

Latvijas Zinātņu akadēmijas
Bioloģijas institūts

**ETILĒNS UN PEROKSIDĀZES
AUGU ATTĪSTĪBAS UN ADAPTĀCIJAS
REGULĀCIJĀ**

Ģederts Ieviņš

*Disertācija
bioloģijas habilitētā doktora
zinātniskā grāda iegūšanai*

Rīga 1996

SATURS

Ievads	1
1. Literatūras apskats	5
1.1. Augu attīstība un adaptācija: vispārīgie regulācijas principi	6
1.2. Etilēns kā augu attīstības un adaptācijas endogēnais regulators	8
1.2.1. Etilēna biosintēze	8
1.2.2. Etilēna veidošanās endogēnā un vides atkarīgā regulācija	11
1.2.3. Etilēna fizioloģiskā iedarbība	15
1.2.4. Etilēna darbības mehānisms	18
1.2.5. Etilēns kā potenciāls aizsargmehānismu regulators	19
1.3. Peroksidāžu bioķīmiskais un fizioloģiskais raksturojums	21
1.3.1. Molekulārā heterogenitāte un bioķīmiskā polifunkcionalitāte	21
1.3.2. Peroksidāžu katalizētās reakcijas	24
1.3.3. Peroksidāžu izmaiņas attīstības un adaptācijas procesu gaitā	29
1.3.4. Askorbāta peroksidāze - galvenais ūdeņraža peroksīdu pārtverošais ferments augos	34
1.4. Lignifikācijas bioķīmiskie un fizioloģiskie aspekti	39
1.4.1. Lignīna biosintēzes reakcijas	39
1.4.2. Lignīna uzkrāšanās augu attīstības gaitā un tās regulācija	40
1.5. Endogēnais oksidatīvais stress augos	42
1.5.1. Skābekļa aktivēšanās reakcijas augos	42
1.5.2. Fermentatīvās detoksifikācijas mehānismi	45
1.5.3. Lipoksigenāze un membrānu lipīdu peroksidācija	46
2. Materiāls un pētījumu metodes	49
2.1. Augu materiāla audzēšana	51
2.1.2. Graudzāļu dīgsti	51
2.1.3. Priežu sējeņi	51
2.1.4. Kartupeļu dzinumumu <i>in vitro</i> kultūra	52
2.2. Fermentatīvo olbaltumu ekstrakcija	53
2.3. Fermentu aktivitātes noteikšana	54
2.3.1. Peroksidāze	54
2.3.2. Lipoksigenāze	55
2.4. Etilēna analīze	55
2.4.1. Etilēna izdalīšanās no veselīgiem augiem	55

2.4.2.	Stresa etilēna izdalīšanās no graudzāļu dīgstiem	56
2.4.3.	Etilēna izdalīšanās kartupeļu eksplantu kultūrā	56
2.4.4.	Stresa etilēna izdalīšanās no priežu skuļām	57
2.4.5.	Endogēnā etilēna satura noteikšana	58
2.4.6.	Etilēna izdalīšanās hidrolīzes procesā	58
2.4.7.	Etilēnveidojošā fermenta aktivitātes noteikšana	59
2.4.8.	1-Aminociklopropān-1-karbonskābes noteikšana	59
2.4.9.	Hloretilfosfonskābes analīze	60
2.5.	Olbaltumvielu satura noteikšana	60
2.6.	Lignīna noteikšana	60
2.7.	Lipīdu peroksidācijas noteikšana	61
2.8.	Elektroforēze	61
3.	Rezultāti un to analīze	63
3.1.	Etilēna piedalīšanās graudzāļu dīgstu augšanas regulācijā	64
3.1.1.	Etilēna izdalīšanās un augšanas ritmiskums intaktos dīgstos	64
3.1.2.	Etilēna biosintēzes indukcija stresa ietekmē	74
3.1.3.	Dīgstu lineārās augšanas inhibēšana un lignifikācijas izmaiņas etilēna ietekmē	83
3.1.4.	Etilēna biosintēzes autoregulācija	86
3.1.5.	Lipoksigenāzes saistība ar etilēna veidošanos	90
3.2.	Peroksidāžu sistēmas izmaiņas graudzāļu dīgstu lapas attīstības gaitā	93
3.2.1.	Aktivitātes izmaiņas atkarībā no lietotā ūdeņraža donora	93
3.2.2.	Eksogēnā etilēna ietekme uz peroksidāzes aktivitāti	103
3.2.3.	Gaismas ietekme uz peroksidāzes aktivitāti	107
3.3.	Etilēna biosintēze un pretoksidatīvā stresa reakcijas skujukociem	110
3.3.1.	Etilēna biosintēzes indukcija	110
3.3.2.	Etilēna izdalīšanās no audiem sārma hidrolīzes gaitā	120
3.3.3.	Peroksidāzes indukcija stresa ietekmē	128
3.4.	Askorbāta peroksidāzes aktivitātes izmaiņas kartupeļu dzinumumu <i>in vitro</i> kultūrā	136
4.	Diskusija	145
5.	Secinājumi	153
6.	Izmantotās literatūras saraksts	157

IEVADS

Augi dzīvo vidē, kura nepārtraukti izmainās. Vides faktori, gaismas intensitāte un kvalitāte, CO₂, O₂, minerāli, temperatūra, ūdens pieejamība, mitrums un vējš, augsnes struktūra, citi augi un zālēdāji dzīvnieki, kukaiņi, mikroorganismi – visi apkārtējās vides komponenti mainās no mirkļa uz mirkli, un bieži vien apstākļi nav labvēlīgi optimālai augšanai. Visi uzskaitītie mainīgie faktori var ietekmēt augu augšanu un attīstību, tātad, tiek uztverti šūnās. Bez ārējās vides mainīguma eksistē arī iekšējais mainīgums – augu šūnas atrodas sarežģītā ogļhidrātu, aminoskābju, minerālvielu, ūdens, vitamīnu un augšanas regulatoru maisījumā ar mainīgu pH. Nav nekādu šaubu, ka šī maisījuma sastāvs mainās gan kvalitatīvi, gan kvantitatīvi; un mainās arī tā kustības ātrums. Tāpēc augu šūnām ir nepieciešamas metaboliskās kontroles sistēmas, kas ļautu pārvarēt visu mainīgo faktoru ietekmi un uzturēt stabilu augšanu un attīstību attiecībā pret vides dezorganizējošo iedarbību.

Īpaši svarīgi aģenti augu attīstības integrācijā mainīgos ārējās vides apstākļos ir augu hormoni, kas koordinē ģenētiskā potenciāla izpausmi. Vides faktoru izmaiņas tieši ietekmē hormonu metabolismu un sadalījumu augā. Tas, savukārt, izsauc noteiktu ģēnu ekspresiju ar sekojošu olbaltumvielu sintēzi un fermentu aktivitātes izmaiņām.

Pēdējos desmit gados augu fizioloģijā sākušies intensīvi pētījumi par skābekļa aktivācijas efektiem saistībā ar augu attīstību un vides stresa iedarbību. Auga organismā skābekļa aktivēšanās notiek tā redukcijas procesā par ūdeni, kas ir normāla metabolisma sastāvdaļa. Pastiprināta aktīvā skābekļa formu veidošanās raksturīga noteiktām auga attīstības stadijām, kā arī tā notiek vides stresa ietekmē. Evolūcijas procesā augiem attīstījušās aizsargsistēmas šo toksisko skābekļa starpformu neutralizēšanai. Viens no centrālajiem fermentiem detoksificējošo fermentu sistēmā ir peroksidāze, kas piedalās ūdeņraža peroksīda neutralizēšanā. Praktiski visi patoloģiskie stāvokļi dažādu stresu ietekmē ir saistīti ar nepietiekamu detoksificējošo fermentu darbību. Tāpēc īpaši nozīmīga ir tolerances mehānismu izpēte augu adaptācijas procesos.

Etilēns ir gāzveida augu hormons, kurš piedalās daudzu augu dzīvības aspektu regulācijā, kas ietver augšanu, attīstību, novecošanos u.c. Etilēns veidojas augos visā to ontogēneses laikā, bet tā izdalīšanās īpaši pastiprinās stresa situācijās. Ņemot vērā etilēna biosintēzes indukciju kā vispārēju un nespecifisku atbildi uz stresa faktoru iedarbību, varētu domāt, ka etilēnam ir noteikta regulatīva loma augu aizsargmehānismu aktivēšanā. Iespējams, ka etilēns ir tieši saistīts ar stresa signāla pārneses sistēmu.

Pašreizējā momentā īpaši aktuāli ir pētījumi par tiem mehānismiem, kas nodrošina

auga organisma normālu attīstību mainīgos vides apstākļos, un kuri nosaka pāreju uz adaptācijas reakcijām stresa situācijās. Dotais darbs atspoguļo virkni kompleksu pētījumu, kuri tika veikti LZA Bioloģijas institūta Augu fizioloģijas laboratorijā un Zviedrijas Lauksaimniecības zinātņu universitātes Augu fizioloģijas institūtā, un kas vērsti uz etilēna un peroksidāžu sistēmas mijiedarbības izpratni auga attīstības laikā un vides stresa faktoru ietekmē.

Galvenais darba mērķis bija izpētīt etilēna biosintēzes un peroksidāžu sistēmas izmaiņas augšanas un attīstības gaitā, kā arī stresa ietekmē un stresa pielāgošanās procesā. Īpaša uzmanība tika pievērsta etilēna potenciālajām funkcijām augu attīstības un adaptācijas regulācijā.

Atbilstoši darba mērķim, tika nosprausti sekojoši eksperimentālie uzdevumi:

1. Noteikt etilēna biosintēzes, peroksidāžu sistēmas un lignifikācijas procesa izmaiņas intaktos augos saistībā ar to augšanu un attīstību. Analizēt iespējamās etilēna regulatīvās funkcijas intaktos augos.

2. Izpētīt dažāda veida stresa faktoru ietekmi uz etilēna biosintēzi un pretoksidatīvo fermentu aktivitāti. Pētīt faktorus, kas piedalās stresa atkarīgo izmaiņu regulācijā.

3. Analizēt izmaiņas augšanā un lignifikācijā, kā arī etilēna biosintēzē un peroksidāžu sistēmās, ko izraisa augu apstrāde ar eksogēno etilēnu un etilēna priekštecī 1-aminociklopropān-1-karbonskābi. Noteikt iespējamo sakarību starp eksogēno un endogēno etilēnu, no vienas puses, un askorbāta peroksidāzes aktivitāti un potenciālo oksidatīvā stresa toleranci, no otras.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Augu attīstība un adaptācija: vispārīgie regulācijas principi

Termins “attīstība” attiecībā pret augu kā vienotu veselumu, kas rodas dzimumvairošanās ceļā, ietver sevī pakāpeniskas un progresīvas izmaiņas izmēros, struktūrā un funkcijās, kas noved pie pilnvērtīgi funkcionējoša, vairoties spējīga auga izveidošanās no zigotas. Attīstība kā auga organisma funkcionēšanas pamatnoteikums nav šķirama no adaptācijas, kas tuvāk raksturo struktūras pašorganizācijas īpašību sekmīgi attīstīties un eksistēt mainīgos apkārtējās vides apstākļos. Ja attīstības pētījumi parāda organisma iekšējās struktūras un funkcijas vienotību, tad adaptācija atklāj attīstības plastiskumu – organisma spēju (vai nespēju) izmainīt struktūru un funkcijas atbilstoši ārējo apstākļu izmaiņai.

Pretēji dzīvnieku organisma unitārajai dabai, visu augstāko augu organismi ir veidoti kā pamatkonstrukcijas moduļu atkārtojums (*Trewavas* 1983). Virszemes daļā šādi moduļi ir meristēmas (vai pumpuri) ar atbilstošajām lapām, augsnē lokalizētāja daļā moduļus veido sakņu meristēmu atkārtojumi. Šo moduļu skaits ievērojami variē jebkura individuālā auga dzīves laikā. Šāda modulārā uzbūves principa dēļ augiem nav centralizētas, subordinētas kontroles, un katra atsevišķā meristēma augā var darboties līdzīgi individuālam organismam, un augs var tikt uzskatīts par šādu organismu kopumu. Dzinuma meristēmas atrodas konkurējošās attiecībās par gaismas un cirkulējošo minerālvielu, cukuru un ūdens saņemšanu. Ātrāk augošās meristēmas saņem lielāko daļu no šiem pamatresursiem (*White* 1979). Ja lokālie augšanas apstākļi ir optimāli, individuālās dzinuma meristēmas aug ātri un sekmē zemākās pakāpes meristēmu augšanu uz tā paša dzinuma. Sliktos lokālās vides apstākļos augšana var apstāties, jo meristēmas efektīvāk konkurē par minerālvielām un ūdeni.

Šāds augšanas atbilžu elastīgums ir nepieciešams, lai optimizētu resursu uzņemšanu no apkārtējās vides, kuru daudzums un pieejamība katra individuālā auga apkārtnē var ievērojami variēt. Tā kā augi ir nekustīgi organismi, bet to individuālās augšanas apstākļi ir krasi mainīgi, individuālo augu struktūra un forma ir ārkārtīgi plastiska (*Trewavas* 1983).

Katras atsevišķās meristēmas augšana ir atkarīga gan no tās iekšējiem apstākļiem, gan arī no ārējo faktoru iedarbības. Principiāli būtisks ir novērojums, ka dažādas auga daļas var savstarpēji ietekmēt cita citas augšanu un attīstību. Šādas korelācijas var izsaukt gan pozitīva kontrole, piemēram, hormonu dabas, gan arī negatīva kontrole, kas saistīta ar konkurenci uz izejvielām. Fitohormoni, atšķirībā no zīdītāju dzīvnieku hormoniem, nenodrošina centralizētu attīstības vadību, bet gan darbojas kā integrējoši faktori auga attīstībā, principāli piedaloties mainīgas ārējās vides signālu ietekmē uz attīstību. Fitohormonu regulējošā ietekme uz attīstību ir saistīta gan ar attiecīgo hormonu koncentrācijas izmaiņām konkrētajos audos, gan arī ar šo audu jutīguma pret doto hormonu izmaiņām (*Trewavas* 1981).

Būtiski ir uzsvērt arī kādu citu augu organismu pamatīpašību – t.s. periodisko augšanu. Normālā situācijā augšana nenotiek nemainīgā ātrumā, bet ir pārtraukts process, kas izpaužas kā zināms periodiskums vai ritmiskums, kas atkarīgs gan no ārējo apstākļu ritmiskas izmaiņas, gan arī no iekšējiem faktoriem (*Cumming & Wagner 1968*). Augšanas relatīvais raksturs izpaužas arī attiecībā uz atsevišķa auga dažādām daļām, kā arī uz atsevišķu orgānu dažādām daļām. Paplašinot šo principu tālāk, jāatzīmē, ka visa auga organisma funkcionēšana sastāv no dažāda garuma fizioloģiskajiem cikliem, no kuriem vislabāk izpētītie ir cirkādie ritmi ar 24 h periodu pat šķietami nemainīgos ārējās vides apstākļos, kā arī sezonas ritmi (*Bunning 1956*). Jādomā, ka šādu ritmu pamatā ir t.s. endogēnās oscilācijas - bioloģiskais pulkstenis, kas nodrošina visu svārstību funkcionēšanu. Tomēr, lai arī ritmiskās parādības augos tiek visai plaši pētītas, šāda vispārīga mehānisma funkcionēšana vēl nav pierādīta.

Viens no vispārīgākajiem bioloģiskajiem principiem definē katru dzīvo organismu kā rezultātu mijiedarbībai starp tā ģenētisko materiālu un vidi. Ģenētiskais materiāls nosaka organisma attīstības potences. Vide nosaka, kāda ģenētiskā potenciāla daļa reāli izpaužas. Citiem vārdiem sakot, augu forma un funkcija ir atkarīga no to ģenētiskās uzbūves un gēnu spējas izpausties caur olbaltumvielu sintēzi. Vide ietekmē augu augšanu, diferenciaciju un metabolismu, vadot ģenētiskā materiāla ekspresiju, kas parādās kā ietekme uz olbaltumvielu sintēzi un fermentu aktivitāti. Visām augu šūnām piemīt pilna ģenētiskā kapacitāte reģenerēt veselu organismu. Lai arī jebkurai individuālai dzīvai šūnai auga organismā potenciāli ir visas veselā organisma īpašības, normālās attīstības laikā tās neizpaužas. Ja ģenētiski visas šūnas ir vienādas, kādi faktori tad rada atšķirības starp dažādām šūnām? Pašreizējā darba teorija balstās uz pieņēmuma, ka diferencētas dažādu veidu šūnas atšķiras galvenokārt pēc fermentu un citu olbaltumu veida un līmeņa, kādus tā satur. Līdz ar to, diferenciacijas veids ir atkarīgs no tā, kādas olbaltumvielas tiks sintezētas šūnā tās attīstības laikā. Fitohormoni ir tie aģenti, caur kuriem izpaužas vides apstākļu izmaiņas ietekme uz gēnu ekspresiju, regulējot ģenētiskā potenciāla izpaušanos.

1.2. Etilēns kā augu attīstības un adaptācijas endogēnais regulators

Etilēns ir gāzveida bioloģiski aktīvs savienojums, kura molekulas vienkāršība ir krasā kontrastā ar tā komplekso lomu augu fizioloģijā. Niecīgie daudzumi, kas nepieciešami bioloģiskās aktivitātes izrādīšanai (pilnai aktivitātei pietiekamā koncentrācija ir 1 $\mu\text{l/l}$), ilgstoši aizkavēja etilēna fizioloģijas pētījumus. Tikai līdz ar precīzu metodiku izstrādāšanu etilēna analīzei radās iespēja visaptverošiem etilēna pētījumiem, un šobrīd etilēns ir salīdzinoši visvienkāršāk pētāmais un visvairāk izpētītais no visiem augu hormoniem.

Etilēna bioloģiskās aktivitātes atklāšana bija tieši atkarīga no tā postošās ietekmes uz kultūraugiem, un bija saistīta ar deggāzes lietošanu siltumnīcu apgaismošanai pagājušā gadsimta beigās (*Abeles et al.* 1992). Etilēna saturs šajā gāzē bija 5 %. Lai arī jau tajā laikā tika aprakstīti un izpētīti vairāki gadījumi par gāzes izsaukto augu novecošanos un lapu priekšlaicīgu nobiršanu, etilēna kā darbīgā bioloģiski aktīvā gāzes komponenta loma tika izpētīta un pierādīta tikai Neļubova eksperimentos ap 1910. gadu. Tolaik aprakstītā "trīskāršā atbilde" etilēna ietekmē (horizontāli orientēta augšana, lineārās augšanas inhibēšana un audu uzbriešana) tika izmantota kā biometode etilēna noteikšanai visus turpmākos 50 gadus. Fakts, ka augi paši izdala etilēnu, tika noskaidrots tikai trīsdesmito gadu vidū.

Revolucionārs apvērsums etilēna fizioloģijas pētījumos notika 1959. gadā, kad tika parādīta gāzu hromatogrāfijas, kā etilēna analīzes tehnikas, nozīme (*Burg & Stolwijk* 1959).

1.2.1. Etilēna biosintēze

Lai arī etilēns var veidoties nebioloģiskās ķīmiskajās reakcijās, piemēram, no askorbīnskābes vara jonu klātbūtnē (*Abeles et al.* 1992), etilēna biosintēze ir dzīvu augstāko augu audu raksturīga un neatņemama sastāvdaļa: no vienas puses, līdz šim nav zināma augu suga, kuras audi neizdalītu etilēnu, un, no otras puses, visos līdz šim zināmajos gadījumos, līdz ar audu dzīvības funkciju izbeigšanos pārtraucas arī etilēna izdalīšanās no tiem. Pretstatā baktērijām un sēnēm, kur etilēns veidojas no ketoglutarāta un glutamīnskābes, etilēna biosintēze augstākajos augos notiek no metionīna (metionīna jeb Janga ceļš, *Abeles et al.* 1992). Cikls sākas ar metionīna pārvēršanos par S-adenozilmetionīnu (SAM) metionīna adenoziltransferāzes katalizētā reakcijā ar ATF piedalīšanos. Tā kā šūnā SAM tiek pārsvarā izlietots citās ķīmiskajās reakcijās, kas nav saistītas ar etilēna veidošanos (piem., poliamīnu sintēze un metilēšanas reakcijas), relatīvi nelielais etilēna sintēzē izmantotais daudzums nevar būtiski izmainīt SAM stabili augsto līmeni šūnā. Tāpēc normālos apstākļos adenoziltransferāze nav etilēna biosintēzi limitējošais solis. Tiešais etilēna priekštecis

ir 1-aminociklopropān-1-aminokarbonskābe (ACKS), kas veidojas no SAM ar piridoksālfosfāta atkarīgās ACKS sintēzes (EC 4.4.1.14) starpniecību. ACKS sintēze ir labils ferments gan *in vitro*, gan *in vivo* apstākļos, tās olbaltuma molekulas inaktivācijas pusperiods ir tikai 30-50 minūtes (Acaster & Kende 1983). ACKS sintēzes olbaltums sastāda tikai 0.001-0.003 % no kopējā olbaltuma daudzuma ievainotos augļu audos, kas intensīvi izdala etilēnu. Molekulārie pētījumi ir parādījuši, ka ACKS sintēze eksistē atšķirīgās formās, kuras kodē gēnu grupa (Kende 1993). Atsevišķie ACKS sintēzes gēni tiek dažādi ekspresēti kā atbilde uz attīstības, vides un ķīmisko faktoru izmaiņām. Tā kā ACKS sintēzes gēna ekspresija ar sekojošu fermenta aktivitātes pieaugumu tiek inducēta praktiski visās tajas situācijās, kad novērots etilēna izdalīšanās intensitātes pieaugums, ACKS sintēzi var uzskatīt par galveno limitējošo posmu etilēna biosintēzē (Kende 1993). Bez tam, ACKS sintēzes aktivitātes pieaugums parasti ir paralēls ACKS satura pieaugumam.

Etilēna izdalīšanos augstākajos augos var inhibēt vairāki savienojumi, kurus augšanas vidē izdala mikroorganismi. Pazīstamākais no šādiem savienojumiem ir rizobitoksīns, kurš inhibē 75 % etilēna izdalīšanās no augiem (Owens *et al.* 1971). Pētījumos plaši tiek lietots sintētisks rizobitoksīna analogs aminoetoksivinilglicīns (AVG), kurš inhibē ACKS sintēzes aktivitāti. Cits fermenta inhibitors ir aminooksietilēnskābe (Amrhein & Wenker 1979).

Etilēna priekšteča ACKS inaktivācija var notikt, veidojoties malonil-ACKS, kas ir etilēnu neveidojoša starpforma (Yang & Hoffman 1984). Malonil-ACKS veidojas *D*-aminoskābju maloniltransferāzes darbības rezultātā situācijās, kad ACKS koncentrācija audos ir augsta un ACKS oksidāze ir piesātināta ar substrātu. Malonil-ACKS ir atrasts visās auga daļās, bet *N*-maloniltransferāze ir raksturota kā konstitutīvs ferments (Martin & Saftner 1995). Tomēr, faktori, kas regulē malonil-ACKS uzkrāšanos un funkcijas augos līdz galam nav noskaidroti. Tiek uzskatīts, ka ACKS malonilēšana ir īslaicīgs vai atgriezenisks process, lai samazinātu etilēna veidošanas intensitāti. Pēdējā laika pētījumi ir parādījuši, ka augos eksistē vēl viena ACKS konjugētā forma – 1-(γ -L-glutamilamino)ciklopropān-1-karbonskābe (Martin *et al.* 1995). Iespējams, ka šī konjugāta veidošanos katalizē γ -glutamiltranspeptidāze. Dati rāda šīs ACKS konjugācijas pozitīvu regulāciju ar etilēnu, vismaz klimaktērisko augļu nogatavošanās procesā (Martin *et al.* 1995).

Pēdējo posma soli, ACKS pārvēršanos par etilēnu, katalizē t.s. etilēnveidojošais ferments (EVF) jeb ACKS oksidāze. Vairākus gadu desmitus EVF aktivitāte tika noteikta tikai *in vivo*, piesātinot augu audus ar substrātu ACKS, jo fermenta aktivitāte izzuda, audus homogenizējot (Yang & Hoffman 1984). Zināma EVF aktivitāte tomēr saglabājas vakuolās, kas ir izdalītas no lapas mezofila (Guy & Kende 1984), kā arī membrānu pūslīšos sulā, kas izspiesta no kivi augļiem (Mitchell *et al.* 1988). Tomēr, šīs sistēmas saglabā tikai 1 % (Porter *et al.* 1986) vai pat mazāk (Mitchell *et al.* 1988) no sākotnējās

in vivo aktivitātes, un aktivitāte izzūd pavisam, ja membrānu integritāte tiek sagrauta (Porter et al. 1986, Mayne & Kende 1986).

Agrīnie darbi par EVF pilnībā nostiprināja uzskatu, ka fermenta aktivitāte ir atkarīga no membrānu integritātes (Yang & Hoffman 1984), vai pat no protonu pārvietošanās cauri plazmas membrānai un membrānu potenciāla saglabāšanās (John 1983). No otras puses, tika atklāts liels skaits bezšūnu sistēmu, kuras bija spējīgas pārvērst ACKS par etilēnu, taču to darbība bija atkarīga pārsvarā no lipoksigenāzes ģenerēto brīvo radikāļu nefermentatīvas reakcijas ar ACKS (Yang & Hoffman 1984).

Autentiskā EVF atklāšana sākās ar *pTOM13* gēna izdalīšanu no tomātu augļiem, kura izpausme sakrita laikā ar etilēna izdalīšanās indukciju. Tā kā ģenētiski pārveidoti augi, kuriem šī gēna darbība bija bloķēta, bija ar būtiski pazeminātu etilēna izdalīšanās līmeni, varēja izdarīt secinājumu, ka *pTOM 13* kodē EVF vai vismaz EVF polipeptīdo komponentu (Hamilton et al. 1990). Šī polipeptīda aminoskābju secība parādīja augstu korelācijas pakāpi ar flavonona-3-hidroksilāzes sekvenci, kas piedalās flavonolu un antocianīdu sintēzē. Neraugoties uz šādu homoloģiju, nav nekad fermentatīvas sakarības starp flavonona-3-hidroksilāzi un EVF. Tā kā flavonola-3-hidroksilāzes aktivitātes stabilizācijai *in vitro* ir nepieciešama Fe^{2+} un askorbāta klātbūtne (Britsch & Grisebach 1986), šādi izolācijas apstākļi izrādījās nepieciešami arī EVF aktivitātes saglabāšanai šķīstošā formā (Ververidis & John 1991). Šis atklājums deva iespēju uzsākt plašus pētījumus par EVF, ACKS oksidāzi.

ACKS pārvēršanos par etilēnu var inhibēt ACKS strukturālie analogi, piemēram, aminoizosviestskābe. Citi etilēna veidošanās inhibitori, kas darbojas ACKS oksidēšanas līmenī, ir kobalta joni, *n*-propilgallāts, salicilskābe u.c. (Abeles et al. 1992). Etilēna izdalīšanos inhibē arī brīvo radikāļu pārtvērēji (Parups 1984).

ACKS oksidēšanās reakcija par etilēnu ir saitīta ar ciānoskudrskābes rašanos, kas augu audos pārvēršas par CO_2 un ciānūdeņradi (HCN). HCN reaģē ar cisteīnu, veidojot β -ciānoalanīnu reakcijā ar β -ciānoalanīna sintēzes piedalīšanos.

Neraugoties uz visai pilnīgajiem pierādījumiem par etilēna biosintēzes vispārīgā ceļa darbību, ietverot ACKS kā tiešo priekšteci, eksistē hipotēze par to, ka zināmās stresa situācijās etilēns no augu audiem var izdalīties arī citu reakciju rezultātā, piemēram, no membrānu lipīdu peroksidācijas. Par pilnīgi pierādītu (izmantojot radioaktīvi iezīmētas potenciālo etilēna priekšteču molekulas) var uzskatīt etilēna veidošanos membrānu bojājumu rezultātā ūdensauga *Spirodela oligorrhiza* audos, kas apstrādāti ar vara joniem (Mattoo et al. 1986, Matto et al. 1992). Šis mehānisms ietver nepiesātināto taukskābju peroksidāciju. No ACKS neatkarīgā etilēna veidošanās mehānisma darbība tika aprakstīta arī ar skābo miglu apstrādātu egļu brūnajās skujās (Chen et al. 1990). ACKS sintēzes inhibitoru lietošanas rezultātā tika izdarīts secinājums par to, ka arī zaļās, stresam nepakļautās egļu skujās no ACKS neatkarīgais etilēna veidošanās ceļš darbojas paralēli parastajam etilēna biosintēzes ceļam (Chen & Wellburn 1991).

