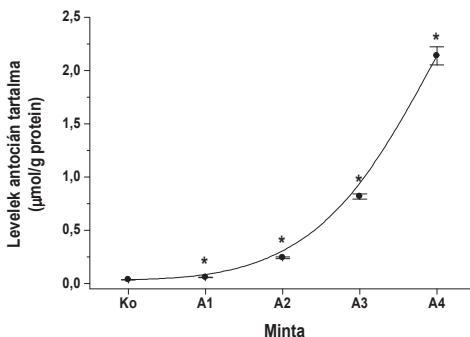
15. táblázat *Populus glauca* L. var *Kopeckii* levelek klorofill-a-, klorofill-b tartalmának és chl<sub>a</sub>/chl<sub>b</sub> arányának változása *T. urticae* atkafertőzés hatására. Az adatsorok kontroll értékekhez viszonyított szignifikáns eltéréseit ( $t_{0,05}$ )\*-gal jelöltem. Az egyes adatok közötti szignifikáns eltérés hiányát a számkarakterek kék illetve piros színe jelzi.

Az A<sub>3</sub>–A<sub>4</sub> mintákban mért értékek összehasonlítása alapján elmondható, hogy szignifikáns Chl<sub>a</sub> csökkenés mellett a Chl<sub>b</sub> tartalom nem változott jelentős mértékben (15. táblázat). Az össz-Chl tartalom változásában a legnagyobb mértékű csökkenés a kontroll – A<sub>1</sub> állapot között tapasztalható, ezt követően kisebb mértékű, fokozatos csökkenés jellemző (58.A. ábra).



**58. ábra** *Populus glauca* L. var. *Kopeczkii* levelek össz-klorofill (A) és össz-karotinoid (B) tartalmának változása *T. urticae* biotikus stresszor hatására. Az tendenciát kiemelik az illesztett *B-Spline* görbék (*Origin*<sup>TM</sup> 5.0). A *t*-próba alapján az adatpontok kontroll értékekhez viszonyított szignifikáns eltérését ( $t_{0,05}$ )\*-gal jelöltem. Az egyes adatpontok szignifikáns mértékben eltérnek egymástól.

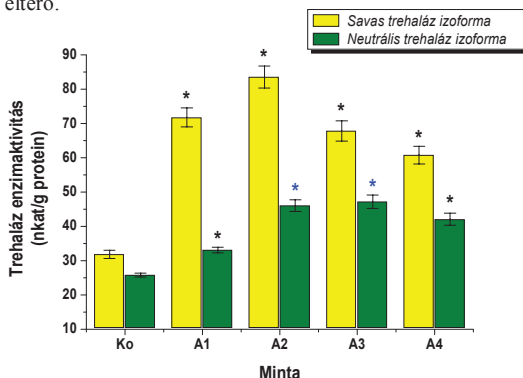
A Chl<sub>ok</sub> mennyiségi változásához viszonyítva az össz-karotinoid tartalom kisebb mértékben csökkent *T. urticae* kártételének hatására, a tendencia fokozatos, kiegyenlített változást mutat, hiányzik a kezdeti, drasztikus csökkenési fázis (58.B. ábra).



**59. ábra** *Populus glauca* L. var. *Kopeczkii* levelek antocián tartalmának változása atkafertőzés biotikus stressz-szindrómában. A *t*-próba alapján az adatpontok kontroll értékekhez viszonyított szignifikáns eltérését ( $t_{0,05}$ )\*-gal jelöltem. A kontroll levelek fertőzöttségi szintjét 0.00 értéknek, míg az A<sub>1</sub>–A<sub>4</sub> minták fertőzöttségi fokát rendre 1.00–4.00 értéknek véve a tendenciát jól jellemzi az illesztett exponenciális görbe, melynek egyenlete:  $y = 0.027e^{1.086x}$   $R^2 = 0.983$

*T. urticae* hatására a levelekben a károsodás mértékével párhuzamosan az antocián tartalom exponenciális emelkedése figyelhető meg (59. ábra).

A trehaláz enzimaktivitás *T. urticae* fitofág kártevő hatására szignifikánsan eltér a kontroll levelekben mért értékektől (60. ábra). Az aktivitás alakulása a neutrális és savas izoformák esetén eltérő.



**60. ábra** *Populus glauca L. var Koepeczkii* levelek trehaláz enzimaktivitásának változása *T. urticae* növényi kártevő hatásának következtében. A *t*-próba alapján az adatpontok kontroll értékekhez viszonyított szignifikáns eltérést ( $t_{0,05}$ )\*-gal jelöltem. Kék csillagok jelölik azokat az adatpontokat melyek között szignifikáns különbség nem áll fenn.

A savas izoformák aktivitása számottevőbb, az A<sub>2</sub> levélmintákban mért maximum értéket követően az A<sub>3</sub>-A<sub>4</sub> mintákban fokozott mértékű csökkenés jellemző (60. ábra). A neutrális trehaláz enzimaktivitás maximuma az A<sub>2</sub>-A<sub>3</sub> fertőzöttségi szintnél tapasztalható, majd az A<sub>4</sub> levélmintákban szignifikáns visszaesést mutat (60. ábra).

A *P. glauca L. var Koepeczkii* levelek fiziológiás nedvességtartalma *T. urticae* biotikus stresszor hatására a fertőzés elhatalmasodásával párhuzamosan jelentős mértékben csökken (54. ábra, 14. táblázat), ennek háttérében egyrészt a növényi nedvek szivogatása során a levelek kutikulájának és epidermisz sejtjeinek nagyszámban bekövetkező sérülése (szondázás<sup>[23]</sup>), másrészt pedig a szívásnyomok, mint a mélyebb epidermisz rétegekbe vezető nyitott csatornák kedvezőtlen hatása és a nagyszámban jelen lévő atkák által együttesen elfogyasztott levélnedv számottevő mennyisége állhat (Sivritepe és mtsai 2009).

<sup>[23]</sup> Az atkák táplálkozás közben a legmegfelelőbb helyet keresik a levélen a növényi nedvek kiszívásához, eközben csáprágóikkal komoly sérüléseket okoznak.



A kártétel következtében a szövetek sejtjei közötti kapcsolat felbomlik, a sejtek beltartalma helyére levegő kerül. A levelek vízvesztése és az atka-populáció denzitása között Sivritepe és mtsai (2009) eredményeivel összhangban pozitív korrelációt tapasztaltam.

*P. glauca* L. var *Kopeczkii* növények levelei a *T. urticae* kártételének tipikus tüneteit mutatták: kezdetben a leveleken sárga foltokat észleltem – az apró szúrásnyomoknak megfelelően, a levéllemezek a fertőzés előrehaladtával márványozottá váltak, majd barna színű, elszáradó területek jelentek meg (Afify és mtsai 2011). *T. urticae* táplálkozása közben a sejtekbe juttatja a növényre nézve toxikus nyálát, aminek következtében a leveleken rozsdás foltok jelennek meg. A szöveti és sejtszintű sérülések, valamint a mérgezés következtében stresszhelyzet alakul ki, az anyagcsere folyamatok oxidatív irányba tolódnak el.

A fitofág rovarok és atkák táplálkozása során a növények szöveteiben jellemzően jelentős mennyiségű  $H_2O_2$  molekula keletkezik. A  $H_2O_2$  viszonylag stabil ROS, mely sajátosságainak köszönhetően (kisebb mértékű reaktivitás, elektromos semlegesség) képes a sejtmembránokon áthatolni, így sejtől-sejtbe vándorolni. A  $H_2O_2$  jelentős szereppel bír a növényi szövetek nekrotikus elváltozásainak kialakulásában, valamint a szignáltranszdukciós folyamatokban is (Foyer és Noctor 2005). A  $H_2O_2$  sejtbeli koncentrációjának növekedése különféle stresszhatásokra bekövetkező általános válaszijelenség, amely jelzi, hogy jelentős szereppel bír az akklimatizáció folyamatában is. Alacsony koncentrációban mint jelmolekula szerepel, magasabb koncentrációban mint ROS káros a sejtekre nézve, így eliminálása mindenképpen szükséges, ebben működnek közre elsősorban a CAT és POD enzimek.

Biotikus stressz hatására a  $H_2O_2$  mellett jellemzően képződnek más ROS is. Közülük a  $O_2^{\cdot-}$  és  $H_2O_2$  képződése normál körülmények között is számottevő az elektrontranszport folyamatok és enzimatis működés következtében, így a mitokondriális, mikroszomális folyamatokban és a fotoszintézis során. Stressz-szituációban jellemzően fokozott mértékben keletkeznek, és amikor a sejtek védelmi rendszere ezzel nem tud fiziológiás szinten egyensúlyt tartani, akkor oxidatív stressz alakul ki.

A ROS toxikusak a sejtek számára, molekuláris (makromolekulák) és strukturális (membránok) károsodást idéznek elő, eliminálásuk eszenciális. A ROS kedvezőtlen hatásait hivatottak kivédeni a nem-enzimatis és enzimatis védelmi mechanizmusok (Noctor és Foyer 1998). A nem-enzimatis csoportba különféle antioxidánsok tartoznak, úgymint GSH, AsA,  $\beta$ -karotin és  $\alpha$ -tokoferol. Az enzimatis védelem jeles képviselői a Foyer-Halliwell-Asada ciklus (F5. ábra) enzimeit mellett a CAT (EC 1.11.1.6.), a POD (EC 1.11.1.7.) és a GST (EC 2.5.1.18).

A *T. urticae* kártétele következtében fokozott mértékben képződnek ROS, kedvezőtlen hatásukat az aktiválódó antioxidáns rendszer igyekszik kivédeni. Az előzőekben röviden bemutatott enzimátikus antioxidáns csoport két képviselőjének, a SOD és POD izoenzimek aktivitásának jelentős mértékű megemelkedése az atka-fertőzés  $A_1$ - $A_2$  szakaszában a fennálló oxidatív stressz egyértelmű jele (55. ábra). Az  $A_3$ - $A_4$  levélmintákban drasztikusan, a kontroll szint alá visszaeső SOD enzimaktivitás a védelmi rendszer kimerülését vetíti elénk (55.A. ábra).

A protohem proszterikus csoportot tartalmazó POD enzimek (EC 1.11.1.7.) élettani funkciója sokrétű: részt vesznek a lignin és szuberin bioszintézisben, az indolecetsav katabolizmusában és az etilén képződésében, antioxidáns sajátságokkal bírnak, fontos szerepet töltenek be a növények biotikus stresszorokkal (kártévők, kórokozók) szembeni védelmében és az öregedési folyamatokban. Lokalizációjukat tekintve megtalálhatóak a sejtfalban, apoplastban, citoplazmában és a vakuólumban, a sejtorganelumokban azonban nem fordulnak elő.

A POD enzimaktivitás az  $A_3$  mintákban szintén jelentős mértékű csökkenést mutat a  $K_0$ - $A_1$  értékek közötti szintre, azonban az  $A_4$  levelekben további aktivitásvesztés nem tapasztalható (55.B. ábra), mivel a ROS akkumulációja kedvez a szeneszcenciának ( $A_3$ - $A_4$  levelekben), amely öregedési folyamatok jellemzője a fokozott POD aktivitás. A *P. glauca* L. var. *Kopeczkii* levelek POD izoenzimeinek aktivitása a stressz-szindróma kimerülési fázisában (nekrotikus elváltozások) így továbbra is emelt (kontroll értékeket meghaladó) szinten maradt. Nekrózist előidézhethet a  $H_2O_2$  és a  $O_2^{\cdot-}$ , ez utóbbi a peroxidtól részben függetlenül is.

A *P. glauca* L. var. *Kopeczkii* levelek MDA tartalmának változását a *T. urticae* táplálkozása következtében indukálódó és egyre fokozódó mértékű oxidatív stressz hatásaként bekövetkező lipidperoxidáció eredményezi (57. ábra). Hildebrand és mtsai (1986) szintén jelentős mértékű lipidperoxidációt írtak le különböző szója genotípusokban *T. urticae* fertőzés hatására, amely a rezisztencia fokával párhuzamosan változott. A MDA tartalom változás tendenciája ( $K_0$  –  $A_4$ ) folyamatos károsodásra utal (57. ábra).

*T. urticae* kártételének következtében a *P. glauca* L. var. *Kopeczkii* levelek Chl tartalma jelentős mértékben csökken (15. táblázat, 58.A. ábra), aminek hátterében egyrészt a ROS mennyiségének növekedése valamint a szövetek sérülésének hatására indukálódó klorofilláz-, majd feltehetően emellett a feofitínáz enzimek aktivitása, másrészt a fertőzés elhatalmasodásakor a ROS közvetlen molekuláris károsító hatása húzódik meg (Kariola és mtsai 2005, Schelbert és mtsai 2009).

A karotinoid tartalom mennyiségének csökkenése (58.B. ábra) szintén a *T. urticae* fertőzés jellemző tünete, mely a biotikus stressz-szituáció komplex folyamatainak (ROS hatása, oxidatív anyagcsere) következménye.

A növényekben a karotinoid vegyületek – karotinok és xantofilok (Terpenoidok anyagörzse, Tetraterpenoidok anyagosztálya) részt vesznek a fotoszintézis folyamataiban, egyrészt mint járulékos pigmentek a fénygyűjtésben és a Chl molekulák felé történő energia-továbbításban, másrészt pedig a fényvédelemben – magas fényintenzitás esetén a Chl fluoreszcencia nem-fotokémiai kioltó mechanizmusában. A magasabbrendű növényekben esszenciális a karotinoidok (xantofil-ciklus) fotoprotektív közreműködése – a főlös gerjesztési energia elvezetése – ahhoz, hogy a fotoszintetikus apparátus túléljen.

A mechanikai sérülések és a *T. urticae* toxicitása kapcsán kialakuló oxidatív stresszhelyzetben a membránok (membránalkotó lipidek, fehérjék) károsodásának mértékével és a fotoszintetikus pigmentek mennyiségének csökkenésével párhuzamosan a fotoszintetikus aktivitás is szignifikáns mértékben csökken (Sivritepe és mtsai 2009).

A fertőzött *P. glauca* L. var *Kopeczkii* levelek pigmenttartalmának változása során a Chl és karotinoid tartalom csökkenésével párhuzamosan az antocián tartalom jelentős mértékű növekedése figyelhető meg (59. ábra). Az antociánok szintézise megindul az A<sub>1</sub> levelekben, majd mennyisége exponenciálisan nő a kártétel következtében kialakuló oxidatív stressz mértékével párhuzamosan. Antioxidáns sajátága már a vészreakció fázisában (A<sub>1</sub> levelek) a helyreállítás folyamatában jelentős szereppel bír, majd exponenciálisan emelkedő koncentrációja hozzájárul a sejtek védelméhez a stressz-szindróma ellenállási szakaszában (A<sub>2</sub>-A<sub>3</sub> levélminták). A fitofág atkák táplálkozásának közvetlen induktív hatása (mérgező nyál) is feltételezhető az antociánok szintézisében a közvetett (kártétellel összefüggő oxidatív stressz) hatás mellett.

Az antociánok<sup>[24]</sup> (antocianinok és antocianidinek) különféle szerepet töltenek be a növények stresszhatások elleni védekezésében: részt vesznek az UV sugarak elleni védelemben, antioxidáns tulajdonságuk révén szerepet játszanak különféle stresszorok kedvezőtlen hatásainak enyhítésében, oldott anyagként hozzájárulnak a szárazság- illetve fagystresszrel szembeni ellenállóképesség fokozásához (Murakami és mtsai 2008).

Az antocián bioszintézis és különféle stresszhatások kapcsolata a szakirodalomból ismert: számos abiotikus és biotikus stresszhatást követően levelekben antocián felhalmozó-

---

<sup>[24]</sup> Az antociánok a Fenoloidok anyagörzse, Poliketid cinnamoidok anyagosztálya, Flavonoidok rendjébe tartoznak.

dást figyeltek meg (bioszintézis kulcsenzimei stressz-indukáltak), ezáltal szerepük az adaptív stresszválaszban valószínűsíthető (Lee és Gould 2002, Murakami és mtsai 2008).

Az A<sub>1</sub>-A<sub>4</sub> levélmintákban tapasztalt élettani változások lefedik a stressz-szindróma szakaszait. Az A<sub>1</sub> mintákat a vészreakció fázisa, az A<sub>2</sub>-A<sub>3</sub> leveleket az ellenállási szakasz, majd az A<sub>4</sub> károsodási szintet a kimerülési fázis jellemzi. Az A<sub>4</sub> levélmintákban már visszafordíthatatlan élettani változások következnek be, melyek a levelek lehullásához vezetnek.

A trehaláz izoenzimok aktivitásváltozása (60. ábra) a *T. urticae* kiváltotta biotikus stresszhelyzetben a kártétellel összefüggő oxidatív stressz következtében aktiválódó anyagcsere folyamatokkal hozható összefüggésbe. A savas és neutrális izoformák egyaránt stresszinduktív sajátosságúak, azonban eltérő az indukció mechanizmusa (Nwaka és Holzer 1998, Zähringer és mtsai 2000, Garre és mtsai 2009). Az élesztők neutrális trehaláz enzimei a stresszproteinek közé tartoznak – kódoló génjeik promoter régiójában STRE tartalmaznak, míg a savas trehalázt kódoló gén transzkripciója számos stresszhatásra a Hog1p protein kináz közreműködésével valósul meg (Zähringer és mtsai 2000, Garre és mtsai 2009).

A *P. glauca* L. var *Kopeczkii* levelekben *T. urticae* kártételének hatására bekövetkező trehaláz enzimaktivitás változása a két izoforma esetén eltérő mértékű és tendenciájú (60. ábra). A savas trehaláz izoformák aktivitása jelentős mértékben meghaladja a neutrális izoformákét, maximum értéke megelőzi a neutrális izoformák esetén mért maximum értékeket (60. ábra). A *T. urticae* kártételének hatására az eredményeim alapján a savas trehaláz enzimaktivitás dominanciája jellemző, melynek indukálódása vélhetően a MAPK szignáltranszdukciós útvonal közreműködése, az élesztő Hog1 MAPK funkcionális homológja révén valósul meg a kialakuló stresszhelyzetre adott válaszreakcióban. A neutrális trehaláz aktivitás a STRE által indukálódik a fennálló stresszhelyzetben. Fontos megemlíteni, hogy biotikus stresszhelyzetben a növényi védekező gének aktiválásában az etilén, az abszcizinsav és a JA szerepét bizonyították. JA jelenléte szükséges *S. lycopersicon* *T. urticae* káros hatásaival szembeni védelmi mechanizmusainak aktiválódásához (Rohwer és Erwin 2008).

Összegezve *P. glauca* L. var *Kopeczkii* fogékonyak bizonyult a *T. urticae* stresszor kártételével szemben. A kártétel következtében oxidatív stresszhelyzet alakul ki, mely a ROS felhalmozódásának következtében a fertőzés elhatalmasodásával a sejtek maradandó károsodásához vezet, így végső soron előidézve a levelek lehullását. A fertőzés kezdeti fázisában (A<sub>1</sub>) aktiválódó antioxidáns védelmi rendszer biztosítja a fertőzöttség A<sub>2</sub> szintjén a

helyreállást, majd az ellenállási szakaszban az A<sub>3</sub> levelekben már a SOD és POD enzimaktivitás csökkenése jelzi, hogy tovább már nem képes az oxidatív stressz hatásait kivédeni, így a rendszer a kimerülés irányába halad. Ebben a biotikus stressz állomásait jól reprezentáló rendszerben a trehalázok aktivitása is szignifikáns változásokat mutat. A növényi trehaláz izoenzimek biotikus stresszhelyzetben bekövetkező aktivitásváltozásáról eddig nem rendelkezünk ismeretekkel. A neutrális és savas trehaláz izoformák aktivitásváltozása a korábbiakban tárgyalt (5.4. alfejezet) tendenciáktól eltér, a kísérleti modell növény ezen a szinten is megkülönbözteti a biotikus és abiotikus stresszhatásokat<sup>625</sup>.

## 5.6. Természetben gyűjtött *Populus canescens* virágrügyek trehaláz izoenzim aktivitásának meghatározása

A dioikus *Populus* fajok diclin virágai laza szerkezetű barkavirágzatot alkotnak. A *P. canescens* érett porzós barkavirágzatai<sup>626</sup> (amentum) átlagosan 6 cm hosszúak, termős barkái elérik a 10 cm-es méretet. A porzós barkák a portokok felnyílását megelőzően élénkpiros színben pompáznak, a termős virágzatok zöldes-fehérek.

A növények összetett életciklusa különböző fenológiai fázisokra (F) osztható fel. A nyugalmi állapotban (dormancia, F0) áttelelő rügyek tavasszal a természet újjáéledésekor megduzzadnak, bennük az anyagcsere folyamatok aktiválódnak (rügyduzzadás, F1). A *P. canescens* életciklusának generatív szakaszában a duzzadt virágrügyek felnyílnak (rügypattanás, F2) és előtűnnek a barkavirágzatok (rügyfakadás, F3), melyek hosszan lecsüngő, ivaros szaporodásra kész barkákká érnek (virágzás, F4). A trehaláz izoenzimek aktivitásváltozását az F0-F4 fenológiai fázisokban a 61. ábra mutatja be.

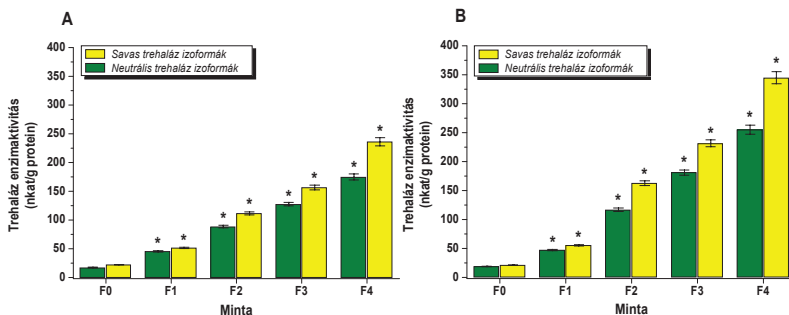
Az F0 fázisban lévő barkarügyekben az anyagcsere folyamatok minimum szinten zajlanak, ebben az állapotban a trehaláz enzimaktivitás csekély mértékű. Az F1 fázisban, a megduzzadt rügyekben a metabolikus hálózatok aktiválódása következtében jelentős mértékű trehaláz izoenzim aktivitásemelkedés tapasztalható (61. ábra). Az F2 és F3 fázisokban a barkavirágzatok fejlődése zajlik, az anyagcsere folyamatok fokozott aktiválódása jellemző. A porzós és termős virágzatok F2-F3 mintáiban egyaránt a trehaláz enzimek meredek aktivitásemelkedése figyelhető meg az F4 fázisban mérhető maximumokkal (61. ábra). Az F3-F4 fázisok között jelentős méretbeli változás következik

<sup>625</sup> Az abiotikus és biotikus stresszhatások növényi stresszválaszokban megnyilvánuló megkülönböztetését tudományosan igazolt (AbuQamar és mtsai 2009).

<sup>626</sup> A *P. canescens* lecsüngő porzós barkavirágzata az *Amentiflorae* virágzat típusba tartozik.

be, mellyel párhuzamosan zajló érési folyamatok vezetnek a reprodukív hatékonyság eléréséhez. A barkarügyek F0-F3 fázisokban jelentős fejlődésen mennek keresztül, ennek biztosít háttérrel a metabolikus hálózatok komplex rendszere.

A trehaláz enzimaktivitás izoformák közti megoszlása tekintetében elmondható, hogy a savas trehaláz izoformák aktivitása az F0-F4 fenológiai fázisok mindegyikében meghaladja szignifikánsan a neutrális izoformákét (61. ábra).



**61. ábra** *Populus canescens* trehaláz izoenzim aktivitásának változása a termős (A) és porzós (B) barkavirágzatok F0-F4 fenológiai fázisaiban. A *t*-próba alapján az adatpontok F0 értékéhez viszonyított szignifikáns eltérést ( $t_{0,05}$ )\*-gal jelöltem.

A virágzás fázisában (F4) az érett porzós és termős barkavirágzatokban kiemelkedően magas a trehaláz izoenzim aktivitása, a porzós barkákban mérhető maximummal (61. ábra). Müller és mtsai (2001) hasonló eredményre jutottak *Arabidopsis* növények vizsgálatakor: a rügycsúcs és virágok fejlődésével párhuzamosan jelentős mértékű trehaláz enzimaktivitás fokozódást figyeltek meg, a pollent tartalmazó portokokban mérhető maximum értékekkel.

A *P. canescens* generatív részeiben tapasztalt trehaláz enzimaktivitás háttérben a növényi trehaláz anyagcsere sokrétű szerepe húzódik meg a szénhidrát-anyagcsere, a növekedés és fejlődés folyamatainak szabályozásában (Paul és mtsai 2008, Iturriaga és mtsai 2009, Schluemann és Paul 2009, Smeekens és mtsai 2010). A trehaláz szintéziséért felelős TPS/TPP enzimkomplex a trehaláz izoenzimekkel együttesen alakítja a T6P és a trehaláz sejtbeli koncentrációját, ezáltal fejtik ki hatásukat a növények fejlődési folyamataira (Schluemann és Paul 2009). A trehalózt feltételezhetően magas koncentrációban tartalmazó barkavirágzatokban az endogén trehaláz bontásával a trehaláz izoenzim aktivitás biztosítja a homeosztázis fenntartását, valamint vélhetően szerepet játszanak a reprodukív folyamatokban is (Müller és mtsai 2001, Schluemann és Paul 2009).



Faj latin neve	TPS gén*	Szekvenciák hasonlósága (%)	
		<i>M. esculenta</i>	<i>M. steppicola</i>
<i>Aspergillus niger</i>	gi 551470	77.2	76.9
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	gi 109137808	76.2	76.4
<i>Coccidioides immitis</i>	gi 119194712	75.7	75.7
<i>Emericella nidulans</i>	gi 3170245	75.5	75.7
<i>Magnaporthe grisea</i>	gi 28557449	72.9	72.6
<i>Magnaporthe oryzae</i>	gi 145606918	72.9	72.6
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	gi 61744009	74.1	73.4
<i>Neurospora crassa</i>	gi 164422743	75.7	75.3

**16. táblázat** *Morchella esculenta* és *M. steppicola* TPS génrészletének hasonlósága az adatbázisokban fellelhető *Peizomycotina* altörzsbe tartozó fajok TPS szekvenciáival összehasonlítva. \*A TPS gének hivatkozási számai. A fajok pontos megnevezése a Függelékben szerepel (F9. ábra).

*M. esculenta* és *M. steppicola* (NTH) génrészletek szekvenciái 99 %-ban megegyeznek. A szekvencia 284-287 nukleotid pozícióiban variabilitás tapasztalható (63. ábra). Emellett eltérés a 138, 141, 464, 467-468 és 608 nukleotid-helyeken adódott.

```
Mesc_NTH_part 251 AGCTGCCATCAAGGAGTACTACTATAGTGTCTGGACTTGTGAAGCCCGTCTAG 300
|||||
Mst_NTH_part 251 AGCTGCCATCAAGGAGTACTACTATAGTGTCTGGACAGCCGAAGCCCGTCTAG 300
*****
```

**63. ábra** *Morchella esculenta* és *M. steppicola* NTH gén részletének illesztéssel (EMBOSS Needle) azonosított legnagyobb mértékben variábilis régiója. A piros szín a variábilis nukleotidokat, a csillagok a teljes egyezést jelölik.

Az NTH génrészletek további analizéséhez szükséges méretű átfedő fragmentek előállításánál a TPS szekvenciáknál leírt módon jártam el. A *Peizomycotina* altörzsbe tartozó fajok már leközölt és a két *Morchella* faj NTH génrészleteit páronként illesztve (EMBOSS Strecher) a 17. táblázatban szereplő hasonlósági értékek adódtak.

A TPS és NTH szekvenciárészletek hasonlósága természetesen nem jelent megfelelő alapot messzemenő következtetések levonására, mivel ehhez szükség lenne a teljes génszekvenciák ismeretére. A *Peizomycotina* altörzsbe tartozó fajok TPS és NTH szekvenciáinak a primer tervezés folyamán elvégzett elemzése során több konzervatív motívumot azonosítottam, a 16. és 17. táblázatokban szereplő százalékos értékek az ezeket tartalmazó génszakaszok eltéréseinek mértékéről adnak számot.



Faj latin neve	NTH gén*	Szekvenciák hasonlósága (%)	
		<i>M. esculenta</i>	<i>M. steppicola</i>
<i>Aspergillus terreus</i>	gi 115389811	69.1	69.2
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	gi 109137810	71.1	71.3
<i>Chaetomium globosum</i>	gi 116197924	70.5	70.6
<i>Cordyceps bassiana</i>	gi 119960029	75.2	75.3
<i>Emericella nidulans</i>	gi 2827391	75.5	75.8
<i>Magnaporthe grisea</i>	gi 2688969	70.3	70.4
<i>Magnaporthe oryzae</i>	gi 39960830	70.3	70.4
<i>Metarhizium acridum</i>	gi 45550220	81.8	81.7
<i>Metarhizium anisopliae</i> <i>var. anisopliae</i>	gi 11544716	83.6	83.1

**17. táblázat** *Morchella esculenta* és *M. steppicola* NTH génrészletek hasonlósága az adatbázisokban fellelhető *Pezizomycotina* altörzsbe tartozó fajok NTH szekvenciáival összevetve. \*Az NTH gének hivatkozási számai. A fajok pontos megnevezése a Függelékben szerepel (F9. ábra).

A TPS gének keresésében *Populus glauca L. var. Kopeczkii* és *Quercus robur* minták esetén a PTScFo<sub>3</sub> és PTScRe<sub>1</sub> oligonukleotid pár alkalmazásával TPS génrészleteket sikerült izolálnom. További analízisre azonban csekély méretük miatt nem bizonyultak alkalmasnak.

Összességében elmondható, hogy a TPS és NTH gének jelenlétének igazolása eredménnyel zárult: a két *Morchella* fajban mind a két gén-, míg *Populus glauca L. var. Kopeczkii* és *Quercus robur* növényfajok mintáiból TPS gén szekvenciárészletét sikerült izolálnom. Az eredményül kapott szekvenciák felhasználásával további primerek tervezése indokolt, melyek által elérhető a teljes gén izolálása.

## 6. KÖVETKEZTETÉSEK

*Morchella steppicola* vegetatív micéliumon és kitartóképletein (PS) elvégzett vizsgálataim eredményei összefüggéseket tártak fel a trehalóz szintézis és akkumuláció, az oxidatív stressz és a kitartóképlet képzés indukciója között, adatokat szolgáltatottak a trehalóz bontását katalizáló trehaláz enzimek aktivitásváltozásairól a teljes vegetatív életciklus folyamán:

- ✓ igazolódott az oxidatív stressz induktív szerepe *Morchella steppicola* PS képzésében: hatására megindul a trehalóz akkumulációja, mely kijelöli a PS képződésének helyét; a trehalóz lokálisan szintetizálódik a felépítésükben részt vevő micélium-zónában, mennyisége a kitartóképletek érése során éri el maximumát
- ✓ a külső trehalóz forrás indukálja a PS képzést
- ✓ az eltérő pH optimummal és lokalizációval jellemezhető trehaláz izoformák aktivitása két fő trend szerint alakul: aktivitási trend<sub>1</sub> (PSI – PSD – PSM → csírázás), aktivitási trend<sub>2</sub> (csírázás → PSI megjelenése)
- ✓ a micéliális neutrális trehaláz izoenzimek mellett a savas izoformák is szerepet játszanak az endogén trehalóz koncentrációjának szabályozásában, a trehalóz hasznosításában

A szélsőséges környezeti paraméterekhez alkalmazkodott *Morchella steppicola* kivételes szárazságstressz-toleranciájának hátterében meghúzódó mechanizmusokat mesterségesen kiváltott (PEG) ozmotikus stressz-szituációban vizsgáltam. Eredményeim alapján elmondható, hogy a szárazságstresszre adott élettani válasz részeként

- ✓ a SOD izoenzimek aktivitásváltozása a lipidperoxidáció indikátor molekulájának (MDA) mennyiségi változásaival együttesen kirajzolja a vegetatív micélium helyzetét a stressz-szindróma egyes szakaszaira vetítve, rávilágítva a *M. steppicola* rezisztencia-potenciáljára, mely lehetővé teszi, hogy fokozott mértékű stressz (15-18 % (<sup>m</sup>/<sub>v</sub>) PEG) fennállásakor is képes a stressz-szindróma ellenállás stádiumában maradni
- ✓ a stressz mértékével párhuzamosan a tenyészetek trehalóz tartalma jelentős mértékben megemelkedett, párhuzamosan a glükóz részarányának fokozott csökkenésével
- ✓ mindezek alapján igazolódott a *M. steppicola* szárazságtűrésében a trehalóz bioprotektív sajátosságának döntő szerepe

*Morchella steppicola* és *Morchella conica* vegetatív micélium trehaláz izoenzim aktivitásának összehasonlító vizsgálatában született eredményeim alapján a következő megállapításokra jutottam:

- ✓ a két eltérő környezeti igényű *Morchella* faj trehaláz enzimaktivitására jellemző, hogy a *M. steppicola* vegetatív micéliumában mért aktivitások szignifikáns mértékben meghaladják a *M. conica* mintákban mért értékeket, melynek hátterében a két faj alapvető (stressz)élettani különbözősége áll

- ✓ eredményeim bizonyítják mind a neutrális (micéliális), mind a savas izoformák (extramicéliális, excretált) induktív sajátosságait, igazolják szerepüket az exogén trehalóz hasznosításában; a savas izoformák aktivitása mindvégig meghaladja a neutrális izoformákét, tehát a külső közegben végbemenő hidrolízis dominanciája jellemző

*Populus glauca L. var Kopeczkii* és *Populus canescens* (Aiton)Sm. vegetatív és reprodukív szerveiben kontroll helyzetben meghatároztam a trehaláz enzimaktivitást, továbbá *P. glauca* kifejelett leveleiben monitoroztam az izoformák aktivitásváltozását induktív körülmények között. A vizsgálatok eredményei a következő megállapításokra vezettek:

- ✓ *Populus glauca L. var Kopeczkii* és *Populus canescens* vegetatív és reprodukív szerveiben normál körülmények között jelentős mértékben eltérő trehaláz enzimaktivitás mérhető, a reprodukív szervekben jellemzően magasabb aktivitási értékekkel: a fokozott aktivitás hátterében a generatív szervek fejlődési folyamatai, és ezzel összefüggésben a virágzatokban feltehetően jelentős mennyiségben jelen lévő trehalóz állnak
- ✓ a trehalóz anyagcsere hatással van a növények szénhidrát anyagcserejére, így fejlődési folyamataira, melyet a rügyfakadás folyamán elvégzett vizsgálatok eredményei is alátámasztanak: a barkavirágzatok fejlődése-érése során a trehaláz enzimaktivitás szignifikáns mértékben fokozódik
- ✓ a *P. glauca* levélkísérlet eredményei a trehaláz enzimaktivitás indukálhatóságáról tanúskodnak: a citoplazmatikus neutrális izoformák aktivitása dominál, időben egyre csökkenő, lecsengő aktivitás mérhető; mindez az exogén trehalóz hatására fokozódó sejten belüli lebontás elsődleges szerepére utal

Biotikus stresszhelyzetben *Populus glauca L. var Kopeczkii* leveleiben vizsgáltam a trehalóz anyagcsere lebontó folyamatában kulcsszerepű trehaláz izoenzimek aktivitásváltozását, a stresszhatás kialakulásának és mértékének követésére használt SOD és POD izoenzimek aktivitásának, a pigment tartalom valamint a MDA tartalom változása mellett. Eredményeim alapján elmondható, hogy

- ✓ biotikus stressz hatására a trehaláz izoformák aktivitása fokozódik, melyben feltehetően az alapanyagcsere működésének változása és a növényi védekező mechanizmusok aktiválódása játszik szerepet
- ✓ a stressz-indukált trehaláz izoformák közül a savas trehaláz enzimaktivitás értékei mindvégig meghaladják a citoplazmatikus neutrális izoformákét, a stressz mértékének fokozódásával a savas izoformák aktivitása csökkenést mutat

A trehalóz anyagcsere-gének izolálását célzó munkám során *Morchella steppicola* és *Morchella esculenta* fajokban sikerült TPS és NTH-, *Populus glauca L. var Kopeczkii* és *Quercus robur* genomi DNS állományában TPS gének létét igazolnom.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A trehalóz anyagcsere kapcsolódik a stressz- és fejlődésélettan tárgyköréhez, szerepet játszik a szénhidrát-anyagcsere regulációjában, így vizsgálata során sokrétű új tudományos ismeretre tehetünk szert. A doktori munkám során e szerteágazó terület összefüggéseinek feltárását tűztem ki célul.

A speciális életmódú *Morchella* fajok különleges életciklusában a trehalóz anyagcsere központi helyet foglal el. *Morchella steppicola* vegetatív micéliumon és kitaratóképletein (PS) elvégzett vizsgálataim eredményei feltárták a trehalóz szintézis és akkumuláció, az oxidatív stressz és a kitaratóképlet képzés közötti összefüggéseket, igazolják az oxidatív stressz induktív szerepét a PS képzésben, mely hatás következtében trehalóz akkumuláció indul meg a kitaratóképletek felépítésében részt vevő micélium-zónában. A száraz, sok esetben zavart élőhelyekhez adaptálódott *M. steppicola* kivételes szárazságstressz-toleranciájában a bioprotektív trehalóz szerepét kísérleti eredményeim bizonyították. A szintézis és raktározás folyamata mellett a trehalóz degradációjának (trehaláz izoenzimiek) követése a vegetatív életciklus egészében a trehalóz anyagcsere finom szabályozottságáról nyújt átfogó képet.

A trehalózt tartalmazó folyadékkultúrában és szilárd tápközegen nevelt *M. conica* és *M. steppicola* tenyészetekkel végzett kísérleteim eredményei bizonyították a trehaláz izoformák indukálhatóságát, együttes szerepüket a trehalóz hasznosításában és a külső trehaláz forrás induktív hatását *M. steppicola* PS képzésére.

A trehalóz anyagcsere hatását a növények szénhidrát metabolizmusára illetve növekedési-fejlődési folyamataira *Populus canescens* rügyfakadás vizsgálatából származó eredményeim is alátámasztják. *Populus glauca* L. var *Kopeczkii* és *P. canescens* vegetatív és reproduktív szerveiben normál körülmények között eltérő trehaláz enzimaktivitás mérhető, *P. glauca* levelekkel végzett kísérleti eredményeim pedig az aktivitás indukálhatóságáról tanúskodnak. Biotikus stressz hatására a trehaláz izoformák aktivitása fokozódik *P. glauca* leveleiben, melyben feltehetően az alapanyagcsere működésének változása és a növényi védekező mechanizmusok aktiválódása együttesen játszik szerepet.

A trehalóz anyagcsere-gének izolálását célzó munkám során *M. steppicola* és *M. esculenta* mintákból TPS és trehaláz, *P. glauca* és *Quercus robur* növényi anyagból TPS génrészletet sikerült izolálnom saját tervezésű degenerált primerekkel.

Összességében elmondható, hogy a trehalóz anyagcsere szerteágazó világában barangolva számos új eredményre jutottam, melyek kiegészítik és pontosítják a kucsmagombák életciklusáról birtokunkban lévő ismereteket, színesítik és kibővítik a növényekkel végzett kutatások eredményeit.

## 8. SUMMARY

Trehalose metabolism is closely related to the basic scientific fields of stress and developmental physiology. It has an admirable role in the regulation of carbohydrate-metabolism, thus investigating this field of physiology may widen our scientific knowledge by manifold fundamental new information. The aim of my PhD work was to explore this complex field of physiology.

Trehalose metabolism has a key role in the life cycle of *Morchella* species, a fungal genus bearing a characteristic lifestyle. My researches on the vegetative mycelia and the resting bodies (PS) of *Morchella steppicola* revealed the relationship between the synthesis and accumulation of trehalose, oxidative stress and the formation of the resting bodies, as well as the inductive role of oxidative stress on PS formation, which leads to trehalose accumulation in the mycelia zone comprising the resting bodies. My experimental results confirmed the role of bioprotective trehalose in the exceptional drought-stress tolerance of *M. steppicola*, which species is highly adapted to dry and often disturbed habitats. In addition to the processes of synthesis and accumulation, monitoring the degradation of trehalose (by trehalase isozymes) revealed the overall picture of the fine regulation of trehalose metabolism throughout the whole vegetative life cycle.

Results of my investigations on *M. conica* and *M. steppicola* mycelia, maintained on trehalose containing solid and liquid media, proved the inducibility of trehalase isoforms, revealed their simultaneous role in trehalose utilisation, and also demonstrated the inductive effect of external trehalose on the PS formation of *M. steppicola*.

Moreover, the influence of trehalose metabolism on the carbohydrate metabolism and developmental processes of plants are also supported by the results of my budding investigations of *Populus canescens*. Different level of trehalase enzyme activity was detected in the vegetative and reproductive organs of *Populus glauca* L. var *Kopeczkii* and *P. canescens*, and my leaf experiments of *P. glauca* indicated the inducibility of the trehalase activity. Biotic stress increased the activity of trehalase isoforms in the leaves of *P. glauca*, what was presumably caused by the changes of primary metabolism together with the activation of plant defence mechanisms.

A part of my work was to identify some genes of the trehalose metabolism. With the application of self-designed, degenerate primers, I have managed to isolate partial TPS and trehalase genes from *M. steppicola* and *M. esculenta* partial TPS gene from the plant materials of *P. glauca* and *Quercus robur*.

As a conclusion, I can declare that I have found several new results within the complex field of trehalose metabolism, which clarify and enlarge the recent scientific knowledge on the life cycle of morels, as well as they refine and contribute to the results of the studies on plant species.

## 9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Szigeti Zoltán professzor úrnak, az ELTE Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék vezetőjének, hogy biztosította tanszékén a lehetőségét doktori munkám elvégzéséhez és az értekezésem elkészítéséhez.

Megköszönöm témavezetőmnek, Dr. Király István adjunktusnak, hogy szakmai és emberi támogatásával, hasznos tanácsokkal mind az elméleti, mind pedig a gyakorlati munkámban segítségemre volt, miként azt is, hogy bevezetett a pályázatok varázslatos világába. Külön köszönet illeti meg azért, mert a doktori éveimet őszinte odafigyeléssel átitatott családi légkörben tölthetem el.

Köszönettel tartozom Dr. Gárdonyi Márknak, Dr. Kovács M. Gábornak és Balázs Tímeának a molekuláris biológiai munkákban nyújtott szakmai segítségükért.

Köszönöm Dr. Erős-Honti Zsoltnak az értekezés elkészítéséhez nyújtott hasznos tanácsait, a nyelvi lektorálást és a baráti biztatást.

Köszönöm Pardi Sándorné, Györgyi technikusnak önzetlen közreműködését, praktikus tanácsait, a baráti légkört, melyekkel megkönnyítette a laboratóriumi munkám elvégzését.

Szeretném megköszönni a Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék valamennyi munkatársának, hogy kérdéseimmel fordulhattam hozzájuk, és a technikai feltételek önzetlen biztosításával hozzájárultak munkám eredményességéhez. Külön köszönöm mindannyiuknak, hogy aktív résztvevője lehettem számos kiemelkedő pályázati együttműködésnek, és szakmai elhivatottsággal átitatott bensőséges közösségüknek megbecsült tagja lettem.

Hálásan köszönöm Szüleimnek, hogy megteremtették mindazon feltételeket, melyek elősegítették a kutatómunkám eredményességét. Köszönöm, hogy a doktori éveim alatt is mindvégig mellettem álltak támogató szeretetükkel, türelmükkel, élettapasztalataikkal, és az eredményességembe vetett mélységes bizalmukkal, mellyel erőt adtak a doktori értekezésem befejezéséhez.

Végezetül, de nem utolsósorban hálás köszönetemet szeretném kifejezni Férjemnek, Czövek Márknak a hosszú, küzdelmekkel teli évek alatti töretlen és feltétel nélküli szeretetért és bizalmáért, a megannyi bátorításért és végtelen türelméért mellyel mindvégig mellettem állt, és csodálattal köszönöm Kisfiamnak, Zsombor Beliánnak megértő türelmét, végtelen, rajongó szeretetét, a csillogó tekintetében közvetített bátorítását, a 'Mami megvonás' hősiesség elfogadását.

*Az értekezés elkészüléséhez hozzájárult a Nemzeti Erőforrás Minisztérium Deák Ferenc Ösztöndíj pályázata.*

## 10. IRODALOMJEGYZÉK

- Abbott, P.J. and Chen, J. (2000): Trehalose. WHO Food Additives Series 46: ANNEX 3. International Programme on Chemical Safety. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives Geneva, <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v46je05.htm> 6-15 June 2000
- AbuQamar, S., Luo, H., Laluk, K., Mickelbart, M.V. and Mengiste, T. (2009): Crosstalk between biotic and abiotic stress responses in tomato is mediated by the AIM1 transcription factor. *The Plant Journal* **58**(2): 347-360.
- Adams, R.P., Kendall, E. and Kartha, K.K. (1990): Comparison of free sugars in growing and desiccated plants of *Selaginella lepidophylla*. *Biochemical Systematics and Ecology* **18**(2-3): 107-110.
- Affify, A.E.-M.M.R., El-Beltagi, H.S., Fayed, S.A. and Shalaby, E.A. (2011): Acaricidal activity of different extracts from *Syzygium cumini* L. Skeels (Pomposia) against *Tetranychus urticae* Koch. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **1**(5): 359-364.
- Agostini, D., Polidori, E., Palma, F., Ceccaroli, P., Saltarelli, R., Tonelli, D. and Stocchi, V. (2001): Cloning, expression, and characterization of the *hxc-1* gene from the white truffle *Tuber borchii* Vittad.: A first step toward understanding sugar metabolism. *Fungal Genetics and Biology* **33**: 15-23.
- Aisaka, K. and Masuda, T. (1995): Production of trehalose phosphorylase by *Catellatospora ferruginea*. *FEMS Microbiology Letters* **131**(1): 47-51.
- Aisaka, K., Masuda, T., Chikamune, T. and Kamitori, K. (1998): Purification and characterization of trehalose phosphorylase from *Catellatospora ferruginea*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **62**(4): 782-787.
- Ajdić, D. and Pham, V.T.T. (2007): Global transcriptional analysis of *Streptococcus mutans*. Sugar Transporters Using Microarrays. *Journal of Bacteriology* **189**(14): 5049-5059.
- Al-Bader, N., Vanier, G., Liu, H., Gravelat, F.N., Urb, M., Hoareau, C.M., Campoli, P., Chabot, J., Filler, S.G. and Sheppard, D.C. (2010): Role of trehalose biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* development, stress response, and virulence. *Infection and Immunity* **78**(7): 3007-3018.
- Albini, F.M., Murelli, C., Patritti, G., Rovati, M., Zienna, P. and Finzi, P.V. (1994): Lowmolecular weight substances from the resurrection plant *Sporobolus stapfianus*. *Phytochemistry* **37**: 137-142.
- Alizadeh, P. and Klionsky, D.J. (1996): Purification and biochemical characterization of the ATH1 gene product, vacuolar acid trehalase from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **391**(3): 273-278.
- Almeida, A.M., Cardoso, L.A., Santos, D.M., Torné, J.M. and Fevereiro, P.S. (2007): Trehalose and its applications in plant biotechnology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **43**: 167-177.
- Alpers, D.H. and Isselbacher, K.J. (1970): Disaccharidase deficiency. *Advances in Metabolic Disorders* **4**: 75-122.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990): Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403-410.
- Amaral, F.C., Van Dijck, P., Nicoli, J.R. and Thevelein, J.M. (1997): Molecular cloning of the neutral trehalase gene from *Kluyveromyces lactis* and the distinction between neutral and acid trehalases. *Archives of Microbiology* **167**: 202-208.
- Andersson, U., Levander, F. and Radstrom, P. (2001): Trehalose-6-phosphate phosphorylase is part of a novel metabolic pathway for trehalose utilization in *Lactococcus lactis*. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 42707-42713.

- Andre, A., Maccheroni, W., Doignon, F., Garnier, M. and Renaudin, J. (2003): Glucose and trehalose PTS permeases of *Spiroplasma citri* probably share a single IIA domain, enabling the spiroplasma to adapt quickly to carbohydrate changes in its environment. *Microbiology* **149**: 2687-2696.
- App, H. and Holzer, H. (1989): Purification and characterization of neutral trehalase from the yeast ABYS1 mutant. *The Journal of Biological Chemistry* **264**(29): 17583-17588.
- Apse, M.P. and Blumwald, E. (2002): Engineering salt tolerance in plants. *Current Opinion in Biotechnology* **13**: 146-150.
- Arai, C., Kohguchi, M., Akamatsu, S., Arai, N., Yoshizane, C., Hasegawa, N., Hanaya, T., Arai, S., Ikeda, M. and Kurimoto, M. (2001): Trehalose suppresses lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis bone marrow in mice. *Nutrition Research* **21**: 993-999.
- Arakawa, T., Prestrelski, S.J., Kenney, W.C. and Carpenter, J.F. (2001): Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews* **46**(1-3): 307-326.
- Arguelles, J.C. (2000): Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Archives of Microbiology* **174**(4): 217-224.
- Arnon, D.I. (1949): Copper enzymes in isolated chloroplasts: Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* **24**: 1-15.
- Arola, H., Koivula, T., Karvonen, A.L., Jokela, H., Ahola, T. and Isokoski, M. (1999): Low trehalase activity is associated with abdominal symptoms caused by edible mushrooms. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **34**(9): 898-903.
- Avigad, G. (1990): Disaccharides – Methods in plant biochemistry. In: *Carbohydrates* Editors: Dey, P.M. and Harborne, J.B. pp. 111-188. Academic Press, London ISBN-10: 0124610129
- Avonce, N., Mendoza-Vargas, A., Morett, E. and Iturriaga, G. (2006): Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evolutionary Biology* **6**: 109-124.
- Barna, T., Bartha, D., Bidló, A., Csóka, Gy, Frank, N., Gyuró, É., Kovács, G., Molnár, S. és Szabó, I. (2005): Az év fája 2002: a molyhos tölgyek (*Quercus pubescens* agg.). Editors: Bartha, D. és Bús, M. pp. 1-8. Saját kiadás
- Barra, L., Pica, N., Gouffi, K., Walker, G.C., Blanco, C. and Trautwetter, A. (2003): Glucose 6-phosphate dehydrogenase is required for sucrose and trehalose to be efficient osmoprotectants in *Sinorhizobium meliloti*. *FEMS Microbiology Letters* **229**: 183-188.
- Bartha, D. (1992): Óriási nyárfák. *Erdészeti Lapok CXXVII. évf. 7-8.sz.*: 226-228.
- Bartha, D. (1999): Magyarország fa és cserjefajai. Mezőgazda Kiadó, Budapest ISBN-13: 9789632861050
- Bartha, D. (2002): A molyhos tölgyek (*Quercus pubescens* agg.) botanikai jellemzése. *Erdészeti Lapok* **137**(1): 7-8.
- Bartha, D. (2004): A Magyarországon előforduló nyár (*Populus L.*) taxonok határozókulcsa és rövid jellemzése. *Flora Pannonica* **2**(2): 85-101.
- Bartels, D. and Salamini, F. (2001): Desiccation tolerance in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. A contribution to the study of drought tolerance at the molecular level. *Plant Physiology* **127**: 1346-1353.
- Bayless, T.M. and Christopher, N.L. (1969): Disaccharidase deficiency. *The American Journal of Clinical Nutrition* **22**(2): 181-190.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971): Superoxide dismutase. Improved assays and an assay applicable to acrylamide gel. *Analytical Biochemistry* **44**: 276-287.
- Behm, C.A. (1997): The role of trehalose in the physiology of nematodes. *International Journal for Parasitology* **27**: 215-229.
- Belinky, P.A., Flikshtein, N., Lechenko, S., Gepstein, Sh. and Dosoretz, C.G. (2003): Reactive Oxygen Species and Induction of Lignin Peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(11): 6500-6506.



- Bell, W., Klaassen, P., Ohnacker, M., Boller, T., Herweijer, M., Schoppink, P., Vanderzee, P. and Wiemken, A. (1992): Characterization of the 56-kDa subunit of yeast trehalose-6-phosphate synthase and cloning of its gene reveal its identity with the product of C1F1, a regulator of carbon catabolite inactivation. *European Journal of Biochemistry* **209**(3): 951-959.
- Bell, W., Sun, W., Hohmann, S., Wera, S., Reinders, A., De Virgilio, C., Wiemken, A. and Thevelein, J.M. (1998): Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. *Journal of Biological Chemistry* **273**(50): 33311-33319.
- Belocopitow, E. and Maréchal, L.R. (1970): Trehalose phosphorylase from *Euglena gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta* **198**(1): 151-154.
- Benaroudj, N., Lee, D.H. and Goldberg, A.L. (2001): Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 24261-24267.
- Benkő, L., Kiss, L. és Papp, L. (1967-1984): A magyar nyelv történeti-etimológiai szótára I-IV. Szerkesztő: Benkő, L. Akadémiai Kiadó Zrt., Budapest ISBN-10: 9630537702
- Bergoz, R. (1971): Trehalose malabsorption causing intolerance to mushrooms. Report of a probable case. *Gastroenterology* **60**(5): 909-912.
- Bergoz, R. and Righetti, A. (1970): Mushroom intolerance due to selective malabsorption of trehalose: a little known syndrome. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* **100**(28): 1244-1245.
- Béranger, F., Crozet, C., Goldsborough, A. and Lehmann, S. (2008): Trehalose impairs aggregation of PrP<sup>Sc</sup> molecules and protects prion-infected cells against oxidative damage. *Biochemical Biophysical Research Communications* **334**: 44-48.
- Berthelot, M. (1858): Sur le trehalose, nouvelle espece de sucre. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences* **46**: 1276-1279.
- Bhumiratana, A., Anderson, R.L. and Costilow, R.N. (1974): Trehalose metabolism by *Bacillus popilliae*. *Journal of Bacteriology* **119**(2): 484-493.
- Bianchi, G., Gamba, A., Limiroli, R., Pozzi, N., Elster, R., Salamini, F. and Bartels, D. (1993): The unusual sugar composition in leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*. *Physiologia Plantarum* **87**(2): 223-226.
- Bieganski, R.M., Fowler, A., Morgan, J.R. and Toner, M. (1998): Stabilization of active recombinant retroviruses in an amorphous dry state with trehalose. *Biotechnology Progress* **14**(4): 615-620.
- Birch, G.G. (1963): Trehalose. *Advances in Carbohydrate Chemistry* **18**: 201-225.
- Bittsánszky, A., Kőmives, T., Gullner, G., Gyulai, G., Kiss, J., Heszky, L., Radimsky, L. és Renneberg, H. (2005): Ability of transgenic poplars with elevated glutathione content to tolerate zinc<sup>2+</sup> stress. *Environment International* **31**: 251-254.
- Bíró, I. és Takács, T. (2007): Study of heavy metal uptake of *Populus nigra* in relation to phytoremediation. *Cereal Research Communications* **35**: 265-268.
- Black, M., Corbineau, F., Grzesik, M., Guy, P. and Come, D. (1996): Carbohydrate metabolism in the developing and maturing wheat embryo in relation to its desiccation tolerance. *Journal of Experimental Botany* **47**: 161-169.
- Blazquez, M.A., Lagunas, R., Gancedo, C. and Gancedo, J.M. (1993): Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. *FEBS Letters* **329**: 51-54.
- Bolling, C. and Fiehn, O. (2005): Metabolite profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nutrient deprivation. *Plant Physiology* **139**(4): 1995-2005.