1.2.2. Etilēna veidošanās endogēnā un vides atkarīgā regulācija

Etilēna veidošanās intensitāte ir principiāli atkarīga no konkrētā objekta augšanas un attīstības stadijas. Attiecībā pret augšanas procesiem, visaktīvāk etilēnu izdala tieši meristemātiskas šūnas, kas izpaužas kā etilēna izdalīšanās intensitātes samazināšanās virzienā no apikālajiem uz diferencētiem audiem (*Satler & Kende 1985, Atwell et al. 1988, Taylor et al. 1988, Schierle et al. 1989*). Šāds gradients parādās arī attiecībā uz ACKS līmeni un EVF aktivitāti. Atklāta arī zināma pozitīva sakarība starp etilēna izdalīšanos un lapu vai starpposmu augšanas ātrumu (*Roberts & Osborne 1981, Boyer et al. 1983*). Audu kultūrā maksimālais etilēna izdalīšanās ātrums korelē ar svaigās masas uzkrāšanās maksimumu (*Huxter et al. 1979, Martins-Loucao & Rodriguez-Barrueco 1983*). Atsevišķi pētījumi ir parādījuši augstas etilēna izdalīšanās intensitātes saistību ar augstu endogēnā augsīna līmeni attiecīgajos audos (*Abeles & Rubinstein 1964, Chkanikov et al. 1985*). Tā kā tauriņziežu hipokotila āķa attīstība ir saistīta ar endogēnā augsīna koncentrāciju asimetriju, interesi izraisa dati par to, ka augsīna asimetriju pilnībā atspoguļo dažāda ACKS sintētāzes indukcija ar sekojošām etilēna veidošanās atšķirībām dažādās pusēs (*Schierle & Schwark 1988*).

Tomēr jāatzīmē, ka lielākajā daļā pētījumu sakarība starp etilēna izdalīšanās intensitāti un aktīvu šūnu augšanu parādās, ja etilēna izdalīšanos izsaka attiecībā pret svaigās masas vienību. Izsakot etilēna izdalīšanās intensitāti attiecībā pret audu sauso masu, var novērot apgrieztu korelāciju starp etilēna veidošanos un audu augšanas intensitāti (*Kevers et al. 1989*).

Etilēna veidošanās pastiprināšanās raksturīga lapām un ziediem novecošanas stadijā (*Aharoni et al. 1979, Cook & Van Staden 1988*), kā arī augļu nogatavošanās procesā (*Ku et al. 1970*). Tomēr novecošanās iniciācija ir saistīta drīzāk ar etilēna veidošanās samazināšanos līdztekus augsīna satura kritumam (*Roberts & Osborne 1981*). Tikai līdz ar pastiprinātu hlorofila noārdīšanos parādās etilēna izdalīšanās pieaugums (*Gepstein & Thimann 1981*). Pēdējā laika pētījumi ir pilnībā pierādījuši, ka endogēni veidojies etilēns ir galvenais iniciējošais faktors to augļu nogatavošanās procesam, kuriem raksturīga elpošanas pastiprināšanās un daudzkārtīgs sekundārs etilēna izdalīšanās pieaugums (*Yamamoto et al. 1995*).

Etilēnam ir izteikts atgriezeniskais efekts uz tā biosintēzi. Eksogēnais etilēns var gan palielināt (autostimulācija), gan samazināt (autoinhibēšana) etilēna veidošanos. Etilēna atgriezeniskā iedarbība uz biosintēzi notiek transkripcijas līmenī (*Woltering & de Vrije 1995*). Etilēna izdalīšanās pieaugums augļos ir tipisks pilnās autostimulācijas piemērs, kur etilēns izsauc gan ACKS sintētāzes, gan EVF aktivitātes pieaugumu (*Sawamura & Miyazaki 1989*). Daļēja autostimulācija ir novērojama pārsvarā veģetatīvajos audos, kur etilēna izdalīšanās pieaugums eksogēnā etilēna ietekmē ir

saistīts ar EVF aktivitātes pieaugumu (*Schierle et al.* 1989). Etilēna veidošanās autoinhibēšanu izraisa ACKS sintāzes līmeņa samazināšanās (*Liu et al.* 1985, *Philosoph-Hadas et al.* 1985, *Hyodo & Fujinami* 1989, *Nakajima et al.* 1990) vai EVF aktivitātes kritums (*Ketsa & Herner* 1989, *Sawamura & Miyazaki* 1989). Tomēr, šajos eksperimentos lietotās eksogēnā etilēna devas būtiski pārsniedz tās intensitātes, kādas ir novērojamas endogēnā etilēna izdalīšanās procesā, un ir jāattiecinā drīzāk uz stresa etilēna autoregulatīvo iedarbību. Ir jāatzīst, ka etilēna atgriezeniskās regulācijas nozīme normālos apstākļos nav noskaidrota.

Principiāli svarīga ir arī informācija par etilēna biosintēzes izmaiņām atkarībā no citu fitohormonu līmeņa augos. Parasti gan šādi eksperimenti tiek izdarīti, palielinot iekššūnas hormonu koncentrāciju, apstrādājot audus ar eksogēniem hormoniem. Visvairāk pētītā parādība šinī ziņā ir etilēna biosintēzes stimulācija ar augsni (indolil-3-etiķskābi). Tipiskā sliekšņa koncentrācija augsnes stimulējošajai darbībai ir 1 μM (*Abeles & Rubinstein* 1964). Nepieciešams indukcijas nosacījums etilēna izdalīšanās stimulēšanai ar augsni ir *lag* fāze, kas var būt no 30 minūtēm līdz 1 stundai, pie kam, garāka *lag* fāze novērojama augstāku augsnes koncentrāciju pielietošanas gadījumā (*Chadwick & Burg* 1967, *Arteca et al.* 1983). Tā kā papildus augsnes avota likvidēšana izraisa pakāpenisku etilēna izdalīšanās intensitātes atgriešanos kontroles līmeni (*Shingo & Imaseki* 1971), var domāt, ka etilēna izdalīšanās paaugstināšanās ir tieši saistīta ar augsnes līmeni audos. To apstiprina arī eksperimenti, kuros endogēnais augsnes līmenis tiek izmainīts citu savienojumu iedarbībā. Tā piemēram, augsnes līmeņa paaugstināšanās brasinosteroīdu ietekmē izsauc arī etilēna izdalīšanās pieaugumu (*Eun et al.* 1989). Augsnes inducētais etilēna veidošanās pieaugums ir atkarīgs no olbaltuma sintēzes *de novo* un notiek caur ACKS sintēzes indukciju (*Arteca et al.* 1988).

Mazāk informācijas atrodams par citu fitohormonu ietekmi uz etilēna biosintēzi. Salīdzinot ar augsnes efektu (vidēji 100-kārtīgs etilēna izdalīšanās pieaugums), abscizskābes, citokinīna un giberelīna efekts uz etilēna izdalīšanos ir relatīvi mazs (parasti 2 līdz 4 reizes), pie tam, iedarbības veids izteikti variē atkarībā no eksperimentos lietoto augu sugas un darbīgās vielas koncentrācijas (*Abeles et al.* 1992).

Virkne pētījumu parāda arī etilēna veidošanās intensitātes saistību ar neorganisko un organisko endogēno savienojumu satura izmaiņām (*Abeles et al.* 1992). Vispārīn, neliels barības vielu deficīts apspiež etilēna izdalīšanos, bet ievērojama deficīta gadījumā var novērot etilēna veidošanās pastiprināšanos, it īpaši, saistībā ar nekrožu attīstību. No organiskajām vielām visvairāk izpētīta ir dažādu cukuru stimulējošā iedarbība uz etilēna izdalīšanos.

Dažādu vides faktoru izmaiņas var izsaukt arī etilēna veidošanās intensitātes novirzes. Tā piemēram, etilēna izdalīšanās ir tieši atkarīga no pozitīvu, bojājumus neizsaucošu, temperatūru izmaiņas. Etilēna veidošanās optimālā temperatūra ir

apmēram 30°C (*Burg & Thimann 1959*), bet, paaugstinot temperatūru virs 40°C, etilēna izdalīšanās vispār pārtraucas. Gaismas iedarbība uz etilēna biosintēzi ir atkarīga no tā, kadas fizioloģiskās izmaiņas dotajam objektam tiek izsauktas gaismas faktora iedarbības rezultātā (*Abeles et al. 1992*). Slēgtās sistēmās ar atdalītiem fotosintētiski aktīviem augu audiem gaisma parasti inhibē etilēna izdalīšanos. Atsevišķos gadījumos ir pierādīts, ka šāds efekts ir saistīts ar CO₂ patēriņu šajās sistēmās fotosintēzes rezultātā (*Philosoph-Hadas et al. 1986*). Tomēr, caurplūdes sistēmu lietošana izdalītā etilēna analīzei no intaktiem augiem ir apstiprinājusi domu, ka gaismas faktoram ir stimulējoša iedarbība uz etilēnveidojošo sistēmu normālos apstākļos (*Weckx & Van Poucke 1989*).

Interesants ir arī jautājums par etilēna veidošanās intensitātes izmaiņām atkarībā no diennakts laika vai gadalaika. Ja pirmajā gadījumā šīs izmaiņas ir saistītas ar fotoperioda darbību, tad otrajā gadījumā tas var atspoguļot fizioloģiskā stāvokļa un metabolisma izmaiņas veģetācijas perioda laikā. Diennakts etilēna izdalīšanās ritmiskums novērots vairākām augu sugām, t.sk., aļģēm (*Vanden Driessche et al. 1988*), kokvilnas dīgstiem (*Rikin et al. 1984*), tomātu augļiem (*El-Beltagy et al. 1976*), rīsiem (*Michiyama & Saka 1988*) un priežu skujās (*Yang et al. 1993*). Lielākajā daļā gadījumu minimālam etilēna izdalīšanās līmenim tumsas perioda vidū seko maksimums dažas stundas pēc gaismas perioda sākuma. Atsevišķām sugām novērota etilēna ritmiskuma pārtraukšanās, pārvietojot augus tumsā, taču tā saglabājas nepārtrauktā gaismā (*Rikin et al. 1984*). Etilēna izdalīšanās ritmiskums parasti ir paralēls ACKS koncentrācijas izmaiņām, kas apstiprina, ka ACKS sintetāze ir galvenais etilēna veidošanos regulējošais posms arī diennakts etilēna ritmu izpausmē (*Rikin et al. 1984, Yang et al. 1994*).

Etilēna biosintēzes indukcija ir visplašāk izpētītā un vispārīgākā atbildes reakcija jebkāda veida stresa faktoru ietekmē (*Abeles et al. 1992*). To var izsaukt gan abiotiskas (ķīmikālijas, temperatūras ekstrēmi, sausums, hipoksija, gamma starojums, mehānisks ievainojums, noliekšana, augsnes pretestība u.c.), gan biotiskas (slimības, insektu ievainojumi) dabas faktori, tāpēc šis mehānisms plašāk pazīstams ar kopīgu apzīmējumu "stresa etilēns".

Etilēna fizioloģijas izpratnei visbūtiskākie stresa faktori ir mehāniskais ievainojums, ķīmiskais stress un infekcija. Mehāniskais stress jāmin pirmajā vietā, jo apmēram 95 % pētījumu par etilēna veidošanos ir saistīti ar audu atdalīšanas ievainojuma inducētās etilēna izdalīšanās likumsakarību izpēti. Līdz ar to, analizējot jebkādu faktoru ietekmi uz etilēna veidošanos, eksperimentētāji pēta pirmām kārtām doto faktoru ietekmi uz konkrēto audu spēju sintezēt ievainojuma inducēto etilēnu. Šāda pieeja novedusi pie pretrunīgu datu un interpretāciju eksistences, jo šādos apstākļos principiāla nozīme var būt inkubācijas apstākļiem. Paralēli pētījumi ar intaktiem augiem caurplūdes sistēmās un endogēnā etilēna satura analīze var ievērojami uzlabot situācijas izpratni. Ķīmiskā stresa iedarbības pētījumus aktualizē augsnes un gaisa piesārņojuma izraisītie augu bojājumi dabiskajos apstākļos un

aizsargmehānismu izpētes nepieciešamība. Līdzīgi tam, svarīgi ir izprast etilēna piedalīšanos aizsargreakcijās pret slimībām.

Veģetatīvo audu mehāniska ievainojuma gadījumā novērojamas būtiskas etilēna izdalīšanās parametru atšķirības atkarība no pētāmā objekta (skatīt apskatu *Abeles et al.* 1992). Pirmkārt, *lag* periods starp ievainojuma izdarīšanu un pirmo būtisko etilēna izdalīšanās pieaugumu var būt no 16 līdz 55 minūtēm. Otrkārt, atšķiras laiks pēc ievainošanas, kurā parādās etilēna izdalīšanās maksimums (39 līdz 133 minūtes). Treškārt, visizteiktākās atšķirības parādās relatīvajā etilēna izdalīšanās intensitātes pieauguma pakāpē ievainojuma rezultātā – tā var variēt no 1.4 reizēm etiolētu miežu koleoptilos līdz 24.8 reizēm etiolētas kukurūzas koleoptilos. Vispārīgi ņemot, viendīgļlapjiem raksturīgs relatīvi lielāks ievainojuma stresa inducētais etilēna pieaugums, nekā divdīgļlapjiem. Savukārt, etiolēti audi intensīvāk izdala etilēnu atbildē uz ievainojumu, neka tāda pat vecuma fotosintētiski aktīvi audi. Ceturtkārt, atšķirības parādās attiecībā pret to, vai lielāka audu ievainojuma pakāpe izsauc intensīvāku etilēna izdalīšanos uz audu masas vienību.

Atšķirībā no veģetatīvajiem audiem, augļu un dārzeņu sakņu ievainošanas gadījumā parādās tieša sakarība starp etilēna izdalīšanās intensitāti un ievainojuma virsmas lielumu (piemēram, *Imaseki et al.* 1968).

Vispārpieņemts ir uzskats, ka ķīmisko savienojumu spēja stimulēt etilēna veidošanos ir funkcija no to izraisītā audu ievainojuma pakāpes (*Abeles et al.* 1992). To varētu pilnībā attiecināt uz vispārējas darbības bioloģiski toksiskiem savienojumiem, piemēram, amonjaku, bisulfītu, metilbromīdu, sēra dioksīdu, slāpekļa oksīdiem, trihloretiķskābi u.c. Nevar noliegt arī, ka atsevišķi metālu joni varētu tiešā veidā ietekmēt etilēna biosintēzes fermentu aktivitāti un stabilitāti. Īpaša ir situācija attiecībā uz ozonu kā etilēna veidošanās induktoru. Lai arī virkne pētījumu rāda etilēna izdalīšanās pieaugumu ozona apstrādes rezultātā (*Tingey et al.* 1976, *Pell & Puente* 1986), ir izvirzīta hipotēze par to, ka ozona fitotoksiskums, kas izpaužas kā nekrotisku ievainojumu parādīšanās uz lapām, ir tieši saistīts ar ķīmisko reakciju starp ozonu un stresa etilēnu, kas ģenerē toksiskus brīvos radikālus (*Mehlhorn & Wellburn* 1987). Kā pierādījums tam kalpoja fakts, ka etilēna biosintēzes inhibitora AVG lietošana pirms apstrādes ar ozonu reducēja etilēna izdalīšanos par 85 % līdztekus ar redzamo bojājumu samazināšanos no 50 % uz 5 %. Tomēr vēlākie eksperimenti šo hipotēzi nav ne pilnībā apstiprinājuši, ne arī noraidījuši (*Zilinskas et al.* 1990, *Wenzel et al.* 1995).

Gan augļu, gan veģetatīvo audu gadījumā stresa etilēna veidošanās ir saistīta ar ACKS sintēzes un atsevišķos gadījumos, arī EVF, indukciju atbilstošo gēnu aktivācijas un olbaltumu sintēzes *de novo* limenī. Tātad, stresa etilēna biosintēze norisinās pa to pašu ceļu, kā augsna inducētā etilēna biosintēze. Tomēr, olbaltuma sintēzes un nukleīnskābju sintēzes inhibitoru lietošana nedod viennozīmīgu atbildi, kāda ir transkripcijas un translācijas loma stresa etilēna biosintēzes regulācijā. Tā piemēram,

gan RNS (aktinomicīns D), gan olbaltuma (cikloheksimīds) biosintēzes inhibitori var izsaukt stresa etilēna veidošanos (*Rasmussen & Jones 1971, Saltveit & Larson 1983, Mauch et al. 1984*). Pārsteidzošs ir ātrums, ar kādu notiek stresa etilēna biosintēzes indukcija olbaltuma sintēzes *de novo* līmenī. ACKS sintēzes indukcija sākas 8 līdz 10 minūtes pēc ievainojuma, ko pavada etilēna izdalīšanās pieaugums 15 līdz 20 minūtes pēc stimula (*Konze & Kwiatkowski 1981*). Tas liek domāt, ka etilēna biosintēzes indukcija ievainojuma rezultātā ir saistīta ar kāda ātrdarbīga ķīmiskā signāla atbrīvošanos, kurš ir šūnas struktūras sastāvdaļa normālā stāvoklī. Etiolētos zirņu dīgstos šis signāls pārvietojas ar ātrumu 2 mm stundā (*Saltveit & Dilley 1978*).

1.2.3. Etilēna fizioloģiskā iedarbība

Lai arī visplašāk pētītais etilēna fizioloģiskais efekts ir tā ietekme uz šūnu augšanu, etilēna iedarbība parādās praktiski visu augu fizioloģisko procesu norises gaitā. Tā piemēram, etilēns izsauc fotosintēzes izmaiņas, taču tās tiek saistītas ar etilēna netiešo iedarbību (*Abeles et al. 1992*). Tā kā etilēns izraisa audu novecošanās paātrināšanos, elpošanas fermentu pieaugums etilēna ietekmē, acīmredzot, ir saistīts tieši ar šo ietekmi. Parasti šāds efekts izpaužas kā alternatīvās, pret cianīda iedarbību nejutīgās elpošanas intensitātes pieaugums (*Gude & van der Plas 1985, Duncan & Spencer 1987*). Vēl viens netiešs etilēna efekts saistīts ar tā ietekmi uz asimilātu pārvietošanos (*Abeles et al. 1992*).

Visai pretrunīgi ir rezultāti par etilēna ietekmi uz citu hormonu līmeni audos un to metabolismu (*Abeles et al. 1992*). Visticamākie ir dati par etilēna inhibējošo ietekmi uz augsīna transportu (*Suttle 1988*). Tomēr, arī šajos gadījumos efekta pakāpe ir atkarīga no tā, vai etilēna ietekme pētīta eksperimentos ar veselīgiem augiem, vai arī ar augu daļām, jo etilēna izsauktā augsīna transporta inhibēšana parādās tikai veselu augu gadījumā (*Wood 1985*).

Etilēna inhibējošā ietekme uz veselu augu lineāro augšanu ir daļa no visagrāk aprakstītās etilēna darbības, un ir tipisks etilēna efekts. Stublāju lineārās augšanas inhibēšana ir ātra un atgriezeniska. Izolētu segmentu gadījumā inhibēšana iestājas 1 līdz 3 stundu laikā pēc gāzes pievienošanas (*Nee et al. 1978*), taču intaktu augu stiepšanās inhibēšana ir ātrāka – *lag* periods var būt tikai 6 līdz 10 minūtes (*Warner & Leopold 1971*). Pēc augu ievietošanas atpakaļ parastajā gaisa vidē normāla augšana atjaunojas 21 minūtes laikā. Līdzīgi ātra un atgriezeniska ir arī sakņu lineārās augšanas inhibēšana. Interesanti, ka piesaknes ir mazāk jutīgas pret etilēnu, kā galvenās saknes (*Abeles et al. 1992*).

Lai arī lineārās augšanas inhibēšana eksogēnā etilēna ietekmē ir plaši izpētīts fenomens, tās mehānismi nav skaidri saprotami. Zināms, ka stumbru vai sakņu augšanu regulē šūnu dalīšanās, šūnu stiepšanās, augsīna transporta un augsīna darbības saskaņota mijiedarbība. Etilēns var ietekmēt katru no šiem procesiem. Daudzi no eksperimentiem par etilēna ietekmi uz augšanu neizšķir iedarbību uz stiepšanos un šūnu dalīšanos. Šūnu dalīšanās inhibēšana ir tieši saistīta ar etilēna augšanu inhibējošo iedarbību veselos augos. Jāņem arī vērā, ka etilēna iedarbības pakāpe un virziens ir atkarīga no pētamo šūnu tipa attiecīgajos audos (*Mosejev et al.* 1990). Tomēr neatbildēts paliek jautājums par to, vai etilēns piedalās lineārās augšanas inhibēšanā arī normālos apstākļos *in vivo*. Par pierādītu var uzskatīt stresa faktoru izsauktās etilēna biosintēzes piedalīšanos augšanas inhibēšanā (*Goeshl et al.* 1966). Jādomā, ka eksogēnā etilēna darbības mehānismi tomēr nav identiski endogēnā etilēna darbības mehānismiem intaktos augos.

Pretstatā inhibējošajam efektam uz lineārās augšanas inhibēšanu, ūdensaugiem etilēns izsauc stiepšanās aktivēšanu (*Ridge* 1987). Šī parādība ir saistīta ar to, ka augiem, kuri aug zem ūdens, vai arī apstākļos, kad iespējama applūšana, tāds mehānisms, kas atļauj daļu auga eksponēt gaisā un labākos gaismas apstākļos, dod zināmas priekšrocības. Appludināšana izsauc etilēna veidošanās strauju pieaugumu, kurš, savukārt, izraisa auga ass orgānu strauju stiepšanos garumā. Lineārās augšanas pastiprināšanās etilēna ietekmē ir saistīta gan ar šūnu stiepšanās, gan dalīšanās pastiprināšanos (*Metraux & Kende* 1984).

T.s. "trīskāršās etilēna atbildes" divi pārējie komponenti bez stiepšanās augšanas inhibēšanas ir horizontālā augšana un audu "uzbriešana". Pēdējo minēto parādību izsauc šūnu izodiametriska paplašināšanās vertikāla virzienā. Ar etilēna darbību saistītā audu uzbriešana parasti ir raksturīga intaktiem aktīvi augošiem dīgstu audiem (*Eisinger et al.* 1983). Šāds mehānisms var atvieglot sēklu dīgšanu un dīgstu izaugšanu cauri augsnei. Etilēna darbība uzbriešanas inducēšanā ir kompleksa, jo parādība ir saistīta gan ar izmaiņām šūnapvalka sintēzē, gan osmotiskā potenciāla izmaiņu. Pēc apstrādes ar etilēnu, celulozes mikrofibrilu orientācija izmainās no vertikālas uz horizontālu 6 stundu laikā (*Ridge* 1973).

Etilēnam ir raksturīga spēja stimulēt sēklu dīgšanu, pārtraucot sēklu miera stadiju (*Abeles et al.* 1992). Tomēr šīs parādības mehānismi līdz galam nav izpētīti. Problēma ir saistīta ar apstākli, ka uzbriedušo sēklu dīgšana var aizkavēties vairāku iemeslu dēļ. Piemēram, etilēns nevar veicināt dīgšanu sēklām, kurām nepieciešama stratifikācija. citos gadījumos dīgšanu aizkavē sēklas apvalks, kas veido nepārvaramu šķērslī dīgļa augšanai. Šādā gadījumā etilēns var stimulēt dīgstu augšanu, lai tie iegūtu nepieciešamo spēku šķēršļa pārvarēšanai.

Rezultāti pētījumos ar eksogēno etilēnu un etilēna biosintēzes inhibitoriem augu šūnu un audu kultūrās liecina, ka etilēns piedalās morfoģenēzes regulācijā kultivēšanas procesa gaitā. Bez tam, tā kā *in vitro* kultūras bieži atrodas stresa apstākļos (audu

ievainošana to atdalīšanas rezultātā, nepareizu hormonu koncentrāciju un kombināciju lietošana, slāpekļa vielu pārdozēšana, paaugstināts mitrums, gāzu uzkrāšanās kultivēšanas vidē, osmotiskais šoks kultūras vides iefiltrēšanās rezultātā starpšūnu telpā), pastiprināta etilēna biosintēze stresa rezultātā var izraisīt nevēlamas atbildes reakcijas. Līdz ar to, etilēna veidošanās inhibitoru lietošana nevar dot pilnīgu ieskatu par etilēna piedalīšanos morfoģenēzes regulācijā normālos apstākļos. Problēmu īpaši sarežģī tas apstāklis, ka dažādas embriogēneses un morfoģenēzes stadijas ir ar dažādu jutību pret etilēnu (*Abeles et al.* 1992).

Interesanta ir etilēna spēja samazināt apikālo dominēšanu. Tā piemēram, etilēna biosintēzes indukcija dzinuma apgriešanas rezultātā izsauc apikālās dominēšanas zudumu (*Prasad & Cline* 1986). Līdzīgu iedarbību izsauc apstrāde ar eksogēno etilēnu vai etefonu (*Timm et al.* 1986).

No daudzajiem efektiem, kuri raksturīgi etilēna iedarbībai uz augu attīstību, būtu jāpiemin sakņu veidošanās iniciācija, spurgaliņu veidošanās indukcija, ziedēšanas sekmēšana, novecošanās paātrināšana, augļu nogatavošanās stimulēšana (*Abeles et al.* 1992).

Etilēna inducētā sakņu iniciācija parasti raksturīga augiem, kam ir tipiska adventīvo sakņu veidošanās. Plašos pētījumos par etilēna ietekmi uz sakņošanos, 15 no 27 augu sugām parādīja pozitīvu sakņošanās atbildi etilēna apstrādes rezultātā (*Abeles et al.* 1992). Apsakņošanās ir daudzpakāpju process, kas ietver saknes aizmetņa iniciāciju un aktivāciju, saknes parādīšanos un sekojošu stiepšanos. Aizmetņa iniciācijai ir nepieciešama mitogēnā iedarbība un meristemātisku audu veidošanās, ko stimulē etilēns. Etilēns inhibē sakņu stiepšanos, tāpēc arī etilēna pozitīvais efekts uz sakņošanos vislabāk parādās, ja īsai apstrādei ar etilēnu seko inkubācija vidē bez etilēna (*Robbins et al.* 1985). Līdzīga apsakņošanos veicinošajai funkcijai ir etilēna spēja izsaukt spurgaliņu veidošanos, kura ir novērojama arī reģionos, kur normālā situācijā spurgaliņas neveidojas, kā arī augiem, kuriem to veidošanās nav raksturīga (*Abeles et al.* 1992).

Novecošanās ir komplekss process, ko vada dažādi faktori. Lai arī etilēnu var uzskatīt par ļoti svarīgu signālu novecošanās iniciācijā, eksperimenti ar etilēnnejutīgo *Arabidopsis thaliana* mutantu ir parādījuši, ka šie augi noveco, tikai ievērojami lēnāk, nekā augi ar normālu jutību (*Bleecker et al.* 1988). Tātad, etilēns ir drīzāk potenciāli aktivējošs, nevis iniciējošs faktors novecošanas procesā. Lai arī dažādi etilēna biosintēzes inhibitori un anti-etilēna vielas var novērst vai palēnināt novecošanos, jaunākie dati liecina, ka ne visus novecošanai raksturīgos procesus regulē etilēns (*Philosoph-Hadas et al.* 1994). Īpašs novecošanās gadījums ir ziedu novecošanās. Daudzu sugu ziediem raksturīga t.s. apputeksnēšanas inducētā novecošanās. Tā piemēram, *Phalaenopsis* neapputeksnēti ziedi var saglabāties pat 3 mēnešus, kamēr pēc apputeksnēšanās pirmās novecošanās pazīmes parādās vienas dienas laikā (*Stead*

1992). Galvenais faktors, kurš izsauc pastiprinātu novecošanos pēc apputeksnēšanās, ir etilēna veidošanās pieaugums. Tomēr, sākotnējais regulatīvais solis šajā procesā ir apputeksnēšanās izraisīts jutīguma pieaugums pret etilēnu, kas, savukārt, izraisa etilēna biosintēzes autostimulāciju ar sekojošu novecošanos (*Porat et al.* 1995).