- Boos, W., Ehmann, U., Bremer, E., Middendorf, A. and Postma, P. (1987): Trehalase of *Escherichia coli*. Mapping and cloning of its structural gene and identification of the enzyme as a periplasmic protein induced under high osmolarity growth conditions. *Journal of Biological Chemistry* **262**(27): 13212-13218.
- Bordács, S., Borovics, A. and Bach, I. (2002a): Genetic diversity of natural populations and gene bank of Black Poplar in Hungary. In: *Genetic diversity in river populations of European Black Poplar - implications for riparian eco-system management*. Editors: van Dam, B.C. and Bordács, S. pp. 93-106. Proceedings of an international symposium held in Szekszárd, Hungary from 16-20 May, 2001, Csiszár Nyomda Ltd., Budapest
- Bordács, S., Popescu, F., Slade, D.M., Csaikl, U., Lesur, I., Borovics, A., Kézdy, P.O., König, A., Gömöry, D., Brewer, S., Burg, K. and Petit, R.J. (2002b): Chloroplast DNA variation of white oaks in northern Balkans and in the Carpathian Basin. *Forest Ecology and Management* **156**(1-3): 197-209.
- Borhidi, A. (2003): Magyarország növénytársulásai. Akadémiai Kiadó Zrt., Budapest ISBN-10: 9630579839
- Boy-Marcotte, E., Lagniel, G., Perrot, M., Bussereau, F., Boudsoq, A., Jacquet, M. and Labarre, J. (1999): The heat shock response in yeast: differential regulations and contributions of the Msn2p/Msn4p and Hsf1p regulons. *Molecular Microbiology* **33**(2): 274-283.
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Brambl, R. and Marzluf, G.A. (2004): The Mycota III. Biochemistry and Molecular Biology 2nd Edition. A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research. Editor: Esser, K. Springer-Verlag Berlin Heidelberg ISBN-10: 354042 6302
- Breeuwer, P., Lardeau, A., Peterz, M. and Joosten, H.M. (2003): Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *Journal of Applied Microbiology* **95**(5): 967-973.
- Buitink, J. and Leprince, O. (2008): Intracellular glasses and seed survival in the dry state. *Comptes Rendus Biologies* **331**(10): 788-795.
- Buscot, F. (1989): Field observations on growth and development of *Morchella rotunda* and *Mitrophora semilibera* in relation to forest soil temperature. *Canadian Journal of Botany* **67**: 589-593.
- Buscot, F. (1992a): Mycorrhizal succession and morel biology. In: *Mycorrhizas in Ecosystems*. Editors: Read, D.J., Lewis, D.H., Fitter, A.H. and Alexander, I.J. pp. 220-224. C.A.B. International Wallingford Oxon UK ISBN: 0851987869 9780851987866
- Buscot, F. (1992b): Synthesis of two types of association between *Morchella esculenta* and *Picea abies* under controlled culture conditions. *Journal of Plant Physiology* **141**: 12-17.
- Buscot, F. (1993): Mycelial differentiation of *Morchella esculenta* in pure culture. *Mycological Research* **97**: 136-140.
- Buscot, F. (1994): Ectomycorrhizal types and endobacteria associated with ectomycorrhizas of *Morchella elata* (Fr)Boudier with *Picea abies* (L)Karst. *Mycorrhiza* **4**: 223-232.
- Buscot, F. and Bernillon, J. (1991): Mycosporins and related compounds in field and cultured mycelial structures of *Morchella esculenta*. *Mycological Research* **95**: 752-754.
- Buscot, F. and Kottke, I. (1990): The association of *Morchella rotunda* (Pers.)Boudier with roots of *Picea abies* (L.)Karst. *New Phytologist* **116**: 425-430.
- Buscot, F. and Roux, J. (1987): Association between living roots and fruit bodies of *Morchella rotunda*. *Transactions of the British Mycological Society* **89**: 249-252.

- Buscot, F., Munch, J.C., Charcosset, J.Y., Gardes, M., Nehls, U. and Hampp, R. (2000): Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbios in ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* **24**: 601-614.
- Carpinelli, J., Kraemer, R. and Agosin, E. (2006): Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for trehalose over production: role of the TreYZ trehalose biosynthetic pathway. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 1949-1955.
- Caspi, R., Altman, T., Dale, J.M., Dreher, K., Fulcher, C.A., Gilham, F., Kaipa, P., Karthikeyan, A.S., Kothari, A., Krummenacker, M., Latendresse, M., Mueller, L.A., Paley, S., Popescu, L., Pujar, A., Shearer, A.G., Zhang, P. and Karp, P.D. (2010): The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Research* **38**: D473-D479.
- Cegla, G. and Bell, K. (1977): High pressure liquid chromatography for the analysis of soluble carbohydrates in defatted oilseed flours. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **54**(4): 150-152.
- Cesaro, A., De Giacomo, O. and Sussich, F. (2008): Water interplay in trehalose polymorphism. *Food Chemistry* **106**: 1318-1328.
- Chary, S.N., Hicks, G.R., Choi, Y.G., Carter, D. and Raikhel, N.V. (2008): Trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase regulates cell shape and plant architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **146**(1): 97-107.
- Chen, Q. and Haddad, G.G. (2004): Role of trehalose phosphate synthase and trehalase during hypoxia: from flies to mammals. *The Journal of Experimental Biology* **207**: 3125-3129.
- Clegg, J.S. (1986): The physical properties and metabolic status of *Artemia* cysts at low water contents: The water replacement hypothesis. In: *Membranes, Metabolism and Dry Organisms*. Editor: Leopold, A.C. pp. 169-187. Cornell University Press: Ithaca, NY, USA ISBN-10: 0801419794
- Cortina, C. and Culiñez-Macià, F.A. (2005): Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Science* **169**:75-82.
- Crowe, J.H., Carpenter, J.F. and Crowe, L.M. (1998): The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology* **60**: 73-103.
- Crowe, J.H., Crowe, L.M. and Chapman, D. (1984): Preservation of membranes in anhydrobiotics organism. The role of trehalose. *Science* **223**: 209-217.
- Crowe, J.H., Crowe, L.M. and Jackson, S.A. (1983): Preservation of structural and functional activity in lyophilized sarcoplasmic reticulum. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **220**(2): 477-484.
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A. and Crowe, L.M. (1992): Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology* **54**: 579-599.
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A., Nguyen, K.H.N. and Crowe, L.M. (1996): Is vitrification involved in depression of the phase transition temperature in dry phospholipids? *Biochimica et Biophysica Acta* **1280**: 187-196.
- Crowe, L.M., Spargo, B.J., Itoneda, T., Beaman, B.L. and Crowe, J.H. (1994): Interaction of cord factor (alpha, alpha'-trehalose-6,6'-dimycolate) with phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta* **1194**(1): 53-60.
- Crowe, J.H., Crowe, L.M., Carpenter, J.F. and Wistrom, C.A. (1987): Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochemical Journal* **242**: 1-10.
- Dahlstrom, J.L., Smith, J.E. and Weber, N.S. (2000): Mycorrhiza-like interaction by *Morchella* with species of the *Pinaceae* in pure culture synthesis. *Mycorrhiza* **9**(5): 279-285.

- Dahlqvist, A. (1966): Disaccharide intolerance. *The Journal of the American Medical Association* **195**(3): 225-227.
- Dai, J., Wang, L., Allen, K.N., Radstrom, P. and Dunaway-Mariano, D. (2006): Conformational cycling in beta-phosphoglucomutase catalysis: reorientation of the beta-D-glucose 1,6-(Bis)phosphate intermediate. *Biochemistry* **45**(25): 7818-7824.
- Danielson, R.M. (1984): Ectomycorrhizal associations in jack pine stands in northeastern Alberta. *Canadian Journal of Botany* **62**: 932-939.
- Dardanelli, M.S., Gonzalez, P.S., Bueno, M.A. and Ghittoni, N.E. (2000): Synthesis, accumulation and hydrolysis of trehalose during growth of peanut rhizobia in hyperosmotic media. *Journal of Basic Microbiology* **40**: 149-156.
- Davies, J.E., Sarkar, S. and Rubinsztein, D.C. (2006): Wild-type PABPN1 is anti-apoptotic and reduces toxicity of the oculopharyngeal muscular dystrophy mutation. *Human Molecular Genetics* **15**: 23-31.
- De Araujo, P.S. (1996): The role of trehalose in cell stress. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **29**: 873-875.  
<http://www.dendromania.hu>
- Demelier, J.-F., Labat, J. and Courtois, J.-E. (1975): Influence of parenteral injection of trehalose on mammals with distinct trehalase equipment. *Comptes Rendus de l'Académie des sciences (Paris) Serie D* **280**: 669-672.
- Desai, J.D. and Banat, I.M. (1997): Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**:47-59.
- Destruelle, M., Holzer, H. and Klionsky, D.J. (1995): Isolation and characterization of a novel yeast gene, ATH1, that is required for vacuolar acid trehalase activity. *Yeast* **11**: 1015-1025.
- De Mesquita, J.F., Paschoalin, V.M. and Panek, A.D. (1997): Modulation of trehalase activity in *Saccharomyces cerevisiae* by an intrinsic protein. *Biochimica et Biophysica Acta* **1334**: 233-239.
- De Silva-Udawatta, M.N. and Cannon, J.F. (2001): Roles of trehalose phosphate synthase in yeast glycolen metabolism and sporulation. *Molecular Microbiology* **40**: 1345-1356.
- De Virgilio, C., Bürckert, N., Bell, W., Jenö, P., Boller, T. and Wiemken, A. (1993): Disruption of TPS2, the gene encoding the 100-kDa subunit of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae*, causes accumulation of trehalose-6-phosphate and loss of trehalose-6-phosphate phosphatase activity. *European Journal of Biochemistry* **212**(2): 315-323.
- Dhindsa, R.S., Plumb, K., Dhindsa, P. and Thorpe, T.A. (1981): Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany* **32**: 93-101.
- Dickmann, D.I. and Kuzovkina, J. (2008): Poplars and willows of the world, with emphasis on silviculturally important species. FAO Forest Management Division Working Paper IPC/9-2 (FAO, Rome).
- Donnamaria, M.C.; Howard, E.I.; Grigera, J.R. (1994): Interaction of water with alpha, alpha-trehalose in solution: Molecular dynamics simulation approach. *Journal of the Chemical Society: Faraday transactions* **90**: 2731-2735.
- Drennan, P., Smith, M., Goldsworthy, D. and van Staden, J. (1993): The occurrence of trehalose in the leaves of the desiccation-tolerant angiosperm *Myrothamnus flabellifolia* Welw. *Journal of Plant Physiology* **142**: 493-496.
- Eastmond, P.J. and Graham, I.A. (2003): Trehalose metabolism: a regulatory role for trehalose-6-phosphate? *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 231-235.
- Eastmond, P.J., Li, Y. and Graham, I.A. (2003): Is trehalose-6-phosphate a regulator of sugar metabolism in plants? *Journal of Experimental Botany* **54**(382): 533-537.

- Eastmond, P.J., Van Dijken, A.J.H., Spielman, M., Kerr, A., Tissier, A.F., Dickinson, H.G., Jones, J.D.G., Smeekens, S.C. and Graham, I.A. (2002): Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. *The Plant Journal* **29**(2): 225-235.
- Eck, R., Bergmann, C., Ziegelbauer, K., Schonfeld, W. and Kunkel, W. (1997): A neutral trehalase gene from *Candida albicans*: molecular cloning, characterization and disruption. *Microbiology* **143**: 3747-3756.
- Eckardt, N.A. (2009): A New Chlorophyll Degradation Pathway. *The Plant Cell* **21**(3): 700.
- Egger, K.N. and Paden, J.W. (1986): Biotrophic associations between lodgepole pine seedlings and postfire ascomycetes (*Pezizales*) in monoxenic culture. *Canadian Journal of Botany* **64**: 2719-2725.
- Eis, C. and Nidetzky, B. (1999): Characterization of trehalose phosphorylase from *Schizophyllum commune*. *The Biochemical Journal* **341**(2): 385-393.
- Elbein, A.D. (1967a): Carbohydrate metabolism in *Streptomyces hygroscopicus*. I. Enzymatic synthesis of trehalose phosphate from guanosine diphosphate D-glucose-<sup>14</sup>C. *Journal of Biological Chemistry* **242**(3): 403-406.
- Elbein, A.D. (1967b): Carbohydrate metabolism in streptomycetes II. Isolation and enzymatic synthesis of trehalose. *Journal of Bacteriology* **94**(5): 1520-1524.
- Elbein, A.D. (1968): Trehalose phosphate synthesis in *Streptomyces hygroscopicus*: purification of guanosine diphosphate D-glucose: D-glucose-6-phosphate 1-glucosyltransferase. *Journal of Bacteriology* **96**(5): 1623-1631.
- Elbein, A.D. (1974): The metabolism of alpha, alpha-trehalose. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* **30**: 227-256.
- Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I. and Carroll, D. (2003): New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* **13**: 17R-27R.
- Eleutherio, E.C., Araujo, P.S. and Panek, A.D. (1993): Protective role of trehalose during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cryobiology* **30**: 591-596.
- Eroglu, A., Russo, M.J., Bieganski, R., Fowler, A., Cheley, S., Bayley, H. and Toner, M. (2000): Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nature Biotechnology* **18**: 163-167.
- Eroglu, A., Toner, M. and Toth, T.L. (2002): Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes. *Fertility and Sterility* **77**: 152-158.
- Franco, A., Soto, T., Vicente-Soler, J., Paredes, V., Madrid, M., Gacto, M. and Cansado, J. (2003): A role for calcium in the regulation of neutral trehalase activity in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *The Biochemical Journal* **376**(Pt 1): 209-217.
- Francois, J., Eraso, P. and Gancedo, C. (1987): Changes in the concentration of cAMP, fructose-2,6-bisphosphate and related metabolites and enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* during growth on glucose. *European Journal of Biochemistry* **164**: 369-373.
- Francois, J. and Parrou, J.L. (2001): Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* **25**(1): 125-145.
- Foyer, C.H. and Noctor, G. (2005): Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment* **28**: 1056-1071.
- Galmarini, M.V., van Baren, C., Zamora, M.C., Chirife, J., Di Leo Lira, P. and Bandoni, A. (2011): Impact of trehalose, sucrose and/or maltodextrin addition on aroma retention in freeze dried strawberry puree. *International Journal of Food Science & Technology* **46**(7): 1337-1345.
- Garg, A.K., Kim, J.K., Owens, T.G., Ranwala, A., Choi, Y., Kochian, L. and Wu, R.J. (2002): Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *The Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 15898-15903.

- Garre, E. and Matallana, E. (2009): The three trehalases Nth1p, Nth2p and Ath1p participate in the mobilization of intracellular trehalose required for recovery from saline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **155**(Pt 9): 3092-3099.
- Garre, E., Pérez-Torrado, R., Gimeno-Alcañiz, J.V. and Matallana, E. (2009): Acid trehalase is involved in intracellular trehalose mobilization during postdiauxic growth and severe saline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* **9**: 52-62.
- Garland, G. (1989): Brush border membrane sucrose–isomaltase, maltase–glucoamylase and trehalase in mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology* **94B**: 1-11.
- Gawel, N.J. and Jarret, R. (1991): A modified CTAB DNA extraction procedure for *Musa* and *Ipomea*. *Plant Molecular Biology Reporter* **9**(3): 262-266.
- Georgiou, D.C., Papapostolou, I., Patsoukis, N., Tsegenidis, T. and Sideris, T. (2005): An ultrasensitive fluorescent assay for the in vivo quantification of superoxide radical in organisms. *Analytical Biochemistry* **347**: 144-151.
- Georgiou, D.C., Patsoukis, N., Papapostolou, I. and Zervoudakis, G. (2006): Sclerotial metamorphosis in filamentous fungi is induced by oxidative stress. *Integrative and Comparative Biology* **46**(6): 691-712.
- Georgiou, D.C. and Petropoulou, K.P. (2001): Effect of the antioxidant ascorbic acid on sclerotial differentiation in *Rhizoctonia solani*. *Plant Pathology* **50**: 594-600.
- Gibson R.P., Lloyd R.M., Charnock S.J. and Davies G.J. (2002): Characterization of *Escherichia coli* OtsA, a trehalose-6-phosphate synthase from glycosyltransferase family 20. *Acta Crystallographica D* **58**(2): 349-351.
- Gockler, L. (2010a): Fás száru energiaültetvények a mezőgazdaságban. A tüzeléscélú biomaszra jelentősége és volumene hazánkban. *Mezőgazdasági technika* **LI**(11): 30-34.
- Gockler, L. (2010b): Fás száru energiaültetvények a mezőgazdaságban. A sarjzattatásos fás száru energetikai ültetvény technológiájának megfontolandó elemei. *Mezőgazdasági technika* **LI**(11): 40-43.
- Goddijn, O.J.M. and Smeekens, S. (1998): Sensing trehalose biosynthesis in plants. *The Plant Journal* **14**: 143-146.
- Goldway, M., Amir, R., Goldberg, D., Hadar, Y. and Levanon, D. (2000): *Morchella conica* exhibiting a long fruiting season. *Mycological Research* **104**: 1000-1004.
- Gómez-Escobedo, I.A., Cabrera-Ponce, J.L., Herrera-Estrella, L.R., Hernández-Luna, C. and Montes de Oca-Luna, R. (2004): Mejora del crecimiento de plantas de tabaco mediante la inhibición del gen de la trehalasa. *Ciencia UANL* **VII**(4): 483-489.
- González, C.M., Casanovas, S.S. and Pignata, M.L. (1996): Biomonitoring of air pollutants from traffic and industries employing *Ramalina echlinii*. *Environmental Pollution* **91**: 269-277.
- Gossett, D.R., Millhollon, E.P. and Lucas, M.C. (1994): Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt sensitive cultivars of cotton. *Crop Science* **34**: 706-714.
- Graille, M., Baltaze, J.P., Leulliot, N., Liger, D., Quevillon-Cheruel, S. and van Tilbeurgh, H. (2006): Structure-based functional annotation: yeast ymr099c codes for a D-hexose-6-phosphate mutarotase. *The Journal of Biological Chemistry* **281**(40): 30175-30185.
- Green, J.L. and Angell, C.A. (1989): Phase relations and vitrification in saccharide-water solution and the trehalose anomaly. *Journal of Physical Chemistry* **93**: 2880-2882.
- Greis, H. (1940): Befruchtungsarten bei *Morchella*. *Jahrbuch für Wissenschaftliche Botanik* **89**: 245-253.
- Guler, P. and Ozkaya, E.G (2008): Sclerotial structures of *Morchella conica* in agar media with different carbohydrates. *Acta Alimentaria* **37**(3): 347-357.
- Guo, N., Puhlev, I., Brown, D.R., Mansbridge, J. and Levine, F. (2000): Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nature Biotechnology* **18**: 168-171.

- Gültekin, L. (2008): Taxonomic review of the stem-inhabiting trehala-constructing *Larinus* Dejean, 1821 (*Coleoptera: Curculionidae*): New species, systematics and ecology. *Zootaxa* **1714**: 1-18.
- Gyulai, G. (2010): Biotechnológia a növénynemesítési alapanyagok előállításában, a fitoremediációs fajok genetikai kontrolljában, és a kultúrnövények archeogenetikai stabilitásának meghatározásában. MTA Doktori értekezés (DSc Dissertation) Magyar Tudományos Akadémia, Budapest – Szent István Egyetem MKK GBI, Gödöllő
- Hammond, J.B.W. and Nichols, R. (1976): Carbohydrate metabolism in *Agaricus bisporus* (Lange) Sing.: changes in soluble carbohydrates during growth of mycelium and sporophore. *Journal of General Microbiology* **93**: 309-320.
- Hanbury, D. (1859): Note on two insect-products from Persia. *Journal of the Proceedings of the Linnean Society* **3**: 254-259.
- Hamzeh, M. and Dayanandan, S. (2004): Phylogeny of *Populus* (*Salicaceae*) based on nucleotide sequences of chloroplast TRNT-TRNF region and nuclear rDNA. *American Journal of Botany* **91**: 1398-1408.
- Han, J.R. (2003): Solid-state fermentation of cornmeal with the basidiomycete *Herichium erinaceum* for degrading starch and upgrading nutritional value. *International Journal of Food Microbiology* **80**: 61-66.
- Han, S.E., Kwon, H.B., Lee, S.B., Yi, B.Y., Murayama, I., Kitamoto, Y. and Byun, M.O. (2003): Cloning and characterization of a gene encoding trehalose phosphorylase (TP) from *Pleurotus sajor-caju*. *Protein Expression and Purification* **30**(2): 194-202.
- Han, S-E., Park, S-R., Kwon, H-B., Yi, B-Y., Lee, G-B. and Byun, M-O. (2005): Genetic engineering of drought-resistant tobacco plants by introducing the trehalose phosphorylase (TP) gene from *Pleurotus sajor-caju*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **82**: 151-158.
- Hazell, B.W., Kletsas, S., Nevalainen, H. and Attfield, P.V. (1997): Involvement of CIF1 (GGSI/TPS1) in osmotic stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **414**: 353-358.
- Hazell, B.W., Nevalainen, H. and Attfield, P.V. (1995): Evidence that the *Saccharomyces cerevisiae* CIF1 (GGSI/TPS1) gene modulates heat shock response positively. *FEBS Letters* **377**: 457-460.
- He, S., Bystricky, K., Leon, S., François, J.M. and Parrou, J.L. (2009): The *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar acid trehalase is targeted at the cell surface for its physiological function. *The FEBS Journal* **276**(19):5432-5446.
- Heath, R.L. and Packer, L. (1968): Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **125**: 189-198.
- Helfert, C., Gotsche, S. and Dahl, M.K. (1995): Cleavage of trehalose-phosphate in *Bacillus subtilis* is catalysed by a phospho-alpha-(1-1)-glucosidase encoded by the treA gene. *Molecular Microbiology* **16**(1): 111-120.
- Higashiyama, T. (2002): Novel functions and applications of trehalose. *Pure and Applied Chemistry* **74**: 1263-1269.
- Hildebrand, D.F., Rodriguez, J.G., Brown, G.C., Luu, K.T. and Volden, C.S. (1986): Peroxidative Responses of Leaves in Two Soybean Genotypes Injured by Twospotted Spider Mites (*Acar: Tetranychidae*). *Journal of Economic Entomology* **79**(6): 1459-1465(7).
- Hoagland, D.R., and Arnon, D.I. (1950): The water-culture method for growing plants without soil. Ext Circ. 347. California Agricultural Experiment Station, Berkeley, CA.
- Hodge, J.E. (1953): Dehydrated Foods Chemistry of Browning Reactions in Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1**(15): 928-943.

- Hoekstra, F.A., Crowe, L.M. and Crowe J.H. (1989): Differential desiccation sensitivity of corn and *Pennisetum* pollen linked to their sucrose contents. *Plant, Cell & Environment* **12**: 83-91.
- Hoffmann, E., Wallenda, T., Schaeffer, C., Hampp, R. (1997): Cyclic AMP, a possible regulator of glycolysis in the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. *New Phytologist* **137**: 351-356.
- Hohmann, S., Bell, W. and Jose, M. (1996): Evidence for trehalose-6-phosphate-dependent and -independent mechanisms in the control of sugar influx into yeast glycolysis. *Molecular Microbiology* **20**(5): 981-991.
- Horlacher, R., Uhland, K., Klein, W., Ehrmann, M. and Boos, W. (1996): Characterization of a cytoplasmic trehalase of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **178**(21): 6250-6257.
- Hounsa, C.G., Brandt, E.V., Thevelein, J., Hohmann, S. and Prior, B.A. (1998): Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology* **144**: 671-680.
- Horáková, H., Polakovičová, I., Shaik, G.M., Eitler, J., Bugajev, V., Dráberová, L. and Dráber, P. (2011): 1,2-propanediol-trehalose mixture as a potent quantitative real-time PCR enhancer. *BMC Biotechnology* **11**:41 doi:10.1186/1472-6750-11-41
- Hottiger, T., De Virgilio, C., Hall, M., N., Boller, T., Wiemken, A. (1994): The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins *in vitro*. *European Journal of Biochemistry* **219**: 187-193.
- Hottiger, T., Schmutz, P. and Wiemken, A.J. (1987): Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **169**: 5518-5522.
- Hudson, C.S. (1916): Some numerical relations among the rotatory powers of the compound sugars. *Journal of the American Chemical Society* **38**(8): 1566-1575.
- Häffner, J. and Lukács, Z. (1995/1996): Recent findings of ascomycetes XVII. *Morchella steppicola* Zerova. *Rheinland-Pfälzischen Pilzjournal* **5+6**: 108-118.
- Ingram, J. and Bartels, D. (1996): The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 377-403.
- Inoue, Y., Ishii, K., Tomita, T., Yatake, T. and Fukui, F. (2002): Characterization of trehalose phosphorylase from *Bacillus stearothermophilus* SK-1 and nucleotide sequence of the corresponding gene. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **66**(9): 1835-1843.
- Iturriaga, G., Suárez, R. and Nova-Franco, B. (2009): Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. *International Journal of Molecular Sciences* **10**: 3793-3810.
- Iwaya-Inoue, M. and Tataka, M. (2001): Trehalose plus chloramphenicol prolong the base life of tulip flowers. *Horticultural Science* **36**: 946-950.
- Jain, N.K. and Roy, I. (2008): Role of trehalose in moisture-induced aggregation of bovine serum albumin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **69**:824-834.
- Jain, N.K. and Roy, I. (2009): Effect of trehalose on protein structure. *Protein Science* **18**(1): 24-36.
- Jakucs, E. (2001): A *Fumana procumbens*(Dun.)Go. & Godr. ektomikorrhizái alföldi homoki gyepekben. In: *Ökológia az ezredfordulón I. Koncepció, hosszútávú kutatások*. Editors: Borhidi, A. and Botta-Dukát, Z. pp. 169-171. MTA, Budapest
- Jakucs, E., Kovács, G.M., Szedlay, Gy. and Erős-Honti, Zs. (2005): Morphological and molecular diversity and abundance of tomentelloid ectomycorrhizae in broad-leaved forests of the Hungarian Plain. *Mycorrhiza* **15**: 459-470.