VĒL viens piemērs par saskaņotu etilēna jutīguma un etilēna stimulētu etilēna biosintēzes gēnu ekspresiju, kam ir kritiska nozīme fizioloģisko procesu regulācijā, saistās ar augļu nogatavošanos (*Abeles et al.* 1992).

1.2.4. Etilēna darbības mehānisms

Neskatoties uz etilēna biosintēzes ceļa un tā regulācijas aspektu samērā vispusīgu atklāšanu pēdējos desmit gados, ilgu laiku bija palicis neatrisināts pats galvenais etilēna fizioloģijas jautājums: kā augi atpazīst šo ķīmiski tik vienkāršo molekulu un kā notiek signāla pārnešana, kas izsauc kompleksas fizioloģiskās atbildes reakcijas. Eksistē vispārīgs pieņēmums, ka etilēna darbība sākas ar tā molekulas piesaistīšanos receptoram un ka etilēna signāla pārnešana izraisa gēnu ekspresijas izmaiņas. Agrākie dati par etilēna iespējamo darbības mehānismu iegūti, izmantojot savienojumus, kas inhibē etilēna darbību. Pie nekonkurējošiem toksikantiem, kuri inhibē metabolismu un arī etilēna darbību, var pieskaitīt CO₂, etilēna oksīdu u.c. savienojumus (*Abeles et al.* 1992). No konkurējošiem inhibitoriem jāmin sudraba joni (*Beyer* 1976) un 2,5-norbornadiēns un radniecīgie cikloolefīni (*Sisler & Wood* 1988). Ir skaidri pierādīts, ka gēnu ekspresija mainās etilēna ietekmē, un ir klonēti vairāki etilēna inducējami gēni (*Abeles et al.* 1992). Attiecībā par signāla pārnešanu, ir zināms, ka vismaz patoģenētiskajā reakcijā uz etilēnu piedalās olbaltumu fosforilācija un kalcijs (*Raz & Fluhr* 1993). Bez tam, etilēna receptori ir pētīti eksperimentos ar etilēna piesaistīšanos augu ekstraktos; taču atklātā piesaistīšanās nav bijusi asociēta ar fizioloģiskajām atbildes reakcijām (*Sisler & Wood* 1988).

Izņemot augstāk minētos piemērus, etilēna uztveršanas un pārneses mehānismi bija pilnīgi neskaidri līdz pat molekulārās bioloģijas metožu pielietošanai problēmas risināšanai dažu pēdējo gadu laikā. Iespēju ģenētiski sadalīt etilēna atbildes reakcijas ceļu ir devuši *Arabidopsis thaliana* mutanti, kas atšķiras pēc atbildes reakcijas uz etilēnu (*Kieber & Ecker* 1993). Mutantu izolēšanai pielietota vienkārša ar etilēnu apstrādātu etioloģisku dīgstu analīze uz "trīskāršo atbildi". Ar šo metodi ir atrasti vairāki mutanti, kuriem iztrūkst tipiskās atbildes reakcijas uz etilēnu. Bez tam, dīgstu analīze bez apstrādes ar etilēnu ir devusi iespēju atklāt mutantus, kuri konstitutīvi reaģē uz etilēnu vai arī pārproducē etilēnu. Gēni, kuri izraisa mutācijas diviem no izolētajiem

mutantiem, *etr1* un *ctr1* ir tikuši klonēti un raksturoti (Chang et al. 1993, Kieber et al. 1993). Šie atklājumi ir devuši iespēju izskaidrot atsevišķus molekulāros mehānismus etilēna signāla uztveršanā un pārnēsē.

Varētu domāt, ka ETR1 ir saistīts tieši ar etilēna recepcijas funkcijām, jo attiecīgajam mutantam pilnībā iztrūkst atbildes reakcijas uz vairākām zināmām etilēna izpausmēm, ieskaitot sēklu dīgšanu, etilēna biosintēzi, peroksidāzes aktivitāti un "trīskāršo atbildi" (Bleecker et al. 1988). Bez tam, etilēna piesaistīšanās intensitāte *in vitro* dotajam mutantam ir piecas reizes zemāka, nekā normālajai formai. Interesanti, ka šī mutācija ir dominanta attiecībā pret normālo tipu.

Iespējamais ETR olbaltums sastāv no divām sekvencēm, no kurām viēnai (320 aminoskābju atliekas) nav līdzības ne ar vienu no zināmajām olbaltumu secībām. Taču atlikusī daļa izrāda augstu līdzības pakāpi ar lielu grupu divkomponentu vides signāla pārnēsēju, kas zināmi dažādiem prokariotiem, piemēram, baktērijām (Chang et al. 1993). Šī līdzība ļauj domāt, ka ETR1 darbojas kā etilēna sensorais komponents. Tādējādi ETR1 substrāts varētu būt atbildi regulējošs olbaltums ar uztvērēja domēnu un raidītāja domēnu.

Mutācijas *Arabidopsis CTR1* lokusā izsauc nepārtrauktu etilēna atbildes reakciju, kas fizioloģiski izpaužas tā, itkā augi visu laiku atrastos etilēna iedarbībā (Kieber et al. 1993). Tas norāda, ka normālos augos CTR1 olbaltums negatīvi regulē etilēna atbildes reakciju. Šī mutācija ir recesīva. Iespējamā CTR1 olbaltuma sekvenca raksturo to kā tipisku proteīnkināzi. Pašreizējā brīdī ir grūti pateikt, kāda tipa saistība ir starp ETR1 un CTR1. Var pieņemt, ka eksistē tieša mijiedarbība starp šiem olbaltumiem. Jādomā arī, ka etilēna atbildes ceļš ietver sevī arī virkni citu papildus komponentu, kādi nav sastopami bakteriālajā divkomponentu sistēmā. Visticamāk, ka tieši olbaltumu fosforilācijas kaskāde piedalās etilēna signāla pārnēses ceļā (Ohme-Takagi & Shinshi 1995).

1.2.5. Etilēns kā potenciāls aizsargmehānismu regulators

Ņemot vērā etilēna biosintēzes indukciju kā vispārēju un nespēcificisku atbildi uz stresa faktoru iedarbību, varētu domāt, ka etilēnam ir noteikta regulatīva loma augu aizsargmehānismu aktivēšanā. Tomēr, līdztekus šādam uzskatam eksistē arī viedoklis, ka etilēns ir blakusprodukts reakcijās, kas saistītas ar metabolisma aktivāciju stresa ietekmē.

Viena no hipotēzēm saista etilēnu kā sekundāro signālmolekulu ar signālu pārnēses sistēmu augos. Termins "sekundārā signālmolekula" tiek lietots, lai apzīmētu

hipotētisku mehānismu augos, kurš pārnes ārēju stimulu no membrānas ārpusē šūnas iekšpusē un pārveido šo signālu tādā formā, ko var uztvert un pastiprināt citozola komponenti (*Blowers & Trewavas* 1989).

Pētījumos, pielietojot etilēna biosintēzes inhibitorus, ir parādīts, ka endogēni veidotais etilēns nepiedalās fenilalanīn-amonijsliāzes un fitoaleksīnu sintēzes indukcijā (*Paradies et al.* 1980). Tomēr, atsevišķas aizsargreakcijas var tikt inducētas gan ar infekciju, gan eksogēno etilēnu, piemēram, hitināzes un glukanāzes veidošanās (*Boller et al.* 1983, *Mauch et al.* 1984), kā arī ar hidroksiprolīnu bagātinātu glikoproteīnu uzkrāšanās (*Roby et al.* 1985). Tomēr, etilēna biosintēzes pilnīga inhibēšana tikai daļēji novērsa atbildes reakciju uz patogēniem, apliecinot, ka etilēns šajās sistēmās darbojas nevis kā sekundārais mesendžeris, bet gan kā modulātors noteiktu aizsargreakciju regulācijā. Pēdējā laika pētījumi ar transgēniem augiem ir apstiprinājuši, ka noteiktu ievainojuma atbildes gēnu indukcijai nav absolūtas etilēna nepieciešamības, bet etilēns ir nepieciešams augstam ekspresijas līmenim (*Weiss & Bevan* 1991).

Nevar izslēgt arī iespēju, ka konkrētās etilēna funkcijas mainās atkarībā no pētītā objekta. Tā piemēram, gēnu ekspresijas pētījumi burkānu saknēs liecina, ka eksogēnais etilēns būtiski palielina vairāku aizsargreakcijās iesaistītu fermentu mRNS saturu (*Ecker & Davis* 1987).

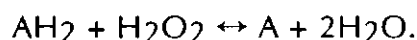
Daudzskaitlīgi pētījumi liecina par to, ka gan gāzveida etilēns, gan etilēnproducents etefons stimulē peroksidāzes aktivitāti dažādos augos. Šādas vispārīgas atbildes reakcijas pakāpe un raksturs parasti ir atkarīgs no koncentrācijas, kas lietota apstrādei, kā arī no tās ilguma un no pētījamā objekta audu fizioloģiskā stāvokļa un specifikas. Arī peroksidāzes aktivitātes noteikšanai izmantotā ūdeņraža donora raksturs var izmainīt atbildes reakciju. Šādu peroksidāzes aktivitātes pieaugumu parasti saista ar augšanas inhibēšanu (*Ridge & Osborn* 1970a, *Arora & Bajaj* 1981, *Prasad & Cline* 1987) vai šūnapvalka stingrības palielināšanos (*Ridge & Osborn* 1971, *Prasad & Cline* 1987), kā arī ar novecošanas stimulāciju etilēna ietekmē (*Gahagan et al.* 1968, *Abeles et al.* 1988). Attiecībā uz etilēna ietekmi uz ievainojuma inducēto peroksidāzes aktivitāti eksistē pretrunīga informācija. Ir parādīts gan aktivitātes pieaugums (*Gahagan et al.* 1968), gan arī peroksidāzes sistēmas nejutīgums pret etilēna iedarbību (*Adams & Galston* 1974). Līdztekus peroksidāzes aktivitātes pieaugumam etilēna ietekmē, novērojams arī specifisko peroksidāzes mRNS pieaugums (*Abeles et al.* 1988, *Ishige et al.* 1993, *Ito et al.* 1994). Ir aprakstīta arī specifiska askorbāta peroksidāzes aktivēšana ar etilēnu (*Mehlhorn* 1990), kā arī askorbāta peroksidāzes cDNS transkriptu līmeņa pieaugums etefona ietekmē (*Mittler & Zilinskas* 1992), kas tieši saistīts ar etilēna inducētajām pretstresa reakcijām.



1.3. Peroksidāžu bioķīmiskais un fizioloģiskais raksturojums

1.3.1. Molekulārā daudzveidība un bioķīmiskā polifunkcionalitāte

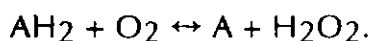
Ar terminu “peroksidāzes” mēdz apzīmēt veselu fermentu grupu, kuru primārā katalītiskā funkcija ir dažādu ūdeņraža donoru oksidēšana, kā akceptoru izmantojot H_2O_2 :



Peroksidāze ir plaši izplatīta augstāko augu, dzīvnieku un mikroorganismu grupās. Īpaši liela nozīme peroksidāzei ir augstāko augu fizioloģijā. Peroksidāze piedalās augšanas un diferenciācijas procesos, kā arī pretstresa aizsargreakcijās augos, katalizējot fizioloģiski aktīvu un bioloģiski svarīgu savienojumu sintēzi un katabolismu (Gaspar 1986). Salīdzinot ar citiem augu fermentiem, pārsteidzoša ir peroksidāžu molekulārā heterogenitāte, bioķīmiskais polifunkcionālisms un fizioloģisko procesu daudzveidība, kuru gaita notiek peroksidāzes formu indukcija vai apspiešana.

Kā olbaltumviela peroksidāze jāraksturo kā hēmu saturošs glikoproteīns, kā ferments peroksidāze pieder divkomponentu fermentiem un sastāv no apoproteīna un prostētiskās grupas. Peroksidāzes prostētiskā grupa – protohematīns IX – sastāv no protoporfirīna IX un Fe^{3+} . Tipiskajā gadījumā apofermenta primāro struktūru veido viena polipeptīdu ķēde (apm. 300 aminoskābju palieku), vairākas ogļhidrātu ķēdes (līdz 20 % no molekulas masas) un kalcija atomi. Peroksidāzes sekundāro struktūru raksturo augsts (apm. 45 %) α -spirāles saturs, bet terciāro struktūru veido hidrofobās saites starp hemīnu un olbaltumu. Peroksidāzes molekulai bez hēma nav fermentatīvās aktivitātes (Stephan & van Huystee 1980). Interesanti, ka ogļhidrātu ķēde, kas sastāv no oligosaharīdiem, neietekmē fermenta stabilitāti (Hu & van Huystee 1989). Domājams, ka kalcija funkcija ir nodrošināt molekulas terciāro struktūru (Ogawa et al. 1979).

Katalītisko reakciju norises gaitā peroksidāze var atrasties piecos dažādos oksidācijas stāvokļos, kas atšķiras ar hēma dzelzs jona oksidācijas pakāpi, un ir atkarīgi no fermenta molekulas mijiedarbības ar H_2O_2 , skābekļa formām un ūdeņraža donoriem (Dunford 1986). Ūdeņraža donoru oksidēšana notiek pēc vienelektrona mehānisma. Bez tipiskās reakcijas, kur par ūdeņraža akceptoru kalpo H_2O_2 , peroksidāze var katalizēt ūdeņraža donoru oksidāciju ar molekulāro skābekli:



Šajā gadījumā var runāt par peroksidāzes oksidāzes funkciju.

Sadalot dažādu augu audu fermentu ekstraktus ar elektroforēzes, hromatogrāfijas vai izoelektrofokusēšanas palīdzību, parādās liels daudzums peroksidāzes molekulāro formu, kuras pieder divām galvenajām grupām: skābās izoperoksidāzes, kas

elektroforēzes procesā virzās uz anodu, un sārmainās, kuras virzās uz katodu. Molekulāro formu daudzums variē atkarībā no pētījumu objekta, kā arī no fermentu ekstrakcijas un sadalīšanas tehnikas (*Gaspar et al.* 1982). Līdz ar to, pastāv iespēja, ka ne visas peroksidāzes molekulārās formas ir natīvas molekulas, bet gan ir saistītas ar natīvo fermenta formu modifikācijām, kas notiek ekstrakcijas, sadalīšanas un vizualizācijas laikā.

Ir pierādījumi tam, ka ekstrakcijas gaitā var notikt dažādu fenolu molekulu pievienošanās peroksidāzes molekulām ar ūdeņraža un kovalento saišu palīdzību. Tā, piemēram, augu ekstraktu apstrāde ar jonapmaiņas sveķiem *Dovex 1-XI*, kas atdala fenolu savienojumus, pārvērš piecas anodās izoperoksidāzes ar dažādu elektroforētisko kustīgumu par vienu fermenta formu (*Srivastava & van Huystee* 1977b). Līdzīgā veidā, ekstrakta hromatogrāfija ar *Sephadex G-25* samazina izoperoksidāžu joslu skaitu (*Ros Barcelo et al.* 1987). Cits izoperoksidāžu elektroforētiskā kustīguma atšķirības iemesls varētu būt ogļhidrātu ķēžu dažāda satāvs peroksidāzes molekulām, kuru olbaltuma daļas ir vienādas (*Gaudreault & Tyson* 1988). Šādas atšķirības izraisa pēctranslācijas modifikācijas.

Jāatzīmē arī, ka izoperoksidāžu nokrāsošanās gēlos ir atkarīga no substrāta koncentrācijas, vides pH un lietotā ūdeņraža donora, kas var izsaukt papildus noteikšanas kļūdas (*Gaspar et al.* 1982).

Neraugoties uz visām augstākminētajām peroksidāzes molekulāro formu analīzes problēmām, var secināt, ka izoperoksidāžu daudzveidība, kas parādās *in vitro*, atspoguļo būtiskas fermenta *in vivo* īpašības. Piemēram, ir aprakstīta atsevišķu izoperoksidāžu specifiska lokalizācija noteiktos augu orgānos (*Mills & Crowden* 1968), bet peroksidāžu spektrs mainās atkarībā no fizioloģisko procesu norises un ārējo faktoru ietekmē (*Gaspar et al.* 1982). Parādīta arī tādu peroksidāžu eksistence, kuras ir specifiskas noteiktām organoģenēzes stadijām (*Kay & Basile* 1987). Bez tam, eksistē arī zināmas atšķirības atsevišķu izoperoksidāžu katalītiskajās īpašībās – dažas no tām ir pilnībā neaktīvas apstākļos, kuri citām formām ir optimāli (*Evans* 1970).

Cita problēma, kas saistīta ar peroksidāzes molekulāro formu eksistenci, ir daļējs vai pilnīgs specifiskuma trūkums attiecībā uz ūdeņraža donoriem, kā arī iespēja, ka atsevišķas izoperoksidāzes var piedalīties neperoksidatīvā tipa reakcijās. Ir aprakstīts, piemēram, ka visām 7 izoperoksidāzēm no zemesrieksta šūnu kultūras vides piemīt peroksidāzes, IES oksidāzes un polifenoloksidāzes aktivitāte, bet atšķiras to specifiskā aktivitāte un daži katalītiskie parametri (*Srivastava & van Huystee* 1973). Līdzīga parādība novērota arī citu objektu gadījumā (*Shinshi & Noguchi* 1975, *Srivastava & van Huystee* 1977, *Jaeger-Wenderer* 1980, *Grison & Pilet* 1985). Tuvāki pētījumi parāda, ka šādiem izofermentiem IES oksidāzes un polifenoloksidāzes aktivitātei ir kopīgs aktīvais saits uz apofermenta (*Srivastava & van Huystee* 1973).

Frakcionējot audu ekstraktus vai arī izdarot citoķīmisko analīzi, peroksidāzes

aktivitāti var novērot praktiski visos augu šūnu kompartmentos: šūnapvalkā, plazmalemmā, citoplazmā, Goldži aparātā, vakuolās, tonoplastā, endoplazmatiskajā retikulumā, ribosomās un hloroplastos (*Gaspar et al.* 1982). Līdz ar to, rodas jautājums, vai ir iespējams, ka tik reaktīvs ferments, kāda ir peroksidāze, tik plaši sastopams visā šūnā, vai arī šī parādība ir saistīta ar artefaktu darbību?

Vienīgā peroksidāzes lokalizācijas vieta, kura neizsauc šaubas, ir šūnapvalks. Citoķīmiskie novērojumi un audu infiltrācija ar vakuumu apstiprina, ka šūnapvalks satur peroksidāzi, kura atbrīvojas starpšūnu telpā aktīvā formā (*Mäder et al.* 1986). Nav skaidrs, vai peroksidāzes saistās pie šūnapvalka tā sintēzes laikā, vai arī pēc tās (*Catesson et al.* 1986). Ir aprakstīta peroksidāzes lokalizācija izolētās vakuolās (*Boller & Kende* 1979, *Perrey et al.* 1989). Bez tam, pilnīgi iespējama peroksidāzes lokalizācija Goldži aparātā un endoplazmatiskajā retikulumā, kas principā saistīts ar fermenta sintēzi un transportu, tā kā peroksidāzes var uzskatīt par sekretoro olbaltumu (*Mäder* 1992). Tomēr, praktiski nav nekādas informācijas par peroksidāzes molekulu pārvietošanos un piesaistīšanos. Peroksidāzes lokalizāciju visos pārējos organoīdos var apšaubīt, jo ekstrakcijas laikā sakarā ar šūnas struktūras komponentu sagraušanu var notikt fermenta molekulu nespecifiska saistība ar dažādām šūnas struktūrām ar elektrisko lādiņu un citu saistošo spēku starpniecību (*Kiefer & Penel* 1985). Bez tam, citoķīmiskajās analizēs iespējamais kļūdu avots varētu būt dažādu fenolu dabas inhibitoru klātbūtne (*Gaspar et al.* 1986).

Peroksidāzes atšķiras pēc to saistības stingrības pakāpes ar šūnas struktūrām. Pētījumos peroksidāzes visbiežāk sadala sekojošās frakcijās: šķīstošā peroksidāze (ekstraģējas ar buferi, kuram ir zems jonu spēks), ar šūnas struktūrām jonu saistītā peroksidāze (ekstraģējas ar buferi, kura sāļu koncentrācija ir 1 M) un kovalenti saistītā peroksidāze (izdalās, apstrādājot audus ar fermentiem, kuri sadala šūnu sienas). Bieži tiek izmantota arī ekstracelulārā (izdala intaktu augu infiltrācijas un sekojošas centrifugēšanas gaitā) un membrānu saistītā peroksidāze. Daudzi pētījumi parāda, ka šādam peroksidāzes aktivitātes sadalījumam starp dažādām frakcijām ir zināma fizioloģiskā jēga, jo aktivitātes proporcionālais sadalījums mainās atkarībā no audu fizioloģiskā stāvokļa un vides faktoru iedarbības rezultātā (*Gaspar et al.* 1982). Tādējādi, peroksidāzes šķīstošo formu piesaistīšanās šūnas struktūrām ir ar noteiktu nozīmi fermenta aktivitātes un funkciju regulācijā. Virkne pētījumu, piemēram, parāda peroksidāzes saistīšanos ar membrānām, ko inducē Ca^{2+} un Mn^{2+} joni (*Rubery & Fosket* 1969, *Gaspar* 1982). Šāda saistīšanās raksturīga tikai sārmainajām izoperoksidāzēm. Saistības likņu raksturs parāda, ka eksistē tikai noteikts fermenta piesaistīšanās vietu daudzums un reakcija ir piesātināma (*Gaspar* 1982). Ir pierādījumi, ka šādai reakcijai nepieciešama peroksidāzes molekulas ogļhidrātu ķēžu klātbūtne (*Gaspar* 1982). Interesanti arī atzīmēt, ka peroksidāžu piesaistīšanās pakāpei pie membrānām ir diennakts ritma raksturs (*Kiefer et al.* 1987).

Līdzīgs piesaistīšanās mehānisms darbojas arī attiecībā uz šūnapvalku (Ros Barcelo et al. 1988). Šo procesu regulē H^+ un Ca^{2+} jonu koncentrācija šūnapvalkos. Ir izteikts pieņēmums, ka skābo izoperoksidāžu saistīšanās ar šūnapvalku pasargā fermentu no denaturācijas šūnu aktīvas augšanas laikā un rada peroksidāzes neaktīvo formu pulu (Ros Barcelo et al. 1989).

1.3.2. Peroksidāžu katalizētās reakcijas

Indolil-3-etiķskābes oksidēšana (IES oksidāzes funkcija)

Indolil-3-etiķskābes (IES) oksidāzes funkcija ir visvairāk pētītā peroksidāzes reakcija. Tas arī ir labi saprotams, jo cits IES katabolisma ferments augu šūnās līdz šim nav atrasts. Peroksidāzes katalizētajai IES oksidēšanas (dekarboksilēšanas) reakcijai nepieciešamie komponenti ir fenolu dabas kofaktors, Mn^{2+} un skābeklis. Reakcijā piedalās brīvie radikāļi ($IES\cdot$, $O_2\cdot^-$ un izdalās CO_2 . Indol-3-aldehīds un 3-metilēnoksidols ir galvenie produkti. Kofaktora funkcijas var izpildīt monofenoli (2,4-dihlorfenols, p-kumārskābe u.c.) un m-difenoli (Lee 1982). O- un p-difenoli darbojas kā IES oksidāzes inhibitori. Gadījumā, ja inhibēšana notiek ar o-difenolu starpniecību, IES oksidēšanas reakcijā novērojams tikai noteikts lag periods, jo šie fenoli sadalās dotajā sistēmā. IES oksidēšanas mehānisms nav līdz galam izpētīts un te eksistē daudz pretrunu. Galvenās problēmas saistītas ar jautājumiem par peroksidāzes aktivāciju, O_2 patērēšanu, iespējamo H_2O_2 piedalīšanos, Mn^{2+} un fenolu kofaktora nozīmi reakcijā. Tiek uzskatīts, ka IES oksidēšanās notiek peroksidāzes tiešā iedarbībā (Macnicol 1966), tomēr atsevišķi autori pieņem, ka peroksidāze piedalās tikai kofaktoru oksidēšanā, bet IES oksidēšana notiek reakcijā starp oksidēto kofaktoru un IES (BeMiller & Colilla 1972, Machackova et al. 1975).

Nav skaidrības arī jautājumā par IES aktivitātes molekulārās lokalizācijas vietu. Attiecībā par peroksidāzes un IES oksidāzes aktivitāšu strukturālo mijiedarbību eksistē trīs pretrunīgas hipotēzes: (1) peroksidāzes un IES oksidāzes aktivitāte ir saistīta ar divu atšķirīgu fermentu darbību, (2) peroksidāzes un IES oksidāzes funkcijas īsteno viena fermenta divas dažādas izoformas, (3) peroksidāzes un IES oksidāzes aktivitāte piemīt vienam fermentam. Par pirmās hipotēzes iespējamību liecina pH optimumu un termoinaktivācijas likņu atšķirība, aktivitātes saglabāšanās dažadais ilgums, ekstraktus glabājot, aktivitāšu atdalīšanas hromatogrāfiskajās frakcijās (Sequeira & Mineo 1966), kā arī dažādu savienojumu atšķirīgā ietekme (Pilet et al. 1970). Savukārt, trešo hipotēzi pamato dati par nespēju atdalīt peroksidāzes un IES oksidāzes aktivitātes



gēlfiltrācijas un jonapmaiņas hromatogrāfijas ceļā (Hoyle 1972, Srivastava & van Huystee 1973, Shinshi & Noguchi 1975), kā arī par elektroforētisko spektru identiskumu, kur izoperoksidāzēm ar augstu peroksidāzes aktivitāti piemita arī augsta IES oksidāzes aktivitāte (Hoyle 1977). Tomēr, visticamākā šķiet otrā hipotēze, kuru apstiprina dati par nepilnīgu aktivitāšu sakritību frakcionēšanas rezultātā un elektroforētisko spektru daļēju identitāti. Lielākajā daļā gadījumu frakcionēšanas rezultātā iespējams iegūt frakcijas ar peroksidāzes aktivitāti, kā arī frakcijas, kurām ir abi aktivitātes veidi, bet retos gadījumos – arī frakcijas ar vienīgi IES oksidāzes aktivitāti (Bryant & Lane 1979). Virkne pētījumu norāda uz IES oksidāzes saistību tieši ar sārmainajām izoperoksidāzēm (Klisurska & Dencheva 1983). Uzskata, ka izoperoksidāžu spēja oksidēt IES ir tieši atkarīga no to redokspotenciāla, tāpēc arī pašām sārmainākajām izoperoksidāzēm ir visaugstākā IES oksidāzes aktivitāte (Mazza et al. 1970).

Tomēr jautājums par IES oksidāzes darbību IES sadalīšanā *in vivo* paliek strīdīgs. Neraugoties uz datiem par to, ka vielas, kas izsauc IES oksidāzes inhibēšanu *in vitro*, stimulē augu augšanu, bet IES oksidāzes stimulatori inhibē augšanu (Gaspar et al. 1982), vairākos gadījumos šāda sakarība nav novērojama (Knypl 1973). Šādas pretrunas izsaukušas divu pretēju koncepciju izvirzīšanu attiecībā par to, vai IES oksidāzes sistēma ģenerē augšanas stimulatorus (Bhattacharya et al. 1976) vai augšanas inhibitorus (Hofinger et al. 1980). Bez tam, līdztekus peroksidāzes katalizētajai IES dekarboksilēšanas reakcijai, atklāts arī cits IES katabolisma ceļš, ar oksindol-3-etiķskābi kā galveno oksidācijas produktu (Reinecke & Bandurski 1988).

Lai arī fakts par to, ka peroksidāze var katalizēt IES *in vitro* neizraisa šaubas, jautājums par to, vai peroksidāze piedalās *in vivo* IES dekarboksilācijā, paliek atklāts. Viens no iespējamiem pierādījumiem varētu būt atbilstošo IES peroksidatīvo katabolītu atklāšana intaktos augos.