- Jeffrey, G.A. and Nanni, R. (1985): The crystal structure of anhydrous alpha,alpha-trehalose at -150 degrees. *Carbohydrate Research* **137**: 21-30.
- Jones, C.R., Ray, M., Dawson, K.A. and Strobel H.J. (2000): High-affinity maltose binding and transport by the thermophilic anaerobe *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(3): 995-1000.
- Jorge, C.D., Fonseca, L.L., Boos, W. and Santos, H. (2008): Role of periplasmic trehalase in uptake of trehalose by the thermophilic bacterium *Rhodothermus marinus*. *Journal of Bacteriology* **190**(6): 1871-1878.
- Jorge, J.A., Polizeli, M.L., Thevelein, J.M. and Terenzi, H.F. (1997): Trehalases and trehalose hydrolysis in fungi. *FEMS Microbiology Letters* **154**: 165-171.
- Jönsson, K.I. (2007): Tardigrades as a potential model organism in space research. *Astrobiology* **7**(5): 757-766.
- Jules, M., Guillou, V., Francois, J. and Parrou, J.L. (2004): Two distinct pathways for trehalose assimilation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(5): 2771-2778.
- Jules, M., Beltrán, G., François, J. and Parrou, J.L. (2008): New insights in yeast trehalose metabolism: *NTH2* encodes a functional cytosolic trehalase, and deletion of *TPS1* reveals a Ath1p-dependent trehalose mobilization. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 605-614.
- Jankovics, M. (1991): A fa mitológiája. Csokonai Kiadó, Debrecen ISBN-10: 9632600371
- Kandler, O. and Hopf, H. (1980): Occurrence, metabolism, and function of oligosaccharides. In: *Carbohydrates: Structure and Function*. Editor: Preiss, J., Vol. 3. of The Biochemistry of Plants. Editors: Stumpf, P.K. and Conn, E.E. pp. 221-270. Academic Press, New York ISBN: 01267540399780126754032
- Kandler, O. and Senser, M. (1965): Vorkommen von Trehalose in *Botrychium lunaria*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **53**: 157-161.
- Kandror, O., DeLeon, A. and Goldberg, A.L. (2002): Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **99**: 9727-9732.
- Kappen, L. and Valladares, F. (1999): Opportunistic growth and desiccation tolerance: the ecological success of poikilohydrous autotrophs. In: *Handbook of Functional Plant Ecology*. Editors: Pugnaire, F.I. and Valladares, F. pp. 10-80. Marcell Dekker Inc. New York, Basel, ISBN-10: 0824719506
- Kariola, T., Brader, G., Li, J. and Tapio Palva, E. (2005): Chlorophyllase 1, a damage control enzyme, affects the balance between defense pathways in plants. *The Plant Cell* **17**: 282-294.
- Katsuno, M., Adachi, H. and Sobue, G. (2004): Sweet relief for Huntington disease. *Nature Medicine* **10**: 123-124.
- Keller, F., Schellenberg, M. and Wiemken, A. (1982): Localization of trehalase in vacuoles and of trehalose in the cytosol of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Archives of Microbiology* **131**: 298-301.
- Kempf, B. and Bremer, E. (1998): Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of Microbiology* **170**: 319-330.
- Kendall, E.J., Adams, R.P. and Kartha, K.K. (1990): Trehalase activity in plant tissue cultures. *Phytochemistry* **29**(8): 2525-2528.
- Kidd, G. and Devorak, J. (1994): Trehalose is a sweet target for agbiotech. *Biotechnology* **12**: 1328-1329.
- Kitamoto, Y., Akashi, H., Tanaka, H. and Mori, N. (1988):  $\alpha$ -glucose-1-phosphate formation by a novel trehalose phosphorylase from *Flammulina velutipes*. *FEMS Microbiology Letters* **55**: 147-150.

- Klein, W., Horlacher, R. and Boos, W. (1995): Molecular analysis of treB encoding the *Escherichia coli* enzyme II specific for trehalose. *The Journal of Bacteriology* **177**(14): 4043-4052.
- Kopp, M., Müller, H. and Holzer, H. (1993): Molecular analysis of the neutral trehalase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* **268**(7): 4766-4774.
- Koster, K.L. (1991): Glass formation and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiology* **96**: 302-304.
- Kovács, G.M. and Szigetvári, Cs. (2002): Mycorrhizae and other root-associated fungal structures of the plants of a sandy grassland on the Great Hungarian Plain. *Phyton* **42**: 211-223.
- Kremer, A., Petit, R. and Zanetto, A. (1991): Nuclear and organelle gene diversity in *Quercus robur* and *Q. petraea*. In: *Genetic variation in European populations of forest trees*. Editors: Müller-Starck, G. and Ziehe, M. pp. 141-166. Sauerländer's Verlag, Frankfurt am Main ISBN-10: 3793907902
- Kuliev, Z.A., Vdovin, A.D., Abdullaev, N.D., Makhmatkulov, A.B. and Malikov, V.M. (1997): Study of the catechins and proanthocyanidins of *Quercus robur*. *Chemistry of Natural Compounds* **33**(6): 642-652.
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lang, S. and Philp, J.C. (1998): Surface-active lipids in *Rhodococci*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **74**: 59-70.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. and Higgins, D.G. (2007): ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* **23**(21): 2947-2948.
- Lee, D.W. and Gould, K.S. (2002): Anthocyanins in leaves and other vegetative organs: An introduction. *Advances in Botanical Research* **37**: 1-16.
- Lee, J.H., Lee, K.H., Kim, C.G., Lee, S.Y., Kim, G.J., Park, Y.H. and Chung, S.O. (2005): Cloning and expression of a trehalose synthase from *Pseudomonas stutzeri* CJ38 in *Escherichia coli* for the production of trehalose. *Applied Microbiology and Biotechnology* **68**(2): 213-219.
- Lee, S.-J., Engelmann, A., Horlacher, R., Qu, Q., Vierke, G., Hebbeln, C., Thomm, M. and Boos, W. (2003): TrmB, a sugar-specific transcriptional regulator of the Trehalose/Maltose ABC transporter from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 983-990.
- Levander, F., Andersson, U. and Radstrom, P. (2001): Physiological role of beta-phosphoglucomutase in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(10): 4546-4553.
- Lide, D.R. (2005): CRC Handbook of Chemistry and Physics. Internet Version 2005, <http://www.hbcpnetbase.com>, CRC Press, Boca Raton, FL
- Lin, C.-T., Lee, T.-L., Duan, K.-J. and Su, J.-C. (2001): Purification and characterization of black porgy muscle Cu/Zn superoxide dismutase. *Zoological Studies* **40**: 84-90.
- Lin, T.P. and Huang, N.H. (1994): The relationship between carbohydrate composition of some tree seeds and their longevity. *Journal of Experimental Botany* **45**: 1289-1294.
- Lippert, K., Galinski, E.A. and Truper, H.G. (1993): Biosynthesis and function of trehalose in *Ectothiorhodospira halochloris*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **63**(1): 85-91.
- Liu, R., Barkhordarian, H., Emadi, S., Park, C.B. and Sierks, M.R. (2005): Trehalose differentially inhibits aggregation and neurotoxicity of beta amyloid 40 and 42. *Neurobiology of Disease* **20**:74-81.

- Londesborough, J. and Varimo, K. (1984): Characterization of two trehalases in baker's yeast. *Biochemical Journal* **219**: 511-518.
- López, M.F., Männer, P., Willmann, A., Hampp, R. and Nehls, U. (2007): Increased trehalose biosynthesis in Hartig net hyphae of ectomycorrhizas. *New Phytologist* **174**(2): 389-398.
- Lucio, A.K., Polizeli, M.L., Jorge, J.A. and Terenzi, H.F. (2000): Stimulation of hyphal growth in anaerobic cultures of *Mucor rouxii* by extracellular trehalose. Relevance of cell wall-bound activity of acid trehalase for trehalose utilization. *FEMS Microbiology Letters* **182**:9-13.
- Lutfiyya, L.L., Iyer, V.R., DeRisi, J., DeVit, M.J., Brown, P.O. and Johnston, M. (1998): Characterization of three related glucose repressors and genes they regulate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **150**: 1377-1391.
- Luyckx, J. and Baudouin, C. (2011): Trehalose: an intriguing disaccharide with potential for medical application in ophthalmology. *Clinical Ophthalmology* **2011**(5): 577-581.
- Maillard, L.C. (1912): Action des acides aminés sur les sucres: formation des mélanoidines par voie méthodique. *Compte-rendu de l'Académie des Sciences* **154**: 66-68.
- Maréchal, L.R. and Belocopitow, E. (1972): Metabolism of trehalose in *Euglena gracilis*. I. Partial purification and some properties of trehalose phosphorylase. *The Journal of Biological Chemistry* **247**(10): 3223-3228.
- Maréchal, L.R., Oliver, G., Veiga, L.A. and de Ruiz Holgado, A.A. (1984): Partial purification and some properties of beta-phosphoglucomutase from *Lactobacillus brevis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **228**(2): 592-599.
- Masaphy, S., Zabar, I. and Goldberg, D. (2009): New long-season ecotype of *Morchella rufobrunnea* from Northern Israel. 45 New ecotype of *Morchella*. *Micologia Aplicada Internacional* **21**(2): 45-55.
- Matsuo, T. (2001): Trehalose protects corneal epithelial cells from death by drying. *British Journal of Ophthalmology* **85**: 610-612.
- May, P., Wienkoop, S., Kempa, S., Usadel, B., Christian, N., Rupprecht, J., Weiss, J., Recuenco-Munoz, L., Ebenhoh, O., Weckwerth, W. and Walther, D. (2008): Metabolomics- and proteomics-assisted genome annotation and analysis of the draft metabolic network of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* **179**(1): 157-166.
- McGarvey, O.S., Kett, V.L. and Craig, D.Q.M. (2003): An investigation into the crystallisation of  $\alpha,\alpha$ -trehalose from the amorphous state. *Journal of Physical Chemistry B* **107**: 6614-6620.
- Mercer, J., Eagles, M.E. and Talbot, I.C. (1990): Brush border enzymes in coeliac disease: histochemical evaluation. *Journal of Clinical Pathology* **43**: 307-312.
- Miller, S.L., Torres, P. and McClean, T.M. (1994): Persistence of basidiospores and sclerotia of ectomycorrhizal fungi and *Morchella* in soil. *Mycologia* **86**: 89-95.
- Miranda, J.A., Avonce, N., Suárez, R., Thevelein, J., van Dijck, P. and Iturriaga, G. (2007): A bifunctional TPS-TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic *Arabidopsis*. *Planta* **226**: 1411-1421.
- Molina, R., Massicotte, H. and Trappe, J.M. (1992): Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community-ecological consequences and practical implications. In: *Mycorrhizal Functioning – An Integrative Plant-Fungal Process*. Editor: Allen, M.F. pp. 357-423. Chapman & Hall, London ISBN-10: 0412018918
- Morimoto, H., Noro, H. and Ohtaki, H. (1979): Acute toxicity test of isoamylase (of *Pseudomonas amyloclavata* origin). Unpublished report No. 12110175-3 from Japan Food Research Laboratories, Tokyo, Japan. Submitted to WHO by Bioresco Ltd, Switzerland.

- Murakami, P.F., Schaberg, P.G. and Shane, J.B. (2008): Stem girdling manipulates leaf sugar concentrations and anthocyanin expression in sugar maple trees during autumn. *Tree Physiology* **28**: 1467-1473.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497.
- Murphy, H.N., Stewart, G.R., Mischenko, V.V., Apt, A.S., Harris, R., McAlister, M.S., Driscoll, P.C., Young, D.B. and Robertson, B.D. (2005): The OtsAB pathway is essential for trehalose biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 14524-14529.
- Müller, J., Aeschbacher, R.A., Wingle, A., Boller, T. and Wiemken, A. (2001): Trehalose and trehalase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **125**(2): 1086-1093.
- Müller, J., Boller, T. and Wiemken, A. (1995): Trehalose and trehalase in plants: recent developments. *Plant Science* **112**(1): 1-9.
- Müller, J., Sprenger, N., Bortlik, K., Boller, T. and Wiemken, A. (1997): Desiccation increases sucrose levels in *Ramonda* and *Haberlea*, two genera of resurrection plants in the *Gesneriaceae*. *Physiologia Plantarum* **100**: 153-158.
- Nagase, H., Endo, T., Ueda, H. and Nakagaki, M. (2002): An anhydrous polymorphic form of trehalose. *Carbohydrate Research* **337**: 167-173.
- Nagase, H., Endo, T., Ueda, H. and Nakai, T. (2003): Influence of dry conditions on dehydration of  $\alpha,\alpha$ -trehalose dihydrate. *STP Pharmaceutical Sciences* **13**: 269-275.
- Nakada, T., Maruta, K., Mitsuzumi, H., Kubota, M., Chaen, H., Sugimoto, T., Kurimoto, M. and Tsujisaka, Y. (1995a): Purification and characterization of a novel enzyme, maltooligosyl trehalose trehalohydrolase, from *Arthrobacter* sp. Q36. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **59**: 2215-2218.
- Nakada, T., Maruta, K., Tzusaki, K., Kubota, M., Chaen, H., Sugimoto, T., Kurimoto, M. and Tsujisaka, Y. (1995b): Purification and properties of a novel enzyme, maltooligosyl trehalose synthase, from *Arthrobacter* sp. Q36. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **59**: 2210-2214.
- Nelson, D.R. (2002): Current Status of the *Tardigrada*: Evolution and Ecology. *Integrative and Comparative Biology* **42**(3): 652-659.  
<http://www.nevezetesfak.hu>
- Nishimoto, T., Nakano, M., Ikegami, S., Chaen, H., Fukuda, S., Sugimoto, T., Kurimoto, M. and Tsujisaka, Y. (1995): Existence of a novel enzyme converting maltose to trehalose. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* **59**: 2189-2190.
- Nishimoto, T., Nakano, M., Nakada, T., Chaen, H., Fukuda, S., Sugimoto, T., Kurimoto, M. and Tsujisaka, Y. (1996): Purification and properties of a novel enzyme, trehalose synthase, from *Pimelobacter* sp. R48. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* **60**: 640-644.
- Nishizaki, Y., Yoshizane, C., Toshimori, Y., Arai, N., Akamatsu, S., Hanaya, T., Arai, S., Ikeda, M. and Kurimoto, M. (2000): Disaccharide-trehalose inhibits bone resorption in ovariectomized mice. *Nutrition Research* **20**: 653-664.
- Noctor, G. and Foyer, C.H. (1998): Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 249-279.
- Norwood, M., Truesdale, M.R., Richter, A. and Scott, P. (2000): Photosynthetic carbohydrate metabolism in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Journal of Experimental Botany* **51**: 159-165.
- Noubhani, A., Bunoust, O., Bonini, B.M., Thevelein, J.M., Devin, A. and Rigoulet, M. (2009): The Trehalose Pathway Regulates Mitochondrial Respiratory Chain Content through Hexokinase 2 and cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* **284**(40): 27229-27234.

- Nwaka, S. and Holzer, H. (1998): Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **58**: 197-237.
- Nwaka, S., Kopp, M. and Holzer, H. (1995a): Expression and function of the trehalase genes NTH1 and YBR0106 in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* **270**: 10193-10198.
- Nwaka, S., Mechler, B., Destruelle, M. and Holzer, H. (1995b): Phenotypic features of trehalase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **360**: 286-290.  
<http://oregfak.emk.nyme.hu>
- Ogden, R.C. and Adams, D.A. (1987): Electrophoresis in agarose and acrylamide gels. *Methods in enzymology* **152**: 61-87.
- Oliver, M.J., Tuba, Z. and Mishler, B.D. (2000): The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. *Plant Ecology* **151**: 85-100.
- Otsubo, M. and Iwaya-Inoue, M. (2000): Trehalose delays senescence in cut gladiolus spikes. *Horticultural Science* **35**: 1107-1110.
- Ower, R. (1982): Notes on the development of morel ascocarp: *Morchella esculenta*. *Mycologia* **74**: 142-144.
- Page-Sharp, M., Behm, C.A. and Smith, G.D. (1999): Involvement of the compatible solutes trehalose and sucrose in the response to salt stress of a cyanobacterial *Scytonema* species isolated from desert soils. *Biochimica et Biophysica Acta* **1472**(3): 519-528.
- Pan, Y.T., Carroll, J.D. and Elbein, A.D. (2002): Trehalose-phosphate synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. Cloning, expression and properties of the recombinant enzyme. *European Journal of Biochemistry* **269**(24): 6091-6100.
- Pan, Y.T., Drake, R.R. and Elbein, A.D. (1996): Trehalose-p synthase of mycobacteria: its substrate specificity is affected by polyanions. *Glycobiology* **6**(4): 453-461.
- Panek, A.D. (1995): Trehalose metabolism – new horizons in technological applications. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **28**: 169-181.
- Panek, A.D. and Mattoon, J.R. (1977): Regulation of energy metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Relationship between catabolite repression, trehalose synthesis and mitochondrial development. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **183**: 306-316.
- Panneman, H., Ruijter, G.J., van den Broeck, H.C. and Visser, J. (1998): Cloning and biochemical characterisation of *Aspergillus niger* hexokinase – the enzyme is strongly inhibited by physiological concentrations of trehalose 6-phosphate. *European Journal of Biochemistry* **258**(1): 223-232.
- Panni, S., Landgraf, C., Volkmer-Engert, R., Cesareni, G. and Castagnoli, L. (2008): Role of 14-3-3 proteins in the regulation of neutral trehalase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* **8**(1): 53-63.
- Parrou, J.L., Enjalbert, B., Plourde L., Bauche, A., Gonzalez, B. and Francois, J. (1999): Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**: 191-203.
- Paul, M.J. (2007): Trehalose 6-phosphate. *Current Opinion in Plant Biology* **10**(3): 303-309.
- Paul, M.J., Primavesi, L.F., Jhurreea, D. and Zhang, Y. (2008): Trehalose Metabolism and Signaling. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 417-441.
- Petit, R.J., Csaikl, U.M., Bordács, S., Burg, K., Coart, E., Cottrell, J., van Dam, B., Deans, J.D., Dumolin-Lapègue, S., Fineschi, S., Finkeldey, R., Gillies, A., Glaz, I., Goicoechea, P.G., Jensen, J.S., König, A.O., Lowe, A.J., Madsen, S.F., Mátyás, G., Munro, R.C., Olalde, M., Pemonge, M.-H., Popescu, F., Slade, D., Tabbener, H., Turchini, D., de Vries, S.G.M., Ziegenhagen, B. and Kremer, A. (2002): Chloroplast DNA variation in European white oaks: Phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management* **156**(1-3): 5-26.

- Pavia, C.L. and Panek, A.D. (1996): Biotechnological applications of the disaccharide trehalose. *Biotechnology Annual Review* **2**: 293-314.
- Pedreno, Y., Maicas, S., Arguelles, J.C., Sentandreu, R. and Valentin, E. (2004): The ATC1 gene encodes a cell wall linked acid trehalase required for growth on trehalose in *Candida albicans*. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 40852-40860.
- Pereira, M.D., Eleutherio, E.C.A. and Panek, A.D. (2001): Acquisition of tolerance against oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Microbiology* **1**:11.
- Peternel, W.W. (1968): Disaccharidase deficiency. *The Medical clinics of North America* **52**(6):1355-1365.
- Peters, S., Mundree, S.G., Thomson, J.A., Farrant, J.M. and Keller, F. (2007): Protection mechanisms in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* (Baker): both sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs) accumulate in leaves in response to water deficit. *Journal of Experimental Botany* **58**: 1947-1956.
- Pilon-Smits, E.A.H., Terry, N., Sears, T., Kim, H., Zayed, A., Hwang, S., van Dun, K., Voogd, E., Verwoerd, T.C., Krutwagen, R.W.H.H. and Goddijn, O.J.M. (1998): Trehalose-producing transgenic tobacco plants show improved growth performance under drought stress. *Journal of Plant Physiology* **152**:525-532.
- Placer, Z.A., Cushman, L.L. and Johnson, B.C. (1966): Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical Biochemistry* **16**: 359-364.
- Plourde-Obwobi, L., Durner, S., Goma, G. and François, J. (2000): Trehalose reserve in *Saccharomyces cerevisiae*: phenomenon of transport, accumulation and role in cell viability. *International Journal of Food Microbiology* **55**: 33-40.
- Porra, R.J. (2002): The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls *a* and *b*. *Photosynthesis Research* **73**(1-3): 149-156.
- Porra, R.J., Thompson, W.A. and Kriedemann, P.E. (1989): Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* **975**: 384-394.
- Porchia, A.C., Fiol, D.F. and Salerno, G.L. (1999): Differential synthesis of sucrose and trehalose in *Euglena gracilis* cells during growth and salt stress. *Plant Science* **149**(1): 43-49.
- Porembski, S. and Barthlott, W. (2000): Granitic and gneissic outcrops (inselbergs) as centers of diversity for desiccation-tolerant vascular plants. *Plant Ecology* **151**: 19-28.
- Pósfai, Gy (2005): Magyarország legnagyobb fái – Dendrománia. Alexandra Könyvkiadó, Pécs ISBN-10: 9633693810
- Proctor, M.C.F. and Pence V.C. (2002): Vegetative tissues: bryophytes, vascular resurrection plants and vegetative propagules. In: *Desiccation and survival in plants: drying without dying*. Editors: Black, M. and Pritchard, H.W. pp. 207-237. CAB International: Wallingford, UK ISBN-10: 0851995349
- Proctor, M.C.F. and Tuba, Z. (2002): Poikilohydry and homoihydry: antithesis or spectrum of possibilities? *New Phytologist* **156**: 327-349.
- Radko, S.P., Chen, H.T., Zakharov, S.F., Bezrukov, L., Yergey, A.L., Vieira, N.E. and Chrambach, A. (2002): Electroelution without gel sectioning of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: Fluorescent detection, recovery, isoelectric focusing and matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight of the electroeluate. *Electrophoresis* **23**: 985-992.
- Rajaram, S. (2001): Prospects and promise of wheat breeding in the 21st century. *Euphytica* **119**: 3-15.

- Ramløv, H. and Westh, P. (1992): Survival of the cryptobiotic eutardigrade *Adorybiotus coronifer* during cooling to -196°C: Effect of cooling rate, trehalose level, and short term acclimation. *Cryobiology* **29**: 125-130.
- Ramon, M., Rolland, F., Thevelein, J.M., Van Dijck, P. and Leyman, B. (2007): ABI4 mediates the effects of exogenous trehalose on *Arabidopsis* growth and starch breakdown. *Plant Molecular Biology* **63**(2): 195-206.
- Reinders, A., Burckert, N., Hohmann, S., Thevelein, J.M., Boller, T., Weimken, A. and De Virgilio, C. (1997): Structural analysis of the subunits of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae* and their function during heat shock. *Molecular Microbiology* **24**: 687-695.
- Richards, A.B., Krakowka, S., Dexter, L.B., Schmid, H., Wolterbeek, A.P., Waalkens-Berendsen, D.H., Shigoyuki, A. and Kurimoto, M. (2002): Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food and Chemical Toxicology* **40**(7):871-898.
- Rimmele, M. and Boos, W. (1994): Trehalose-6-phosphate hydrolase of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **176**(18): 5654-5664.
- Rohwer, C.L. and Erwin, J.E. (2008): Horticultural applications of jasmonates: A review. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **83**(3): 283-304.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E. and Sheen, J. (2006): Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 675-709.
- Rolland, F., Moore, B. and Sheen, J. (2002): Sugar sensing and signaling in plants. *The Plant Cell* **14**: s185-s205.
- Roser, B. (1991): Trehalose, a new approach to premium dried foods. *Trends in Food Science & Technology* **2**: 166-169.
- Roser, B. and Colaço, C. (1993): A sweeter way to fresh food. *New Scientist* **138**: 25-28.
- Rueda, B., Miguelez, E.M., Hardisson, C. and Manzanal, M.B. (2001): Changes in glycogen and trehalose content of *Streptomyces brasiliensis* hyphae during growth in liquid cultures under sporulating and non-sporulating conditions. *FEMS Microbiology Letters* **194**(2): 181-185.
- Ryu, S.I., Park, C.S., Cha, J., Woo, E.J. and Lee, S.B. (2005): A novel trehalose-synthesizing glycosyltransferase from *Pyrococcus horikoshii*: molecular cloning and characterization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **329**(2): 429-436.
- Saha, P., Chatterjee, P. and Biswas, A.K. (2010): NaCl pretreatment alleviates salt stress by enhancement of antioxidant defense system and osmolyte accumulation in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Indian Journal of Experimental Biology* **48**: 593-600.
- Saito, K., Kase, T., Takahashi, E. and Horinouchi, S. (1998): Purification and characterization of a trehalose synthase from the basidiomycete *Grifola frondosa*. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(11): 4340-4345.
- Sakurai, M., Furuki, T., Akao, K., Tanaka, D., Nakahara, Y., Kikawada, T., Watanabe, M. and Okuda, T. (2008): Vitriification is essential for anhydrobiosis in an African chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **105**(13): 5093-5098.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, volume 3, appendices B.11 and B.23 ISBN-10: 0879693096
- Sampedro, J.G. and Uribe, S. (2004): Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity. *Journal Molecular and Cellular Biochemistry* **256-257**(1-2): 319-327.
- Sano, F., Asakawa, N., Inoue, Y. and Sakurai, M. (1999): A dual role for intracellular trehalose in the resistance of yeast cells to water stress. *Cryobiology* **39**: 80-87.

- Sasai-Takedatsu, M., Taketani, S., Nagata, N., Furukawa, T., Tokunaga, R., Kojima, T. and Kobayashi, Y. (1996): Human trehalase: characterization, localization, and its increase in urine by renal proximal tubular damage. *Nephron* **73**(2): 179-185.
- Satoh-Nagasawa, N., Nagasawa, N., Malcomber, S., Sakai, H. and Jackson, D. (2006): A trehalose metabolic enzyme controls inflorescence architecture in maize. *Nature* **441**(7090): 227-230.
- Schelbert, S., Aubry, S., Burla, B., Agne, B., Kessler, F., Krupinska, K. and Hörtensteiner, S. (2009): Pheophytin pheophorbide hydrolase (pheophytinase) is involved in chlorophyll breakdown during leaf senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**:767-785.
- Schenk, N., Schelbert, S., Kanwischer, M., Goldschmidt, E.E., Dörmann, P. and Hörtensteiner, S. (2007): The chlorophyllases AtCLH1 and AtCLH2 are not essential for senescence-related chlorophyll breakdown in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letter* **581**(28): 5517-5525.
- Schluepmann, H. and Paul, M. (2009): Trehalose Metabolites in *Arabidopsis* – elusive, active and central. In: *The Arabidopsis Book 7*. Editors: The American Society of Plant Biologists. pp. 1-17. doi:10.1199/tab.0122
- Schwendeman, S.P., Constantino, H.R., Gupta, R.K., Siber, G.R., Klibanov, A.M. and Langer, R. (1995): Stabilization of tetanus and diphtheria toxoids against moisture-induced aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**: 11234-11238.
- Scott, P. (2000): Resurrection plants and the secrets of eternal leaf. *Annals of Botany* **85**: 159-166.
- Secks, M.E., Richardson, M.D., West, C.P., Marlatt, M.L. and Murphy, J.B. (2000): Role of trehalose in desiccation tolerance of endophyte-infected tall fescue. *Discovery* **1**: 54-55.
- Silva, Z., Sampaio, M-M., Henne, A., Böhm, A., Gutzat, R., Boos, W., da Costa, M.S. and Santos, H. (2005): The high-affinity maltose/trehalose ABC transporter in the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27 also recognizes sucrose and palatinose. *Journal of Bacteriology* **187**(4): 1210-1218.
- Sims, D.A. and Gamon J.A. (2002): Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment* **81**: 337-354.
- Singer, M.A. and Lindquist, S. (1998): Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends in Biotechnology* **16**: 460-468.
- Sivritepe, N., Kumral, N.A., Erturk, U., Yerlikaya, C. and Kumral, A. (2009): Responses of grapevines to two-spotted spider mite mediated biotic stress. *Journal of Biological Sciences* **9**: 311-318.
- Smeeckens, S., Ma, J., Hanson, J. and Rolland, F. (2010): Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology* **13**(3): 273-278.
- Smith, S.E. and Read, D.J. (1997): Mycorrhizal symbiosis. 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, London ISBN-10: 0126528403
- Sola-Penna, M. and Meyer-Fernandes, J.R. (1998): Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: why is trehalose more effective than other sugars? *Archives of Biochemistry and Biophysics* **360**(1): 10-14.
- Soto, T., Fernandez, J., Dominguez, A., Vicente-Soler, J., Cansado, J. and Gacto, M. (1998): Analysis of ntp1+ gene, encoding neutral trehalase in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1443**: 225-229.
- Stamburk, B.U., da Silva, M.A., Panek, A.D. and de Araujo, P.S. (1999): Active  $\alpha$ -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* **170**: 105-110.



- Stambuk, B.U. and De Araujo, P.S. (2001): Kinetics of active alpha-glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* **1**(1): 73-78.
- Stambuk, B.U., De Araujo, P.S., Panek, A.D. and Serrano, R. (1996): Kinetics and energetics of trehalose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* **237**: 876-881.
- Sterky, F., Bhalerao, R.R., Unneberg, P., Segerman, B., Nilsson, P., Brunner, A.M., Charbonnel-Campaa, L., Lindvall, J.J., Tandré, K., Strauss, S.H., Sundberg, B., Gustafsson, P., Uhlén, M., Bhalerao, R.P., Nilsson, O., Sandberg, G., Karlsson, J., Lundeberg, J. and Jansson, S. (2004): A *Populus* EST resource for plant functional genomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **101**(38): 13951-13956.
- Stott, K. and Mohammed, C. (2004): Specialty Mushroom Production Systems: Maitake and Morels. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. ISBN-10: 0642587345
- Streeter, J., G. (1985): Accumulation of alpha,alpha-trehalose by *Rhizobium* bacteria and bacteroids. *Journal of Bacteriology* **164**: 78-84.
- Streeter, J.G. and Bhagwat, A. (1999): Biosynthesis of trehalose from maltooligosaccharides in *Rhizobia*. *Canadian Journal of Microbiology* **45**(8): 716-721.
- Strom, A.R. and Kaasen, I. (1993): Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. *Molecular Microbiology* **8**(2): 205-210.
- Styvold, O.B. and Strom, A.R. (1991): Synthesis, accumulation, and excretion of trehalose in osmotically stressed *Escherichia coli* K-12 strains: influence of amber suppressors and function of the periplasmic trehalase. *Journal of Bacteriology* **173**(3): 1187-1192.
- Suárez, R., Calderón, C. and Iturriaga, G. (2009): Enhanced tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic alfalfa accumulating trehalose. *Crop Science* **49**: 1791-1799.
- Sussich, F., Skopec, C., Brady, J. and Cesaro, A. (2001): Reversible dehydration of trehalose and anhydrobiosis: from solution state to an exotic crystal? *Carbohydrate Research* **334**: 165-176.
- Swaim, C.L., Anton, B.P., Sharma, S.S., Taron, C.H. and Benner, J.S. (2008): Physical and computational analysis of the yeast *Kluyveromyces lactis* secreted proteome. *Proteomics* **8**: 2714-2723.
- Szajkó, G., Mezösi, A., Pató, Zs., Scultéty, O., Sugár, A. és Tóth, A.I. (2009): Erdészeti és fászfűrű energetikai biomassza Magyarországon. Budapesti Corvinus Egyetem, Regionális Energiagazdasági Kutatóközpont, Műhelytanulmány pp. 83-86.
- Taga, T., Senma, M. and Osaki, K. (1972): The crystal and molecular structure of trehalose dihydrate. *Acta Crystallographica B* **28**: 3258-3263.
- Takenaka, S., Kondo, T., Nazeri, S., Tamura, Y., Tokunaga, M., Tsuyama, S., Miyatake, K. and Nakano, Y. (1997): Accumulation of trehalose as a compatible solute under osmotic stress in *Euglena gracilis* Z. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **44**: 609-613.
- Tanaka, M., Michida, Y., Niu, S., Ikeda, T., Jana, N.R., Doi, H., Kurosawa, M., Nekooki, M. and Nukina, N. (2004): Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington's disease. *Nature Medicine* **10**: 148-154.
- Thevelein, J.M. (1984): Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiological Reviews* **48**(1): 42-59.
- Thevelein, J.M. and Hohmann, S. (1995): Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends in Biochemical Sciences* **20**(1): 3-10.
- Tillequin, F. (2009): Trehala, a meeting point between zoology, botany, chemistry, and biochemistry. *Revue d'Histoire de la Pharmacie* **57**(362): 163-172.

- Traynor, B.J., Bruijn, L., Conwit, R., Beal, F., O'Neill, G., Fagan, S.C. and Cudkowicz, M.E. (2006): Neuroprotective agents for clinical trials in ALS. A systematic assessment. *Neurology* **67**(1): 20-27.
- Tsuchida, T., Murakami, Y., Nishimoto, Y. and Kotani T. (1996): Method of producing trehalose by microorganisms which can produce tremalose with sucrose or maltose as main carbon source. Patent Number: 5,484,714.
- Tuba Z. (2001): A kizáradástűrő edényes növények előfordulása, elterjedése és evolúciója. *Botanikai Közlemények* **88**(1-2): 173-183.
- Tuskan, G.A., Difazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., ...<sup>□27</sup>..., Vahala, J., Wall, K., Wessler, S., Yang, G., Yin, T., Douglas, C., Marra, M., Sandberg, G., Van de Peer, Y. and Rokhsar, D. (2006): The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **313**(5793): 1596-1604.
- Ushijima, K., Fujisawa, T. and Kretschmer, N. (1995): Study on digestion and absorption of trehalose in human intestine. *Digestion and Absorption* **18**: 56-57.
- Van Dijck, P., Colavizza, D., Smet, P. and Thevelein, J.M. (1995): Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Applied and Environmental Microbiology* **61**(1): 109-115.
- Van Dijck, P., Vandesteene, L. and Avonce, N. (2010): Use of trehalase to obtain drought resistance in plants. WIPO Patent WO/2010/089392A1
- Van Elburg, R.M., Uil, J.J., Kokke, F.T.M., Mulder, A.M., van de Broek, W.G.M., Mulder, C.J.J. and Heymans, H.S.A. (1995): Repeatability of the sugar-absorption test, using lactulose and mannitol, for measuring intestinal permeability for sugars. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **20**: 184-188.
- Vandercammen, A., François, J. and Hers, H.G. (1989): Characterization of trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* **182**: 613-620.
- Vázquez-Ortíz, F.A. and Valenzuela-Soto, E.M. (2004): HPLC determination of trehalose in *Selaginella lepidophylla* plants. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **27**(12): 1937-1946.
- Veiga, S.S., da Silveira, R.B., Dreyfus, J.L., Haoach, J., Pereira, A.M., Mangili, O.C. and Gremski, W. (2000): Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon* **38**: 825-839.
- Vogel, G., Fiehm, O., Jean-Richard-dit-Bressel, L., Boller, T., Wiemken, A., Aeschbacher, R.A. and Wengler, A. (2001): Trehalose metabolism in *Arabidopsis*: occurrence of trehalose and molecular cloning and characterization of trehalose-6-phosphate synthase homologues. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1817-1826.
- Voit, E.O. (2003): Biochemical and genomic regulation of the trehalose cycle in yeast: review of observations and canonical model analysis. *Journal of Theoretical Biology* **223**: 55-78.
- Volk, T.J. and Leonard, T.J. (1989a): Experimental studies on the Morel. I. Heterokaryon formation between monoasporous strains of *Morchella*. *Mycologia* **81**: 523-531.
- Volk, T.J. and Leonard, T.J. (1989b): Physiological and environmental studies of sclerotium formation and maturation in isolates of *Morchella crassipes*. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 3095-3100.
- Volk, T.J. and Leonard, T.J. (1990): Cytology of the life-cycle of *Morchella*. *Mycological Research* **94**: 399-406.
- Vuorio, O.E., Kalkkinen, N. and Londesborough, J. (1993): Cloning of two related genes encoding the 56-kDa and 123-kDa subunits of trehalose synthase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* **216**(3): 849-861.

<sup>□27</sup> A szerzők száma meghaladja az ötvenet, ezért a teljes hivatkozást a Függelékben helyeztem el.

- Wang, W., Vinocur, B. and Altman, A. (2003): Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218**: 1-14.
- Wannet, W.J., Op den Camp, H.J., Wisselink, H.W., van der Drift, C., Van Griensven, L.J. and Vogels, G.D. (1998): Purification and characterization of trehalose phosphorylase from the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1425**(1): 177-188.
- Wassenberg, D., Liebl, W. and Jaenicke, R. (2000): Maltose-binding protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: stability and binding properties. *Journal of Molecular Biology* **295**: 279-288.
- Whatmore, A.M. and Reed, R.H. (1990): Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K<sup>+</sup> in turgor regulation. *Journal of General Microbiology* **136**: 2521-2526.
- Wiese, A., Gröner, F., Sonnewald, U., Deppner, H., Lerchl, J., Hebbeker, U., Flügge, U.I. and Weber, A. (1999): Spinach hexokinase I is located in the outer envelope membrane of plastids. *FEBS Letters* **461**: 13-18.
- Wiggers, H.A.L. (1832): Untersuchung über das Mutterkorn, *Secale cornutum*. *Annalen der Pharmacie* **1**(2): 129-182.
- Willets, H.J. and Bullock, S. (1992): Developmental biology of sclerotia. *Mycological Research* **96**(10): 801-816.
- Williams, R.J. and Leopold, A.C. (1989): The glassy state in corn embryos. *Plant Physiology* **89**: 977-981.
- Winderickx, J., Winde, J.H., Crauwels, M., Hino, A., Hohmann, S., Dijck, P. and Thevelein, J.M. (1996): Regulation of genes encoding subunits of the trehalose synthase complex in *Saccharomyces cerevisiae*: novel variations of STRE-mediated transcription control? *Molecular & General Genetics* **252**(4): 470-482.
- Wingler, A. (2002): The function of trehalose biosynthesis in plants. *Phytochemistry* **60**(5): 437-440.
- Wipf, D., Koschinsky, S., Clowez, P., Munch, J.C., Botton, B. and Buscot, F. (1997): Recent advances in ecology and systematics of morels. *Cryptogamie Mycologie* **19**: 95-109.
- Wisser, G., Guttenberger, M., Hampp, R. and Nehls, U. (2000): Identification and characterization of an extracellular acid trehalase from the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. *New Phytologist* **146**(1): 169-175.
- Woese, C., Kandler, O. and Wheelis, M. (1990): Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proceedings of the National Academy of Sciences (U.S.)* **87**(12): 4576-4579.
- Wojtek, P.M. (1996): Chromatographic and electrophoretic methods for analysis of superoxide dismutases. *Journal of Chromatography B* **684**: 59-75.
- Xavier, K.B., Martins, L.O., Peist, R., Kossmann, M., Boos, W. and Santos, H. (1996): High-affinity maltose/trehalose transport system in the hyperthermophilic Archeon *Thermococcus litoralis*. *Journal of Bacteriology* **178**: 4773-4777.
- Yeo, E-T., Kwon, H-B., Han, S-E., Lee, J-T., Ryu, J-C. and Byun, M-O. (2000): Genetic engineering of drought resistant potato plants by introduction of the trehalose-6-phosphate synthase (*TPS1*) gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecules and Cells* **10**: 263-268.
- Yoshida, M., Nakamura, N. and Horikoshi, K. (1995): Production and application of maltose phosphorylase and trehalose phosphorylase by a strain of *Plesiomonas*. *Oyo Tshitsu Kagaku* **42**: 19-25.

- Yousefi, B., Assarehad, M.H. and Modir-Rahmati, A.R. (2008): Compatibility experiment of 14 black poplar varieties (*Populus nigra*) for introducing of superior varieties in Kurdistan (Iran), (First 5 years). In: *Review of Forests, Wood Products and Wood Biotechnology of Iran and Germany – Part II*. Editors: Kharazipour, A.R., Schöpfer, C. and Müller, C. pp. 147-164. Universitätsverlag Göttingen ISBN-13: 9783940344212
- Yousefi, B. and Modir-Rahmati, A.R. (2004): Evaluation and classification of 48 Poplar (*Populus* spp.) clones by seedling leaf and wood yield characteristics. *RIFR Iranian Journal of Forests and Poplar Research* **12**(1): 79-109.
- Yu, Y., Zhang, H. and Zhu, G. (2010): Plant-type trehalose synthetic pathway in *Cryptosporidium* and some other Apicomplexans. *Public Library of Science ONE* **5**(9): e12593.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. and Miller, W. (2000): A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* **7**(1-2): 203-214.
- Zhao, H., Kalivendi, S., Zhang, H., Joseph, J., Nithipatikom, K., Vasquez-Vivar, J. and Kalyanaraman, B. (2003): Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radical Biology & Medicine* **34**: 1359-1368.
- Zähringer, H., Burgert, M., Holzer, H. and Nwaka, S. (1997): Neutral trehalase Nth1p of *Saccharomyces cerevisiae* encoded by the NTH1 gene is a multiple stress responsive protein. *FEBS Letter* **412**(3): 615-620.
- Zähringer, H., Thevelein, J.M. and Nwaka, S. (2000): Induction of neutral trehalase Nth1 by heat and osmotic stress is controlled by STRE elements and Msn2/Msn4 transcription factors: variations of PKA effect during stress and growth. *Molecular Microbiology* **35**(2): 397-406.
- Zentella, R., Mascorro-Gallardo, J.O., Van Dijck, P., Folch-Mallol, J., Bonini, B., Van Vaeck, C., Gaxiola, R., Covarrubias, A.A., Nieto-Sotelo, J., Thevelein, J.M. and Iturriaga, G. (1999): A *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphate synthase complements growth and stress-tolerance defects in a Yeast tps1 mutant. *Plant Physiology* **119**: 1473-1482.
- Zerova, M. (1941): A new morel from the virgin steppe (*Morchella steppicola* Zerova sp. nov.). *Journal Botanique de l'Académie des sciences de la RRS d'Ukraine* **II**: 155-159.

## Függelék

<b>Domain</b>	<b>Eukaryota</b> *	<b>Eukarióta domén</b>
	<i>Opisthokonta</i>	
<b>Kingdom</b>	<b>Fungi</b>	<b>Gombák országa</b>
Subkingdom	Dikarya	Kétmagvú gombák alországa
<b>Phylum</b>	<b>Ascomycota</b>	<b>Tömlősgombák törzse</b>
	<i>Saccharomyceta</i>	
Subphylum	Pezizomycotina	Csészegombák altörzse
<b>Class</b>	<b>Pezizomycetes</b>	<b>Csészegombák osztálya</b>
<b>Order</b>	<b>Pezizales</b>	<b>Csészegomba-félék rendje</b>
<b>Family</b>	<b>Morchellaceae</b>	<b>Kucsmagombák családja</b>
<b>Genus</b>	<b>Morchella</b>	<b>Kucsmagombák nemzetsége</b>
Species	<i>Morchella conica</i> Pers.	<i>Hegyes kucsmagomba</i>
	<i>Morchella esculenta</i> (L.)Pers.	<i>Ízletes kucsmagomba</i>
	<i>Morchella steppicola</i> Zer.	<i>Sztyeppei kucsmagomba</i>

**F1.ábra** *Morchella* fajok rendszertani besorolása az NCBI taxonómiai oldala<sup>[F1]</sup> szerint

\*Woese és mtsai (1990) módosításával

---

<sup>[F1]</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Taxonomy>

<b>Domain</b>	<b>Eukaryota<sup>*</sup></b>	<b>Eukaróta domén</b>
<b>Kingdom</b>	<b>Viridiplantae</b>	<b>Zöld növények országa</b>
<b>Phylum</b>	<b>Streptophyta</b>	<b>Zöld növények törzse</b>
	<i>Streptophytina</i>	
	<i>Embryophyta</i>	<i>Szárazföldi zöld növények</i>
	<i>Tracheophyta</i>	<i>Edényes növények</i>
	<i>Euphyllophyta</i>	<i>Valódi leveles növények</i>
<b>Class</b>	<b>Spermatophyta</b>	<b>Magvas növények osztálya</b>
	<i>Magnoliophyta</i>	<i>Zárvatermő növények</i>
	<i>Eudicotyledons</i>	<i>Valódi kétszikűek</i>
	<i>Core eudicotyledons</i>	<i>Központi valódi kétszikűek</i>
Subclass	Rosids	
	<i>Fabids</i>	
<b>Order</b>	<b>Malpighiales</b>	
<b>Family</b>	<b>Salicaceae</b>	<b>Fűzfa-félék családja</b>
Tribe	Saliceae	Fűzek nemzetségsoportja
<b>Genus</b>	<b>Populus</b>	<b>Nyár-félék nemzetsége</b>
Species	<i>Populus glauca L. var Koepczkii</i>	
	<i>Populus canescens (Aiton)Sm.</i>	<i>Szürke nyár</i>

**F2.ábra** *Populus* fajok rendszertani besorolása az NCBI taxonómiai oldala<sup>[1]</sup> szerint  
(<sup>\*</sup>Woese és mtsai 1990)

<sup>[1]</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Taxonomy>

<b>Domain</b>	<b>Eukaryota<sup>*</sup></b>	<b>Eukaróta domén</b>
<b>Kingdom</b>	<b>Viridiplantae</b>	<b>Zöld növények országa</b>
<b>Phylum</b>	<b>Streptophyta</b>	<b>Zöld növények törzse</b>
	<i>Streptophytina</i>	
	<i>Embryophyta</i>	<i>Szárazföldi zöld növények</i>
	<i>Tracheophyta</i>	<i>Edényes növények</i>
	<i>Euphyllophyta</i>	<i>Valódi leveles növények</i>
<b>Class</b>	<b>Spermatophyta</b>	<b>Magvas növények osztálya</b>
	<i>Magnoliophyta</i>	<i>Zárvatermő növények</i>
	<i>Eudicotyledons</i>	<i>Valódi kétszikűek</i>
	<i>Core eudicotyledons</i>	<i>Központi valódi kétszikűek</i>
Subclass	Rosids	
	<i>Fabids</i>	
<b>Order</b>	<b>Fagales</b>	<b>Bükkfafélék rendje</b>
<b>Family</b>	<b>Fagaceae</b>	<b>Bükkfafélék családja</b>
<b>Genus</b>	<b>Quercus</b>	<b>Tölgyek nemzetsége</b>
Species	<i>Quercus robur</i> L.	<i>Kocsányos tölgy</i>

F3.ábra *Quercus robur* rendszertani besorolása az NCBI taxonómiai oldala<sup>□F1</sup> szerint  
 (\* Woese és mtsai 1990)

□F1 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Taxonomy>

## F1. *Morchella* fajok gyógyászati és ipari alkalmazásának lehetőségei

A *Morchella* fajok nem tartoznak az általánosan ismert gyógyhatású gombák közé, bár a kínai tradicionális orvoslás már régóta alkalmazza őket krupp, gyomorproblémák és légszomj kezelésében, mentálhigiénés problémák esetén (Ying és mtsai 1987). A 2000-es években intenzíven kezdték vizsgálni gyógyhatásukat, tudományosan igazolták gyulladáscsökkentő, antioxidáns, immunrendszer stimuláns és antitumor hatásukat (Duncan és mtsai 2002, Mau és mtsai 2004, Turkoglu és mtsai 2006, Nitha és mtsai 2007, 2010).

A *Morchella* fajok gyógyászatban betöltött szerepének áttekintésekor említést érdemel, hogy néhány esetben megfigyeltek mérgezési tüneteket nagymennyiségű kucsmagomba fogyasztását követően, melyet feltételezhetően a bennük csupán csak kis mennyiségben előforduló instabil, volatilis neurotoxinek okoztak (Pfab és mtsai 2008). A tünetek olyan esetekben jelentkeztek, amikor a fogyasztást megelőzően az termőtesteket nem főzték kellő ideig, így a mérgező vegyületek az ételben maradtak (Pfab és mtsai 2008).

A napjainkban reneszánszukat élő fermentációs technológiák között a *Morchella* fajokat a *M. esculenta* képviseli: keményítő SSF módszerrel történő fermentálásában Zhang és mtsai (2010) kedvező eredményre<sup>[1]F2</sup> jutottak. Az ötletet Han fermentációs kísérletének eredményei adták, miszerint a bazidiumos gombák közé tartozó *Hericium erinaceum* (Bull.)Pers. a gabona keményítőt meglepően jó hatékonysággal képes bontani, és így a gabonakorpa tápértékét növelni (Han 2003). Az SSF eljárás során a korpa keményítőtartalma 64.5%-ról 23.5%-ra csökkent (74.8% hatékonysággal) (Zhang és mtsai 2010). Egy további biotechnológiai (fermentációs) alkalmazás lehetőségét vetíti előre *M. esculenta* lipoxigenáz aktivitásának részletes vizsgálata (Bisakowski és mtsai 2000).

---

<sup>[1]F2</sup> A fenti vizsgálatok megerősítették, hogy az SSF technológiában a fonalas gombák sokkal hatékonyabbak, mint az egyszéjtű mikroorganizmusok (baktériumok, élesztők).



## F2. A *Populus* nemzetség kultúrtörténeti vonatkozásai

Írásos emlékek és művészeti alkotások állítanak emléket a nyárfák szépségének és az emberek hozzájuk fűződő viszonyának az ókortól egészen napjainkig, köztük a legismertebbek: a 4500 éves mezopotámiai arany nyárfalevél-koszorúk és nyakláncok (királynősírok), a Harris-papirusz – amely megemlékezik egy héliupoliszi szent nyárfáról (ie. 1168), Plinius Secundus írása a rómaiak fá-tiszteletéről és ábrázolása, mely egy vízparton álló nyárat örökít meg (isz. I. század), régi magyar oklevelek, a nagy impresszionista festő Claude Monet híres festmény-sorozata az Epte folyó partján álló hatalmas nyárfákról (1891), a neves 19. századi magyar festő Paál László – Nyárfák (1876) címet viselő alkotása, és a kortárs Szalay S. Zoltán nyárat ábrázoló festménye (Plinius isz. 77 (1987), Szamota és mtsai 1984). Mindemellett nem címadóként számos képzőművészeti alkotáson szerepelnek, a tájfestészetben gyakori szereplők.

A nyárok az életfák közé tartoznak, Herkules életfája is ennek a nemzetségnek a tagja. Az ókori görögök az emlékezés tavának partján növő fehér nyárfákat (*Populus alba* L.) szentnek tartották, a fekete nyárral együtt (*Populus nigra* L.) – az alvilág fáit – temetők kapujához, síremlékek köré ültették (Godet 2001). Kalüpszó nimfa halálszigetén (Homérosz: Odüsszeia) az alvilág bejáratánál is fekete nyárok állnak égerfák és ciprusok társaságában.

A magyar hitvilágban a fekete nyárfák a halál, a gyász fáiként ismertek, sötét lombjuk, sötét színű kérgük és vérvörös fájuk tette őket a halál szimbólumává (Surányi 1985). A magyar népmesékben megjelenő égigérő fa (életfa, világfa) jellemzően jegenyenyár (*Populus nigra* L. var. *Italica*), mely összeköti az emberek világát az alsó és felső világokkal (Diószegi 1969, Magyar Néprajzi Lexikon I.)

Az észak-amerikai hidatsza indiánok a nyárfák árnyékának életükre gyakorolt kedvező hatásában hittek (Jankovics 1991).

A fehér nyárok leveleinek fényes sötétzöld színe és molyhos, fehér fonáka élesen eltér egymástól, ennek köszönhetően váltak az őszi napforduló jelképeivé, miként a vizek tájbeli választóvonal jellegének köszönhetően a vízpartokat övező fák, így a vízparti nyárfák a sorsfordulók jelképei (Jankovics 1991).

Magyarországi elterjedtségüket számos település neve őrzi, úgymint Nyárád, Mezőnyárád, Felsőnyárád, Kisnyárád, Nagynyárád és Nyáregyháza (Kiss 1988). Hasonló elven a Maros egyik mellékfolyója – Nyárád – és a görög Akherón folyó a partját övező nyárfasorról (akhe-riosz) kapta nevét (Kiss 1988). Az ősmagyar személynevek között fellelhető Nyárád (főrfőnév) eredete szintén a nyárákhoz köthető.

**F1. táblázat I-II-III.** Magyarországon őshonos *Populus* fajok előfordulása természetes növénytársulásokban Borhidi rendszere alapján (Borhidi 2003). A társulások alkotásában részt vevő nyárfajokat az arab számok jelzik: **1** – *P. alba*, **2** – *P. nigra*, **3** – *P. tremula*, **4** – *P. canescens*. Rövidítések jelentése: **szórv.** = szórványosan, **szál.** = szálanként.

**F1.1.**

Oszályok	Rendek	Csoportok	Társulás latin neve	Társulás magyar neve
28. <i>Salicetea purpureae</i> Moor 1958 Folyóparti fűzesek	28.1. <i>Salicetalia purpureae</i> Moor 1958 Bokorfűzesek és puhafáiágatok		<i>Rumici crispi-Salicetum purpureae</i> Kevey in Borhidi & Kevey 1996	Csigolya-bokorfűzesek <sup>2</sup>
			<i>Senecioni sarracenicis-Populetum albae</i> Kevey in Borhidi & Kevey 1996	Fehérnyárliget <sup>1,2</sup> szórv.
			<i>Carduo crispus-Populetum nigrae</i> Kevey in Borhidi & Kevey 1996	Feketenyárliget <sup>2,1</sup> szál.
			<i>Leucojo aestivi-Salicetum albae</i> Kevey in Borhidi & Kevey 1996	Fűzligetek <sup>1,2</sup> szál.
29. <i>Alnetea glutinosae</i> Br.-Bl. & Tx. ex Westhoff & al. 1946 Láperdők és lápeserjések	29.1. <i>Alnetalia glutinosae</i> Tx. 1937 Láperdők és lápeserjések		<i>Angelico sylvestris-Alnetum glutinosae</i> Borhidi in Borhidi & Kevey 1996	Égeres mocsárerdő <sup>1</sup>
			<i>Salici cinereae-Sphagnetum recurvi</i> (Zólyomi 1934) Soó 1955	Tőzegmohás fűzláp <sup>3</sup>

F1.II.

Osztályok	Rendek	Csoportok	Társulás latin neve	Társulás magyar neve
30. <i>Quercus-Fagetea</i> Br.-Bl. & Viteger in Viteger 1937 em. Borhidi 1996 Mezofili lombos erdők	30.1. <i>Fagetealia sylvaticae</i> Pawlowski in Pawl. et al. 1928 Bükkösök és elegyes mezofili erdők	30.1.1.	<i>Paridi quadrifoliae-Alnetum</i> Kevey in Borhidi & Kevey 1996	Sikvidéki égerliget <sup>1,2</sup>
		30.1.1.	<i>Fraxino pannonicae-Ulmetum</i> Soó in Aszód 1935 corr. 1963	Tiszai tölgy-köris-szil liget <sup>1</sup>
		30.1.1.	<i>Knautio drymeiae-Ulmetum</i> Borhidi & Kevey 1996	Dél-dunántúli tölgy-köris-szil liget <sup>1</sup>
		30.1.2.	<i>Carpesio abrotanoidis-Carpinetum</i> Kevey & al. in Borhidi & Kevey 1996	Dél-alföldi gyertyános-tölgyes <sup>1</sup>
		30.1.3.	<i>Roso pendulinae-Tilietum</i> <i>platyphylli</i> Csiky in Csiky et al. 2001	Görgeteg-sziklaerdő <sup>3</sup>
	30.1.6.	<i>Luzulo nemorosae-Fagetum</i> <i>sylvaticae</i> Meusel 1937	Középhegységi mészkerülő bükkös <sup>3</sup>	
	30.2. <i>Quercetalia roboris</i> R. Tx. 1931 Mészkerülő lombos erdők	30.2.1.	<i>Deschampsio flexuosae- Quercetum sessiliflorae</i> Firbas et Sigmund 1928	Középhegységi mészkerülő tölgyes <sup>3</sup>

Az egyes csoportok megnevezése: **30.1.1.** *Alnion incanae* Pawlowski in Pawlowski & Wallisch 1928 - Keményfáligetek, **30.1.2.** *Carpinion betuli* Issler 1931 - Közép-európai gyertyános-tölgyesek, **30.1.3.** *Tilio platyphylli-Acerion pseudoplatani* Klika 1955 - Közép-európai törmelenklejtő- és szurdokerdők, **30.1.6.** *Luzulo-Fagion* Lohm. & R. Tx. in R. Tx. 1954 - Mészkerülő bükkösök, **30.2.1.** *Genisto germanicae-Quercion* Neuhäusl & Neuhäuslová-Novotná 1967 - Mészkerülő tölgyesek

F1.III.