Oksikanēļskābes spirtu polimerizācija (lignīnopolimerāzes funkcija)

Uz histoloģiskā pētījumu pamata tika izteikts pieņēmums, ka peroksidāze piedalās lignifikācijā *in vivo* (Freudenberg et al. 1952). Šūnapvalka peroksidāzes iespējamo darbību hidroksilēto kanēļspirtu polimerizācijā netieši apstiprina eugenola, ferulskābes un kanēļspirtu oksidatīvā polimerizācija par lignīnam līdzīgiem savienojumiem peroksidāzes darbības rezultātā (Stafford 1960, Bowling & Crowden 1973, Harkin & Obst 1973, Tanahashi & Higuchi 1981). Uzskata, ka izoperoksidāzes, kas piedalās lignīna monomēru polimerizācijā, ir lokalizētas tieši lignificējošos audos. Šāda specifiska lokalizācija ir parādīta eksperimentos ar siringaldazīnu – substrātu, kurš tika lietots histoloģiskajos testos (Harkin & Obst 1973). Tā piemēram, mehāniski ievainotos tomātu augļos bojājuma zonā atrasta tikai viena izoperoksidāze ar augstu

specifiskumu attiecībā pret siringaldazīnu kā ūdeņraža donoru (*Fleuriet & Deloire* 1982). Atklāts arī, ka siringaldazīna oksidāze, kurai aktivitāte ar siringaldazīnu ir relatīvi simts reizes augstāka nekā ar gvajakolu, lokalizēta tikai papeles dzinuma lignificējošu šūnu sienās (*Goldberg et al.* 1983). Līdzīga substrāttieksme atklāta arī siringaldazīna oksidāzes aktivitātei no tabakas šūnapvalka (*Goldberg et al.* 1985). Ir arī pretēji piemēri, kā nelignificējoši kukurūzas sakņu audi, kuros siringaldazīna oksidāzes aktivitāte ir ievērojami augstāka, nekā lignificējošos audos (*Grison & Pilet* 1985). Var secināt, ka siringaldazīns ir specifisks lignīna monomērus polimerizējošās peroksidāzes substrāts tikai atsevišķām augu sugām, ko, acīmredzot, nosaka peroksidāzes starpsugu heterogenitāte, vai arī atšķirības dabisko lignīnperoksidāzes substrātu proporcionālajā pieejamībā augu sugām ar dažādu atsevišķo fenola monomēru saturu natīvajā lignīnā.

Daudzi pētījumi veltīti specifisku peroksidāžu atklāšanai, kuras piedalās lignifikācijā. Ir aprakstīta zināma korelācija starp specifisku audu lignifikāciju un anodās šūnu sienas peroksidāzes pieaugumu (*Goldberg et al.* 1983, *De Jaegher et al.* 1985, *Imberty et al.* 1985). Ņemot vērā labi zināmo šūnapvalka anodo peroksidāžu spēju oksidēt koniferilalkoholu *in vitro*, ir loģiski pieņemt, ka šīs peroksidāzes piedalās fenoksi-radikālu veidošanā *in situ*. Tomēr, atsevišķi darbi ir parādījuši, ka lignifikācijas pieaugums sakrīt ar jaunu katodās peroksidāzes izoformu parādīšanos (*Masuda et al.* 1983). Varētu domāt, ka šīs katodās šūnu sienas peroksidāzes pieadalās H₂O₂ veidošanā, kas nepieciešams fenoksi-radikālu polimerizācijai.

1-Aminociklopropān-1-karbonskābes oksidēšana (ACKS oksidāzes funkcija)

Ilgu laiku tika uzskatīts, ka peroksidāze piedalās etilēna biosintēzē. Vēl pirms ACKS kā etilēna priekšteča atklāšanas tika parādīta etilēna veidošanās no metionāla un α -keto- γ -metilbutirāta peroksidāzes ietekmē (*Ku et al.* 1967, *Yang* 1969). ACKS lomas atklāšana parādīja, ka šādām sistēmām nav fizioloģiskas nozīmes.

Pētījumi ar attīrītu peroksidāzi no kviešu un zirņu dīgstiem parādīja, ka ferments nevar oksidēt ACKS par etilēnu pat dažādu kofaktoru klātbūtnē (*Machačkova & Zmrhal* 1981, *Rohwer & Mäder* 1981). Tas dod iespēju secināt, ka peroksidāze tieši nepiedalās etilēna veidošanā. Tomēr, attīrīta IES oksidāze no olīvkoka lapām (*Vioque et al.* 1981, *Vioque & Vioque* 1985) un mandarīnu mizas (*Shimokawa* 1983) var oksidēt ACKS Mn²⁺, IES, 2.4-dihlorfenola un piridoksāl-5'-fosfāta klātbūtnē. Bez tam, ACKS pārvēršanās par etilēnu notiek attīrītas katodās peroksidāzes un Mn²⁺ klātbūtnē no *Bryonia dioica*, kura piesaistīta membrānām (*De Jaegher & Boyer* 1986). Savukārt, mārrotku peroksidāze oksidē ACKS par etilēnu Mn un IES klātbūtnē, ko iespējams aizvietot ar indol-3-metanolu vai p-hidroksiacetofenonu (*Osswald et al.* 1989). Visos minētajos gadījumos etilēna veidošanos no ACKS inhibē brīvo radikālu pārtvērēji.

Tātad, lai arī etilēna veidošanās no ACKS peroksidāzes klātbūtnē *in vitro* nekādas

šaubas nerada, nav nekādu datu, kas liecinātu, ka peroksidāze funkcionē kā etilēnu veidojošais ferments *in vivo* apstākļos.

Askorbīnskābes oksidēšana (askorbātperoksidāzes funkcija)

Tiek uzskatīts, ka askorbāta peroksidāze izpilda tādu pašu funkciju aizsargreakcijās pret aktīvā skābekļa formām augu šūnās, kā glutationperoksidāze dzīvnieku šūnās (Dalton et al. 1987, Tomasi et al. 1987). Tā kā askorbāta peroksidāze pēc tās īpašībām ir atsevišķs, no tradicionālajām peroksidāzēm (gvajakola peroksidāzes) atšķirīgs ferments, tās īpašības un fizioloģija apskatīta atsevišķā nodaļā (1.3.4.).

Krusteniskās saistīšanās reakcija (ekstensīnpolimerāzes un suberīnpolimerāzes funkcija)

Augstāko augu primārais šūnapvalks satur sārmainu glikoproteīnu – ekstensīnu, kurš izceļas ar īpaši augstu hidroksiprolīna un tirozīna saturu un sekretējas caur plazmalemmu šķīstošā formā un joniski saistās ar šūnapvalka skābajiem polisaharīdiem (Lamport & Epstein 1983). Šūnu stiepšanās pārtraukšanās laikā notiek ekstensīna ciešāka sasaistīšanās ar šūnu sienu ekstensīna molekulas tirozīna paliekām oksidatīvi veidojot krusteniski saistītu dimēru, izoditirozīnu (Fry 1982a). Jau agrāk bija aprakstīta tirozīna oksidācija ar peroksidāzes starpniecību (Gross & Sizer 1959), kā arī apgriezta sakarība starp šūnu stiepšanās intensitāti un peroksidāzes aktivitātes līmeni (Fry 1982b). Bez tam, histoķīmiskie pētījumi devuši iespēju parādīt, ka peroksidāzēm šūnapvalkā var būt papildus funkcija bez lignifikācijas (De Jong 1966). Varētu domāt, ka ekstensīna molekulu polimerizāciju katalizē tieši starpšūnu telpas peroksidāze (Fry 1982a).

Specifiskas ekstensīnperoksidāzes eksistenci apstiprina sekojoši fakti: (1) ferments no lēni augošas tomāta šūnu kultūras H_2O_2 klātbūtnē krusteniski saista ekstensīna monomērus, kas izolēti no ātri augošas kultūras; (2) šis ferments nekatalizē citu olbaltumu krustenisko saistīšanos; (3) mārrutka peroksidāzes izofermentu maisījums nekatalizē ekstensīna saistīšanos (Everdeen et al. 1988).

Domājams, ka krusteniskās saistīšanās procesā piedalās sistēma peroksidāze-askorbāta oksidāze, jo askorbāts ir pats efektīvākais šādas reakcijas inhibitors, bet šūnapvalks satur askorbātoksidāzi ar nenoskaidrotu funkciju (Cooper & Varner 1983).

Cits šūnapvalka krusteniski saistītais polimērs ir suberīns, kurš uzkrājas sakņu peridermā. Pamatojoties uz rezultātiem par augstu korelācijas pakāpi starp peroksidāzes aktivitāti un suberīna veidošanos kartupeļu bumbuļos bija izdarīts secinājums par iespējamo peroksidāzes piedalīšanos suberinizācijas procesā (Borchert 1978). Pētījumi parādīja, ka specifiska anodā izoperoksidāze parādās suberinizējošos audos

ievainošanas un abscizskābes iedarbības rezultātā (*Cottle & Kolattukudy* 1982). Pie tam, izoperoksidāze, ko inducē abscizskābe, nav identiska ar to, kuru inducē ievainojums (*Espelie & Kolattukudy* 1985). Korelācija starp suberinizāciju un specifisku izoperoksidāzi atrasta arī pupiņu saknēs (*Sijmons et al.* 1985) un priežu sējeņos (*Johnson-Flanagan & Owens* 1985). Pēdējā gadījumā atrasta arī sakarība starp suberinperoksidāzes aktivitātes pieaugumu un alternatīvo elpošanu. Specifiskas anodās peroksidāzes piedalīšanos suberīna aromātiskās polimērās daļas sintēzē apstiprina arī imunohistoķīmiskās analīzes rezultāti (*Espelie et al.* 1986). Pupiņu saknēs starpšūnu telpā lokalizēta suberinperoksidāze ir joniski saistīta ar šūnapvalku, un nav atrodama stublājā vai dīgstu lapās (*Sijmons* 1986). Tomēr, šādas reakcijas darbības mehānisms *in vivo* nav noskaidrots.

Jāatzīmē arī, ka peroksidāze var piedalīties krusteniskās saistības katalizēšanā starp lignīnu un olbaltumiem (*Whitmore* 1978), kā arī starp šūnapvalka polimēriem, veidojot diferulskābes saites (*Whitmore* 1976). Diferulskābe ir atrasta vairāku divdīgļlapju šūnapvalkā, un praktiski visu graudzāļu šūnapvalkā (*McDougall* 1992). Ir pierādījumi, ka diferulāts šūnapvalkā darbojas kā krusteniski saistošais aģents. Pierādījumi par peroksidāžu piedalīšanos diferulāta krustsaistīšanā balstās uz novērojumu par to, ka ferulskābi saturošu polisaharīdu apstrāde ar peroksidāzi un H_2O_2 izsauc to želejveidīgas struktūras veidošanos ar vienlaicīgu diferulāta parādīšanos (*Geissman & Neukom* 1973).

Citas iespējamās reakcijas

Attīrīta peroksidāze var katalizēt NADH un NADPH oksidēšanu fenolu kofaktora un Mn jonu klātbūtnē (*Halliwell* 1978, *Mäder & Amberg-Fisher* 1982). Šādas reakcijas nozīmi šūnapvalka peroksidāzēm varētu izskaidrot ar H_2O_2 molekulu piegādāšanu lignifikācijas procesam. Tomēr, šāda tipa reakciju darbība *in vivo* nav pierādīta.

Mārrutku peroksidāze var katalizēt arī hlorofila oksidēšanos H_2O_2 un 2,4-dihlorfenola klātbūtnē, kas izpaužas kā substrāta atkrāsošanās (*Matile* 1980). Tamlīdzīga reakcija dažādu fenolu klātbūtnē raksturīga arī peroksidāzei no apelsīna mizas (*Huff* 1982), tabakas lapām (*Kato & Shimizu* 1985), pētersīļa lapām (*Yamauchi & Minamide* 1985). Atsevišķi autori uzskata, ka šāda sistēma varētu piedalīties hlorofila degradācijā *in vivo* novecojošās lapās (*Kato & Shimizu* 1985).

1.3.3. Peroksidāžu izmaiņas attīstības un adaptācijas procesu gaitā

Šūnu augšana un diferenciācija

Salīdzinot lineārās augšanas ātrumu un peroksidāzes aktivitāti var secināt, ka principā starp šiem rādītājiem pastāv apgriezta sakarība – ātri augošiem orgāniem ir raksturīga zema peroksidāzes aktivitāte, kas palielinās līdz ar augšanas ātruma samazināšanos (*Chappet & Dubouchet 1972, Miidla et al. 1987*). Augšanas bremsēšana ar dažādu faktoru palīdzību (retardantu pielietošana, mehāniska ievainošana u.c.) arī izsauc fermenta aktivitātes pieaugumu (*De Jagher et al. 1985*), bet augšanas intensifikācija saistīta ar peroksidāzes aktivitātes samazināšanos (*Gardiner & Cleland 1974*). Tāpēc ir pieņemts uzskatīt, ka aktīvi augošās šūnās peroksidāzes aktivitāte ir zemā līmenī, palielinoties līdz ar augšanas apstāšanos un audu nobriešanu. Tomēr, salīdzinot peroksidāzes aktivitātes gradientus augošos veģetatīvajos orgānos, kuriem ir raksturīgs noteikts šūnu attīstības gradients, var izdalīt vairākus raksturīgus peroksidāzes aktivitātes sadalījuma tipus.

1. Zema aktivitāte stiepšanas zonā, kas palielinās līdz ar lineārās augšanas pārtraukšanos un audu nobriešanu. Šāds sadalījums raksturīgs peroksidāzei, kas ar jonu saitēm saistīta ar šūnapvalku (*Ridge & Osborne 1970, Penel et al. 1979, Goldberg et al. 1986, Goldberg et al. 1989*), bet atsevišķos gadījumos arī šķīstošajai (citoplazmatiskajai) peroksidāzei (*Parish 1969, Desbiez et al. 1981, Thaker et al. 1986*).

2. Augsta aktivitāte dalīšanās zonā, kura samazinās stiepšanās zonā un saglabājas zema līdz ar šūnu nobriešanu. Šāds sadalījums raksturīgs šķīstošajai peroksidāzei (*Goldberg et al. 1986, Goldberg et al. 1989*), bet atsevišķos gadījumos arī jonu saistītajai peroksidāzes aktivitātei (*Chanda et al. 1986*).

3. Augsta aktivitāte dalīšanās zonā, kura samazinās stiepšanās zonā ar sekojošu pieaugumu ar audu nobriešanu. Šāda sakarība atrasta gan šķīstošajai (*Ridge & Osborne 1970*), gan šūnapvalka peroksidāzei (*MacAdam & Nelson 1989*).

Šādu pretrunu rašanos var izskaidrot: (1) augu objekta un pētāmā orgāna (hipokotils, koleoptils, lapa) īpatnības; (2) atšķirības, kas rodas, izsakot fermenta aktivitāti uz dzīvo masu, sauso masu, olbaltuma vienību; (3) aktivitātes noteikšanai lietotais ūdeņraža donors.

Atsevišķu peroksidāzes izoformu aktivitātei arī raksturīga noteiktu gradientu eksistence atkarībā no augšanas procesiem. Tā piemēram, kviešu koleoptilēs atrastas izoperoksidāzes, kas pieder pie trīs atšķirīgām grupām (*Chappet & Dubouchet 1975*). Pirmās grupas izoperoksidāžu aktivitāte ir apgriezti proporcionāla augšanas ātrumam, otrās grupas izoformām maksimālā aktivitāte sakrīt ar maksimālo stiepšanos, bet trešās grupas izoformām aktivitāte sāk pieaugt tikai līdz ar augšanas ātruma samazināšanos

un sasniedz maksimumu tikai pēc pilnīgas lineārās augšanas apstāšanās.

Kukurūzas ziedu driksnā atrastas izoperoksidāzes, kuras var kalpot par šūnu stiepšanās fāzes marķieriem (*Cheignon & Schaefferbeke* 1970). Tā piemēram, anodā izoperoksidāze 6 izzūd šūnu stiepšanās laikā, bet izoperoksidāzes 7 aktivitāte sāk palielināties tieši stiepšanās laikā. Sorgo stublāja posmos izoperoksidāzes C3 daudzums pieaug virzienā uz posma pamatni (*Stafford & Bravinder-Bree* 1972). Šī izoperoksidāze nav atrodamā meristēmā, bet izoformas A1 un A3 dominē tieši meristēmas zonā.

Virkne darbu saistīti ar peroksidāzes lomas izpēti pundurformu fizioloģijā. Lielākajā daļā gadījumu pundurainība ir saistīta ar peroksidāzes pieaugumu šūnapvalka frakcijā (*Jupe & Scott* 1989, *Evans* 1990). Pundurformu normālu augšanu var atjaunot, eksogēni pielietojot giberelīnu, un tas ir saistīts ar vienlaicīgu peroksidāzes sekrēcijas inhibēšanu (*Fry* 1980). Līdzīgi rezultāti ir iegūti, lietojot IES. Tā, IES augšanu stimulējošā iedarbība ir saistīta ar ātru šķīstošās starpšūnu telpas peroksidāzes aktivitātes samazināšanos (*Ros Barcelo et al.* 1989).

Visi augstākminētie dati par peroksidāžu iespējamo saistību ar augšanas procesiem ir iegūti eksperimentos ar veselīgiem augiem. Nav šaubu, ka rezultātus, kas iegūti vesela auga līmenī, ir visai sarežģīti interpretēt. Tāpēc var saprast cenšanos izdalīt šūnu augšanas, citodiferenciācijas un morfoģenēzes elementāros etapus ārpus tām korelācijām, kas nodrošina auga organisma veselumu. Tāda pieeja, protams, palīdz izskaidrot iegūtos rezultātus, taču rodas iespēja, ka līdz ar organisma veseluma sagraušanu augšanas un diferenciācijas procesu norise var atšķirties no tās, kas norit intaktā augā.

Šinī sakarībā ir būtiski analizēt galvenās peroksidāzes sistēmas aktivitātes izmaiņu likumsakarības augu šūnu un audu kultivēšanas laikā un inducējot diferenciāciju. Pirmām kartām ir jāatzīmē, ka ieviešot audus kultūrā to peroksidāzes aktivitāte palielinās salīdzinot ar izejas aktivitāti (*Gaspar et al.* 1982). Šūnu suspensiju kultūrās maksimālās dalīšanās fāzē peroksidāzes aktivitāte ir zemā līmenī, taču pārejot uz šūnu stiepšanos, tā paaugstinās (*Arnison & Boll* 1976, *Bredemeijer et al.* 1985). Šūnu kultūru raksturīga īpatnība ir ievērojama peroksidāzes daudzumu izdalīšanās kultivēšanas vidē, pie kam peroksidāzes specifiskā aktivitāte vidē ir augstāka, nekā šūnās (*Bredemeijer et al.* 1985).

Visumā peroksidāzes aktivitāte palielinās paralēli kultūras dzīvās masas pieaugumam (*Kossatz & van Huystee* 1976, *Bredemeijer et al.* 1985). Citrona augļu eksplantu kultūrā peroksidāzes aktivitāte korelē ar masas pieaugumu, bet visas vielas, kas stimulē augšanu, izsauc arī peroksidāzes aktivitātes pieaugumu (*Altman et al.* 1982). Interesanti arī atzīmēt, ka līdz ar laiku mainās arī fermenta lokalizācija: jaunās šūnās maksimālā aktivitāte lokalizēta citoplazmā, bet līdz ar vecuma palielināšanos – šūnapvalkā (*Arnison & Boll* 1976), kas var liecināt par peroksidāzes funkciju izmaiņu.

Parasti par citodiferenciācijas kritēriju tiek izmantota vadaudu elementu

veidošanās. Eksistē virkne darbu, kuros pētīta lignifikācijas un dažādu peroksidāzes formu dinamika, inducējot vadaudu elementu veidošanos. Cīnijas lapas mezofila šūnu suspensijas kultūrā jonu un kovalenti saistītās peroksidāzes aktivitāte korelēja ar vadaudu elementu diferenciaciju un lignīna veidošanos, bet šķīstošās un starpšūnu telpas peroksidāzes aktivitāte palielinājās neatkarīgi no indukcijas (*Masuda et al.* 1983). Jonu saistītās peroksidāzes aktivitātes pieaugums šajā gadījumā sakrita ar visaktīvāko lignīna sintēzes periodu.

Sakarība starp saistīto peroksidāzi un ksilēmas diferenciaciju un lignifikāciju parādīta arī salātu serdes eksplantu kultūrā (*Miller et al.* 1985). Uz šāda veida eksperimentu pamata izdarīts secinājums par to, ka šūnapvalka saistītā peroksidāze var kalpot par citodiferenciacijas marķieri (*Fukuda & Komamine* 1982, *Miller et al.* 1985). Tomēr literatūrā ir norādījumi, ka šūnas no suspensijas kultūrām neatbilst tām šūnām, kādas ir veselā auga organismā ne strukturāli, ne bioķīmiski (*Street* 1977), un ka ne suspensiju, ne kallusu kultūras nevar droši izmantot par citodiferenciacijas modeļiem to heterogenitātes dēļ. Tā, piemēram, ieviešot tējas auga audus kallusa kultūrā, mainās ne vien atsevišķu peroksidāzes formu aktivitāte un lokalizācija, bet visa lignifikācijas aina kopumā (*Zaprometov et al.* 1982).

Organoģenēze

Peroksidāzes lomas pētīšana organoģenēzes procesos saistīta ar tādu pašu grūtību pārvarēšanu, kā aprakstīts iepriekšējā apakšnodalā. Vispārīgi ņemot, var secināt, ka kopējā peroksidāzes aktivitāte mainās inducējot organoģenēzi, kā arī izejot dažādus tās etapus. Piemēram, veģetatīvo pumpuru veidošanās un kallusa iniciācija tabakas eksplantu kultūrā ir saistīta ar peroksidāzes aktivitātes pieaugumu, bet ziedpumpuru veidošanās sakrīt ar zemu fermenta aktivitāti (*Thorpe et al.* 1978). Virknē darbu par peroksidāzes aktivitātes izmaiņām saistībā ar apsākņošanos ir parādīts, ka indukcijas perioda laikā notiek sārmaino peroksidāžu aktivitātes pieaugums, kam seko aktivitātes samazināšanās iniciācijas perioda laikā, turpretim skābo peroksidāžu aktivitāte pakāpeniski palielinās abu fāžu laikā (*Gaspar et al.* 1982). Ir parādīts arī, ka savienojumi, kuri izsauc sakņu veidošanās pastiprināšanos (piemēram, paklobutrazols), vienlaicīgi stimulē peroksidāzes aktivitāti (*Upadhyaya et al.* 1986), bet atsevišķos gadījumos var novērot tiešu korelāciju starp peroksidāzes aktivitāti un sakņošanās spēju dotajam augam (*Hirsch & Fortune* 1986). Ziedēšana saistīta ar pretēji vērstām kopējās un sārmaino peroksidāžu aktivitātes izmaiņām indukcijas un iniciācijas fāzēs (*Thorpe et al.* 1978, *Gaspar et al.* 1985). Līdzīga sakarība starp peroksidāzes aktivitāti un ziedēšanu novērojama arī veselos augos (*Sergeeva et al.* 1984).

Lai izprastu peroksidāzes funkcijas organoģenēzē nepieciešams ņemt vērā arī peroksidāzes molekulāro formu eksistenci. Jau agrāk tika pieņemts, ka dažādas

izoperoksidāzes var piedalīties atsevišķos organoģenēzes etapos (*Kahlem 1976, Fukuda & Komamine 1982*), tomēr mēģinājumi izdalīt atsevišķas peroksidāzes izoformas, kas piedalītos specifiskos organoģenēzes procesos nedeva pozitīvus rezultātus (*Thorpe et al. 1978, Gaspar et al. 1988*). Tikai pēdējā laikā ir parādījušies dati par to, ka specifiskas peroksidāzes izoformas tabakas eksplantu kultūrā korelē ar tādiem procesiem kā šūnu dalīšanās iniciācija, vadaudu elementu nobriešana, lapu attīstība u.c. (*Kay & Basile 1987*).

Novecošanās un atbilde uz stresa iedarbību

Augu novecošanos raksturo tādas metaboliskās izmaiņas, kas var izsaukt visa auga vai tā atsevišķu daļu bojāeju. Raksturīgākās pazīmes ir brīvo radikāļu veidošanās pastiprināšanās, membrānu lipīdu peroksidācija, olbaltumu un DNS noārdīšanās, hlorofila sadalīšanās (*Belver et al. 1988*). Novecošanos regulē un inducē gan endogēnie faktori, gan ārējās vides iedarbība: temperatūra, gaisma, ievainojums, sasaldēšana, UV radiācija, herbicīdi, patogēni. Peroksidāzes aktivitātes pieaugums novērojams kā ievainojuma un patogēnu iedarbības gadījumā, tā arī normāla novecošanās procesa gaitā (*Lagrimini & Rothstein 1987, Edreva et al. 1989*). Novecošanās procesam raksturīgs endogēnā ūdeņraža peroksīda satura pieaugums audos (*Gidrol 1989*). Tā kā katalāzes aktivitāte ar vecumu samazinās (*Dhindsa et al. 1981*), galvenā nozīme H₂O₂ sadalīšanā novecošanās laikā ir peroksidāzei.

Gaisa piesārņojums ir viens no izplatītākajiem stresa faktoriem, kas ietekmē augu augšanu un produktivitāti lauka apstākļos. Lapas audu starpšūnu telpa ir pirmā vieta, kur iekļūst gaisa piesārņotāji pirms reakcijas ar plazmas membrānu, kas ir visjutīgākā augu šūnu struktūra attiecībā pret gaisa piesārņojumu (*Castillo 1992*). Tāpēc šūnapvalka-citoplazmas membrānas pētījumi ir būtiski gaisa piesārņotāju un lapas šūnu mijiedarbības izpratnē. Tā kā starpšūnu telpa ir bagāta ar peroksidāzēm, nav šaubu, ka peroksidāžu sistēma tieši piedalās audu reakcijā uz gāzveida gaisa piesārņotājiem. Var domāt, ka relatīvi augstāks peroksidāzes aktivitātes līmenis starpšūnu telpā parāda relatīvi augstāku rezistenci pret gaisa piesārņotājiem. Ir pilnīgi pierādīts, ka gaisa piesārņojums (ozons, SO₂) izsauc ne tikai peroksidāzes aktivitātes pieaugumu, bet arī atsevišķu izoformu izmaiņas (*Endress et al. 1980, Varshney & Varshney 1985*). Būtiska nozīme šajā procesā ir Ca jonu aktivētajai peroksidāzes sekrēcijai starpšūnu telpā (*Sticher et al. 1981*). Jādomā, ka šāda reakcija ir saistīta ar peroksīdu tipa savienojumu sadalīšanu, kas rodas kā atbildes reakcija uz aģentu tiešu mijiedarbību ar šūnas struktūrām. Vēl viena apoplasta peroksidāžu funkcija varētu būt SO₂ detoksifikācija. Paaugstinātai peroksidāzes aktivitāte apstrādātos augos tādā gadījumā būtu aizsargfunkcija, oksidējot sulfītu par mazāk toksisko sulfātu (*Pfanz & Oppmann 1991*).

Pētot peroksidāzes atbildes reakciju patogēna (sēņu, vīrusu, bakteriāla infekcija) un nepatogēna (toksiskas sāļu koncentrācijas, starojums) stresa iedarbības rezultātā un novecošanās gaitā tabakas lapās ir atklāts, ka fermenta reakcija nav atkarīga no stimula dabas, bet gan no ievainojuma pakāpes un tipa (*Edreva et al.* 1989). Visos minētajos stresa iedarbības gadījumos parādās vienādas izoperoksidāžu spektra izmaiņas. Tāpēc peroksidāzes atbildi var uzskatīt par nespecifisku reakciju uz šūnu ievainojumu dažādu stimulu ietekmē. Tomēr ir informācija arī par to, ka peroksidāze var tieši piedalīties rezistences nodrošināšanā pret patogēniem (*Gaspar et al.* 1982).