Osztályok	Rendek	Csoportok	Társulás latin neve	Társulás magyar neve
31. <i>Quercetea pubescentis</i> (Doing 1955) Scamoni & Passarge 1959 Szubmediterrán és szubkontinentális xerotherm erdők	31.2. <i>Quercetalia cerridis</i> Borhidi 1996 Szubkontinentális-szubmediterrán xerotherm tölgyesek	31.2.1.	<i>Agrostio tenuis-Quercetum cerridis</i> Csapody (1974) ex Borhidi et Kevey 1996	Cérnatippanos cseres-tölgyes <sup>3,4</sup>
			<i>Molinio litoralis-Quercetum cerridis</i> Szodfridt & Tallós ex Borhidi 1996	Kékperjés cseres-tölgyesek <sup>3</sup>
		31.2.3.	<i>Polygonato latifolio-Quercetum roboris</i> (Hargitai 1940) Borhidi 1996	Duna-Tisza közti gyöngyvirágos tölgyes <sup>1,3 és 4</sup>
			<i>Convallario-Quercetum roboris</i> Soó (1939) 1957	Nyírségi gyöngyvirágos tölgyes <sup>3</sup>
			<i>Iridi variegatae-Quercetum roboris</i> (Hargitai 1940) Borhidi in Borhidi & Kevey 1996	Nőszirmos pusztai tölgyes <sup>4 szál.</sup>
			<i>Junipero-Populetum albae</i> (Zólyomi ex Soó 1950) Szodfridt 1969	Nyáras-borókás <sup>1,4 szál.</sup>

Az egyes csoportok megnevezése: 31.2.1. *Quercion petraeae* Zólyomi et Jakucs 1957 - Szubkontinentális száraz tölgyesek, 31.2.3. *Aceri tatarici-Quercion* Zólyomi & Jakucs 1957 - Szubkontinentális tölgyesek és elegyes xerotherm erdők B) Alföldi erdősztyepp-erdők és bokorerdők homokon

### F3. Hazánk nevezetes nyárfái

Magyarországon számos 6 m törzskörfogatot meghaladó nyárfá egyed tartanak nyilván, melyek közül a nevezetes Mihály-fa (*P. x canescens*, 7.65 m, 250 év; <sup>1</sup>Abaujker<sup>□F3</sup>), a Mária-fa (*P. alba*, >7.50 m, >250 év; <sup>1</sup>Alsóberecki), a Takó-hegyi tökfák (3 *P. alba* egyed, 300 évesek; <sup>3</sup>Hédervár), a szintén matuzsálem korú <sup>2</sup>szeged-tápei fehér nyár (10.53 m, >280 év) és a két óriás <sup>4</sup>nagyatádi fekete nyár (*P. nigra*, 10.40 m és 11.00 m, >250 év) képviselik a legnagyobb méretű nyárfákat (Bartha 1992, Pósfai 2005, <http://www.dendromania.hu>, <http://www.nevezetesfak.hu>, <http://oregfak.emk.nyme.hu>).

### F4. A fatest felépítése

A faanyag (fatest) széleskörű felhasználása (faipar, vegyipar, hagyományos mesterségek) az emberiség őskorába nyúlik vissza és a mai napig töretlen. A fatest kemény, rostokban gazdag lignifikálódott szövet, mely sejtes szerkezetű, vízmegkötő (higroszkópos) és anizotróp<sup>□F4</sup> sajátsgú. Az élő faanyag nedvességtartalma 20-50 %; a lignifikáció folyamán a cellulóz (a faanyag 40-50 %-a) és hemicellulóz (a faanyag 15-25 %-a) rostjai közé 15-30 % lignin rakódik be, emellett tartalmazhat még ásványi anyagokat, cseresavat, olajokat, zsírokat, viaszt és gyantát.

A fatest makroszkópos szerkezete mechanikai-, taxonómiai és esztétikai szempontból egyaránt jelentős szereppel bír. Élettani funkcióját tekintve egyrészt a benne futó vízszállító edényekben (trachea) a víz és a benne oldott ásványi anyagok szállítása és vízraktározás valósul meg, másrészt a farostoknak köszönhetően szilárdító szerepet tölt be. A fatestet a tracheák, a tracheidák, a farostok és a faparenchimasejtek alkotják. A rostok mennyiségének és szerkezetének függvényében beszélhetünk puha és keményfákról.

A zárvatermők heteroxil fatesté a bennük futó nagy üregű tracheák elrendeződése alapján lehet szórt- illetve gyűrűslikacsú. Szórtlikacsú esetben a fa évgyűrűiben a tracheák egyenletesen oszlanak el, míg a gyűrűslikacsú fák fatestében gyűrűs elrendeződést mutatnak és elsősorban a tavaszi fában (tavaszi pászta) helyezkednek el. A szórtlikacsú fák szövetszerkezete a gyűrűslikacsú és a nyitvatermő típusokénál egyenletesebb. A mérsékelt égövi szórtlikacsú fajok közé egyaránt tartoznak lágy- és keményfák, sötét gesztü<sup>□F5</sup> (gesztes) és színes geszt nélküli ún. szíjács fák.

---

<sup>□F3</sup> A településnevek index számai a megyéket jelölik: 1 – Borsod-Abaúj-Zemplén, 2– Csongrád, 3 – Győr-Moson-Sopron, 4 – Somogy

<sup>□F4</sup> A fatestet különféle funkciójú, többnyire a hossz tengely irányában megnyúlt sejtek építik fel, ennek következtében fizikai ellenállóképessége a hatások irányától is függ.

<sup>□F5</sup> A fatest belső, idősebb évgyűrűi inaktívvá válnak, a szállítósejtek üregét a faparenchimasejtek benővései (tillisz) eltömítik, a sejtfalaikba színes anyagok (flobafének: polifenol oxidációs származék) épülnek be, melyek védelmet nyújtanak a víz és a kórokozók ellen.

## F5. Nemesnyár ültetvények széleskörű alkalmazási lehetőségei

A gazdaságos hagyományos szántóföldi termesztésre alkalmatlan, jó vízellátottságú talajokon eredményesen termesztethetők rövid vágásfordulójú nemesnyár energiaültetvények (Szajkó és mtsai 2009, Gockler 2010a,b).

A biomassa – úgymint energetikai növénytermelés (energiaültetvények), erdészeti biomassa, mezőgazdasági melléktermékek – energetikai célú hasznosítása a modern kor elvárásainak megfelelő irányvonalat képvisel, az energiatranszformáció CO<sub>2</sub> mérleg értéke nulla<sup>□F6</sup> (Fogarassy 2001). Magyarországon ezen belül a dendromassa felhasználása a legszámottevőbb, a zöldenergia 'előállítás' mellett a fás szárú energiaültetvények telepítésével mérsékelhetőek a szél- és vízerózió, valamint a belvíz okozta károk is. A biomassa, mint megújuló energiaforrás alkalmazása a környezetterhelés csökkentését és egyúttal a humán erőforrások megfelelő szintű kihasználtságát biztosítja.

A nemes nyárasok szerepe jelentős a korszerű (decentralizált, környezetbarát) szennyvízkezelés folyamatában is. Mechanikai tisztítást és rövid idejű ülepetést követően a szennyvíz nyárfás elhelyező rendszerbe (cellulóznyár) juttatása, illetve a szennyvíziszap energia nyárületetvényekre történő elhelyezése széleskörben alkalmazott.

Nyárfá ültetvények a környezetvédelmi biotechnológia tárgykörébe tartozó fitoremedációban eredményesen alkalmazhatóak. Napjaink egyik legégetőbb környezetvédelmi feladata a talajok és felszíni vizek méregtelenítése a nagyobb részt ipari eredetű toxikus vegyi anyagoktól (gyártási melléktermékek, növényvédőszer (peszticid) maradványok, nehézfémek). A célzottan nemesített GST transzformáns GMO szürkenyáarak jól tolerálják a talajok nehézfém szennyezéséből eredő stresszkörülményeket, más kedvezőtlen környezeti paraméterek hatásaival együttesen is (Gyulai 2010). Magas transpirációs rátájuknak és a talajok mélyebb rétegeit elérő gyökérzetüknek köszönhetően eredményesen adszorbeálják, detoxifikálják és/vagy lebontják a talaj szennyezőanyagait.

Gyors növekedésük és fitoremedációs hatékonyságuk eredményeképpen felhagyott bauxitbányák, meddőhányók kedvelt pionír fajai, ahol szerepük a talajerózió folyamatainak gátlásában is jelentős (Gyulai 2010). A szennyezőanyagok széles spektrumát tekintve alkalmazhatóak a talajok méregtelenítésére úgymint kőolaj szénhidrogének, nehézfémek, peszticidek, klórtartalmú oldószerek (Bittsánszky és mtsai 2005, Bíró és Takács 2007, Gyulai 2010).

---

<sup>□F6</sup> A növények fejlődésük során a fotoszintézis révén ugyanannyi CO<sub>2</sub>-ot építenek be szövetükbe, mint amennyi élegetésükkor felszabadul és a légkörbe kerül.

## F6. *Populus* fajok jellemzése humán-egészségügyi szempontból

A *Populus* fajok humán-egészségügyi szempontból szerepet játszanak egyrészt mint allergének, másrészt pedig mint gyógyhatású növények.

A nyárfák koratavaszi virágzásakor a levegőbe kerülő tekintélyes mennyiségű pollen összkoncentrációja miatt – bár az allergén pollenfehérje molekula kevésbé reaktív – a közepes allergenitású fajok közé tartoznak.

Gyógyászati szempontból a *Populus* fajokra jellemző glikozidok, a populin és szalicin jelentősége ismert: gyulladásgátló és lázcsillapító hatásúak. A barkavirágzatban és a levelekben egyaránt megtalálhatóak. A népi gyógyászatban a *P. nigra* főzetek hatékonysága régtől fogva ismert. A fekete nyárak rügyét, barkavirágzatát, hajtását, levelét és kérgét is felhasználják. A rügyeiből készült főzet hatékonyan bizonyult köszvénybántalmak, húgyúti és prosztatata problémák, ízületi panaszok kezelésében. A *P. nigra* leveleiből készített tea szintén hatásos a genitális-húgyúti régiót érintő megbetegedések, valamint bőrgombásodás kezelésében. Fogasztása kedvező emésztési zavarok, a szájüreg problémái, hörgőgyulladás, belső vérzések, ficamok és zúzóadások esetén egyaránt.

## F7. Magyarországi nevezetes tölgyek

Hazánk dicső korú, nevezetes tölgyei a <sup>4</sup>hédervári<sup>[F7]</sup> Árpád fa (kocsányos tölgy, >600 éves), a <sup>1</sup>szebényi óriástölgy (molyhos tölgy, >450 éves), a <sup>8</sup>zsennyei tölgy (kocsányos tölgy, >400 év), a szintén matuzsálem<sup>3</sup>ragályi ősök fája (kocsányos tölgy, >400 év), Mátyás király fája <sup>5</sup>Tiszaigaron (kocsányos tölgy, >400 év), az <sup>2</sup>ordasi Rákóczi-tölgy (kocsányos tölgy, >350 év), a <sup>6</sup>Tábi öreg tölgy (kocsánytalan tölgy - *Quercus petraea*, >300 év), a <sup>7</sup>Gemenci Bárkarakodói-tölgy (kocsányos tölgy, >250 éves), a <sup>4</sup>babóti Királyfa (kocsányos tölgy, >250 éves), és a Juhász Gyula-emlékfá Makón (kocsányos tölgy, >200 éves) (<http://www.dendromania.hu>, Hajnal-táj – Nevezetes fák [MR1-Kossuth Rádió], <http://www.nevezetesfak.hu>, <http://oregfak.emk.nyme.hu>, Pósfai 2005). Szintén nevezetesek a Székelyföldön, Zágóban található tisztas korú Mikes-tölgyek (>300 évesek), melyeket Mikes Kelemen édesapja ültetett.

Hazánkban több, 100 éves kort meghaladó kocsányos tölgyfasor lehető fel. Mindközül a <sup>8</sup>rátóti Aradi-ligetben a vértanúk emlékparkját övező >150 éves 13 emlék-tölgyfa a leghíresebb, melyekből napjainkban már csak 7 él. A fákat vélhetően maga Deák Ferenc ültette az aradi vértanúk emlékére.

<sup>[F7]</sup> A településnevek index számai a megyéket jelölik: 1 – Baranya, 2 – Bács-Kiskun, 3 – Borsod-Abaúj-Zemplén, 4 – Győr-Moson-Sopron, 5 – Jász-Nagykun-Szolnok, 6 – Nógrád, 7 – Tolna, 8 – Vas

**F2. táblázat** Magyarországon honos *Quercus* fajok előfordulása természetes növénytársulásokban Borhidi rendszere alapján (Borhidi 2003).

Osztályok	Rendek	Csoportok	Társulás latin neve	Társulás magyar neve
<p><b>29.</b> <i>Alnetea glutinosae</i> Br.-Bl. &amp; Tx. ex Westhoff &amp; al. 1946 Láperdők és lápeserjések</p>	<p><b>29.1.</b> <i>Alnetalia glutinosae</i> Tx. 1937 Láperdők és lápeserjések</p>	<p><b>29.1.2.</b></p>	<p><i>Betulo pubescenti-Sphagnetum recurvi</i> Zólyomi 1931</p>	<p>Tőzegmohás nyírláp<sup>3</sup></p>
<p><b>30.</b> <i>Querceto-Fageteta</i> Br.-Bl. &amp; Viteger in Viteger 1937 em. Borhidi 1996 Mezőfili lombos erdők</p>	<p><b>30.1.</b> <i>Fagetalia sylvaticae</i> Pawlowski in Pawl. et al. 1928 Bükkösök és elegyes mezőfili erdők</p>	<p><b>30.1.1. / 30.1.1.2.</b></p>	<p><i>Fraxino pannonicae-Ulmetum</i> Soó in Aszód 1935 corr. 1963</p>	<p>Tiszai tölgy-köris-szil liget<sup>1</sup></p>
			<p><i>Pimpinello majoris-Ulmetum</i> Kevey in Borhidi &amp; Kevey 1996</p>	<p>Szigetközi tölgy-köris-szil liget<sup>1</sup></p>
			<p><i>Scillo vindobonensis-Ulmetum</i> Kevey in Borhidi &amp; Kevey 1996</p>	<p>Közép-dunai tölgy-köris-szil liget<sup>1</sup></p>
			<p><i>Knautio drymeiae-Ulmetum</i> Borhidi &amp; Kevey 1996</p>	<p>Dél-dunántúli tölgy-köris-szil liget<sup>1</sup></p>
			<p><i>Circaeo-Carpinetum</i> Borhidi nomen novum 2003 hoc loco</p>	<p>Alföldi gyertyános-tölgyes<sup>1</sup></p>



Osztályok	Rendek	Csoportok	Társulás latin neve	Társulás magyar neve
30. <i>Quercus-Fagetum</i> Br.-Bl. & Viteger in Viteger 1937 em. Borhidi 1996 Mezőfil lombos erdők	30.1. <i>Fagelalia sylvaticae</i> Pawlowski in Pawl. et al. 1928 Bükkösök és elegyes mezofil erdők	30.1.2.	<i>Carpesio abrotanoidis-Carpinetum</i> Kevey & al. in Borhidi & Kevey 1996	Dél-alföldi gyertyános-tölgyes <sup>1</sup>
			<i>Cyclamini purpurascenti-Carpinetum</i> Csapody ex Borhidi & Kevey 1996	Dunántúli gyertyános-tölgyes <sup>2</sup>
			<i>Waldsteinio-Carpinetum</i> (Jakus & Jurko 1967) Soó 1971	Felvidéki gyertyános-tölgyes <sup>2</sup>
			<i>Carici pilosae-Carpinetum</i> Neuhäusl & Neuhäuslová-Novotná 1964 em. Borhidi 1996	Hegyvidéki gyertyános-tölgyes <sup>2</sup>
			<i>Aceri campestri-Quercetum roboris</i> Fekete 1965	Gyertyánelegyes mezei juharos-tölgyes <sup>2</sup>
			<i>Melittio-Fagetum</i> Soó 1964 em. 1971	Északi-középhegységi bükkös <sup>2</sup>
		30.1.4. / 30.1.4.1.	<i>Daphno laureolae-Fagetum</i> (Isépy 1970) Borhidi in Borhidi & Kevey 1996	Nyugat-középhegységi bükkös <sup>2</sup>
			<i>Cyclamini purpurascensis-Fagetum</i> Soó 1971	Dunántúli bükkös <sup>2</sup>
			30.1.4. / 30.1.4.2.	<i>Fago-Ornetum</i> Zólyomi (1950) 1958
<i>Seslerio hungaricae-Fagetum</i> Zólyomi 1967	Nyúlfarkfüves sziklai bükkös <sup>2</sup>			

Osztályok	Rendek	Csoportok	Társulás latin neve	Társulás magyar neve
30. <i>Quercus-Fagetes</i> Br.-Bl. & Viteger in Viteger 1937 em. Borhidi 1996 Mezőfil lombos erdők	30.1. <i>Fagetalia sylvaticae</i> Pawlowski in Pawl. et al. 1928 Bükkösök és elegyes mezofil erdők	30.1.4. / 30.1.4.2.	<i>Epipactio atrorubentis-Fagetum</i> Less 1998	Nőszőfűves sziklai bükkös <sup>2</sup>
			<i>Fraxino pannonicae-Carpinetum</i> Soó & Borhidi in Soó 1962	Dél-dunántúli síksági gyertyános-tölgyes <sup>1</sup>
			<i>Helleboro dumetorum-Carpinetum</i> Soó & Borhidi in Soó 1962 (83. kép)	Délnyugat-dunántúli gyertyános-kocsánytalan tölgyes <sup>2</sup>
		30.1.5. / 30.1.5.1	<i>Anemoni trifoliae-Carpinetum</i> Borhidi & Kevey 1996	Dél-zalai gyertyános-tölgyes <sup>1</sup>
			<i>Asperulo taurinae-Carpinetum</i> Soó & Borhidi in Soó 1962	Mecseki gyertyános-tölgyes <sup>1, 6 szál</sup>
			<i>Vicio oroboidi-Fagetum</i> Pócs & Borhidi 1960	Dél-dunántúli bükkös <sup>2</sup>
		30.1.5. / 30.1.5.2	<i>Doronico austriaci-Fagetum</i> Borhidi & Kevey 1996	Dél-zalai bükkös <sup>2</sup>
			<i>Leucojo verni-Fagetum</i> Kevey & Borhidi 1992	Dél-dunántúli homoki bükkös <sup>1</sup>
		30.1.6.	<i>Luzulo nemorosae-Fagetum sylvaticae</i> Meusel 1937	Középhegységi mészkerülő bükkös <sup>2</sup>
			<i>Galio rotundifolio-Fagetum</i> Soó 1971	Nyugat-dunántúli mészkerülő bükkös <sup>2</sup>
			<i>Sorbo torminalis-Fagetum</i> (Horvát A. O. 1972) Borhidi & Kevey 1997	Mecseki mészkerülő bükkös <sup>2</sup>

Osztályok	Rendek	Csoportok	Társulás latin neve	Társulás magyar neve
30. <i>Quercus-Fagetea Br.-Bl. &amp; Vitiger in Vitiger 1937 em. Borhidi 1996</i> Mezőfői lombos erdők	30.2. <i>Quercetalia roboris R. Tx. 1931</i> Mészkerülő lombos erdők	30.2.1.	<i>Deschampsio flexuosae-Quercetum sessiliflorae Firbas et Sigmond 1928</i>	Középhegységi mészkerülő tölgyes <sup>2</sup>
			<i>Luzulo forsteri-Quercetum Borhidi et Kevey 1996</i>	Mecseki mészkerülő tölgyes <sup>2, 6 szál</sup>
			<i>Sorbo-Quercetum petraeae Simon 1977</i>	Szilikátszika-erdő <sup>2</sup>
		30.2.2.	<i>Castaneo-Quercetum I. Horvat 1938</i>	Gesztenyész tölgyes <sup>2</sup>
			<i>Luzulo-Carpinetum Soó ex Csapody 1964</i>	Mészkerülő gyertyános-tölgyes <sup>1,2</sup>
		31. <i>Quercetea pubescentis (Doing 1955) Scamoni &amp; Passarge 1959 - Szubmediterrán és szubkontinentális xerotherm erdők</i>	31.1. Rend: <i>Orno-Coinetalia Jakucs 1960</i> Délkelet-európai molyhos tölgyesek	31.1.1.
<i>Tamo-Quercetum virgilianae Borhidi &amp; Morschhauser in Borhidi &amp; Kevey 1996</i>	Mecseki mészkedvelő olasz tölgyes <sup>4,5 és 6</sup>			
<i>Aconito anthorae-Fraxinetum orni Borhidi &amp; Kevey 1996</i>	Mecseki sisakvirágos tetőerdő <sup>4,5</sup>			
<i>Euphorbio-Quercetum (Knapp 1942) Hübl 1959</i>	Alpokalji molyhos tölgyes <sup>3,4</sup>			

Osztályok	Rendek	Csoportok	Társulás latin neve	Társulás magyar neve	
<p>31. <i>Quercetea pubescentis</i> (Doing 1955) Scamoni &amp; Passarge 1959 Szubmediterrán és szubkontinentális xerotherm erdők</p>	<p>31.1. Rend: <i>Orno-Coinetalia Jakucs 1960</i> - Délkelet-európai molyhos tölgyesek</p>	<p>31.1.1.</p>	<p><i>Cotino-Quercetum pubescentis</i> Soó (1931) 1932</p>	<p>Cserszömöréc karsztbokorerdő <sup>4</sup></p>	
	<p>31.2. Rend: <i>Quercetalia cerridis Borhidi 1996</i> Szubkontinentális-szubmediterrán xerotherm tölgyesek</p>	<p>31.2.1.</p>	<p><i>Quercetum petraee-cerridis</i> Soó 1963</p>	<p>Középhegységi cseres-tölgyesek <sup>3,6</sup></p>	
			<p><i>Genisto pilosae-Quercetum petraeeae</i> (Magyar 1933) Zólyomi et al. ex Soó 1963</p>	<p>Középhegységi rekettyés-tölgyesek <sup>2, 5 szál</sup></p>	
			<p><i>Asphodelo-Quercetum roboris</i> (Borhidi &amp; Járαι-Komlódi 1959) Borhidi 1996</p>	<p>Genyötés cseres-tölgyesek <sup>2,3</sup></p>	
			<p><i>Agrostio tenuis-Quercetum cerridis</i> Csapody (1974) ex Borhidi et Kevey 1996</p>	<p>Cérnatippanos cseres-tölgyes <sup>1,2 és 3</sup></p>	
			<p><i>Molinio litoralis-Quercetum cerridis</i> Szodfridt &amp; Tallós ex Borhidi 1996</p>	<p>Kékperjés cseres-tölgyesek <sup>1,2 és 3</sup></p>	
			<p>31.2.2.</p>	<p><i>Potentillo micranthae-Quercetum dalechampii</i> Horvát A. O. 1981</p>	<p>Mecseki cseres-tölgyes <sup>6</sup></p>
				<p><i>Genisto pilosae-Quercetum polycarpae</i> (Horvát A. O. 1967) Borhidi &amp; Kevey 1996</p>	<p>Mecseki rekettyés-tölgyes <sup>2,4,5,6 és 7</sup></p>

Osztályok	Rendek	Csoportok	Társulás latin neve	Társulás magyar neve
<p><i>31. Quercetea pubescentis (Doing 1955) Scamoni &amp; Passarge 1959</i> Szubmediterrán és szubkontinentális xerotherm erdők</p>	<p><i>31.2. Rend: Quercetalia cerridis Borhidi 1996</i> Szubkontinentális-szubmediterrán xerotherm tölgyesek</p>	<p><i>31.2.3.</i></p>	<p><i>Corno-Quercetum pubescentis Jakucs &amp; Zólyomi ex Máthé et Kovács 1962</i></p>	<p>Melegkedvelő tölgyes <sup>2</sup></p>
			<p><i>Ceraso mahaleb-Quercetum pubescentis Jakucs &amp; Fekete 1957</i></p>	<p>Sajmeggyes bokorerdő <sup>4,6</sup></p>
			<p><i>Tilio-Fraxinetum excelsioris Zólyomi (1934) 1967</i></p>	<p>Hársas-körises sziklaerdő <sup>2</sup></p>
			<p><i>Poo pannonicae-Quercetum petraeae (Horánszky 1964) Soó 1971</i></p>	<p>Andezit-törmeléklető tölgyese <sup>2</sup></p>
			<p><i>Epipactio microphyllae-Quercetum pubescentis Csiky 2003 ass. nova, hoc loco</i></p>	<p>Homokkői molyhos tölgyes <sup>2,4</sup></p>
			<p><i>Cirsio pannonicum-Quercetum pubescentis Less 1998</i></p>	<p>Magyar aszatos dolomitölgyes <sup>4</sup></p>
			<p><i>Seslerio hungaricae-Quercetum virgiliana Suba &amp; al. 1982</i></p>	<p>Nyúlfarkfüves tölgyes <sup>5</sup></p>
			<p><i>Polygonato latifolio-Quercetum roboris (Hargitai 1940) Borhidi 1996</i></p>	<p>Duna-Tisza közti gyöngyvirágos tölgyes <sup>1</sup></p>

Osztályok	Rendek	Csoportok	Társulás latin neve	Társulás magyar neve
31. <i>Quercetea pubescens</i> (Doing 1955) Scamoni & Passarge 1959 Szubmediterrán és szubkontinentális xerotherm erdők	31.2. Rend: <i>Quercetalia cerridis</i> Borhidi 1996 Szubkontinentális-szubmediterrán xerotherm tölgyesek	31.2.3.	<i>Convallario-Quercetum roboris</i> Soó (1939) 1957	Nyírségi gyöngyvirágos tölgyes <sup>1</sup>
			<i>Iridi variegatae-Quercetum roboris</i> (Hargitai 1940) Borhidi in Borhidi & Kevey 1996	Nőszirmos pusztai tölgyes <sup>1 és 2, 4 szá1</sup>
			<i>Melampyro debreceniensi-Quercetum roboris</i> Borhidi & Papp L. 2003	Nyírségi pusztai tölgyes <sup>1</sup>
			<i>Festuco rupicolae-Quercetum roboris</i> Soó (1943) 1957	Nyírségi legelő-tölgyes <sup>1</sup>
			<i>Populo canescenti-Quercetum roboris</i> (Hargitai 1940) Borhidi in Borhidi & Kevey 1996	Duna-Tisza közti, szürke nyáras pusztai tölgyes <sup>1, 4 szá1</sup>
			<i>Dictamno-Tilietum cordatae</i> Fekete 1961	Hársas-tölgyes <sup>1, 2 és 4 szá1</sup>
			<i>Aceri tatarici-Quercetum roboris</i> Zólyomi 1957	Tatár juharos-lőszőtölgyes <sup>1, 2 és 3</sup>
			<i>Galatello-Quercetum roboris</i> Zólyomi & Tallós 1967	Sziki tölgyes <sup>1</sup>

**F2. táblázat** Az egyes arab számok a különböző tölgyfajokat jelölik: **1** - *Q. robur*, **2** - *Q. petraea*, **3** - *Q. cerris*, **4** - *Q. pubescens*, **5** - *Q. virgiliana*, **6** - *Q. dalechampii*, **7** - *Q. polycarpa*  
Rövidítések jelentése: **szórv.** = szórványosan, **szá1.** = szá1anként.