Galvenā problēma, kas saistīta ar infekcijas izsuktajām izmaiņām auga metabolismā, ir jautājums par to, vai tās ir saistītas arī ar patogēna metabolisma ieslēgšanos, vai arī ir tikai saimniekorganisma metabolisma izmaiņas (*Moerschbacher* 1992). Esošie novērojami liecina, ka peroksidāžu aktivitātes pieaugums notiek saimniekauga metabolisma izmaiņu rezultātā, ko izsauc patogēns. Pie tam, šādas izmaiņas nevar izskaidrot tikai ar ievainojuma vai paātrinātas novecošanās izsuktajām izmaiņām. Vispārīgi ņemot, rezistentos augos peroksidāzes aktivitātes pieaugums parasti ir ātrāks un izteiktāks, salīdzinot ar uzņēmīgiem augiem (*Flott et al.* 1989). Tomēr, jautājums par šādas parādības cēloņsakarībām joprojām ir iemesls diskusijām. Citiem vārdiem sakot, nav joprojām skaidrs, vai peroksidāzes aktivitātes pieaugums ir paaugstinātas rezistences cēlonis vai arī sekas. Tā kā ne vienmēr paaugstināta peroksidāzes aktivitāte ir saistīta ar vienlaicīgu rezistences pieaugumu, varētu domāt, ka peroksidāze nav tieši iesaistīta rezistences nodrošināšanā. Tomēr, ja ņem vērā, ka peroksidāzes reakcijas produkti var būt toksiski patogēnam, vai arī, ka peroksidāzes reakcija izsauc mehānisku barjeru pastiprināšanos, kas kavē patogēna izplatīšanos, bet šādu reakciju norise ir atkarīga arī no citu substrātu klātbūtnes, varētu pieņemt, ka paaugstināta peroksidāzes aktivitāte ir nepieciešams, bet ne pietiekams priekšnoteikums rezistences attīstībai (*Moerschbacher* 1992). Tā piemēram, gadījumā ar kviešu rezistenci pret rūsas sēņu infekciju, peroksidāzes aktivitātes pieaugums rezistentajās līnijās ir daļa no koordinēta lignīna biosintēzes fermentu aktivitātes pieauguma, kas izsauc inficēto saimniekšūnu lignifikācijas pieaugumu (*Flott et al.* 1989, *Moerschbacher et al.* 1990). Šajā sistēmā peroksidāzes reakcijas produktiem nav tieša antimikrobiālā efekta, kas būtu saistīts ar rezistenci. Aprakstītais rezistences trūkums šajā sistēmā relatīvi augstas temperatūras apstākļos var būt saistīts ar citu termolabilu lignīna sintēzes ceļa fermentu inaktivāciju, kā rezultātā netiek nodrošināts pietiekams lignīna sintēzes priekšteču daudzums.

1.3.4. Askorbāta peroksidāze – galvenais ūdeņraža peroksīdu

pārtverošais ferments augos

Biokīmija un enzīmoloģija

Līdz ar plašu pievēršanos augu fizioloģijas pētījumu pielietošanai vides piesārņojuma problēmu pētījumos, pedējos desmit gados uzkrājies ievērojams informācijas daudzums par askorbāta peroksidāzes īpašajām funkcijām augos. Askorbāta funkcijas augos nebija skaidras līdz pat astoņdesmito gadu sākumam, kad tika parādīts, ka vismaz viena no tām ir saistīta ar augu šūnu aizsardzību pret oksidatīvajiem vai fotooksidatīvajiem bojājumiem, pārtverot ūdeņraža peroksīdu ar askorbāta peroksidāzes starpniecību (*Nakano & Asada 1981*). Attīstoties augu molekulārajai bioloģijai, hipotēze par askorbāta peroksidāzes īpašo vietu peroksidāžu sistēmā ir pilnībā apstiprinājusies (*Asada 1992, Asada et al. 1993*).

Atbilstoši pedējo gadu pētījumiem, visas peroksidāzes sadalās divās grupās atkarībā no to fizioloģiskās funkcijas: (a) peroksidāzes, kuru oksidētiem elektronu donoru produktiem ir noteiktas fizioloģiskās funkcijas augā, un (b) peroksidāzes, kuru funkcija ir pārtvert ūdeņraža peroksīdu vai organiskos peroksīdus (*Asada 1992*).

Pirmās grupas peroksidāzes, kuras apzīmē par gvajakola peroksidāzēm (atbilstoši noteikšanā plaši lietotam ūdeņraža donoram) katalizē fizioloģiski svarīgas reakcijas (uzskaitītas nodaļā 1.3.2.). Ūdeņraža peroksīds vai organiskie peroksīdi, kas nepieciešami šā tipa peroksidāžu reakcijām, veidojas efektīvi regulētās viena elektrona ($O_2^{\cdot-}$ veidojošās) vai divu elektronu (H_2O_2 veidojošās) oksidāžu reakcijās vides un šūnu signālu ietekmē, kas nepieļauj peroksīdu pārprodukciju. Otrās grupas peroksidāzes piedalās ūdeņraža peroksīda un organisko peroksīdu pārtveršanā. Kā piemērus šai grupai var minēt glutathiona peroksidāzi zīdītājiem, citohroma c peroksidāzi raugam un NADH peroksidāzi prokariotiem. Tomēr, H_2O_2 pārtverošas peroksidāzes, kuras izmanto glutathionu, citohromu c vai piridīna nukleotīdus augos nav konstatētas, bet aprakstīto funkciju izpilda askorbāta-specifiska peroksidāze.

Salīdzinot molekulārās un fermentatīvās īpašības divu augu peroksidāžu (gvajakola peroksidāze un askorbāta peroksidāze) un rauga citohroma c peroksidāzes starpā, var secināt, ka augu askorbāta peroksidāzei un sēņu citohroma c peroksidāzei ir daudz vairāk kopīgu īpašību, nekā augu askorbāta peroksidāzei un gvajakola peroksidāzei, un ka tās evolūcijas gaitā ir cēlušās no kopēja priekšteča. Tā piemēram, pretēji gvajakola peroksidāzei, kura ir glikoproteīns, ne askorbāta, ne citohroma c peroksidāze nesatur oligosaharīdus (*Chen & Asada 1989*). Primārās struktūras proksimālā histidīna apgabals parāda sekvenču homoloģiju visu trīs peroksidāžu starpā, taču homoloģijas pakape starp askorbāta peroksidāzi un citohroma c peroksidāzi ir

lielāka, nekā starp askorbāta un gvajakola peroksidāzēm augos (Mittler & Zilinskas 1991b, Chen et al. 1992). Arī jutīguma ziņā pret tiola reaģentiem (Chen & Asada 1989), kā arī reakcijas katalītiskajos mehānismos ir vairāk līdzības askorbāta un citohroma c peroksidāzēm (Asada et al. 1993).

Askorbāta peroksidāze ir atrasta ne tikai hloroplastos, bet arī citozolā dažādās izoformās. Citozoliskajiem izofermentiem, kas izolēti no zirņu lapām (Mittler & Zilinskas 1991a) un *Arabidopsis* (Kubo et al. 1992) nav tranzitpeptīda, lai piesaistītos šūnas organelām, tāpēc par to lokalizācijas vietu var uzskatīt citozolu, bet nevis mitohondrijus. Tātad, citozola askorbāta peroksidāze pārtver ūdeņraža peroksīdu, kurš ģenerējas citozolā. Hloroplastu izozīms ir lokalizēts stromā šķīstošā veidā, bet stromas tilakoīdos – ar membrānām saistītā formā (Miyake & Asada 1992). Amino-terminālā apgabala aminoskābju sekvenču tilakoīdu askorbāta peroksidāzei no spināta un stromas askorbāta peroksidāzei no tējas parāda augstu savstarpējās homoloģijas pakāpi, bet zemu homoloģiju ar citozola formām (Miyake et al. 1993). Savukārt, citozola un stromas askorbāta peroksidāzei ir homologas sekvenču proksimālā un distālā histidīna tuvumā (Chen et al. 1992).

No reakciju katalīzes viedokļa, askorbāta peroksidāzi raksturo augsts specifiskums pret askorbīnskābi kā elektronu donoru, kas ir īpaši izteikts tilakoīdu un stromas fermentu gadījumā. Citozoliskā forma bez askorbāta katalizē arī fenolu oksidāciju (Chen & Asada 1989). Visu askorbāta peroksidāzes izozīmu inhibēšana ar tiolu modificējošiem reaģentiem (hloromerkuribenzoāts u.c.) ir no klasiskās gvajakola peroksidāzes atšķirīga īpašība. Bez tam, visu askorbāta peroksidāzes formu aktivitāte tiek apspiesta ditiotreitola, p-aminofenola, hidroksiurīnvielas un hidroksilamīna klātbūtnē, kas nav novērots gvajakola peroksidāzes gadījumā (Chen & Asada 1992).

Viens no iemesliem, kāpēc askorbāta peroksidāze netika atklāta ilgu laiku, ir tās nestabilitāte bez askorbīnskābes klātbūtnes *in vitro*. Apmēram 50 % no tilakoīdu un stromas askorbāta peroksidāzes aktivitātes zūd 15 sekunžu laikā, bet no citozola askorbāta peroksidāzes aktivitātes – 60 minūšu laikā (Chen & Asada 1989, Miyake & Asada 1992). Inaktivāciju novērš skābekļa izslēgšana no vides, un daļēji arī katalāzes pievienošana. Taču pat anaerobos apstākļos H₂O₂ pievienošana nanomolārā daudzumā inaktivē tilakoīdu askorbāta peroksidāzi (Asada 1991). Šāda īpašība nav konstatēta ne citohroma c peroksidāzei, ne gvajakola peroksidāzei.

Askorbāta peroksidāzei askorbīnskābe ir visefektīvākais elektronu donors, bet hloroplastu un citozola formas var katalizēt gvajakola oksidēšanu, lai arī ar intensitāti, kas ir tikai 5 % (hloroplasta peroksidāzei) vai 25 % (citozola peroksidāzei) no askorbāta oksidēšanas intensitātes.

Primārais askorbīnskābes oksidācijas produkts askorbāta peroksidāzes reakcijā ir monodehidroaskorbāta radikālis. Lai askorbāta peroksidāze varētu darboties kā ūdeņraža peroksīda pārtvērējs, ir nepieciešama askorbāta reģenerācija. Visa askorbāta

pārtveršanas sistēma hloroplastos sastāv no sekojošiem posmiem:

- (a) fotosistēmas I producētā superoksīda difūzija stromā;
- (b) superoksīda pārtveršana, ko katalizē ar tilakoīdiem saistītā perifēriālā superoksīddismutāze;
- (c) ūdeņraža peroksīda redukcija ar askorbātu, ko katalizē tilakoīdu askorbāta peroksidāze;
- (d) monodehidroaskorbāta redukcija ar reducēto ferredoksīnu;
- (e) superoksīda un ūdeņraža peroksīda difūzija uz stromu;
- (f) superoksīda pārtveršana, ko katalizē stromā lokalizētā superoksīddismutāze;
- (g) ūdeņraža peroksīda redukcija, ko katalizē stromas askorbāta peroksidāze;
- (h) monodehidroaskorbāta redukcija ar NAD(P)H, ko katalizē monodehidroaskorbāta reduktāze;
- (i) monodehidroaskorbāta spontāna sadalīšanās par dehidroaskorbātu un askorbātu;
- (j) dehidroaskorbāta redukcija par askorbātu ar glutationu, ko katalizē dehidroaskorbāta reduktāze;
- (k) NADP⁺ redukcija ar reducēto ferredoksīnu, ko katalizē ferredoksīna NADP reduktāze,
- (l) glutaciona redukcija ar NADPH, ko katalizē glutaciona reduktāze (Asada 1994).

Atbilstoša askorbāta reģenerācijas sistēma citozolā līdz šim vēl nav atklāta, bet citozoliskā monodehidroaskorbāta reduktāze jau ir aprakstīta.

Fizioloģiskās funkcijas un regulācija

Dažādi atmosfēras gāzveida piesārņojuma veidi, kā piemēram, slāpekļa oksīdi (NO, NO₂), ozons (O₃) un sēra dioksīds (SO₂) izmaina augu šūnās līdzsvaru starp aktīvā skābekļa veidošanos un uztveršanu (Meyer *et al.* 1987). Piesārņojuma inducēto endogēno oksidatīvo stresu pavada ievērojams askorbīnskābes satura pieaugums, kā novērots skujkoku skujās (Castillo *et al.* 1987, Mehlhorn *et al.* 1986) un vaskulāro augu lapās (Castillo & Greppin 1988).

Līdztekus tam, parasti novērojams paralēls askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugums piesārņojuma rezultātā (Eltner *et al.* 1985, Tanaka *et al.* 1985, Mehlhorn 1990, Chen *et al.* 1991, Ogier *et al.* 1991, Badiani *et al.* 1993, Mittler *et al.* 1993). Tomēr, atsevišķos gadījumos šāda aktivācija nav novērota (Osswald *et al.* 1992). No otras puses, H₂O₂, kas ir viens no endogēnā oksidatīvā stresa būtiskiem aģentiem, pielietots eksogēni, izraisa askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugumu, vienlaikus inhibējot katalāzi (Mittler & Tel-Or 1991, Zheng & van Huystee 1992). Arī citu stresa veidu atbildes reakcijas (temperatūras, sausuma u.c.), kuru laikā notiek aktīvā skābekļa formu pieaugums (Hernandez *et al.* 1993, Okuda *et al.* 1994), raksturīgas ar askorbāta peroksidāzes aktivāciju (Irigoyen *et al.* 1992, Mittler *et al.* 1993, Pastori & Trippi 1993).

Principiāla nozīme varētu būt atklājumam par to, ka transgēni tabakas augi ar paaugstinātu hloroplastu Cu/Zn-superoksīddismutāzes aktivitāti un ievērojami izteiktāku rezistenci pret herbicīdu metilviologēnu (*Sen Gupta et al.* 1993a) izrāda arī četras reizes augstāku askorbāta peroksidāzes aktivitātes un askorbāta peroksidāzes mRNS līmeņa atbilstošu pieaugumu (*Sen Gupta et al.* 1993b).

Gaisma kā attīstības faktors izsauc askorbāta peroksidāzes aktivāciju caur fitohroma darbību neatkarīgi no fotosintēzes procesa norises (*Thomsen et al.* 1992). Tomēr, gaismas kā stresa faktora induktīvā darbība uz askorbāta peroksidāzes aktivitāti ir tieši saistīta ar fotooksidatīvo stresu (*Wise & Naylor* 1988, *Thomsen et al.* 1992). Aktīvo skābekļa formu fotoģenerācija pastiprinās, ja augi, kuri atrodas augstas gaismas intensitātes apstākļos, tiek pakļauti vides stresa iedarbībai, piemēram, zemām temperatūrām sakņu zonā, kas kavē asimilātu transportu. Šādā situācijā palielinās absorbētās gaismas enerģijas izmantošana fotosintētiskajai CO₂ fiksācijai (*Elstner et al.* 1988), bet ierobežotais NADP⁺ puls elektronu uzņemšanai no fotosistēmas I izsauc pastiprinātu O₂ aktivāciju. Askorbāta peroksidāzes pieaugums šādos gadījumos ir tieši saistīts ar augu aizsargsistēmu un rezistences reakcijām (*Anderson et al.* 1992, *Fuse et al.* 1993), it īpaši, nelabvēlīgos minerālās barošanās apstākļos atsevišķu elementu trūkuma gadījumā (*Cakmak & Marschner* 1992, *Polle et al.* 1992).

Pretēji visai plaši dokumentētajai askorbāta peroksidāzes nozīmei stresa aizsargreakcijās, literatūrā atrodams visai maz informācijas par askorbāta peroksidāzes izmaiņām normāla augu metabolisma gaitā. Pēc analogijas ar stresa situācijām, kas izsauc pastiprinātu skābekļa aktivēšanos ar sekojošu askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugumu, varētu domāt, ka, norisinoties tiem fizioloģiskajiem procesiem, kas raksturojas ar intensīvu aktivētā skābekļa formu veidošanos, notiek arī paralēls askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugums.

Tā kā sēklu dīgšanas agras stadijas, sākot jau ar sēklu uzbriešanu, ir saistītas ar skābekļa patēriņa pieaugumu un mitohondriālās elpošanas intensitātes palielināšanos, būtu jānovēro arī askorbāta peroksidāzes indukcija šo procesu gaitā. Šo pieņēmumu apstiprina eksperimenti ar dīgstošām kukurūzas (*De Gara et al.* 1993) un kviešu (*Cakmak et al.* 1993) sēklām. Sausās sēklās askorbāta peroksidāzes aktivitāte nav atrodama (*De Gara et al.* 1993), vai arī tās līmenis ir ļoti zems (*Cakmak et al.* 1993). Sausas sēklas nesatur arī askorbātu (*De Gara et al.* 1993). Dīgšanas laikā askorbāta peroksidāzes aktivitāte pieaug vidēji 10 līdz 30 reizes 24-48 stundas no uzbriešanas sākuma (*Klapheck et al.* 1990, *De Gara et al.* 1991, *Cakmak et al.* 1993, *De Gara et al.* 1993).

Arī citās attīstības stadijās novērojamas fizioloģiski nozīmīgas askorbāta peroksidāzes aktivitātes izmaiņas. Tā piemēram, *Vicia faba* L. sēklu attīstības laikā novērota augsta askorbāta peroksidāzes aktivitāte šūnās, kuras atrodas dalīšanās un stiepšanās stadijā (*Arrigoni et al.* 1992).

Pārsteidzoši maz informācijas atrodams par askorbāta peroksidāzes indukcijas regulāciju. Par fitohormonu piedalīšanos šajā procesā var spriest visai netieši pēc zināmas paralelitātes starp askorbāta peroksidāzes aktivitāti un etilēna veidošanos (Kevers *et al.* 1992), kā arī no visai ierobežotiem datiem par eksogēnās abscīzskābes un etilēnproducentu induktīvo ietekmi (Mehlhorn 1990, Mittler *et al.* 1993). Var pieņemt, ka induktīvais faktors ir arī peroksidāzes substrāti – H_2O_2 vai askorbīnskābe, it īpaši tāpēc, ka eksogēnais H_2O_2 var izsaukt askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugumu (Mittler & Tel-Or 1991, Zheng & van Huystee 1992). Tomēr, tajā pašā laikā, H_2O_2 ir arī askorbāta peroksidāzi inaktivējošs aģents gan *in vitro* (Chen & Asada 1992), gan *in vivo* (Svalheim & Robertsen 1993). Jāatzīmē arī, ka aizsargmehānismu attīstība augos stresa ietekmē sastāv no divām fāzēm: (a) ātra antioksidantu substrātu pieauguma un (b) lēna antioksidatīvo fermentu aktivitātes pieauguma (Ushimaru *et al.* 1992).

Nav arī zināms, kādi molekulārie mehānismi nodrošina askorbāta peroksidāzes indukciju. Var domāt, ka šajā procesā notiek askorbāta peroksidāzes gēna ekspresija, par ko liecina transkriptu daudzuma ievērojams pieaugums stresa iedarbības rezultātā (Mittler *et al.* 1993). Tā kā askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugums parasti ir paralēls fermenta olbaltuma daudzuma pieaugumam, var pieņemt, ka indukcija notiek tieši olbaltuma sintēzes līmenī un nav saistīta ar pēctranslācijas modifikācijām. Interesanti, ka novērojama pretruna starp askorbāta peroksidāzes gēna transkriptu līmeņa būtisko paaugstināšanos stresa situācijās un relatīvi zemo aktivitātes pieaugumu (Mittler & Zilinskas 1994).

1.4. Lignifikācijas bioķīmiskie un fizioloģiskie aspekti

1.4.1. Lignīna biosintēzes reakcijas

Lignīns ir sarežģīts fenolu heteropolimērs, kurš rodas, dehidrogenatīvi polimerizējoties trim dažādiem kanēļspirtiem, monolignoliem, un kurš uzkrājas noteiktu šūnu diferenciācijas beigu posmā. Lignīns nostiprina specializētas šūnas, padara tās ūdensnecaurlaidīgākas, un tam ir fundamentāla nozīme augu audu mehāniskajā izturībā, šķidrums vadīšanā un aizsardzībā pret slimībām. Bioķīmiskajā līmenī lignīna sintēzei ir raksturīga gara reakciju ķēde no vispārējā metabolisma caur šikīmiskābes ceļu, kopējo fenilpropanoīdu ceļu un specifisku lignīna ceļu.

Kopējais fenilpropanoīdu ceļš, kas sākas ar fenilalanīna dezaminēšanu un beidzas ar hidroksikanēļskābju kofermenta A (CoA) esteru veidošanos, ir kopīgā sekvence liela daudzuma dažādu fenolu savienojumu sintēzei, kuri piedalās dažādos augu attīstības aspektos un aizsargreakcijās (*Boudet et al.* 1995). Šo ceļu var uzskatīt par saistošo posmu starp t.s. primāro un sekundāro metabolismu, un tajā piedalās fermenti (a) fenilalanīna amonijliāze (EC 4.3.1.5), (b) kanēļskābju hidroksilāze (EC 1.14.13.11), (c) o-metiltransferāze (EC 2.1.1.6), (d) ferulskābes hidroksilāze un (e) hidroksikanēļskābju CoA ligāzes (EC 6.2.1.12). Pēdējā ir posma svarīgākā reakcija, jo tajā radušies savienojumi ir ar augsti reaktīvo tiolesteru saiti. No hidroksikanēļesteru CoA caur specifiskiem ceļiem rodas tādas savienojumu grupas kā flavonoīdi, lignīns, stilbēni u.c.

Specifiskais lignīna veidošanās zars sākas ar atbilstošo hidroksikanēļesteru CoA pārvēršanos par aldehīdiem reakcijā, ko katalizē kanēļskābju CoA reduktāze (EC 1.2.1.44). Lignīna monomēriskie priekšteči (kumārspirts, koniferilspirts, sinapspirts) rodas kanēļspirta dehidrogenāzes (EC 1.1.1.195) reakcijā. Jautājumā par fermentu, kurš piedalās lignīna monomēru polimerizācijā par natīvo lignīnu, joprojām nav skaidrības. Klasiskā pieeja vēsta, ka šūnu sienā lokalizētas oksidāzes pārvērš monolignolus par mezomēriskiem brīvajiem radikāļiem, kuri spontāni polimerizējas par lignīnu (*Boudet et al.* 1995). Bez tam, netiek izslēgta arī iespēja, ka brīvo radikāļu veidošanās ir nefermentatīvs process (ķēdes veidošanās reakcija). Kā jau aprakstīts nodaļā 1.3.2., ir visai daudz korelatīvu pierādījumu par peroksidāzes piedalīšanos lignīna polimerizācijā. Tomēr, noteikta peroksidāzes izozīma piedalīšanos lignifikācijā vēl nav iespējams definēt bez pretenzijām. Pēdējā laika atjaunojas arī diskusija par to, ka par lignīnu polimerizāciju ir atbildīgs ferments lakāze (EC 1.10.2.2; *Dean & Eriksson* 1994). Kritiskais moments, lai izšķirtos par viena vai otra fermenta darbību šajā posmā, ir iespējamā H₂O₂ kā kosubstrāta piedalīšanās, kas ir nepieciešama tikai peroksidāzes kā darbīgā fermenta gadījumā. Lai arī dati par saistību starp H₂O₂

veidošanos un aktīvu lignifikāciju ir pārsvarā korelatīvi (*Olson & Varner 1993*), ir pieejami arī tiešāki pierādījumi par H₂O₂ nepieciešamību lignifikācijas procesā (*Nose et al. 1995*).

1.4.2. Lignīna uzkrāšanās augu attīstības gaitā un tās regulācija

Šūnas attīstības laikā lignīna uzkrāšanās notiek trīs atsevišķu stadiju veidā, sekojot ogļhidrātu uzkrāšanās procesam dažādos sekundārā šūnapvalka slāņos (*Terashima et al. 1993*). Pirmā lignīna uzkrāšanās notiek šūnas stūros un vidējā plāksnītē pēc pektīna izgulsnēšanās pārtraukšanās un ārējās lamellas (S1 slāņa) veidošanās sākuma. Otrā ir lēnas lignifikācijas fāze, kas saistīta ar celulozes mikrofibrillu un mannāna un ksilāna uzkrāšanos vidējā lamellā (S2). Galvenā lignifikācija notiek pēc celulozes mikrofibrillu nogulsnēšanās sākuma iekšējās lamellas (S3) slānī.

Jautājums par to, vai šūnu sienu lignifikāciju var uzskatīt par vienu no faktoriem, kas izsauc šūnu lineārās augšanas apstāšanos, ir visai principiāls, lai izprastu augu augšanas inhibēšanas mehānismus. Pašlaik gan nav neapgāžamu pierādījumu šādas hipotēzes pierādīšanai, jo dati par sakarību starp šūnu augšanu un lignīna uzkrāšanos ir visai pretrunīgi. Jāatzīmē, ka daudzos gadījumos ir novērojama negatīva korelācija starp augšanas ātrumu un lignīna saturu (*Whitmore 1971, Ros Barcelo et al. 1989*). Lignīna satura pieaugumu var novērot, inhibējot augu augšanu mehāniskā stresa rezultātā (*De Jaegher et al. 1985*), mainot augu orientāciju (*Prasad & Cline 1987*), ar retardantu apstrādi (*Marigo & Boudet 1980, Prasad & Cline 1987*), sāļu stresa ietekmē (*Hagege et al. 1988*). Tomēr, pētot augšanas regulatoru ietekmi uz lignifikāciju kviešu koleoptilēs, nav atrasta cēloniska sakarība starp augšanas inhibēšanu un lignifikāciju atkarībā no lietotās augšanas regulatoru koncentrācijas (*Whitmore 1971*). Uz histohīmisko testu pamata ir izdarīts secinājums par to, ka ievērojama šūnapvalka lignifikācija noteiktā starpposma segmentā sorgo augiem sākas tikai pēc dotā segmenta šūnu lineārās augšanas apstāšanās (*Stafford 1967*), kā arī par to, ka lapas plātnē lignīna uzkrāšanās nesākas pirms epidermas šūnu stiepšanās pārtraukšanās (*MacAdam & Nelson 1989*).

Lignīna uzkrāšanos šūnapvalkā ir pieņemts uzskatīt par vadaudu elementu diferenciācijas marķieri. Audu vai šūnu kultūrās lignifikācijas maksimums parasti sakrīt ar ksilēmas elementu veidošanās stadiju, savukārt, lignīna veidošanās notiek tikai kultivācijas vidē, kas inducē ksilēmas veidošanos (*Wolter & Gordon 1975, Fukuda & Komamine 1982, Miller et al. 1985*). Netieši uz šādas likumsakarības pastāvēšanu

norāda arī pieaugošs lignīna satura gradients virzienā no jaunākiem uz nobriedušiem audiem augošos veģetatīvajos orgānos (*Higuchi 1957, Ros Barcelo et al. 1989*). Tomēr, atsevišķos gadījumos nav novērojama sakarība starp lignīna saturu un diferencēto šūnu skaitu (*Minocha & Halperin 1976*).

Šūnapvalka lignifikācijas aktivēšanās notiek mehāniskā (*De Jaegher et al. 1985*), gravitācijas (*Goliber 1989*) un ķīmiskā stresa, kā arī audu ievainošanas rezultātā (*Rittinger et al. 1987, Ke & Saltveit 1988*) un kā atbilde uz patogēnu infekciju (*Ride 1975, Moerschbacher et al. 1989*). Mehāniskā stresa un audu ievainojuma rezultātā audos tiek inducēti mehānismi, kas izsauc bojātās virsmas izolāciju, samazinot iespēju patogēnu iekļūšanai. Viens no šādiem mehānismiem ir stipri lignificētu šūnu slāņa veidošanās uz bojāto audu virsmas vai to tuvumā (*Ride 1975, Rittinger et al. 1987, Ke & Saltveit 1988*). Savukārt, lokalizēta lignīna veidošanās inficētajos audos, ko inducē rezistences mehānisms, ierobežo patogēna izplatīšanos (*Ride 1975, Moerschbacher et al. 1989*). Bez tam, mehāniskā kairinājuma inducēto lignifikācijas pieaugumu var uzskatīt par mehānismu, kas aizsargā pret iespējamu dotā faktora otrreizēju iedarbību (*De Jaegher et al. 1985*).