Az egyes csoportok megnevezése: **29.1.2.** *Salicion cinereae* T. Müller & Görs ex Passarge 1961 - Füz- és nyírtáplak, **30.1.1.** *Alnion incanae* Pawlowski in Pawlowski & Wallisch 1928 - Keményfáligetek, **30.1.1.2.** *Ulmion Oberd.* 1953 - Folyóparti keményfáligetek, **30.1.2.** *Carpinion betuli* Issler 1931 - Közép-európai gyertyános-tölgyesek, **30.1.4.** *Fagion sylvaticae* Luquet 1926 - Közép-európai bükkösök,

**30.1.4.1.** *Eu-Fagenion Oberd.* 1957- Valódi bükkösök, **30.1.4.2.** *Cephalanthero-Fagenion R. Tx. in R. Tx. & Oberd.* 1958 - Sziklai bükkösök és reliktum cserjések, **30.1.5.** *Aremonio-Fagion (I. Horvat 1938) Borhidi in Török, Podani & Borhidi 1989 - Dél-dunántúli mezofil erdők, **30.1.5.1.** *Erythronio-Carpinenion (Marinček in Wallnöfer et al.1993) Borhidi 1996 - Illír gyertyános-tölgyesek*, **30.1.5.2.** *Primulo vulgaris-Fagenion Borhidi 1963 em. 1996 - Szubmontán illír bükkösök*, **30.1.6.** *Luzulo-Fagion Lohm. & R. Tx. in R. Tx. 1954 - Mészkerülő bükkösök*, **30.2.1.** *Genisto germanicae-Quercion Neuhäusl & Neuhäuslová-Novotná 1967 - Mészkerülő tölgyesek*, **30.2.2.** *Castaneo-Quercion Soó 1962 em. 1971 - Mezofil mészkerülő lomberdők*, **31.1.1.** *Orno-Cotinion Soó 1960 - Pannóniai molyhos tölgyesek*, **31.2.1.** *Quercion petraeae Zólyomi et Jakucs 1957 - Szubkontinentális száraz tölgyesek*, **31.2.2.** *Quercion farnetto I. Horvat 1954 - Balkáni cseres tölgyesek*, **31.2.3.** *Aceri tatarici-Quercion Zólyomi & Jakucs 1957 - Szubkontinentális tölgyesek és elegyes xeroterm erdők.**

## **F8. A hazánkban őshonos tölgyek faanyagának széleskörű felhasználása**

A *Quercus robur* hazánk legnagyobb méreteket elérő tölgye. Kemény fatesté nehéz, a hazai fafajok között szilárdságban és rugalmasságban egyedülálló, mely tulajdonságainak köszönhetően felhasználják épületekhez, talp- és bányafának, hajóépítéshez, parketta, ládák, bútorok, hordók és egyéb kádáripari termékek, különböző esztergályos termékek, valamint vasúti kocsik készítéséhez.

A *Q. petraea* fatestének jellemzői csak kismértékben mutatnak eltérést a kocsányos tölgyétől: faanyaga könnyebb, finomabb szövetszerkezetű – melynek köszönhetően a kocsányos tölgyet is felülmúlva a legértékesebb és legkeresettebb hazai faanyag. Felhasználását tekintve a *Q. robur* alkalmazási területeivel nagymértékben átfed. Az iparban betöltött szerepük mellett jelentősek a képzőművészetek területén is: a szobrászati és egyéb faragott művészeti alkotások kedvelt faanyagai. Mindkét faj kiváló tulajdonságokkal rendelkezik tűzifaként is.

A nemes tölgyek között a *Q. pubescens* fatestének ipari felhasználása nem számottevő. Különlegessége emberi fogyasztásra is alkalmas ízletes makkja.

A *Q. cerris* faanyaga az egyik legjobb tűzifa (fűtőértéke kimagasló), elsősorban ebben a szerepben érvényesül. Napjainkban felhasználják lemez, farostlemez készítéséhez, illetve a különféle eredményes tartósító eljárásoknak köszönhetően a felhasználhatósági köre egyre bővül. Hordók és kültéri szerkezetek gyártására alkalmatlan. Termékkihozatala jelentős mértékben alulmúlja a nemes tölgyekét a feldolgozása során képződő nagyarányú hulladékanyag miatt.

### **F9. *Quercus robur* és *Q. petraea* széleskörű alkalmazása**

A kocsányos tölgy értékes faipari tulajdonságai mellett magas cseresavtartalmának köszönhetően széleskörben hasznosítható (Kuliev és mtsai 1997).

Cseranyagokban különösen gazdag kérgéből fekete, barna és sárga festék nyerhető. Magas cseresavtartalmú gubacsát bőrcserzésre, fapácolásra és szövetfestésre használják, vérzéscsillapító kenőcsöt és vas hozzáadásával tintát készítenek belőle. Makkja nem száradó olajat tartalmaz – amely faanyagok környezetbarát felületkezelésére, kozmetikai és gyógyászati készítményekben használható.

A hazai tölgyfajok közül a kocsányos és kocsánytalan tölgyek gyógyászati célú alkalmazása régtől fogva ismert. A fák kérgét, levelét, termését és gubacsát egyaránt felhasználják, melyek hatóanyagtartalma eltérő. Általában a fiatal ágak kérgét gyűjtik, amely mindkét faj esetén tartalmaz katechin és galluszsav típusú cseranyag keveréket, emellett triterpén és szitoszterol származékok is megtalálhatóak bennük (Kuliev és mtsai 1997). Mind a népi, mind pedig a tudományos orvoslásban alkalmazzák – gyógyhatása külsőleg és belsőleg egyaránt érvényesül különféle egészségügyi problémák kezelésében. Alapvető 'összehúzó sajátsága' révén kiváló vérzéscsillapító (Kuliev és mtsai 1997). Külsőleg különféle sérülések és bőrproblémák (égés, fagyás, gyulladt bőr, nedvező sebek, ekcéma) esetén borogatásként, fogínyvérzésre öblögetve, végbélrepedés, vérző aranyér kezelésében ülőfürdőként alkalmazva fejt ki kedvező hatását. Belsőleg hasmenéses állapot enyhítésére, gyomorfekély, gyomor és bélhurut terápiájában használható eredményesen. Belsőleges alkalmazása körültekintést igényel, nagy mennyiségben illetve huzamos ideig fogyasztva mellékhatások jelentkezhetnek (súlyos székrekedés, májkárosodás). Gyógyhatása mellett kiemelendő fertőtlenítő hatása, valamint eredményessége lábfürdőként a kellemetlen lábizzadás megszüntetésében.

### **F10. Erdők telepítése Magyarországon**

Az 1920-as években indult és a mai napig folytatódó erdősítési program eredményeképpen Magyarország erdővel borított területe folyamatos növekedést mutat. A kezdetben elsősorban gazdasági érdekek által vezérelt erdőtelepítés fokozatosan alakult át a modern kor komplex elvárásainak megfelelően – előtérbe került valódi, felbecsülhetetlen értékű és sokrétű jelentőségük. Az erdők a faipari alapanyag utánpótlás biztosítása mellett eredményesen gátolják a talajeróziót, mérséklik a viharok erejét és az árvízveszélyt (a felszíni vizek elfolyásának lassításával), kiegyenlített hőmérsékleti viszonyokat



biztosítanak. Mindemellett az erdővel borított területek pozitív hatással bírnak a természetközeli gondolkodásmód, a környezettudatos és egészséges életmód minél szélesebb körben történő elterjedésére.

Az erdőterületeink további jelentős mértékű növelése napi feladata hazánkknak, melyet a mezőgazdasági művelésből kivont, alapvetően a több évtizedes talajművelés következtében elszegényedett és sokszor a vegyszerhasználat következtében leromlott mikrobiotájú, illetve az agrárium számára eredendően gazdaságtalan (gyenge termőképességű, sok esetben száraz) talajokon szükséges megvalósítani. További nehézséget jelent, hogy ezekben a talajokban az erdei fák megfelelő növekedéséhez, egészségének megőrzéséhez és így élettartamuk meghosszabbításának támogatásához szükséges gombapartnereik hiányoznak. Mindemellett az elmúlt évtizedben felgyorsult klimatikus változások és a környezetszennyezés további megoldandó feladatokat állítanak az erdősítés elé. Ilyen kedvezőtlen adottságok ellenére is lehet eredményes az erdőtelepítés, ebben lehetnek segítségünkre a fák mikorrhiza gomba partnerei – mesterségesen mikorrhizált facsemeték kiültetésével költséghatékony módon fokozható az erdősítések sikere.

Mikorrhiza kapcsolatban a növénypartnerek számos paraméter tekintetében előnyösebb helyzetben vannak, mint a szimbiota partner nélkül fejlődő fák, ennek köszönhetően eredésük rossz talajviszonyok mellett is közel 100 %, a növekedési paramétereik jobbak – nagyobb tömeget érnek el azonos idő alatt. A mikorrhiza szimbiózis elősegíti a víz és tápanyagfelvételt, mérsékli a kiültetési stressz hatásait, hatékony védelmet biztosít a talajlakó kórokozókkal szemben, ezáltal szükségtelen a talaj mesterséges feljavítása, illetve fungicidek alkalmazása. A mikorrhiza gombák több faegyed 'összekapcsolásával' szupraindividuális szinten (wood wide web – 'erdőközi hálózat') résztvesznek az életközösség kapcsolatrendszerének szabályozásában, a társulás szerkezetének meghatározó tagjai (Jakucs 2009). A mikorrhizált gyökerek hálózata a talajban egységes anyagfelvevő rendszert alkot, ezen keresztül biztosítják az életközösség tagjainak az egyenletes és optimális tápanyagellátást (Jakucs 2009).

Az ektomikorrhiza gombák a mérsékeltövi örökzöld és lombhullató fászfűző növények leggyakoribb szimbiota partnerei (Jakucs 2003, Szabó 2003). Döntő többségük a *Bazidiomycota* törzsbe tartozik (pl. *Boletus*, *Cantharellus*, *Russula* nemzetségek), de az *Ascomycota* törzs kiemelkedő gasztronómiai értékkel bíró képviselői, a *Tuber* és *Mattiolomyces* nemzetségekbe tartozó szarvasgombák is ennek a csoportnak a tagjai (Jakucs 2003). A szarvasgombák az ektomikorrhizák csoportjába tartozó obligát biotrófok,

azaz teljes szaporodási ciklusukat kizárólag gazdanövényük jelenlétében tudják megvalósítani (Jakucs 2003). A szarvasgombák főbb gazdanövényei a *Carpinus* spp. - gyertyánok, a *Corylus* spp. - mogyoró fajok, a *Fagus* spp. - bükkök, a *Tilia* spp. - hársak, a *Quercus* spp. és a fenyők (*Pinus* spp., *Picea* spp.).

A mikorrhizált fűcsetetek telepítésének jelentősége több szinten érvényesül. Szerepük jelentős a rizoszféra helyreállításában és ezzel összefüggésben a biodiverzitás kialakulásának és megőrzésének elősegítésében, mindeközben a kifejlett erdők nagy mennyiségű CO<sub>2</sub> megkötésére képesek, így a klímavédelem szerves részét képezik („Széndioxid elnyelő tölgyerdő“ projekt 2009, Audi AG).

Az erdőtelepítések között az alternatív földhasználat több szempontból (ökológiai, természetvédelmi, gazdasági) eredményes megvalósítását példázza a tölgyerdők mint szarvasgomba ültetvények alkalmazása, melynek technológiája részleteiben kidolgozott, széles körben hozzáférhető (Bratek 2010). Nyári szarvasgomba (*Tuber aestivum* Vittad.) termesztésében a *Q. robur*, *Q. petraea* és *Q. cerris* fajok egyaránt számításba jöhetnek. Hasonlóan eredményes *Tuber melanosporum* Vittad. (périgordi szarvasgomba) és *Tuber uncinatum* Chatin (burgundi szarvasgomba) termesztése kocsányos, csertölgy és *Q. pubescens* ültetvényében is (Chevalier és mtsai 2005). További lehetőséget jelent az eheto nagygombák mint szimbiota partnerek alkalmazása – mesterséges mikorrhiza létrehozása a telepítést megelőzően, így az erdősítés eredménye egyben kültéri gombatermesztő ültetvényként is funkcionál.

A tölgyerdők feljavításával és telepítésével kapcsolatban az egyik megoldandó különleges feladat a *Q. pubescens* állományok területfoglalásának elősegítése. Hazánkban a molyhos tölgy állományok száma drasztikusan lecsökkent. A molyhos tölgyek száraz, meleg termőhelyi viszonyok között, akár szélsőséges talajokon is megélnek (Bordács és mtsai 1999, Frank 2002). A *Q. pubescens* állományok elsődlegesen véderdők, száraz élőhelyeken csertölgyvel elegyítik, ezzel segítve elő a cserfák állékonyságát és az állományok gyorsabb záródását (Frank 2002). A feketefenyves erdők visszaalakításakor tájvédelmi szerepe miatt is molyhos tölgy telepítése indokolt (Frank 2002). Az alternatív földhasználat szép példája a *Q. pubescens* alkotta erdők telepítése felhagyott legelők, szőlők és gyümölcsösök, földes kopárok és kedvezőbb vízgazdálkodású szántók területein (Frank 2002), miként szarvasgomba ültetvényként történő hasznosítása is, mely kedvezően hat telepítésére - ösztönzi és elősegíti annak eredményességét.

## A Morchellák nevelésében használt alaptáptalajok

### Félszintetikus táptalajok

#### *MSK táptalaj*

##### **F3.I-1.**

<b>Makroelem–törzsoldat összetétele*</b>	
<b>Anyagok</b>	<b>Koncentráció g/dm<sup>3</sup></b>
<i>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></i>	33.0
<i>KNO<sub>3</sub></i>	38.0
<i>CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O</i>	8.8
<i>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</i>	7.4
<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	3.4

##### **F3.I-2.**

<b>Mikroelem–törzsoldat összetétele*</b>	
<b>Anyagok</b>	<b>Koncentráció g/dm<sup>3</sup></b>
<i>KI</i>	0.166
<i>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></i>	1.240
<i>MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</i>	4.460
<i>ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</i>	1.720
<i>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O</i>	0.050
<i>CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O</i>	0.005
<i>CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O</i>	0.005

\*A táblázatokban feltüntetett komponenseket desztillált vízben oldjuk fel.

##### **F3.I-3.**

<b>MSK táptalaj komponensei*</b>	<b>Koncentráció</b>
<i>Glükóz-1-hidrát (Reanal)</i>	5.0 g/dm <sup>3</sup>
<i>Maláta (Reanal)</i>	5.0 g/dm <sup>3</sup>
<i>Makroelem–törzsoldat</i>	12.5 ml/dm <sup>3</sup>
<i>Mikroelem–törzsoldat</i>	1.25 ml/dm <sup>3</sup>
<i>Agar (mikrobiológiai célra, Reanal)</i>	12.5 g/dm <sup>3</sup>

\*A táptalaj végső térfogatát a komponensek összemérését követően desztillált vízzel állítjuk be.

## PDA táptalaj

### F3.II.

PDA táptalaj komponensei*	Koncentráció g/dm <sup>3</sup>
Glükóz-1-hidrát (Reanal)	5.0
Burgonyapehely	5.0
Agar (Reanal)	12.5

\*A táptalaj összetevőit desztillált vízben elegyítjük.

## Komplex táptalaj

### Malátás táptalaj

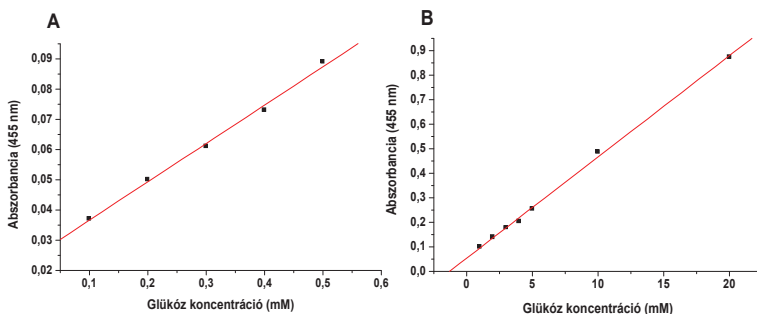
### F3.III.

Malátás táptalaj komponensei*	Koncentráció g/dm <sup>3</sup>
Maláta (Reanal)	12.5
Agar (Reanal)	12.5

\*A táptalaj alkotóelemeit desztillált vízben oldjuk fel.

F3. táblázat A *Morchella* fajok nevelésében használt felszintetikus és komplex táptalajok. Az F3.I.-F3.III. a résztáblázatokat jelölik.

## Kalibráló görbék



F4. ábra Kalibráló egyenesek trehaláz enzimaktivitás méréshez (A) 0.10 – 0.50 mM és (B) 1.00 – 20.0 mM koncentráció tartományban. Az illesztett egyenesek egyenlete:  $y_A = 0.1270x + 0.0239$   $R_A^2 = 0.9956$   $SD_A = 0.00154$  és  $y_B = 0.04128x + 0.05365$   $R_B^2 = 0.9983$   $SD_B = 0.01242$

### SDS\* PAGE

	Szeperáló gél		Koncentráló gél
Törzsoldatok	8 % (ml)	9% (ml)	15 % (ml)
	12% (ml)	3.5 % (ml)	
<i>30:0.6 AA:BisAA</i>	5.33	6.00	10.00
	8.00	2.92	
<i>4xcc Tris-glicin pH=8.3</i> <i>0.75 g SDS/l</i>	10.00	10.00	---
<i>4xcc Tris-HCl pH=6.8</i> <i>0.75 g SDS/l</i>	---	---	4.8
<i>Desztillált víz</i>	4.67	4.00	0.00
	2.00	17.28	
<i>TEMED</i>	20 µl	20 µl	48 µl
<i>APS * 10 %-os</i>	100 µl	100 µl	250 µl

**F4. táblázat** A SOD izoformák elválasztásához és aktivitásuk meghatározásához alkalmazott SDS\* gradiens gél összetétele. \*Az APS oldatot frissen készítjük el. Az oldatok táblázatban szereplő mennyiségei 6 géllap elkészítésére vonatkoznak. Az akrilamid oldatok és a TEMED oldat egészségre káros hatásúak, ezért használatukkor gumikesztyű viselése javasolt. A törzsoldatok összetételét az F6.táblázat tartalmazza.

### Natív PAGE

	Szeperáló gél	Koncentráló gél
Törzsoldatok	10% (ml)	5.0 % (ml)
<i>30:0.6 AA:BisAA</i>	6.67	4.17
<i>4xcc Tris-glicin pH=8.3</i>	10.00	---
<i>4xcc Tris-HCl pH=6.8</i>	---	4.8
<i>Desztillált víz</i>	3.33	16.03
<i>TEMED</i>	20 µl	48 µl
<i>APS * 10 %-os</i>	100 µl	250 µl

**F5. táblázat** A POD izoformák elválasztásához és aktivitásuk meghatározásához alkalmazott natív gél összetétele.

\*Az APS oldatot frissen készítjük el. Az oldatok táblázatban szereplő mennyiségei 6 géllap elkészítésére vonatkoznak. Az akrilamid oldatok és a TEMED oldat egészségre káros hatásúak, ezért használatukkor gumikesztyű viselése javasolt. A törzsoldatok összetétele az F7. táblázatban szerepel.

<b>Trisz-glicin kádpuffer, pH=8,3, 4cc**</b>	<b>Koncentráció g/dm<sup>3</sup></b>
<i>Trisz (Reanal)</i>	<i>12.0</i>
<i>Glicin (Reanal)</i>	<i>57.6</i>
<b>Trisz-HCl kádpuffer, pH=6,8*, 4cc**</b>	<b>Koncentráció g/dm<sup>3</sup></b>
<i>Trisz (Reanal)</i>	<i>60.6</i>
<i>SDS (Reanal)</i>	<i>0.75</i>

\*A pH-t HCl-val állítjuk be a 6,8-as értékre.

\*\*4cc: a gélelektroforézishez használnak négyszer tömény törzsoldat.

**F6. táblázat** Az SDS\* PAGE során alkalmazott pufferek.

<b>Trisz-glicin kádpuffer, pH=8,3, 4cc**</b>	<b>Koncentráció g/dm<sup>3</sup></b>
<i>Trisz (Reanal)</i>	<i>12.0</i>
<i>Glicin (Reanal)</i>	<i>57.6</i>
<b>Trisz-HCl kádpuffer, pH=6,8*, 4cc**</b>	<b>Koncentráció g/dm<sup>3</sup></b>
<i>Trisz (Reanal)</i>	<i>60.6</i>

\*A pH-t HCl-val állítjuk be a 6,8-as értékre.

\*\*4cc: a gélelektroforézishez használnak négyszer tömény törzsoldat.

**F7. táblázat** A natív PAGE során alkalmazott pufferek.

**F8. táblázat I-II-III.** SOD izoenzim aktivitási festéshez használt festőoldatok összetétele és az inkubálás időtartama. Mind a három oldatból 25.0 ml mennyiséget adunk egy géllaphoz. Az I. és II. lépésben az inkubációt sötétben, szobahőmérsékleten végezzük, a III. festőoldatban spot lámpa alatt, a háttér egyenletes lila színének kialakulásáig inkubálunk.

#### **F8.I.**

<b>I. festőoldat</b>	<b>Inkubálási idő: 20 perc</b>
NBT*	4.9x10 <sup>-3</sup> M
Sörensen féle foszfát puffer (pH 8.04)	5.0x10 <sup>-2</sup> M
Frissen készítjük el az I. festőoldatot. *50.0 mg NBT-t 1.0 ml dimetilformamidban feloldunk, ezt követően mérjük hozzá a foszfát puffert és egészítjük ki desztillált vízzel 25.0 ml végtérfogatra. Az inkubáció alatt billenőszalton biztosítjuk az egyenletes festődést.	

**F8.II.**

<b>II. festőoldat</b>	<b>Inkubálási idő: 10 perc</b>
TEMED	$2.8 \times 10^{-2}$ M
Riboflavin	$5.6 \times 10^{-5}$ M
Sörensen féle foszfát puffer (pH 8.04)	$3.6 \times 10^{-2}$ M

A komponenseket desztillált vízben oldjuk fel. Az elkészített festőoldatot 8°C-on tároljuk sötét falú üvegedényben, így hosszabb ideig eltartható. A géllapokat billenőasztalon inkubáljuk.

**F8.III.**

<b>III. festőoldat</b>	
Sörensen féle foszfát puffer (pH 8.04)	$5.0 \times 10^{-2}$ M
EDTA (pH 8.00)	$1.0 \times 10^{-3}$ M
cc. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> *	$1.8 \times 10^{-3}$ M

\*A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ot a **III.** festőoldat géllapokra öntését közvetlenül megelőzően adjuk az oldathoz.

**F9. táblázat** Festőoldat összetétele POD izoenzim aktivitási festéshez. 10.0 ml mennyiséget adunk egy géllaphoz, pipettával mozgatjuk átkeveréssel az oldatot a barna színű sávok megjelenéséig (néhány perc). A festést szobahőmérsékleten végezzük.

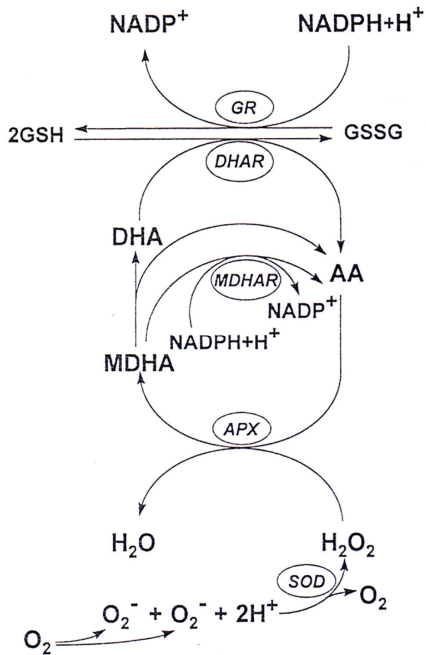
<b>Festőoldat</b>	
orto-dianizidin*	$3.7 \times 10^{-3}$ M
Acetát puffer (pH 4.4)	$2.0 \times 10^{-1}$ M
CaCl <sub>2</sub>	$3.6 \times 10^{-3}$ M
cc. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> **	$1.8 \times 10^{-3}$ M

Frissen készítjük el a festőoldatot. \*5.00 mg orto-dianizidine-t (Fluka) 0.50 ml dimetil-formamidban feloldunk, ezt követően mérjük hozzá a többi összetevőt (bemérési sorrendben szerepelnek). \*\*A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ot a géllapokra öntést közvetlenül megelőzően adjuk az oldathoz.

<b>Adatbázis megnevezése</b>	<b>Adatbázis elérhetősége</b>
<b>BRENDA</b> – The Comprehensive Enzyme Information System (Chang és mtsai 2009)	<a href="http://www.brenda-enzymes.org/">http://www.brenda-enzymes.org/</a>
<b>EMBL</b> – European Molecular Biology Laboratory	<a href="http://www.embl.org/">http://www.embl.org/</a>
<b>EMBL-EBI</b> – European Bioinformatics Institute	<a href="http://www.ebi.ac.uk/">http://www.ebi.ac.uk/</a>
<b>ExPASy</b> Proteomics Server (Gasteiger és mtsai 2003)	<a href="http://expasy.org/">http://expasy.org/</a>
<b>GO</b> – the Gene Ontology (Ashburner és mtsai 2000)	<a href="http://www.geneontology.org/">http://www.geneontology.org/</a>
<b>KEGG</b> – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Kanehisa és Goto 2000, Kanehisa és mtsai 2006)	<a href="http://www.genome.jp/kegg/">http://www.genome.jp/kegg/</a>
<b>Mycobank</b> – Fungal Databases, Nomenclature and species banks (Crous és mtsai 2004)	<a href="http://www.mycobank.org/">http://www.mycobank.org/</a>
<b>NCBI</b> – National Center for Biotechnology Information	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
<b>PlantGDB</b> – Plant Genome Database (Dong és mtsai 2005)	<a href="http://www.plantgdb.org/">http://www.plantgdb.org/</a>
<b>PopulusDB</b> – Populus Database (Sterky és mtsai 2004)	<a href="http://www.populus.db.umu.se/">http://www.populus.db.umu.se/</a>
<b>SGD</b> – Saccharomyces Genome Database (Cherry és mtsai 1997)	<a href="http://www.yeastgenome.org/">http://www.yeastgenome.org/</a>
<b>UniProt</b> – The UniProt Consortium (Jain és mtsai 2009)	<a href="http://www.uniprot.org/">http://www.uniprot.org/</a>

**F10. táblázat** A doktori munkám során használt fontosabb adatbázisok és elérhetőségük.





**F5. ábra** Foyer-Halliwell-Asada ciklus. A ciklusban a SOD izoenzimek mellett a ROS eliminálásában számos további enzim is részt vesz, melyek a  $H_2O_2$  eliminálásában és a redukáltások regenerálásában játszanak szerepet: APX – aszkorbinsav-peroxidáz (EC 1.11.1.11.), MDHAR – monodehidro-aszkorbát-reduktáz enzim (EC 1.6.5.4.), DHAR – dehidroaszkorbát-reduktáz enzim (EC 1.8.5.1.), GR – glutation-reduktáz enzim (EC 1.6.4.2.).

**A**

```

1  tggtagcggat  ggccagggtct  agaggttctct  gaggacgaaa  tgcctatgt  gaagcagcgc
61  ctgctggaag  aatgatgatgc  cgttcccgtc  ttcacgatga  ataagctggc  agacagacat
121  tacaacggct  ttgcaaattc  tatcctgtgg  ccgctcttcc  attaccatcc  tggagagatc
181  atttctgacg  agtctgcctg  ggaggcatat  aatgaggcca  acaggttgtt  cgccaaggac
241  attgctaagg  atataaacga  tggcgatttg  atctgggtgc  acgattacca  tctgatgctc
301  cttcccgaga  tgttccgaga  gaaaattgcc  gccagcaact  gaacaacgct  aagatcggct
361  tttcctccca  cacaccattc  ccttgcagtg  agatctatag  aattctacct  gtcgcaaatg
421  agctcttgca  ggggtgtctg  cattgtgact  tgatcgggtt  ccacacatac  gactatgcat
481  gacacttctc  gagcagctgc  tcgcagaatg  ttggacggcg  acactacgcc  taatggggtc
541  gagtctcatg  gcagattctg  taccgtagg  gccttcccta  tcggcatcga  cccggagaag
601  ttcaccgaag  ggttaaaгаа  ggccaaaгtc  caaaagcgaa  tcgcaccttt  gggagcaaaa
661  ttcgaaggcg  tgaagttgat  ggttggtgtc  gacaggctgg  attacatcaa  aggtgtgcct
721  caaaagtтgc  acgcccтtga  agtгttcctg  accgagcatc  cagaatggat  tggcaaggтt
781  gttct

```

//

**B**

```

1  tggtagcggat  ggccagggtct  agaggttctct  gaggacgaaa  tgcctatgt  gaagcagggа
61  ttgctggaag  aattcgatgc  cgttcccgtc  ttcacgatga  ataagctggc  agacagacat
121  tacaacggct  ttgctaattc  tatcctgtgg  ccgctcttcc  attaccatcc  tggagagatc
181  atttctgacg  agtctgcctg  ggaggcatat  aatgaggcca  acaggttgtt  cgccaaggac
241  attgctaagg  atataaacga  tggcgatttg  atctgggtgc  acgattacca  tctgatgctc
301  cttcccgaga  tgttccgaga  gaaaattgcc  gccagcaact  gaacaacgct  aagatcggct
361  tttcctccca  cacaccattc  ccttgcagtg  agatctatag  aattctacct  gtcgcaaatg
421  agctcttgca  ggggtgtctg  cattgtgact  tgatcgggtt  ccacacatac  gactatgcat
481  gacacttctc  gagcagctgc  tcgcagaatg  ttggaagtgc  acactacgcc  taatggggtc
541  gagtctcatg  gcagattctg  taccgtagg  gccttcccta  tcggcatcga  cccggagaag
601  ttcaccgaag  ggttaaaгаа  ggccaaaгtc  caaaagcgaa  tcgcaccttt  gggagcaaaa
661  ttcgaaggcg  tgaagttgat  ggttggtgtc  gacaggctgg  attacatcaa  aggtgtgcct
721  caaaagtтgc  acgcccтtga  agtгttcctg  accgagcatc  cagaatggat  tggcaaggтt
781  gttct

```

//

**F6. ábra** *Morchella esculenta* (A) és *M. steppicola* (B) TPS génrészleteinek szekvenciája GenBank formátumban.

**A**

```

1  tatacggggt  ggacagctac  atggagtccc  ttgggtgтt  ggtcaacgac  caggtcgact
61  tggcaaaгgc  aatggtgctg  aatttctgct  ttgcaattga  gcactacgga  aagatactca
121  atgccaaccg  gtcgtactat  ctttgccgat  cccagctctc  attcctaacc  gatatgctct
181  tacgtgtgta  cgaaaaгatc  ggtggtcagc  atgaaccggg  cgccatggat  ttctttaacc
241  ggtcgatact  agctgccatc  aaggagtact  atagtгctg  gacttгtga  gcccgtctag
301  atcctatacc  tggтctatca  aggtatcgcc  cagagggcct  ggggtacct  cccggagactg
361  aaгctggcca  ctttгtgcat  cttctggagc  cgtatatoga  aaagcacaat  atggagtтca
421  aggagtттgt  cgcgcctacc  acccagcgcg  agatcaaggа  gccggaattg  gatgactatt
481  ttatgcaoga  cagagcagtg  cgagagtctg  ggcatgacac  taggtaccgt  ttggaggгcg
541  ttгtggccga  cttgcccaca  atcgatctga  actcaactct  gttcaaatat  gagaccgata
601  ttctcgгtac  aatcгgtgtc  tacttcgaaг  acaagctгtг  gatcccggga  gagtттгcc
661  ataagaccgc  catcagгcct  ggtgaaгtgc  taacгtcagc  agттtгggac  cгcccggгcta
721  ggcgaaгcaa  agatgacctt  gacaactacc  tctgggataa  agaacaggga  atgtactctg
781  attacgacac  ggtcaaacaa  gaacгgtgca  catatgagac  ctcaaccagc  tттtggгcaa
841  ttгtggгctgг  tattgcaгcг  ccaaagcaag  gctccgacat  ggttaccaag  ggctttcccг
901  gattгaaгc  gttaggaggt  ctгctттccг  gaactgaaгg  gтctcгcgгg  gacatcgгac
961  tcagaccгcc  caaccгcaaa  tgggattacc  cгtacггctg  ggctctcгac  ca

```

//

**B**

```

1 tatacgggtg ggacagctac atggagtccc ttgggctggt ggccaacgac caggctcact
61 tggcaaaagg aatgggtgctg aatttctgct ttgccaatga cgaactacgga aaataactca
121 atgccaccgg gtctgactact ctttgcctgat cccagcctccc attcctaacc gatattgctt
181 tacgtgtgta cgaaaagatc ggtggtcaag atgaaccogg ccgatggat ttccttagcc
241 atgcgatact agctgccaat aaggagtact atagttctgt gacagccgaa gccccgtctag
301 atcctatacc ttgtctatca aggtatcgcc cagaggccct gggtgtacct ccggagactg
361 aagctggcca cttttgtgat ctctctggagc cgtataatcga aaagcaacaat atggagtcca
421 aggagtttgt ccgcgcctac aaccaaccgg agatcaagga gctgtgactg gatgactatt
481 ttatgcacga cagagcagtg cgagagtctg ggcatacgcg taggtaccgt ttggagggcg
541 tttgcccoga ccttgccaca atcgatctga actcaectct gtccaatat gagaccgata
601 tttcgcgaac aatccgtctc tactctogaag acaagcttgt gatccccgga gagttttgcc
661 ataagcagcc catcaggcct ggtgaagtgc taacgtcagc agtttgggac cgcggggcta
721 ggcgaagcaa agatgacctt gacaactacc tctgggataa agaacagga atgtactctg
781 attacgacac ggtcaaacaa gaacggtgca catatgagac ctcaaccacg ttttgggcaa
841 tgtgggctgg tattgcgagc ccaaagcaag gctccgacat ggttaccag ggctttcccc
901 gatttgaagc gttaggaggt ctgctttccc gaactgaagc gtctcgcgg gacatcggac
961 tcgaccgccc caaccgacaa tgggattacc cgtacggctg ggctcctcag ca
//

```

**F7. ábra** *Morchella esculenta* (A) és *M. steppicola* (B) NTH génrészleteinek szekvenciája GenBank formátumban.

**A**

```

1 gggaaatgga tgacaacaat gccggagcat ttaaatatgg attgggttga cagtgttaag
61 gtgcccttag tagtattaca tttctgtgta attctctctt ctggcctcta agcttatgat
121 gotgatggta tgttttcaag atgtttttga gtatttcaat gaacgaacac caagatcaaca
181 ttttgaacaa cgtgaaacat ccctagtatg gaattacaaa tatgcaagta ctgtattatt
241 tggatgttgt tctgtctat tttcaacctg tatttggctc ctcaattgct ttccttctca
301 tgttatttgt ttagatggtt gaatttggaa gaattcagcc aagagacatg ttgcagcatc
361 tctggactgg cccaatttcc aatgcatctg ttgaagtgtt ccaaggaagc cgatcagttg
421 aggtgcgagc agttggtgtt acaaagtgta tggtgattgc aactatcatc gaaagatctt
481 atattatttg aatttctggt gtattggtac cacagatgca acgctatctt atctggcagc
541 ttcataatca ttcagggtgc agcaattgat cg
//

```

**B**

```

1 gggaaatgga tgacaacaat gccggagcat ttaaatatgg attgggttga cagtgttaag
61 gtgcccttag tagtattaca tttctgtgta attctctctt ctggcctcta agcttatgat
121 gctgatggta tgttttcaag atgtttttga gtatttcaat gaacgaacac caagatcaaca
181 ttttgaacaa cgtgaaacat ccctagtatg gaattacaaa tatgcaagta ctgtattatt
241 tggatgttgt tctgtctat tttcaacctg tatttggctc ctcaattgct ttccttctca
301 tgttatttgt ttagatggtt gaatttggaa gaattcagcc aagagacatg ttgcagcatc
361 tctggactgg cccaatttcc aatgcatctg ttgaagtgtt ccaaggaagc cgatcagttg
421 aggtgcgagc agttggtgtt acaaagtgta tggtgattgc aactatcatc gaaagatctt
481 atattatttg aatttctggt gtattggtac cacagatgca acgctatctt atctggcagc
541 ttcataatca ttcagggtgc agcaattgat cg
//

```

**F8. ábra** *Quercus robur* (A) és *Populus glauca* L. var *Koepczkii* (B) TPS génrészleteinek szekvenciája GenBank formátumban.

<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.
<i>Aspergillus terreus</i> Thom
<i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze ex Fr.
<i>Coccidioides immitis</i> G.W. Stiles
<i>Cordyceps bassiana</i> Z.Z. Li, C.R. Li, B. Huang & M.Z. Fan
<i>Emericella nidulans</i> (Eidam) Vuill.
<i>Magnaporthe grisea</i> (T.T. Hebert) M.E. Barr
<i>Magnaporthe oryzae</i> B.C. Couch
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> Driver & Milner
<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschn.) Sorokin
<i>Neurospora crassa</i> Shear & B.O. Dodge

**F9. ábra** Primerek tervezésébe vont fajok pontos megnevezése.

Az Irodalomjegyzék tagja - teljes szerzőszámmal

Tuskan, G.A., Difazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A., Schein, J., Sterck, L., Aerts, A., Bhalerao, R.R., Bhalerao, R.P., Blaudez, D., Boerjan, W., Brun, A., Brunner, A., Busov, V., Campbell, M., Carlson, J., Chalot, M., Chapman, J., Chen, G.L., Cooper, D., Coutinho, P.M., Couturier, J., Covert, S., Cronk, Q., Cunningham, R., Davis, J., Degroeve, S., Déjardin, A., Depamphilis, C., Detter, J., Dirks, B., Dubchak, I., Duplessis, S., Ehlting, J., Ellis, B., Gendler, K., Goodstein, D., Gribskov, M., Grimwood, J., Groover, A., Gunter, L., Hamberger, B., Heinze, B., Helariutta, Y., Henrissat, B., Holligan, D., Holt, R., Huang, W., Islam-Faridi, N., Jones, S., Jones-Rhoades, M., Jorgensen, R., Joshi, C., Kangasjärvi, J., Karlsson, J., Kelleher, C., Kirkpatrick, R., Kirst, M., Kohler, A., Kalluri, U., Larimer, F., Leebens-Mack, J., Lepplé, J.C., Locascio, P., Lou, Y., Lucas, S., Martin, F., Montanini, B., Napoli, C., Nelson, D.R., Nelson, C., Nieminen, K., Nilsson, O., Pereda, V., Peter, G., Philippe, R., Pilate, G., Poliakov, A., Razumovskaya, J., Richardson, P., Rinaldi, C., Ritland, K., Rouzé, P., Ryaboy, D., Schmutz, J., Schrader, J., Segerman, B., Shin, H., Siddiqui, A., Sterky, F., Terry, A., Tsai, C.J., Uberbacher, E., Unneberg, P., Vahala, J., Wall, K., Wessler, S., Yang, G., Yin, T., Douglas, C., Marra, M., Sandberg, G., Van de Peer, Y. and Rokhsar, D. (2006): The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **313**(5793): 1596-1604.

## Kizárólag a Függelék anyagaiban előforduló hivatkozások jegyzéke

- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M. and Sherlock, G. (2000): The Gene Ontology Consortium. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics* **25**(1): 25-29.
- Bisakowski, B., Atwal, A.S. and Kermasha, S. (2000): Characterization of lipoxygenase activity from a partially purified enzymic extract from *Morchella esculenta*. *Process Biochemistry* **36**(1-2): 1-7.
- Bordács, S., Borovics, A. and Kézdy, P. (1999): A molyhos tölgyek - *Quercus pubescens* (incl. *Quercus virgiliana*) génmegőrzése. In: *Genetikailag veszélyeztetett, ritka fajok génmegőrzésének gyakorlati teendői*. Editor: Mátyás, Cs. pp. 25-32. Országos Mezőgazdasági Minősítő Intézet, Budapest
- Bratek, Z. (2010): Szarvasgomba-termesztés. In: *Gombabiológia, gombatermesztés*. Editor: Györfi, J. p. 350. Mezőgazda Kiadó, Budapest ISBN-13: 9789632866079
- Chang, A., Scheer, M., Grote, A., Schomburg, I. and Schomburg, D. (2009): BRENDA, AMENDA and FRENDA the enzyme information system: new content and tools in 2009. *Nucleic Acids Research* **37**: D588-D592.
- Cherry, J.M., Ball, C., Weng, S., Juvik, G., Schmidt, R., Adler, C., Dunn, B., Dwight, S., Riles, L., Mortimer, R.K. and Botstein, D. (1997): Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **387**(6632): 67-73.
- Chevalier, G., Frochot, H. and Bratek, Z. (2005): Az európai fekete szarvasgomba (Burgundi szarvasgomba – *Tuber uncinatum* Chatin). Első Magyar Szarvasgombász Egyesület ISBN-13: 9789632182391
- Crous, P.W., Gams, W., Stalpers, J.A., Robert, V. and Stegehuis, G. (2004): MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. *Studies in Mycology* **50**: 19-22.
- Diószegi, V. (1969): A honfoglaló magyarság hitvilágának történeti rétegei. A világfa. Népi kultúra - népi társadalom, II-III. Editor: Ortutay, Gy. Budapest
- Dong, Q., Lawrence, C.J., Schlueter, S.D., Wilkerson, M.D., Kurtz, S., Lushbough, C. and Brendel, V. (2005): Comparative plant genomics resources at PlantGDB. *Plant Physiology* **139**: 610-618.
- Duncan, C.J., Pugh, N., Pasco, D.S. and Ross, S.A. (2002): Isolation of a galactomannan that enhances macrophage activation from the edible fungus *Morchella esculenta*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**(20): 5683-5685.
- Fogarassy, Cs. (2001): Energianövények a szántóföldön. SZIE GTK Európai Tanulmányok Központja, Gödöllő ISBN-10: 9639256471
- Frank, N. (2002): Az év fája: A molyhos tölgy (*Quercus pubescens* WILLD.) erdőművelési tulajdonságai. *Erdészeti Lapok* **137**(6): 156-157.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D. and Bairoch, A. (2003): ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis *Nucleic Acids Research* **31**: 3784-3788.
- Godet, J-D. (2001): Fák és cserjék. Officina '96 Kiadó, Budapest ISBN-10: 9789639026

- Jain, E., Bairoch, A., Duvaud, S., Phan, I., Redaschi, N., Suzek, B.E., Martin, M.J., McGarvey, P. and Gasteiger, E. (2009): Infrastructure for the life sciences: design and implementation of the UniProt website. *BMC Bioinformatics* **10**:136.
- Jakucs, E. (2003): Mikorrhizák. In: *Mikológia*. Editors: Jakucs, E. and Vajna, L. pp. 291-304. Agroinform Kiadó, Budapest ISBN-10: 9635027761
- Jakucs, E. (2009): A föld alatti gombavilág titkai. *Természet Világa* **140**(9): 413-415.
- Kanehisa, M. and Goto, S. (2000): KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research* **28**: 27-30.
- Kanehisa, M., Goto, S., Hattori, M., Aoki-Kinoshita, K.F., Itoh, M., Kawashima, S., Katayama, T., Araki, M., and Hirakawa, M. (2006): From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Research* **34**: D354-357.
- Kiss, L. (1988): Földrajzi nevek etimológiai szótára II. (L–Zs). Akadémiai Kiadó Zrt., Budapest ISBN-10: 9630545691
- Magyar néprajzi lexikon I. (A–E). Editor: Ortutay, Gy. Akadémiai Kiadó Zrt., Budapest 1977. ISBN-10: 9630512866
- Mau, J.L., Chang, C.N., Huang, S.J. and Chen, C.C. (2004): Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia. *Food Chemistry* **87**(1): 111-118.
- Nitha, B., De Strayo, Adhikari, S.K., Devasagayam, T.P.A. and Janardhanan, K.K. (2010): Evaluation of free radical scavenging activity of morel mushroom, *Morchella esculenta* mycelia: a potential source of therapeutically useful antioxidants. *Pharmaceutical Biology* **48**(4): 453-460.
- Nitha, B., Meera, C.R. and Janardhanan, K.K. (2007): Anti-inflammatory and antitumor activities of cultured mycelium of morel mushroom, *Morchella esculenta*. *Current Science* **92**(2): 235-239.
- Pfab, R., Haberl, B., Kleber, J. and Zilker, T. (2008): Cerebellar effects after consumption of edible morels (*Morchella conica*, *Morchella esculenta*). *Clinical Toxicology* **46**(3): 259-260.
- Plinius, S. (isz. 77; Reprint 1987): Historia Naturalis. A természet históriája. A növényekről. Részletek a XII-XXI. könyvekből. Natura Kiadó, Veszprém ISBN-10: 9632331176
- Surányi, D. (1985): Kerti növények regénye. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest ISBN-10: 9632320611
- Szabó, I. (2003): Erdészeti mikológia. In: *Mikológia*. Editors: Jakucs, E. and Vajna, L. pp. 365-379. Agroinform Kiadó, Budapest ISBN-10: 9635027761
- Szamota, I., Zolnai, Gy., Sebestyén, L. és Dr. Kollin, F. (1984): Magyar oklevél-szótár. Állami Könyvterjesztő Vállalat, Budapest ISBN-10: 9630226707
- Turkoglu, A., Kivrak, I., Mercan, N., Duru, M.E., Gezer, K. and Turkoglu, H. (2006): Antioxidant and antimicrobial activities of *Morchella conica* Pers. *African Journal of Biotechnology* **5**(11): 1146-1150.
- Ying, J., Mao, X., Ma, Q., Zong, Y. and Wen, H. (1987): Icones of medicinal fungi from China. pp. 38-45. Translator: Xu, Y. Science Press, Beijing, China ISBN-10: 7030001958
- Zhang, G.-P., Zhang, F., Ru, W.-M. and Han, J.-R. (2010): Solid-state fermentation of cornmeal with the ascomycete *Morchella esculenta* for degrading starch and upgrading nutritional value. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **26**: 15-20.

# A TÉMÁHOZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

## Az értekezés témájában megjelent publikációk

### Dolgozatok referált tudományos folyóiratokban

Király, I. and **Czövek, P.** (2007): Oxidative burst induced pseudosclerotium formation of *Morchella steppicola* Zerova on different malt agar media. *Canadian Journal of Microbiology* 53(8): 975-982. (IF: 1.275)

**Czövek, P.** and Király, I. (2011): Inducible trehalase enzyme activity of *Morchella conica* Persoon mycelium. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 58(1): 1-11. (IF: 0.625)

### Konferencia összefoglalók

#### Idegen nyelvű konferencia összefoglalók folyóiratokban

**Czövek, P.** and Király, I. (2002): The function of trehalose in the Morel life cycle. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 49: 394-395. II. Magyar Mikológiai Konferencia, Szeged 2002. május 29-31.

**Czövek, P.** and Király, I. (2005): Comparative assay of the drought stress tolerance of two Morel species (*Morchella steppicola* Zer. and *Morchella esculenta* L.). *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 52(2): 242-243. III. Magyar Mikológiai Konferencia, Mátraháza 2005. május 26-27.

**Czövek, P.**, Kálmán, G. and Király, I. (2008): The inducible trehalase activity in *Cenococcum geophyllum* Fries. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 55(2): 180-181. IV. Magyar Mikológiai Konferencia, Debrecen 2008. május 29-31.

#### Magyar nyelvű konferencia összefoglaló konferencia kiadványban

**Czövek, P.** és Király, I. (2004): Sztjeppei kucsomagomba (*Morchella steppicola* Zer.) szárazságstressz-toleranciájának élettani vizsgálata. Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlése Keszthely, Hotel Helikon 2004. október 7-9.

## Az értekezés témájához kapcsolódó egyéb publikációk

### Dolgozat referált tudományos folyóiratban

**Czövek, P.**, Király, I., Páldi, E., Molnár, I. and Gáspár, L. (2006): Comparative analysis of stress tolerance in *Aegilops* accessions and *Triticum* wheat varieties to detect different drought tolerance strategies. *Acta Agronomica Hungarica* 54(1): 49-60.

### Teljes közlemény konferencia-kiadványban

Király, I. and **Czövek, P.** (2002): Changes of MDA level and O<sub>2</sub> scavenging enzyme activities in wheat varieties as a result of PEG treatment. *Acta Biologica Szegediensis* 46(3-4): 105-106. 7th Hungarian Congress on Plant Physiology 24-27 June 2002 Szeged, Hungary

### Tudományos könyv: könyvfejezet

Szűcs, E., Balla, I., Kirilla, Z., Vörös, I., Takács, T., Király, I. and **Czövek, P.** (2008): Symbiotic and vitalizing effects of microorganisms in counterbalancing the replant disease of fruit trees. In: *Mycorrhiza Works* (Feldmann F., Kapulnik Y., Baar J., eds.) pp. 248-257. ISBN: 9783941261013 ©Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Braunschweig, Germany

### Konferencia összefoglaló

#### Idegen nyelvű konferencia összefoglaló folyóiratban

**Czövek, P.** and Király, I. (2005): Phylogenetics of *Morchella steppicola* (Zer.), *Morchella esculenta* (L.) and *Verpa digitaliformis* (Pers.ex Fr.) based on nuclear its sequences. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 52(2): 227. III. Magyar Mikológiai Konferencia, Mátraháza 2005. május 26-27.

### Tudományos intézetben tartott szakmai előadás

Király, I., **Czövek, P.** és Kálmán, G. (2007): „Ektomikorrhiza gombák és egyéb talaj-mikroorganizmusok vitalizáló hatásai talajunt és stressz körülmények között.” Szimbionta és vitalizáló mikroorganizmusok az integrált gyümölcsstermesztésben szimpózium, ÉGyDKF Kht., Budapest 2007. november 28.

## **A fenti közlemények idézettsége**

Király, I. and **Czövek, P.** (2002): Changes of MDA level and O<sub>2</sub> scavenging enzyme activities in wheat varieties as a result of PEG treatment. *Acta Biologica Szegediensis* 46(3-4) 2002: 105-106. 7<sup>th</sup> Hungarian Congress on Plant Physiology 24-27 June 2002 Szeged, Hungary

---

Független idézetek száma: 4

1. Loureiro, S., Santos, C., Pinto, G., Costa, A., Monteiro, M., Nogueira, A.J.A. and Soares, A.M.V.M. (2006): Toxicity Assessment of Two Soils from Jales Mine (Portugal) Using Plants: Growth and Biochemical Parameters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 50(2): 182-190.



2. Abad, A.K.J. and Khara, J. (2007): Effect of cadmium toxicity on the level of lipid peroxidation and antioxidative enzymes activity in wheat plants colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10:2413-2417.
3. Kocheva, K.V., Kartseva, T., Landjeva, S. and Georgiev, G.I. (2009): Physiological response of wheat seedlings to mild and severe osmotic stress. *Cereal Research Communications* 37(2): 199-208.
4. Savicka, M. and Škute, N. (2010): Effects of high temperature on malondialdehyde content, superoxide production and growth changes in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Ekologija* 56(1-2): 26-33.

**Czövek, P.,** Király, I., Páldi, E., Molnár, I. and Gáspár, L. (2006): Comparative analysis of stress tolerance in *Aegilops* accessions and *Triticum* wheat varieties to detect different drought tolerance strategies. *Acta Agronomica Hungarica* 54(1): 49-60.

---

Független idézetek száma: 9

1. Dobó, E., Singh, M.K. and Szücs, I. (2007): Global environmental change solutions from biomass, bioenergy and biomaterials: A global overview for sustainable development. *Cereal Research Communications* 35(2): 349-352.
2. Horváth, E., Szalai, G. and Janda, T. (2007): Induction of Abiotic Stress Tolerance by Salicylic Acid Signaling. *Journal of Plant Growth Regulation* 26(3): 290-300.
3. Jolánkai, P., Tóth, Z. and Kismányoki, T. (2007): Gains and losses induced by agrochemical applications. *Cereal Research Communications* 35(2): 541-544.
4. Molnár, A., Singh, M.K., Nagy, H. and Percze, A. (2007): Barriers and opportunities of sustainable bioenergy production in Hungary. *Cereal Research Communications* 35(2): 793-796.
5. Percze, A., Singh, M.K. and Szücs, I. (2007): Environmental and ecological sustainability of biomass energy production in Europe. *Cereal Research Communications* 35(2): 921-924.

6. Singh, M.K., Fekete-Farkas, M. and Szűcs, I. (2007): Agriculture land use changes and the dynamics of climate system: a sustainable approach. *Cereal Research Communications* 35(2): 1061-1064.
7. Jolánkai, P., Tóth, Z., Kismányoki, T. and Farkas, I. (2009): Agrokémiiai kezelések hatása őszi búza (*Triticum aestivum* L.) monokultúrában. Impacts of agrochemical treatments in a winter wheat monoculture. *Növénytermelés* 58(1): 39-50.
8. Kocheva, K.V., Kartseva, T., Landjeva, S. and Georgiev, G.I. (2009): Physiological response of wheat seedlings to mild and severe osmotic stress. *Cereal Research Communications* 37(2): 199-208.
9. Hura, T., Hura, K., Grzesiak, S. and Banaszak, Z. (2010): Simulation of osmotic stress during the early stages of triticale development as a promising laboratory test for screening drought resistance. *Cereal Research Communications* 38(3): 327-334.

Király, I. and **Czövek, P.** (2007): Oxidative burst induced pseudosclerotium formation of *Morchella steppicola* Zerova on different malt agar media. *Canadian Journal of Microbiology* 53(8): 975-982. (IF: 1.275)

---

Független idézetek száma: 1

1. Lukács, Z. (2010): Újabb ismeretek a pusztai kucsomagombáról. *Magyar Gombász* 5(18): 9-10.