Fenilpropanoīdu sintēzes ceļa regulācija saistībā ar lignifikāciju ir visai neskaidra. Vismaz trīs svarīgi jautājumi attiecībā par šī kopējā ceļa funkcionēšanu paliek neatbildēti. Vai dažādu hidroksikanēlskābju esteru CoA atšķirīgais relatīvās veidošanās ātrums ir svarīgs lignīna monomēru sastāva noteikšanai? Vai kopējā oglekļa plūsma caur ceļu ir limitējošais faktors vai viens no limitējošiem faktoriem lignīna sintēzē? Vai lignīna priekšteču veidošanās lignificējošos audos ir saistīta ar specifisku fenilpropanoīdu ceļa gēnu aktivitāti? Citiem vārdiem sakot, problēma ir attiecībā par to, vai lignifikāciju aktivējošais faktors izsauc kopīgā gēnu kopuma aktivāciju, kas atbild par dažādu fenolu priekšteču sintēzi, vai arī aktivē multigēnu grupu locekļus, kas ir tieši saistīti ar lignīna sintēzi. Šķiet, ka vismaz uz pirmajiem diviem jautājumiem var atbildēt pozitīvi. Attiecībā uz trešo jautājumu, lai arī fenilpropanoīdu ceļa fermentus kodē multigēnu fermenti, tomēr nav atrasti lignifikācijai specifiski grupu locekļi.

1.5. Endogēnais oksidatīvais stress augos

1.5.1. Skābekļa aktivēšanās reakcijas augos

Primārajā Zemes atmosfērā nebija skābekļa. Substrātu metabolisms tā laika organismos notika ar relatīvi vienkāršu elektronu transporta sistēmu starpniecību, kur elektronu plūsmām bija visai zema oksidēšanas spēja. Līdz ar fotosintēzes rašanos, tās gāzveida produkts, O_2 , pieaugošos daudzumos uzkrājās atmosfērā. Daļa organismu adaptējās šai izmaiņai, ieslēdzot jauno oksidētāju savā metabolismā, kas deva ievērojamas priekšrocības dažādu savienojumu oksidēšanā. Tomēr, dzīve ar skābekli, lai arī ļoti efektīva no enerģētiskā viedokļa, nes sevī potenciālas briesmas. Atmosfēras skābeklis savā pamata (tripleta; O_2) stāvoklī ir relatīvi mazreaktīvs, taču tam ir augsts oksidatīvais potenciāls. Skābeklis var pāriet singleta stāvoklī (aktivēties) gan ķīmisku, gan arī fermentatīvu un fizikālu reakciju gaitā. Tā rezultātā veidojas reaktīvi savienojumi (toksiskie jeb aktīvie skābekļa savienojumi), kurus raksturo ievērojama nestabilitāte bioloģiskajās sistēmās – superoksīda anjonradikālis ($O_2^{\cdot-}$), hidroksilradikālis (OH^{\cdot}) un ūdeņraža peroksīds (H_2O_2) (Salin 1987). Šie aktivētie skābekļa savienojumi var izsaukt molekulu, membrānu un citu šūnas struktūru bojājumus, galvenokārt, reaģējot ar nepiesātinātajām taukskābēm un izraisot to peroksidāciju (Elstner et al. 1988). Šāda situācija, kad aktīvie skābekļa savienojumi izraisa šūnu bojājumus, tiek saukta par endogēno oksidatīvo stresu.

Tādējādi, lai arī skābeklis ir nepieciešams aerobo organismu izdzīvošanai, to eksistence ir tieši atkarīga no efektīvas detoksificējošo sistēmu darbības šūnās. Evolūcijas procesā visiem organismiem, it īpaši, augstākajiem augiem kā pārvietoties nespējīgai dzīvības formai, ir attīstījušies mehānismi skābekļa toksiskuma novēršanai. Pie tiem pieder gan ķīmiskās, gan fermentatīvās antioksidantu sistēmas. Pēdējos desmit gados ir uzkrājušies pierādījumi, kas liecina, ka ļoti daudzi augstāko augu fizioloģijas aspekti ir tieši saistīti ar skābekļa aktivāciju augā un tā detoksifikāciju (Alscher 1989).

Aktīvo skābekļa formu rašanās notiek normāla šūnu metabolisma rezultātā visā auga attīstības laikā, īpaši pastiprinoties vides stresa apstākļos. Fotosintezējošās šūnās galvenais aktīvā skābekļa formu avots ir hloroplastos notiekošie procesi. O_2 redukcija par superoksīdu tilakoīdos notiek fotosistēmā I, kā arī ar perifēriālā ferrodoksīna piedalīšanos (Asada 1992). Superoksīds pats par sevi nav tik augsti toksisks, kā pārējie skābekļa radikāli. Taču tas var piedalīties virknē ar skābekli saistītu reakciju: lipīdu peroksidācijā, membrānu bojājumos, DNS bojājumos u.c. Domājams, ka superoksīds darbojas kā daudz efektīvāks oksidants, hidroksilradikāla, ģenerators reakcijā ar H_2O_2 . Pie tiešajiem $O_2^{\cdot-}$ efektiem var pieskaitīt katalāzes un glutaciona peroksidāzes inaktivāciju (Fridovich 1986). Superoksīda rašanās ātrums hloroplastos ir apmēram

240 μmol sekundē (Asada 1994).

Superoksīda redukcija par H_2O_2 notiek ar fermenta superoksīddismutāzes (EC 1.15.1.1) starpniecību. Ūdeņraža peroksīds ir visstabilākais no visām aktīvā skābekļa formām, un tam nav radikāla īpašību. Tas var darboties gan kā oksidants, gan kā vājš reducētājs. H_2O_2 ir relatīvi mazreaktīvs, un nereaģē efektīvi ar organiskajiem substrātiem. Ūdeņraža peroksīda bioloģiskais toksiskums saistās ar SH grupu oksidāciju, kā arī ar spēju veidot hidroksilradikāli metālu katalizatoru klātbūtnē (Salin 1987).

H_2O_2 vienvērtīgās redukcijas produkts ir ārkārtīgi reaktīvais hidroksilradikālis ($\text{OH}\cdot$). Tā reakcijas ātrumu kontrolē gandrīz tikai difūzijas ātrums, un tas iedarbojas uz praktiski visiem organiskajiem savienojumiem. Tāpēc tā pussabrukšanas periods šķīdumos ir ļoti īss un to ir grūti noteikt. $\text{OH}\cdot$ augu audos praktiski reaģē ar pirmo pieejamo substrātu – fermentiem, nukleīnskābēm, membrānām u.c., tā destruktīvais un mutagēnais potenciāls dzīvajos audos ir milzīgs. Tāpat kā superoksīds, arī hidroksilradikālis iedarbojas ar šūnas komponentiem tieši savā rašanās vietā (Asada 1994). Hidroksilradikāli, pretstatā $\text{O}_2\cdot^-$ un H_2O_2 , ir parāk reaktīvi, lai tos varētu sagraut fermentatīvi, bet to veidošanos ierobežo superoksīda un ūdeņraža peroksīda pārtveršana.

Singletais skābeklis var veidoties dažādās ķīmiskajās, fotoķīmiskajās un bioloģiskajās sistēmās, kurās piedalās brīvie radikāli, lipīdu peroksīdi vai fotooksidācijas. Fotosintezējošos organismos singletais skābeklis rodas, hlorofilam darbojoties kā fotonu absorbentam, izejas enerģiju nododot O_2 molekulai (Salin 1987). Singletais skābeklis ir augsti reaktīvs un veido hidroperoksīdus un endoperoksīdus, kas var izsaukt brīvo radikāļu ķēdes reakcijas. Bioloģiskajās sistēmās singletais skābeklis izsauc lipīdu peroksidāciju, kas noved pie membrānu struktūras izmaiņas un pavājināšanās.

Mitochondriji ir otra svarīgākā iekššūnas superoksīda rašanās vieta (Rabinovitch & Fridovich 1983). Mitochondriju elpošanas ķēdē ir divas $\text{O}_2\cdot^-$ rašanās vietas, saistītas ar flavoproteīna NADH dehidrogenāzi un ubihinona-citohroma *b* segmentiem. Superoksīda dismutāzes darbības rezultātā veidojas H_2O_2 , kurš var pārvietoties no mitochondrijiem uz citām organelām (Puntarulo et al. 1988). Līdz pat 2 % no mitochondrijos patērētā skābekļa piedalās H_2O_2 veidošanā. Superoksīds un tā derivāti var veidoties arī citos šūnas kompartimentos – mikrosomās, peroksisomās un glioksisomās, plazmalemmā, kā arī šūnapvalkā (Elstner & Osswald 1994). Ja pārējos kompartimentos skābekļa aktīvo formu veidošanās pārsvarā saistīta ar endogēno oksidatīvo stresu nelabvēlīgu apstākļu ietekmē, tad šūnapvalkā skābekļa aktivēšanās reakcijām ir kritiska nozīme šūnas normālās fizioloģijas nodrošināšanā. Tas saistīts ar peroksīdu piedalīšanos lignīna polimerizācijā un rezistencē pret patogēniem (Elstner & Osswald 1994).

Normālā auga attīstības gaitā var izdalīt atsevišķus periodus, kas raksturīgi ar

augstu aktivētā skābekļa savienojumu veidošanās intensitāti. Ļoti izteikti H_2O_2 veidošanās un sadalīšanās procesi notiek agrās dīgšanas stadijās (*Puntarulo et al.* 1988). Galvenais H_2O_2 avots šajā laikā ir elektronu pārnese ķēdes mitohondrijos. Tā kā aktivētās skābekļa formas ir arī fotosintēzes blakusprodukts, tad pāreja no etiolēta stāvokļa uz aktīvu fotosintēzi, piemēram, dīgstam izaugot zemes virspusē, arī ir saistīta ar zināmu oksidatīvo stresu audos (*Thomsen et al.* 1992). Vēl viena stadija, kas raksturojas ar sevišķi augstu skābekļa toksisko formu saturu ar sekojošām destruktīvām izmaiņām, ir novecošanās (*Brennan & Frenkel* 1977, *Chin & Frenkel* 1977, *Dhindsa et al.* 1981, *Kumar & Knowles* 1993). Minētajās attīstības stadijās, līdztekus pastiprinātai skābekļa aktivācijai, notiek arī detoksificējošo sistēmu indukcija.

Praktiski visu veidu stresa faktoru iedarbība uz augiem ir saistīta ar skābekļa aktivāciju (*Elstner et al.* 1988). Tā saukto "septiņu stresa faktoru" (gaisma, radiācija, bioloģiskas ietekmes, mehāniskie faktori, ķīmiskie faktori, hidratācija un temperatūra) ietekme dabiskos apstākļos ir grūti atšķirama, parādot, ka skābekļa aktivēšanās šūnās ir nespecifiska, vispārīga augu atbildes reakcija uz vides stresu. It īpaši jāakcentē oksidatīvā stresa iespējamā piedalīšanās augu aizsargreakcijās, jo peroksīdi var darboties par starpniekiem signālu pārnešanas procesos (*Apostol et al.* 1989). Par pilnībā pierādītu var uzskatīt ūdeņraža peroksīda piedalīšanos patogēna-auga mijiedarbībā (*Levine et al.* 1994). Patogēna infekcijas rezultātā šūnā veidojas H_2O_2 , kuram ir divējāda loma. Infekcijas skartajās šūnās H_2O_2 inducē programmētu lokālu šūnu bojāeju, kā arī blakus esošo šūnapvalku olbaltumu krustsaistīšanos, kas darbojas kā fiziska barjera. Daļa H_2O_2 pārvietojas audos kā signālmolekula, izsaucot aizsargsistēmas gēnu transkripciju. Bez tam, H_2O_2 var izsaukt arī sistēmiski iegūto rezistenci (*Chen et al.* 1993). Ūdeņraža peroksīda atkarīgo gēnu ekspresijas mehānismi vēl nav noskaidroti. Jādomā, ka H_2O_2 darbojas kā redoks-jutīgā pārnese modulators (*Inze & Van Montagu* 1995). Varētu pieņemt, ka H_2O_2 ir signālmolekulas loma arī citās situācijās, kas saistītas ar endogēno oksidatīvo stresu. Tā piemēram, H_2O_2 satura pieaugums audos aprakstīts kā reakcija uz inokulāciju ar patogēnu ierosinātājiem (*Apostol et al.* 1989, *Devlin & Gustine* 1992, *Svalheim & Robertsen* 1993), infekcijas rezultātā (*Sekizawa et al.* 1985, 1987), sāļu stresa iedarbībā mitohondrijos (*Hernandez et al.* 1993), sausuma (*Irigoyen et al.* 1992, *Pastori & Trippi* 1993) un temperatūras stresa rezultātā (*Okuda et al.* 1994, *Gianetti et al.* 1993), kā arī fotooksidatīvā stresa apstākļos (*Wise & Naylor* 1988, *Thomsen et al.* 1992). Tā kā ūdeņraža peroksīds ir arī labi zināms vairāku fermentu aktivitātes inhibitors gan *in vitro*, gan *in vivo*, tā darbība signālmolekulas lomā vispārējo stresa situāciju norises laikā ir pretrunīga problēma (*Inze & Van Montagu* 1995). Visparīgi ņemot, atkarībā no stresa faktora intensitātes un auga fizioloģiskā stāvokļa, stresa iedarbība var izsaukt metaboliskus vai transporta blokus, kas izraisa raksturīgas izmaiņas skābekli aktivējošo vai dezaktivējošo fermentu ekspresijā (*Elstner et al.* 1988).

1.5.2. Fermentatīvās detoksifikācijas mehānismi un

antioksidatīvās rezistences pamati

Augsti enerģētiskās fotosintēzes reakcijas, no vienas puses, un skābekļa pieejamība no otras, padara augu hloroplastus par bagātīgu aktīvo skābekļa formu avotu. Antioksidatīvajā sistēmā piedalās gan fermenti (superoksiddismutāze, askorbāta peroksidāzes), gan nefermentatīvie komponenti – askorbāts, glutations u.c. Eksistē vispārējs pieņēmums par to, ka antioksidatīvie fermenti ir kritiskie komponenti, lai novērstu oksidatīvā stresa situācijas augos (*Allen* 1995). Šāda hipotēze balstās uz vairākām pierādījumu grupām. Pirmkārt, viena vai vairāku šo fermentu aktivitāte pieaug augos, kas atrodas stresa situācijā, un šis aktivitātes pieaugums korelē ar stresa tolerances pieaugumu. Otrkārt, augu pakļaušana viena veida stresam var paaugstināt toleranci pret cita sekojoša stresa iedarbību. Šī parādība ir pazīstama kā krusteniskā tolerance. Treškārt, augu līnijām, kuras ir rezistentas pret herbicīdiem, kas inducē aktīvo skābekļa formu veidošanos (piemēram, metilviologēns), ir paaugstināta viena vai vairāku šo fermentu aktivitāte, un tiem var izpausties krusteniskās tolerances parādība. Šie novērojumi parāda, ka vides stresa ietekme var stimulēt augus paaugstināt to aktīvā skābekļa pārtvērēju sistēmu efektivitāti, un šis pieaugums acīmredzot izsauc vispārēju stresa aizsardzību. Lai arī visai acīmredzami, šie novērojumi dod tikai netiešus pierādījumus šo fermentu nozīmei stresa aizsardzībā, un faktiski nesniedz nekādu informāciju par atsevišķo fermentu specifisko lomu.

Tādējādi, pēdējos gados uzkrātā informācija ir par pamatu vispārīgas konceptuālas hipotēzes izveidošanai par to, ka stresa toleranci ir iespējams palielināt, palielinot augu endogēno antioksidatīvo kapacitāti. Principiālu pierādījumu iegūšana šai hipotēzei ir pašreiz notiekošo un netālā nākotnē plānoto zinātnisko eksperimentu uzdevums.

Salīdzinoši nesen uzsāktie pētījumi, pielietojot aktīvā skābekļa formas sadalošo fermentu gēnu ekspresijas manipulāciju ar gēnu pārnesšanas tehnoloģijas palīdzību, ir devuši iespēju tālāk raksturot pretoksidatīvo fermentu funkcijas (*Foyer et al.* 1994). Lai arī pagaidām visai ierobežoti, šie eksperimenti arī norāda uz to, ka hloroplastu aktīvā skābekļa sadalīšanas sistēmas modifikācija var izraisīt ievērojamas oksidatīvā stresa tolerances izmaiņas, un dod zināmu norādi uz iespēju lietot šādu metodiku augu izturības uzlabošanai.

Ļoti daudzos gadījumos augi ar konstanti ekspresētu atsevišķu pretoksidatīvo fermentu aktivitātes pieaugumu neizrāda paaugstinātu stresa toleranci (*Pitcher et al.* 1991). Varētu pieņemt, ka šāda situācija ir tieši saistīta ar visas aizsargfermentu sistēmas aktivēšanas nepieciešamību. Tā piemēram, transgēniem tabakas augiem ar trīskārtīgi palielinātu superoksiddismutāzes aktivitāti līdz ar ievērojamu oksidatīvā stresa

rezistences pieaugumu bija novērojams arī trīskārtīgs askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugums (*Sen Gupta et al.* 1993b).

Antioksidatīvās aizsargsistēmas aktivitātei jābūt vienānai ar aktīvā skābekļa formu destruktīvo potenciālu gan normālā metabolisma laikā, gan stresa situācijās. Ir acīmredzams, ka antioksidatīvā aizsargsistēma augos ir visai ierobežota tās kapacitātē atbildēt uz stresa iedarbību. Atsevišķu fermentu aktivitātes parasti pieaug ne vairāk kā divkārtīgi stresa iedarbībā (*Foyer et al.* 1994). Šī visai mērenā atbildes reakcija kļūst saprotama, ja ņem vērā, ka sistēmā ir ieprogrammēta bojāejai, saskaroties ar ekstrēmu apstākļu iedarbību. Tā piemēram, patogēnu invāzijas gadījumā ir nepieciešama audu un struktūrolbaltumu destrukcija, lai ierobežotu infekcijas izplatīšanos. Lidzšīnējie dati neapstiprina pieņēmumu par to, antioksidatīvā sistēma reaģē uz iespējamo bojājumu ar ātru gēnu ekspresijas izmaiņu, bet drīzāk gan atbild tikai uz reālas bojājumu situācijas iestāšanos. Pārreizējā brīdī nevar atbildēt pilnībā apstiprinoši arī uz jautājumu par pozitīvās antioksidatīvo fermentu gēnu ekspresijas lomu pretstresa reakcijās.

1.5.3. Lipoksigenāze un membrānu lipīdu peroksidācija

Lipoksigenāze (EC 1.13.11.12) ir augos plaši sastopams ferments, nehēma dzelzi saturoša dioksigenāze, kurš katalizē *cis,cis*-1,4-pentadiēnu sistēmu saturošo polinepiesātināto taukskābju un esteru hidroperoksidāciju (*Siedow* 1991). Augu lipoksigenāze oksidē linolskābi par 9- vai 13-hidroperoksīda C₁₈ derivātiem. Sekojošās fermentatīvās reakcijas veidojas dažādi C₁₂ derivāti, to skaitā, arī jasmonskābe (*Sembdner & Parthier* 1993). Pēdējā laika pētījumi liecina, ka lipoksigenāze ir iesaistīta vairākās augu fizioloģiskajās funkcijās. Pie tām pieder augšana un attīstība, aizsardzība pret ievainojumu un patogēniem, novecošanās u.c. Tā kā lipoksigenāze ir nepieciešama jasmonskābes sintēzei, kura ietekmē daudzus fizioloģiskos procesus (*Creelman & Mullet* 1995), var pieņemt, ka atsevišķu lipoksigenāzes izofermentu piedalīšanās fizioloģiskajos procesos ir saistīta ar to darbību jasmonskābes sintēzē. Ir arī dati par to, ka sēklās un lapās lipoksigenāze var izpildīt rezerves olbaltuma funkcijas (*Siedow* 1991). Citas fizioloģiskās funkcijas, kas nav saistītas ar jasmonskābes biosintēzi, varētu būt membrānu degradācija hipersensitīvās rezistences atbildes laikā (*Croft et al.* 1990), antimikrobiālo taukskābju derivātu veidošana (*Ohta et al.* 1990), abscīzskābes sintēze (*Creelman et al.* 1992).

Virkne fakti apstiprina hipotēzi par to, ka lipoksigenāze piedalās membrānu integritātes zaudēšanā novecošanās procesu laikā (*Droillard et al.* 1993). Tas varētu

būt saistīts ar lipoksigenāzes potenciālo substrātu lokalizāciju tieši membrānās, ka arī ar reaktīvu produktu veidošanos, kuri var paaugstināt membrānu caurlaidību. Līdzšinējā informācija gan liecina, ka lielākā daļa augu lipoksigenāžu, ieskaitot arī membrānu saistītās formas, dod priekšroku brīvu taukskābju, nevis membrānu taukskābju, oksidēšanai (*Hildebrand* 1989). Var pieņemt, ka pēc brīvo taukskābju atbrīvošanās no membrānām lipāžu darbības rezultātā, lipoksigenāze katalizē lipīdu peroksidāciju (*Thompson* 1988). Lipīdu derivāti un veidotie brīvie radikāli līdz ar to var izsaukt membrānu funkcijas zudumu.

Lielākā daļa lipoksigenāžu augos ir raksturotas kā šķīstoši fermenti, kas lokalizēti citoplazmā (*Siedow* 1991). Imunoķīmiskā iezīmēšana un frakcionēšanas pētījumi parāda arī membrānu formu esamību (*Vick & Zimmerman* 1987).

Attiecībā uz veģetatīvajiem audiem, daudzos eksperimentos ir atklāta augsta lipoksigenāzes aktivitāte agrās dīgstu attīstības stadijās (*Vernovy-Gerritsen et al.* 1983) un aktīvi augošās lapās ar sekojošu krasu samazināšanos audu nobriešanas laikā (*Douillard* 1979, *Douillard & Bergeron* 1981, *Hertel et al.* 1987). Lapās lipoksigenāzes aktivitāte korelē ar to dzīvās masas pieaugumu (*Kubacka-Zebalska & Kacperska-Palacz* 1980). Raksturīgi arī, ka lipoksigenāzes aktivitāte ievērojami paaugstinās novecošanās laikā un visdažādākajās stresa situācijās (*Dhindsa et al.* 1981, *Vick & Zimmerman* 1987). Tā piemēram, lipoksigenāzes aktivitātes pieaugums un atsevišķu izofermentu izmaiņas ir novērotas pēc infekcijas vairākām augu sugām (*Croft et al.* 1990, *Koch et al.* 1992). Mehāniska ievainošana arī izsauc lipoksigenāzes ekspresijas pieaugumu gan lokāli, gan sistēmiski (*Hildebrand et al.* 1989). Lipoksigenāzes transkriptu līmeņa pieaugums novērots 8 stundu laikā pēc ievainošanas (*Bell & Mullet* 1991). *Arabidopsis thaliana* atklāti dažādi lipoksigenāzes gēni ar dažādu ekspresiju – tikai viens no tiem tika aktivēts ievainojuma ietekmē (*Bell & Mullet* 1993). Visi fizioloģiskie novērojumi par lipoksigenāzes aktivitātes izmaiņām norāda uz zināmu šī fermenta saistību ar etilēna izdalīšanos, jo visas aprakstītās situācijas ir raksturīgas ar relatīvi intensīvu etilēna veidošanos (skatīt 1.2.2.). Pirms natīvā etilēnveidojošā fermenta dabas atklāšanas tika uzskatīts, ka lipoksigenāze varētu piedalīties etilēna biosintēzē no ACKS (*Vick & Zimmerman* 1987). Tā kā šis *in vitro* efekts ir saistīts ar brīvo radikāļu veidošanos lipoksigenāzes reakcijā, bet nevis ar tiešu fermenta darbību, varētu domāt, ka stresa situācijās gan lipoksigenāze, gan etilēna biosintēzes fermenti tiek aktivēti pa kopīgu signālu pārnesei ceļu.

2. MATERIĀLS UN PĒTĪJUMU METODES

2.1. Augu materiāla audzēšana

2.1.1. Graudzāju dīgsti

Graudzāju sēklas ieguva no Priekuļu Selekcijas un izmēģinājumu stacijas (rudzus un kviešus) un Stendes Selekcijas un izmēģinājumu stacijas (miežus). Eksperimentos izmantoja ziemas rudzus (*Secale cereale* L., šķirne Priekuļu), ziemas kviešus (*Triticum aestivum* L., šķirne Mironovskaja 808) un miežus (*Hordeum vulgare* L., šķirne Abava). Vispārējā sēklu sagatavošana ietvēra dezinfekciju 0.1 % KMnO₄ 10 min ar sekojošu aktīvu mazgāšanu ūdenī 10 min, pēc kā sēklas uzbriedināja ūdenī 6 h.

Etilēna izdalīšanās un augšanas ritmiskuma noteikšanai individuālos dīgstos (3.1.1.) sēklas sadiedzēja Petri platēs uz mitra filtrpapīra. Dīgstošas sēklas, kuras atradās aptuveni vienādā attīstības stadijā, izstādīja individuālās mēģenēs (12 x 120 mm, 7 ml) uz mitras vates. Kontroles dīgstus audzēja uz vates Petri platēs. Sēklas diedzēja tumsā 36 h 25°C temperatūrā. Pēc 20 h audzēšanas tumsā, daļu dīgstu pārnesa augšanas kamerā baltā fluorescentajā gaismā (25 W m⁻²) ar fotoperiodu 16 h.

Pārējiem eksperimentiem (3.1.3. – 3.1.5. un 3.2.1. – 3.2.3.) sēklas vienmērīgi izsēja plastmasas foto vanniņās (32 x 25 cm) uz mitras vates. Lai pētītu etilēna indukciju stresa ietekmē (3.1.2.), sēklas izsēja vanniņās ar mitru vermikulītu. Pēc inkubācijas tumsā 25°C temperatūrā, atkarībā no eksperimenta apstākļiem, augus pārvietoja gaismā audzēšanas kamerā vai arī turpināja audzēt termostatā tumsā. Audzēšanas kamerā fotoperiods bija 16 h, temperatūra 20°C un 17°C, attiecīgi dienā un naktī. Gaismu nodrošināja ar fluorescentajām spuldzēm (LD-40 un LB-40), integrālā radiācija augu līmenī 25 Wm⁻². Augus laistīja tikai ar krāna ūdeni, vai arī pievienojot nepieciešamās vielas attiecīgajā koncentrācijā dīgstu apstrādei. Apstrādi ar etilēnproducentiem izdarīja, augus apsmidzinot ar rokas miglotāju ar attiecīgās koncentrācijas šķīdumu (10 ml uz vanniņu). Apstrāde notika ierobežotas gaismas apstākļos un pēc tās augus turēja tumsā vēl 2 h pirms pārvietošanas pilnā apgaismojumā. Tipiskajā gadījumā apstrādāja graudzāju dīgstus, kuru pirmā lapa par 5-10 mm bija izaugusi koleoptiles ārpusē.

Attiecīgā vecuma augu materiālu ievāca no rīta 2 h pēc gaismas perioda sākšanās un izmantoja analizēm nekavējoties pēc audu atdalīšanas vai arī tos saldēja šķidrā slāpekļī un uzglabāja līdz analizēm -25°C temperatūrā.

2.1.3. Priežu sējeņi

Eksperimentos izmantotos 1 gadu vecos priežu (*Pinus sylvestris* L.) sējeņus ieguva no Olaines mežniecības kokaudzētavas (3.3.3.) vai arī no Upsalas kokaudzētavas

Zviedrijā (3.3.2.). Sējeņus izraka martā, pārstādīja 15 x 15 cm māla podos trūdzemē un audzēja augšanas kamerā 12 h fotoperiodā, apgaismojot ar fluorescentajām lampām (fotonu plūsmas blīvums $320 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Temperatūra bija 15°C dienā un 10°C naktī. Pumpuru attīstību inducēja ar apgaismojuma perioda pagarināšanu līdz 14 h un paceļot dienas temperatūru līdz 20°C . Pēc aktīvas dzinuma stiepšanās sākuma gaismas periodu pagarināja līdz 16 h, bet temperatūru izmainīja līdz 25°C dienā un 15°C naktī. Augus laistīja ar destilētu ūdeni ik dienas, bet sabalansētu barības vielu šķīdumu lietoja laistīšanai reizi nedēļā.

In vivo apstrādēm sējeņus migloja ar attiecīgās koncentrācijas šķīdumu, izmantojot rokas miglotāju, apmēram 15 ml uz vienu sējeni. Sējeņus apstrādēja dienas vidū vājā apgaismojumā un palielināta mitruma apstākļos, lai kavētu ķīmikāliju iztvaikošanu. Četras stundas pēc apstrādes augus pārvietoja atpakaļ kamerā. Apstrādi ar inhibitoriem izdarīja 4 h pirms pamatapstrādes.

Skujas ievāca no rīta un nekavējoties lietoja analizēm vai arī saldēja šķidrā slāpekļī un uzglabāja -25°C temperatūrā.

Stresa etilēna biosintēzes pētījumiem izmantoja skujas no zaru galiem, kas tika ievāktas martā un aprīlī no dabiskos apstākļos augošiem priežu kokiem Upsalas dienvidu daļā Zviedrijā. Zarus uzglabāja 4°C temperatūrā, ievietojot polietilēna maisos. Daļai eksperimentu izmantoja arī egļu (*Picea abies* (L.) Karst.) skujas.

2.1.4. Kartupeļu dzinumu *in vitro* kultūra

Materiālu eksperimentiem no kartupeļu (*Solanum tuberosum* L. šķirne Agrie dzeltenie) stublāju eksplantu kultūras ieguva no Dr. Daces Gertneres (Latvijas Universitātes Augu audu kultūru laboratorija). Eksplanti no ilgstošas kartupeļu dzinumu kultūras tika klonēti bezhormonu agara barotnē un audzēti stikla pudelēs ar dažāda veida slēguma korķiem, ka arī etilēnproducenta etefona (hloretilfosfonskābe, HEFS) klātbūtnē. Lietoja sekojošus slēguma veidus: (a) marles korķis, kas nodrošināja gandrīz netraucētu gāzu apmaiņu ar apkārtējo vidi; (b) butadiēna-stirola korķis ar tajā ievietotu caurulīti 3 mm diametrā, kurā ielikta vate, kas uzturēja daļēju gāzu apmaiņu; (c) butadiēna-stirola korķis pilnīgai pudeles noslēgšanai. HEFS pievienoja agara barotnē attiecīgajā galējā koncentrācijā. Vienā pudelē tika kultivēti 20 līdz 30 eksplanti. Augus kultivēja augšanas kamerā *Flora* 25°C temperatūrā. Fotoperiods bija 16 h, apgaismojums no fluorescentajām lampām ar intensitāti 75 līdz $90 \text{ E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ augu līmenī.

Slēguma tipa un etilēnproducenta tiešo ietekmi noteica, analizējot paraugus, kas bija kultivēti dažādos apstākļos. Kultivēšanai izmantoja tikai lapu, tikai posmu, vai arī posmu kopā ar lapu un pumpuru. Pēdējā gadījumā analizēja arī peroksidāzes aktivitāti jaunveidotajā dzinumā. Slēguma tipa pēcietekmi noteica, pārklonējot

materiālu no pirmā tipa eksperimentiem un audzējot apstākļos ar gandrīz neierobežotu gāzu apmaiņu. Ūdeņraža peroksīda ietekmi noteica, pievienojot 3 ml 1 M H₂O₂ mēģenēs augošiem eksplantiem 4 jauno posmu stadijā. Mēģenes aiztaisīja ar korķi un inkubēja kultivēšanas apstākļos 24 h, pēc tam noteica *in vivo* izdalīto etilēnu, bet augu materiālu izmantoja peroksidāzes aktivitātes noteikšanai atsevišķi posmos un lapās.

2.2. Fermentatīvo olbaltumu ekstrakcija

Graudzāju dīgstu fermentu aktivitātes noteikšanai

Audus saldēja šķidrā slāpekli, sasmalcināja ar porcelāna piestiņu porcelāna tiģeli un ekstrahēja 2 reizes ar aukstu acetonu (-20°C, 5 ml uz 1 g materiāla), acetonu atsūca ar vakuumu Buhnera kolbā, pēc tam materiālu žāvēja gaisā. Nepieciešamības gadījumā acetona pulveri glabāja -25°C temperatūrā.

Acetona pulveri ekstrahēja ar 0.1 M nātrija fosfāta buferi pH 7.8 (3 ml bufera uz 0.1 g pulvera) 4°C temperatūrā 15 min, pievienojot 0.1 g nešķīstošā polivinilpirolidona uz 0.1 g acetona pulvera. Homogenātu filtrēja caur kaprona sietu (# 80) un centrifugēja 10 min ar paātrinājumu 16 000 xg. Supernatantu lietoja šķīstošo fermentu aktivitātes noteikšanai (peroksidāze, lipoksigenāze). Pēc ekstrakcijas atlikušo audu materiālu mazgāja 2 reizes 5-kārtīgā ekstrakcijas bufera apjomā ar sekojošu centrifugēšanu, un ekstrahēja 2 h 4°C temperatūrā ar 0.1 M nātrija fosfāta buferi pH 7.8, kas saturēja 1 M KCl. Homogenātu filtrēja un atkārtoti centrifugēja. Supernatantu izmantoja jonu saistītās peroksidāzes aktivitātes noteikšanai. Atlikušo audu materiālu mazgāja 2 reizes buferi ar 1 M KCl, centrifugēja un inkubēja 24 h istabas temperatūrā 0.1 M nātrija fosfāta buferi 2.5 % pektināzes un 0.5 % celulāzes klātbūtnē. Pēc filtrēšanas un centrifugēšanas materiālu lietoja kovalenti saistītās peroksidāzes aktivitātes noteikšanai.

Starpšūnu telpas (ekstracelularās) peroksidāzes aktivitātes noteikšanai, 1 g lapas audu infiltrēja vakuumā 0.1 M nātrija fosfāta buferi (pH 7.8) 2 reizes pa 1 min, izmantojot 10 ml medicīnisko šļirci. Apoplasta mazgājumu ieguva, centrifugējot infiltrētos audus 10 min ar paātrinājumu 1500 xg stobriņos ar perforētu ieliktni šķidrums savākšanai (*Rathmell & Sequeira* 1974). Ekstraktu lietoja brīvi šķīstošās starpšūnu telpas peroksidāzes aktivitātes noteikšanai. No 1 g graudzāju lapas audu ieguva apmēram 250 µl ekstrakta. Tos pašus audus atkārtoti infiltrēja (2 x 1 min) nātrija fosfāta buferi ar 1 M KCl. Pēc centrifugēšanas iegūto ekstraktu izmantoja jonu saistītās šūnapvalka peroksidāzes aktivitātes noteikšanai. Atlikušos audus ekstrahēja, kā aprakstīts iepriekš, lai noteiktu šūnās palikušo (protoplasta) peroksidāzes aktivitāti.

Askorbāta peroksidāzes aktivitātes noteikšanai graudzāju dīgstos un kartupeļu dzinumū audos

Miežu lapu un kartupeļu dzinumū audus sasmalcināja šķidrā slāpekli, lietojot porcelāna piestiņu un ekstrāģēja 4°C temperatūrā 25 mM morfolino-etānsulfonskābes-KOH buferi pH 7.2, kas saturēja 1 % nešķīstošā polivinilpirolidona, 1 mM etilēndiamintetraetiķskābes dinātrija sāls un 1 mM askorbīnskābes. Uz 1 g audu materiāla lietoja 6 ml bufera. Ekstrākcija ilga 15 min. Iegūto homogenātu filtrēja caur neilona sietu (# 80) un centrifugēja 15 min 15 000 xg paātrinājumā 4°C temperatūrā. Supernatantu lietoja askorbāta peroksidāzes aktivitātes noteikšanai. Pirms analīzes ekstraktu uzglabāja 4°C temperatūrā ne ilgāk par 4 h.

Askorbāta peroksidāzes aktivitātes noteikšanai priežu skuļās

Priežu skuļu paraugus sasaldēja šķidrā slāpekli, sasmalcināja ar porcelāna piestiņu porcelāna tīģelī un ekstrāģēja ar 50 mM HEPES buferi (pH 7.2, 6 ml uz g dzīvās masa), kas saturēja 1 mM etilēndiamintetraetiķskābes diNa sāls, 1 mM nātrija askorbāta, 3 % nešķīstošā polivinilpirolidona un 0.3 % Triton X-100. Ekstrākcija ilga 15 min 4°C temperatūrā. Homogenātu filtrēja caur neilona sietu (# 80), centrifugēja 15 000 xg 15 min, un supernatantu lietoja fermenta aktivitātes noteikšanai.

2.3. Fermentu aktivitātes noteikšana

2.3.1. Peroksidāze

Peroksidāzes aktivitāti noteica spektrofotometriski. Reakcijas maisījums (3 ml tilpumā) peroksidāzes aktivitātes noteikšanai sastāvēja no 1.5 ml atbilstošā bufera, 1 ml 0.05 M H₂O₂, 0.4 ml ūdeņraža donora šķīduma un 0.1 ml augu ekstrakta. Absorbāciju reģistrēja uz spektrofotometra attiecībā pret kontroli, kas H₂O₂ vietā saturēja 1 ml H₂O, 1 min pēc reakcijas iniciācijas ar H₂O₂ pievienošanu. Aktivāti noteica līknes lineārajā daļā. Viļņa garums atbilda attiecīgā reakcijas produkta absorbācijas maksimumam dotajos reakcijas apstākļos – benzidīnam 600 nm, vanilīnam 425 nm, gvajakolam 470 nm, dianizidīnam 460 nm, kateholam 395 nm, kafijskābei 410 nm, fenilēndiamīnam 485 nm, ferulskābei 520 nm. Šos ūdeņraža donorus lietoja 0.01 M šķīduma veidā 25 % etanolā, bet grūti šķīstošos savienojumus lietoja piesātinātu

šķīdumu veidā. Askorbāta peroksidāzes aktivitāti noteica, mērot askorbīnskābes absorbcijas kritumu pie viļņa garuma 290 nm ar divstaru *UV-VIS* spektrofotometru *Specord M40*. Askorbātu lietoja nātrija sāls formā, galējā koncentrācijā 1 mM.

Aktivitātes pH optimumu ar dažādiem ūdeņraža donoriem noteica 0.2 M acetāta buferī (pH 4.2, 4.6, 5.0, 5.4, 5.8) un 0.1 M nātrija fosfāta buferī (pH 5.8, 6.2, 6.6, 7.0, 7.4, 7.8). Atbilstoši iegūtajiem rezultātiem, analizēm lietoja sekojošus buferus: gvajakolam, vanilīnam, dianizidīnam, fenilēndiamīnam, kateholam, ferulskābei, kafijskābei – 0.1 M nātrija fosfāta pH 6.0; benzidīnam un askorbīnskābei – 0.2 M acetāta pH 5.4.

2.3.2. Lipoksigenāze

Reakcijas maisījumu lipoksigenāzes noteikšanai sagatavoja atbilstoši aprakstītajai metodikai (*Hertel et al.* 1987). Vienu tilpumu linolskābes izšķīdināja 4 tilpumos absolūtā etanolā. No iegūtā šķīduma 0.4 ml emulģēja 2 h ar magnētiskā maisītāja palīdzību 50 ml H₂O, kas saturēja 0.6 ml 1 M KOH un 0.1 g *Tween-20*. Iegūtajai emulsijai pievienoja 50 ml 0.1 M nātrija fosfāta bufera pH 6.8 un 100 ml H₂O. Fermenta aktivitātes noteikšanai pie 4 ml reakcijas maisījuma pievienoja 0.1 ml ekstrakta no šķīstošās fermenta frakcijas. Ar spektrofotometru reģistrēja absorbcijas pieaugumu 20 min laikā 235 nm viļņa garumā, kas atbilst konjugēto diēnu absorbcijas maksimumam.

2.4. Etilēna analīze

2.4.1. Etilēna izdalīšanās no veselīem augiem

Etilēna izdalīšanās no intaktiem graudzāļu dīgļiem tika noteikta, periodiski aiztaisojot mēģenes, kurās dīgsti auga, ar gumijas korķi un uzkrājot individuālo dīgstu izdalīto etilēnu 2 h. Ar medicīnisko šļirci ņēma gāzu vides paraugu un noteica etilēna daudzumu ar gāzu hromatogrāfu *Chrom-5*. Pēc katra 2 h uzkrāšanas perioda mēģenes ventilēja 0.5 h. Pēc katras etilēna analīzes mērija dīgstu garumu.

Etilēna daudzumu gāzu paraugā (1 ml) noteica pēc kalibrācijas liknes. Hromatogrāfs bija apgādāts ar liesmas jonizācijas detektoru un stikla kolonnu, kas pildīta ar aktivētu Al₂O₃. Kā nesējgāzi izmantoja hēliju. Kolonnas temperatūra bija 80°C, bet detektora temperatūra – 110°C.

2.4.2. Stresa etilēna izdalīšanās no graudzāļu dīgstiem

Eksperimentos lietoja fotosintētiski aktīvus rudzu dīgstus, kuru garums bija apmēram 50 mm, bet pirmā lapa bija izaugusi koleoptila ārpusē 5 līdz 10 mm. Rudzu dīgstus atbrīvoja no vermikulīta, uzmanīgi noskalojot ūdenī. Etilēna analīzei paraugi no 5 dīgstiem tika inkubēti (intakti vai ievainoti, vai arī sadalīti ar skalpeli atbilstošās daļās; 300 līdz 400 mg) 15 ml tilpuma stikla pudelītēs, kas saturēja 0.1 ml ūdens dehidratācijas novēršanai. Pudelītes noslēdza ar gumijas korķiem un inkubēja tumsā 28°C temperatūrā. Izdalītā etilēna daudzumu noteica pēc 1 h. Atsevišķos eksperimentos skābekļa klātbūtni inkubācijas vidē likvidēja, izpūšot pudelītes ar argonu, pēc kam tās inkubēja kā parasti.

Lapu ievainoja, to saduršot ar adatu desmit reizes, vai arī sadalot gareniski uz pusēm. Dažos eksperimentos lapu atbrīvoja no koleoptila. Koleoptili pāršķēla gareniski, neatdalot to no dīgsta, un lapu atbrīvoja no tā aptvēruma. Noteica arī ievainošanas pakāpes ietekmi uz etilēna izdalīšanos no atbrīvotām lapām – 5 lapas sadalīja 2 līdz 14 segmentos un inkubēja 15 ml pudelītēs.

Etilēna izdalīšanās gradientu gar lapu noteica, dažāda vecuma pirmo lapu, kas bija atbrīvota no koleoptila, sadalot attiecīgajos segmentos. Atsevišķos eksperimentos lietoja arī sadalītas, no koleoptila neatbrīvotas lapas. Etilēna izdalīšanos noteica pēc 1 h inkubācijas tumsā.

Noteica arī koleoptila atdalīšanas ietekmi uz etilēna izdalīšanās dinamiku. Šim nolūkam lietoja 1 cm garas sekcijas no dīgsta pamatnes, kas sastāvēja no aptverošā koleoptila segmenta un pirmās lapas tā iekšpusē. Vairākus paraugus (25 segmenti katrs) glabāja mitrā kamerā noteiktu laiku (0 līdz 150 min), pēc tam atdalīja koleoptilu no lapas. Daļai paraugu lapas segmentu vienlaicīgi sadalīja gareniski uz pusēm. Pēc tam segmentu paraugus ievietoja pudelītēs un noslēdza ar gumijas korķiem. Izdalītā etilēna daudzumu noteica katras 30 min. Pēc katras analīzes pudelītes izpūta ar saspiesto gaisu un atkal noslēdza. Par kontroli izmantoja lapas segmentus ar neatdalītu koleoptilu.

Etilēna veidošanās dinamikas eksperimentiem, no koleoptiliem atbrīvotas lapas infiltrēja ar H₂O vai ar 0.1 mM cikloheksimīdu un inkubēja tumsā. Etilēna daudzumu noteica katras 10 min turpmāko 4 h laikā. Pudelītes ventilēja ar saspiesto gaisu pēc katras analīzes.

Etilēnu analizēja ar gāzu hromatogrāfu kā aprakstīts iepriekš (2.4.1.).

2.4.3. Etilēna izdalīšanās kartupeļu eksplantu kultūrā

Etilēna saturu kultivēšanas vidē noteica, ņemot gāzu paraugus (1 ml) ar medicīnisko šļirci no kartupeļu eksplantu kultūras attiecīgā slēguma veida pudeļu gāzes

fāzes 24 h pēc pārkultivēšanas. Lai noteiktu slēguma veida pēcietekmi uz etilēna veidošanās intensitāti, jaunveidotos dzinumus 10 dienas pēc subkultivēšanas sākuma vidē ar praktiski neierobežotu gāzu apmaiņu sadalīja attiecīgajās daļās un inkubēja 4 h slēgtās 15 ml stikla pudelītēs, pēc tam noteica izdalītā etilēna daudzumu. H_2O_2 ietekmi uz etilēna izdalīšanos no intaktiem eksplantiem noteica, kultivējot lapas un stublāju eksplantus pa vienam 35 ml tilpuma mēģenēs, līdz jaunajiem dzinumiem attīstījās 6 līdz 7 starpposmi. Pēc apstrādes ar 1 ml 0.5 M H_2O_2 uz mēģeni, tās noslēdza un uzkrāja etilēnu 24 h.

Etilēnu analizēja ar gāzu hromatogrāfu kā aprakstīts iepriekš (2.4.1.).

2.4.4. Stresa etilēna izdalīšanās no priežu skujujām

Etilēna izdalīšanās dinamikas eksperimentiem 0.5 g svaigi atdalītu skuju ievietoja 10 ml stikla pudelītēs, kas saturēja 1 ml atbilstošās inkubācijas vides un noslēdza ar polipropilēna korķiem. Lai noteiktu, vai efektoru un inhibitoru lietošanas veids ietekmē ķīmikāliju nonākšanu skuju audos, atdalītas skuju inkubēja veselās, sadalītas uz pusēm vai arī sadalītas 1 cm garos segmentos. Tā kā ķīmikāliju lietošanas veids būtiski neietekmēja etilēna izdalīšanās intensitāti, visos eksperimentos tika lietotas tikai intaktas atdalītas skuju. Pudelītes apgaismoja ar fluorescento gaismu ($350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) visā inkubācijas perioda laikā. Gāzes paraugus analizēm ņēma ar hipodermisko šļirci ar 1 h intervāliem. Pēc katra 1 h uzkrāšanas perioda pudelītes intensīvi vēdināja 10 s.

Citiem inkubācijas eksperimentiem, skuju paraugus (0.25 g) ievietoja 10 ml pudelītēs 1 ml atbilstošās vides un inkubēja tādos pašos apstākļos, kā aprakstīts iepriekš. Pēc noteikta laika intervāla pudelītes noslēdza un noteica uzkrātā etilēna vai etāna daudzumu.

Stresa efektoru un inhibitoru galējās koncentrācijas inkubācijas vidē bija sekojošas: 0.88 M (3 %) H_2O_2 , 6 mM $Na_2S_2O_5$, 0.1 mM aminoetoksivinilglicīna, 2 mM aminooksietīkskābes, 5 mM $CoCl_2$, 0.1 mM cikloheksimīda, 2.5 mM selenometionīna.

Etilēna un etāna daudzumu noteica ar *Shimadzu GC-9A* gāzu hromatogrāfu, kas bija apgādāts ar liesmas joinizācijas detektoru un stikla kolonnu, kas pildīta ar aktivētu Al_2O_3 (# 60-80, 2 m x 5 mm x 3 mm). Kolonnas temperatūra bija 90°C, bet detektora temperatūra – 120°C. Par nesējgāzi izmantoja slāpekli (30 ml min^{-1}). Hromatogrāfs bija savienots ar *Shimadzu C-R5A Chromatopac* datoru gāzu daudzumu noteikšanai. Etilēna un etāna pīķi tika identificēti pēc standarta gāzes paraugu hromatogrāfijas laikiem.

2.4.5. Endogēnā etilēna satūra noteikšana

Endogēnā etilēna saturu graudzāju dīgstu lapās noteica pēc divām atšķirīgām metodēm. Atbilstoši oriģinālajai metodikai, šķidrā slāpekli sasaldētus lapas segmentus ievietoja 15 ml stikla pudelītēs, kuras par 50 % bija pildītas ar šķidrā slāpekli atdzesētām stikla lodītēm. Pudelītes hermētiski noslēdza ar gumijas korķiem un kratīja 3 līdz 5 min līdz audu pilnīgai sasmalcināšanai. Pudelītes uzsildīja ūdens vannā līdz istabas temperatūrai un, ņemot ar šļirci 1 ml gāzu vides parauga, noteica etilēna daudzumu.

Atbilstoši aprakstītajai metodikai (Abeles 1973), etilēnu, kas atbrīvojās no saberztajiem lapas audiem, piesaistīja ar dzīvsudraba perhlorātu. Apmēram 200 mg audu saberza ar stikla nūjiņu pudelītē 1 ml dzīvsudraba perhlorāta klātbūtnē tā, lai audi visu laiku būtu apsegti ar šķidrumu. Tūlīt pēc tam pudelītes noslēdza ar gumijas korķiem un pēc 1 h injicēja pa 1 ml 4 mM LiCl caur korķi. Atbrīvotā etilēna daudzumu noteica pēc 4 h.

Abas metodes deva identiskus rezultātus – netika atrasta statistiski būtiska atšķirība atkarībā no lietotās metodes.

2.4.6. Etilēna izdalīšanās hidrolīzes procesā

Augu audu hidrolīzi izdarīja 40 līdz 50 ml tilpuma mēģenēs. Lai noteiktu hidrolīzes procesā izdalītā etilēna daudzumu, audu paraugu (1 g dzīvās masas) vai 1 ml atbilstošās analizējamās vides (audu ekstrakts vai paraugvielu šķīdums) ievietoja mēģenēs un izlīdzināja tilpumu līdz 5 ml ar ūdeni. Lai iegūtu pH 12.5, pievienoja 5 mL 6% NaOH piesātinātā Na₂SO₄ šķīdumā. Mēģenes iztaisīja ar polipropilēna korķiem un inkubēja 5 h 65°C temperatūrā. Pēc atdzesēšanas līdz istabas temperatūrai, gāzu saturs mēģeņu gāzes fāzē tika noteikts ar gāzu hromatogrāfu, kā aprakstīts iepriekš (2.4.4.). Lai noteiktu hidrolīzes izdalītā etilēna dinamiku, vairāki atkārtoti paraugi tika inkubēti un hidrolīzi apstādināja noteiktos laikos ar strauju atdzesēšanu.

Lai ekstrahētu hidrolīzē etilēnu izdalošās vielas, audu paraugus (15 g) homogenizēja kafijas dzirnaviņās un ekstrahēja ar 50 ml destilēta H₂O 1 h. Pēc filtrēšanas caur stikla filtru, homogenātu centrifugēja ar paātrinājumu 10 000 xg 12 min. Dzidru supernatantu (8 ml) uznesa *Sephadex G-15* kolonnai (12 x 150 mm), kas bija izlīdzināta ar H₂O. Etilēnu izdalošās vielas eluēja secīgi ar H₂O, 0.5 kālija-nātrija fosfāta buferi pH 7.0, un kālija-nātrija fosfāta buferi pH 10. Plūsmas ātrums bija 30 ml h⁻¹, un 5 ml tilpuma frakcijas savāca un hidrolizēja, kā aprakstīts iepriekš. Kontrolei hromatografēja ACKS šķīdumu (10 ng 5 ml H₂O).

2.4.7. Etilēnveidojošā fermenta aktivitātes noteikšana

Etilēnveidojošā fermenta aktivitāti rudzu dīgstu lapas noteica, infiltrējot lapas segmentus (300 mg dzīvās masas) vakuumā ar 1 mM ACKS (2 reizes pa 2 min). Audus ievietoja 15 ml pudelītēs, noslēdza ar polipropilēna korķiem un inkubēja 28°C temperatūrā 1 h. Etilēnveidojošā fermenta aktivitātes dinamiku noteica, infiltrējot lapas audus ar 1 mM ACKS vai 1 mM ACKS plus 0.1 mM cikloheksimīda. Audus ievietoja slēgtā pudelē un izdalītā etilēna daudzumu noteica katras 10 min sekojošo 4 h laikā. Etilēnu analizēja ar gāzu hromatogrāfu, kā aprakstīts iepriekš (2.4.1.).

Etilēnveidojošā fermenta aktivitāti priežu skužās noteica, inkubējot atdalītas skužas 1 mM ACKS šķīdumā slēgtās 10 ml tilpuma stikla pudelītēs. Izdalītā etilēna daudzumu noteica ar 1 h intervāliem. Etilēna analīzes apstākļi bija kā aprakstīts iepriekš (2.4.4.).

2.4.8. 1-Aminociklopropān-1-karbonskābes satura noteikšana

Rudzu lapu audus (1 g) ACKS satura noteikšanai sasmalcināja šķidrā slāpekli un ekstrahēja 30 ml 80 % acetona 60°C temperatūrā 1 h. Homogenātu filtrēja caur filtrpapīru. Acetonu iztvaicēja rotācijas iztvaikotājā vakuumā 45°C temperatūrā. Sausās nogulsnes izšķīdināja 3 ml H₂O plus 2 ml hloroforma. ACKS noteica ūdens fāzē atbilstoši aprakstītajai metodikai (*Lizada & Yang* 1979). pie 0.7 ml ekstrakta 15 ml stikla pudelītē pievienoja 4 μmol HgCl₂. Pudelīti aiztaisīja ar gumijas korķi un glabāja ledusūdenī. Analīzei apmēram 0.6 ml atdesēta NaOCl maisījuma ar 10 N NaOH (2:1) injicēja ar šļirci caur korķi. Pudelīti sakratīja 10 s, inkubēja 4 min ledusūdenī, sakratīja vēlreiz 10 s un paņēma 1 ml gāzes fāzes etilēna analīzei. ACKS pārvēršanas par etilēnu efektivitāte bija 60-70 %. Kopējo un saistīto ACKS daudzumu noteica pēc hidrolīzes skābā vidē (*Schierle & Schwark* 1988). Malonil-ACKS daudzumu aprēķināja, no iegūtā ACKS satura pirms hidrolīzes atņemot iegūto ACKS daudzumu pēc hidrolīzes.

Lai ekstrahētu ACKS no priežu skužām, 0.25 g audu parauga sagrieza 1 mm gabaliņos un ekstrahēja 2 reizes ar 80 % etanolu 4°C temperatūrā 2 h. Lai atdalītu fenolu dabas savienojumus, ekstrakcijas videi pievienoja 4 % nešķīstošā polivinilpirolidona. Homogenātus centrifugēja ar paātrinājumu 10 000 xg 10 min un supernatantus iztvaicēja vakuumā 38°C temperatūrā, lietojot *Savant SpeedVac AES2000* sistēmu. Nogulsni izšķīdināja 1 ml hloroforma plus 3 ml H₂O. Pēc centrifugēšanas (10 000 xg, 10 min) ūdens fāzi lietoja ACKS satura noteikšanai kā aprakstīts iepriekš.

2.4.9. Hloretilfosfonskābes analīze

HEFS saturu noteica pēc etilēna izdalīšanās hidrolīzes laikā. Audu paraugu (0.5-1.0 g dzīvās masas) ievietoja 40 ml mēģenē, pielēja H₂O līdz 5 ml tilpumam un pievienoja 0.8 g Na₂SO₄ un p.8 ml 3.75 N HCl. Mēģenes hidrolizēja 1 h 65°C temperatūrā. Pēc izvēdināšanas pievienoja 5 ml 6 % NaOH piesātinātā Na₂SO₄ un hidrolizēja 65°C temperatūrā 1 h. HEFS daudzumu aprēķināja kā starpību starp etilēna daudzumu, kas izdalījās no audiem, kas apstrādāti ar HEFS, un etilēna daudzumu no kontroles audiem.

2.5. Olbaltumvielu satura noteikšana

Olbaltumvielu saturu noteica pēc saistišanās ar krāsvielu *Coomassie BB* (Bradford 1976) atbilstošā modifikācijā (Spector 1978). Krāsvielu pagatavoja, 60 mg *Coomassie BB G-250* izšķīdinot 1 l 3 % HClO₄ un izfiltrējot. Analīzei pie 1.5 ml krāsvielas šķīduma pievienoja 1.5 ml analizējamā parauga. Pēc 20 min spektrofotometriski noteica absorbciju viļņa garumā 595 nm. Standartlikni noteica ar vērša sirds albumīnu.

2.6. Lignīna noteikšana

Lignīna satura analīzei lietoja iepriekš aprakstītas metodikas (Johnson *et al.* 1961, Alibert & Boudet 1979). Rudzu lapu materiālu sasmalcināja šķidrā slāpekli un ekstrahēja istabas temperatūrā pēc kārtas sekojošās vidēs: (a) 2 reizes pa 10 min H₂O, (b) 2 reizes pa 10 min 1 M NaCl ar 2 % *Triton X-100*, (c) 5 h etanola-benzola maisījumā (1:2). Pēc izžāvēšanas paraugu hidrolizēja 2 h 70°C temperatūrā 2M NaOH un mazgāja 2 reizes pa 10 min H₂O un 10 min acetona, kam sekoja žāvēšana. Analīzei pie 2 mg materiāla pievienoja 0.5 ml 25 % acetilbromīda ledus etiķskābē un inkubēja 70°C temperatūrā 30 min. Pēc straujas atdzesēšanas pievienoja 0.5 ml 2 M NaOH un 0.1 ml 7.5 M hidroksilamīna hidrohlorīda un papildināja līdz 10 ml ar ledus etiķskābi. Pēc filtrācijas caur filtrpapīru pēc 1 h spektrofotometriski noteica absorbciju pie 280 nm. Lignīna saturu aprēķināja pēc ekstinkcijas koeficienta $\epsilon=24$ (Johnson *et al.* 1961).



2.7. Lipīdu peroksidācijas noteikšana

Lipīdu peroksidācijas pakāpe tika analizēta, nosakot malondialdehīda saturu ar tiobarbiturskābi atbilstoši aprakstītajai metodikai (*Heat & Packer* 1968). Skujas sagrieza 1 mm segmentos, un 0.5 g audu ekstrahēja 5 ml 1 % o-fosforskābes ar 0.5 % tobarbiturskābes 45 min 95°C temperatūrā. Paraugus atdzesēja un filtrēja caur stikla filtru (# 3). Malondialdehīda-tiobarbiturskābes kompleksu ekstrahēja ar butanolu. Ekstraktu dzidrināja, centrifugējot 10 min ar paātrinājumu 10 000 xg. Absorbēcija tika noteikta spektrofotometriski viļņa garumos 400, 420, 460 un 535 nm, lai novērstu pigmentu mijiedarbības efektu. Reālo malondialdehīda koncentrāciju aprēķināja, lietojot ekstinkcijas koeficientu $156 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.8. Elektroforēze

Lai sadalītu skābās un sārmainās izoperoksidāzes, izmantoja poliakrilamīda gēla elektroforēzes metodi (*Davis* 1964). Šim nolūkam lietoja vertikālās elektroforēzes aparātu *LaborMIM OE-112*.

Anodo elektroforēzi izdara 7.5 % gēlā ar pH 8.9, gēla garums 6 cm. Par koncentrējošo gēlu lietoja 1.5 % gēlu ar pH 6.9, 1 cm garumā. Koncentrēšanu izdara ar 2 mA strāvu uz gēlu, sadalīšanu – 5 mA uz gēlu. Tris-glicīna buferi pH 8.3 izmantoja sadalīšanai.

Katodo elektroforēzi izdara 7.5 % gēlā ar pH 4.3. Koncentrējošais gēls bija 1.5 % ar pH 6.7. Sadalīšanai lietoja β -alanīna-etikāskābes buferi pH 4.5.

Uz katra gēla uznesa pa 0.3 ml ekstrakta un 0.1 ml indikatora šķīduma (bromfenolzilais anodai sadalīšanai un metilēnzaļais – katodajai). Peroksidāzes izoformu krāsošanai lietoja tāda paša sastāva reakcijas vidi, kā peroksidāzes aktivitātes noteikšanai. Krāsošanas ilgums – 2 h. Zonu krāsojuma intensitāti noteica vizuāli.

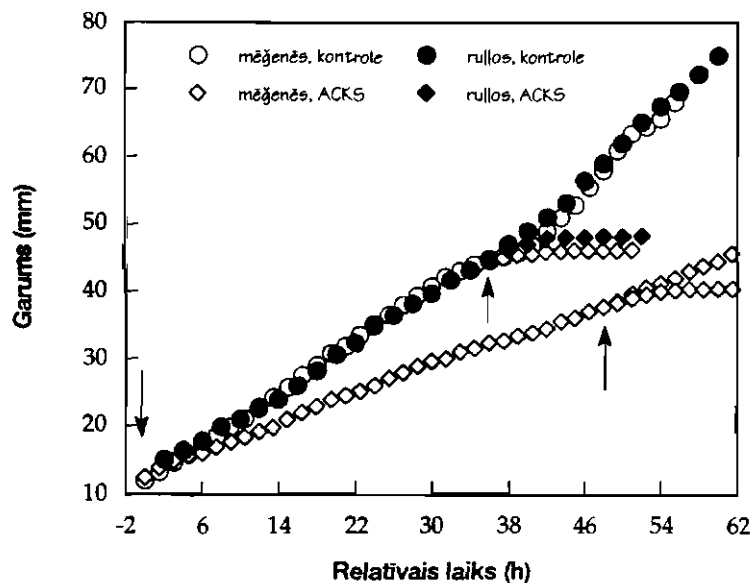
3. REZULTĀTI UN TO ANALĪZE

3.1. Etilēna piedalīšanās graudzāju dīgstu augšanas regulācijā

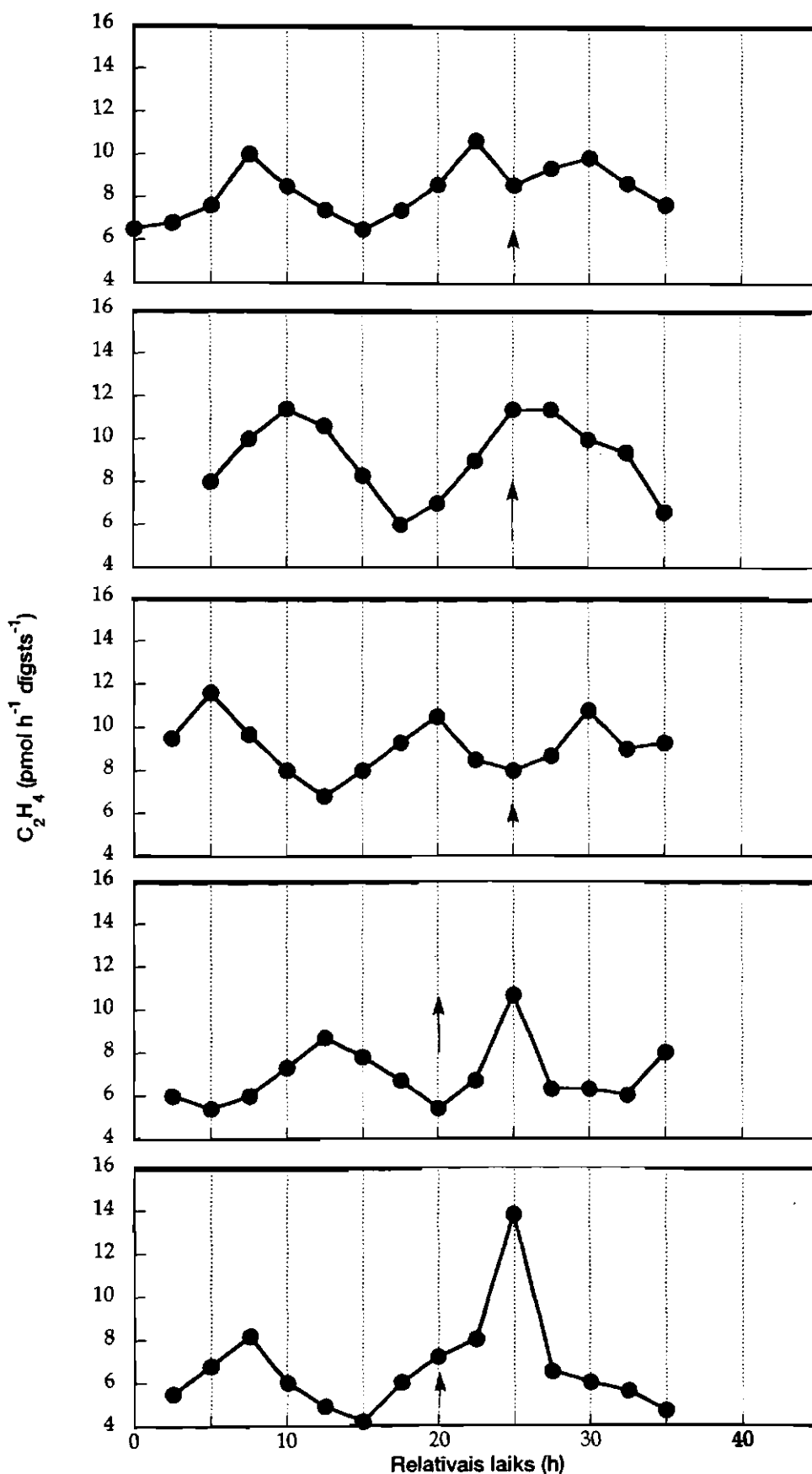
3.1.1. Etilēna izdalīšanās un augšanas ritmiskums intaktos dīgstos

Pētījumi par etilēna fizioloģisko lomu augos lielākajā daļā gadījumu tiek izdarīti ar atdalītām augu daļām vai orgāniem (*Abeles et al.* 1992). Šāda pieeja ir saprotama, ņemot vērā auga organisma mijiedarbību komplicēto raksturu. Tomēr, lai arī t.s. stresa etilēna veidošanās notiek identiski etilēna biosintēzei intaktos augos, etilēna izdalīšanās izmaiņas ievainojuma rezultātā var atspoguļot audu metabolisma vispārīgo izmaiņu sekundāro ietekmi. Tāpēc principiāli svarīga ir informācija par etilēna izdalīšanās likumsakarībām intaktos augos.

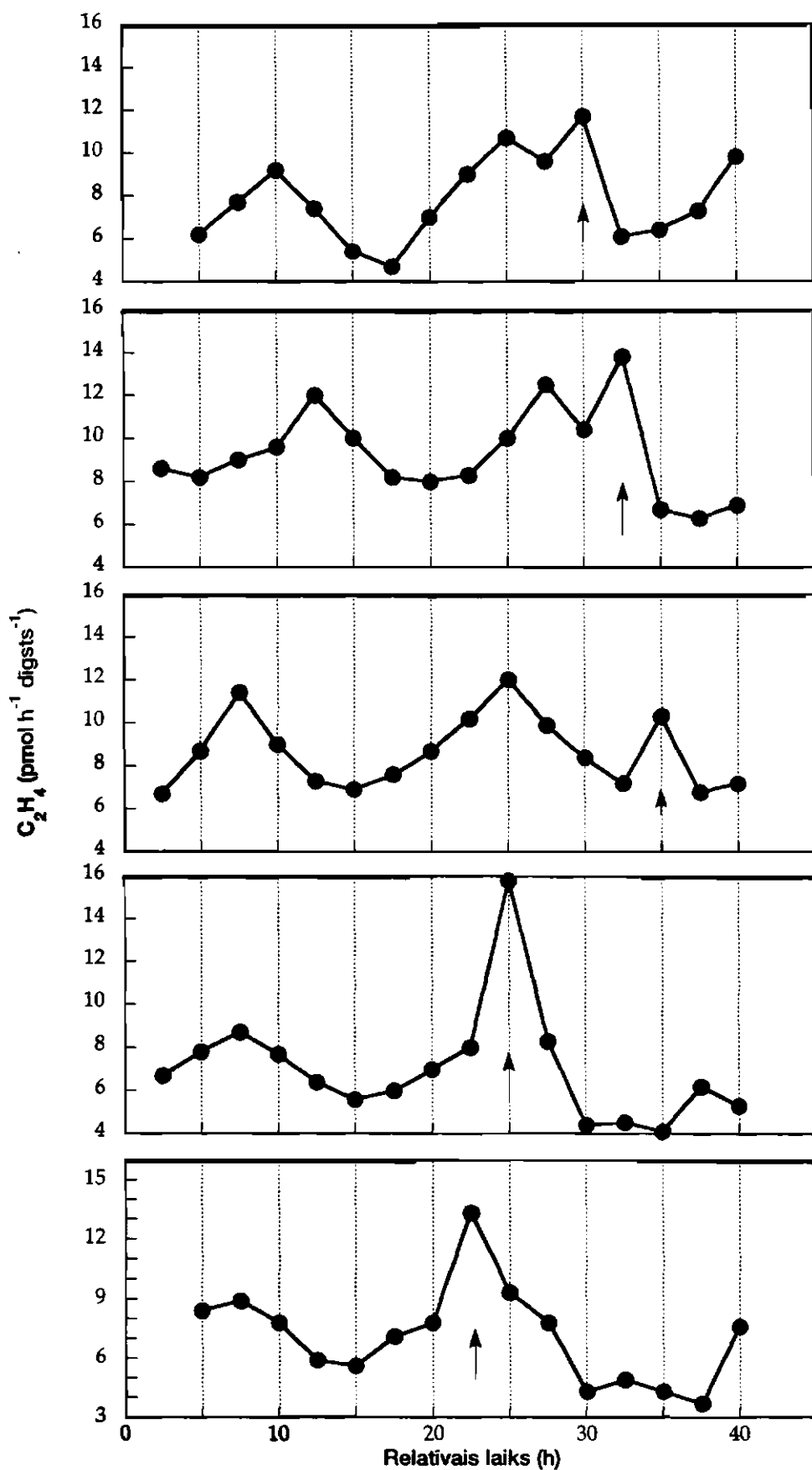
Mūsu eksperimentu ietvaros tika izveidota daļēji slēgta sistēma etilēna izdalīšanās noteikšanai no intaktiem etiolētiem graudzāju dīgstiem, audzējot augus 7 ml tilpuma stikla mēģenēs. Tā kā mēģenes periodiski tika aizvērtas ar polipropilēna aizbāžņiem, lai uzkrātu izdalīto etilēnu (2 stundu uzkrāšana ar sekojošu 0.5 stundu ilgu ventilāciju), bija jāpārlicinās, vai šādi augšanas apstākļi neietekmē augu augšanu. Šim nolūkam paralēli tika izdarīti dīgstu garuma mērījumi eksperimentālajā sistēmā un netraucētas gāzu maiņas apstākļos. Dati 1. attēlā skaidri parāda, ka periodiskā mēģeņu slēgšana/ventilācija neietekmēja rudzu dīgstu augšanu pat 62 stundu ilga eksperimenta apstākļos. Vidējais lapas parādīšanās laiks ārpus koleoptiles bija vienāds abos variantos. Bez tam, augšanas apstākļi neizmainīja arī dīgstu reakciju uz ACKS pievienošanu barības vidē (1. attēls).



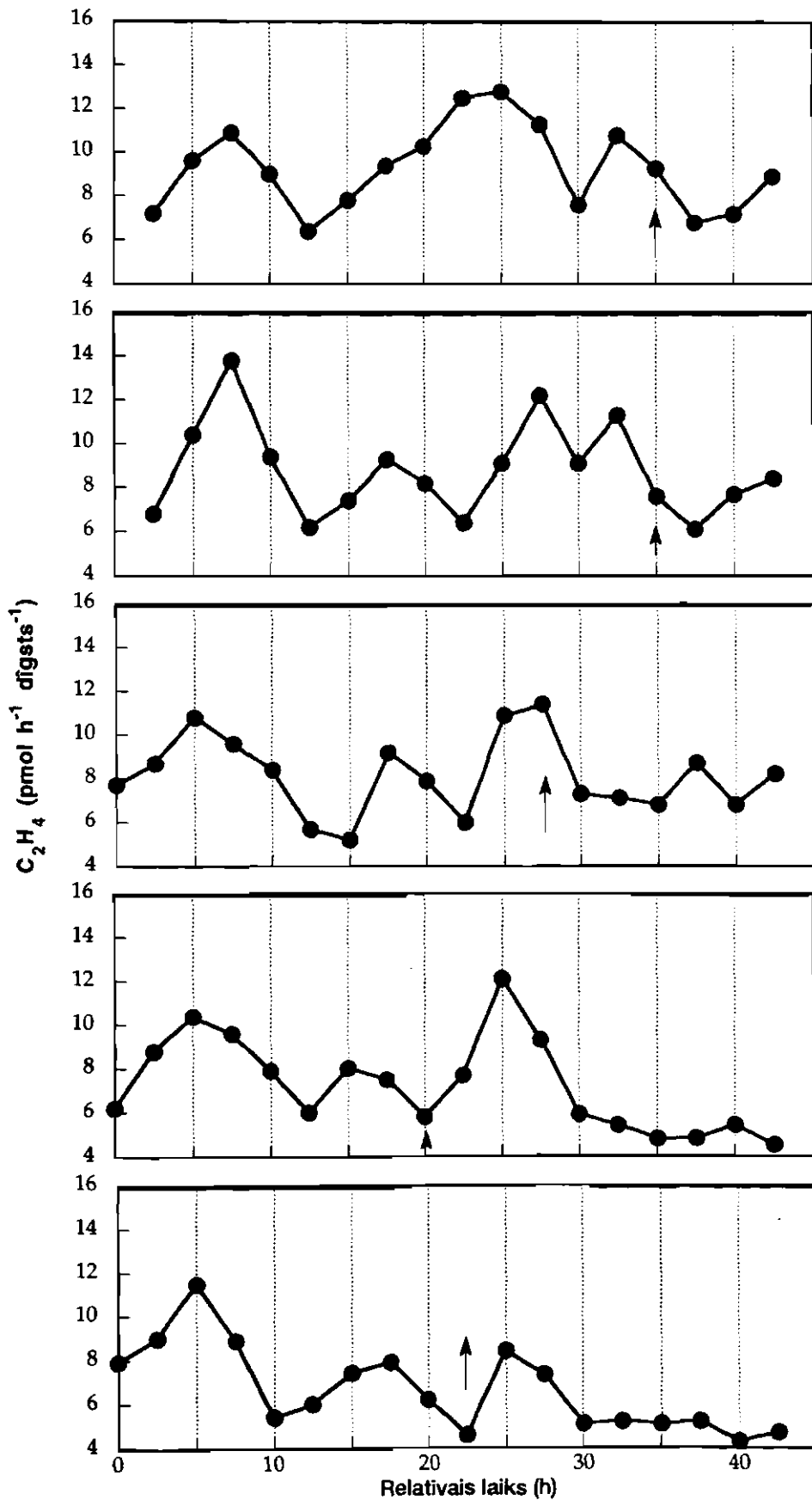
1.attēls. Rudzu dīgstu augšanas dinamika dažādos audzēšanas apstākļos un ACKS ietekmē. Etiolētus dīgstus audzēja tumsā periodiski noslēgtās 7 ml tilpuma mēģenēs vai arī filtrpapīra ruļļos. Garuma noteikšanai dīgstus īslaicīgi apgaismoja ar mazas intensitātes neaktīvu zaļo gaismu. Dati parāda vidējos no 100 augiem katram variantam. Bultas apzīmē ACKS pievienošanas laikus.



2.A attēls. Etilēna izdalīšanās dinamika no individuāliem miežu dīgšiem mēģenēs nepārtrauktā tumsā vai fotoperioda apstākļos. Gaismas apstākļus apzīmē līnijas grafiku augšpusē. Bultas norāda lapas izaugšanu koleoptiles ārpusē.

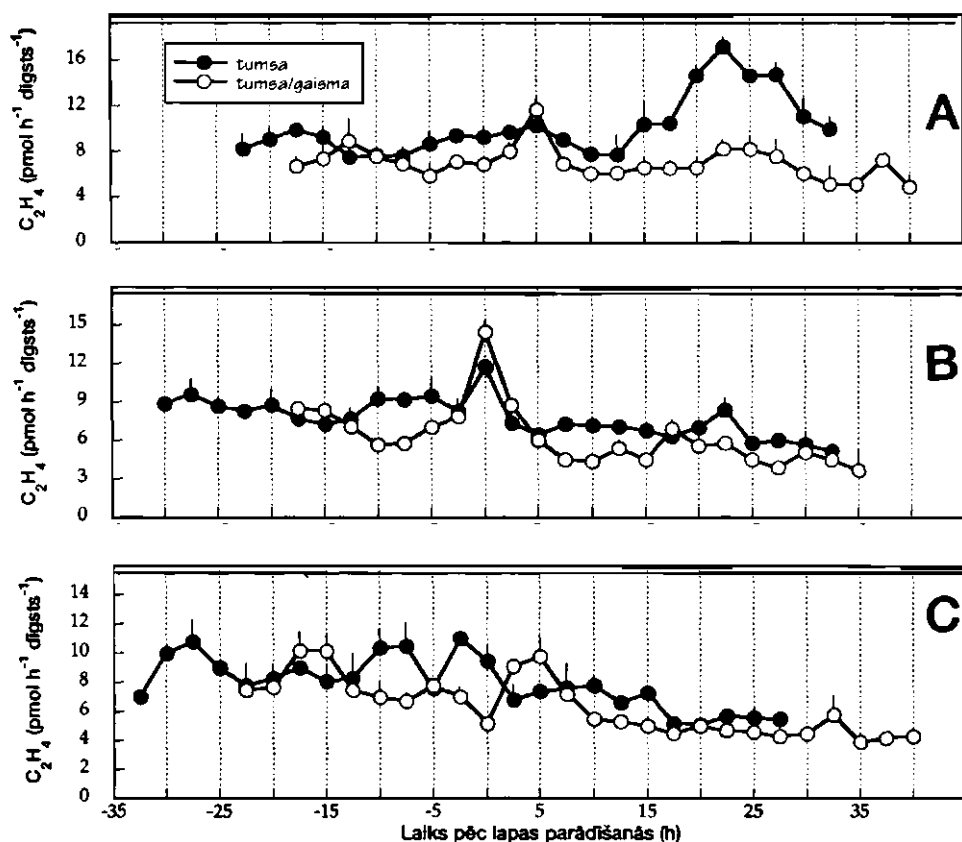


2.B attēls. Etilēna izdalīšanās dinamika no individuāliem kviešu dīgšiem mēģenēs nepārtrauktā tumsā vai fotoperioda apstākļos. Gaismas apstākļus apzīmē līnijas grafiku augšpusē. Bultas norāda lapas izaugšanu koleoptiles ārpusē.

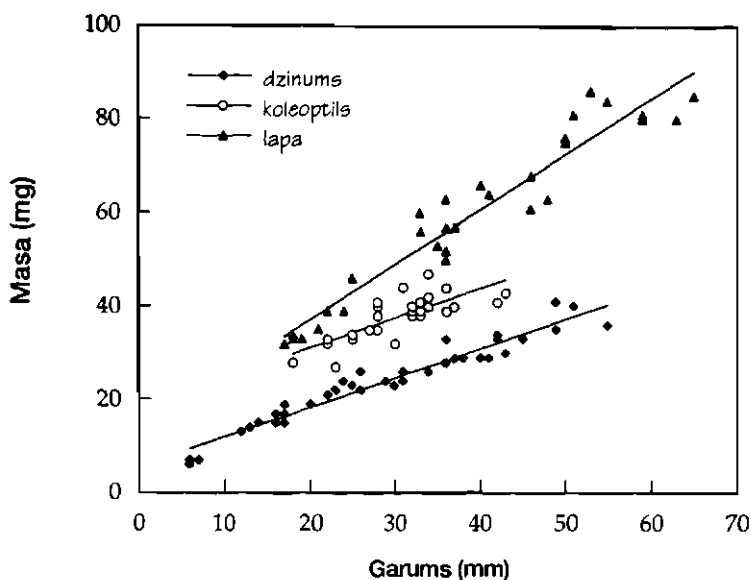


2.C attēls. Etilēna izdalīšanās dinamika no individuāliem rudzu dīgstiem mēģenēs nepārtrauktā tumsā vai fotoperioda apstākļos. Gaismas apstākļus apzīmē līnijas augšpusē. Bultas norāda lapas izaugšanu koleoptiles ārpusē.

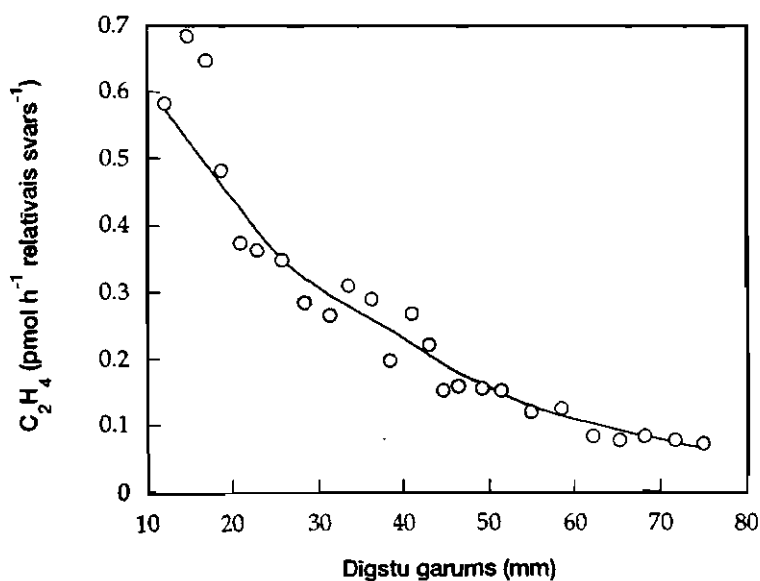
Etilēna izdališanās dinamika no intaktiem individuāliem miežu, kviešu un rudzu dīgstiem nepārtrauktā tumsā vai 20 stundu tumsā ar sekojošu gaismas/tumsas periodisku maiņu parādīta 2. attēlā. Dīgstiem tumsā bija raksturīgas etilēna izdališanās intensitātes fluktuācijas. Miežu un kviešu dīgstiem etilēna izdališanās cikla ilgums bija 16 stundas, bet rudziem – 12 stundas. Individuālie dīgsti nebija sinhroni attiecībā uz etilēna izdališanās maksimumiem laikā, bez tam, etilēna izdališanās amplitūda atsevišķiem augiem bija atšķirīga. Gaismas ieslēgšana neizmainīja etilēna izdališanās ciklisko raksturu, taču gaisma izsauca koleoptiles augšanas apstāšanos un lapas izaugšanu tā ārpusē 2.5 līdz 5 stundas pēc gaismas perioda sākuma. Lapas iznākšana koleoptiles ārpusē izraisīja etilēna izdališanās ritma izjukšanu gan tumsā, gan gaismā augošajiem dīgstiem. Sinhronizējot individuālo dīgstu etilēna izdališanās dinamiku atbilstoši laikam, kad notika lapas izaugšana koleoptiles ārpusē, redzams, ka lapas izaugšanas process saistīts ar etilēna izdališanās pieaugumu (3. attēls). Etiolētiem dīgstiem šis pieaugums bija visai neizteikts, izņemot kviešu dīgstus (3.B attēls). Turklāt, bija novērojamas atšķirības starp sugām pieauguma parādīšanās laika ziņā. Salīdzinot tumsā augošus etiolētus un fotoperioda apstākļos augošus graudzāļu dīgstus, jāsecina, ka gaismas apstākļi statistiski būtiski neietekmēja etilēna izdališanās intensitāti kviešu un rudzu dīgstiem (3.B un C attēls). Pretēji tam, etilēna izdališanās no etiolētiem miežu dīgstiem 22 stundas pēc lapas izaugšanas ārpusē koleoptila pieauga apmēram divas reizes, salīdzinot ar fotoperioda ietekmētiem dīgstiem, un sekojoši samazinājās 13 stundas vēlāk (3.A attēls).



3.attēls. Vidējā etilēna izdališanās intensitāte pēc lapas izaugšanas koleoptiles ārpusē miežu (A), kviešu (B) un rudzu (C) dīgstiem. Dati ir vidējie no vismaz 5 individuālajiem dīgstiem uz variantu +SE.



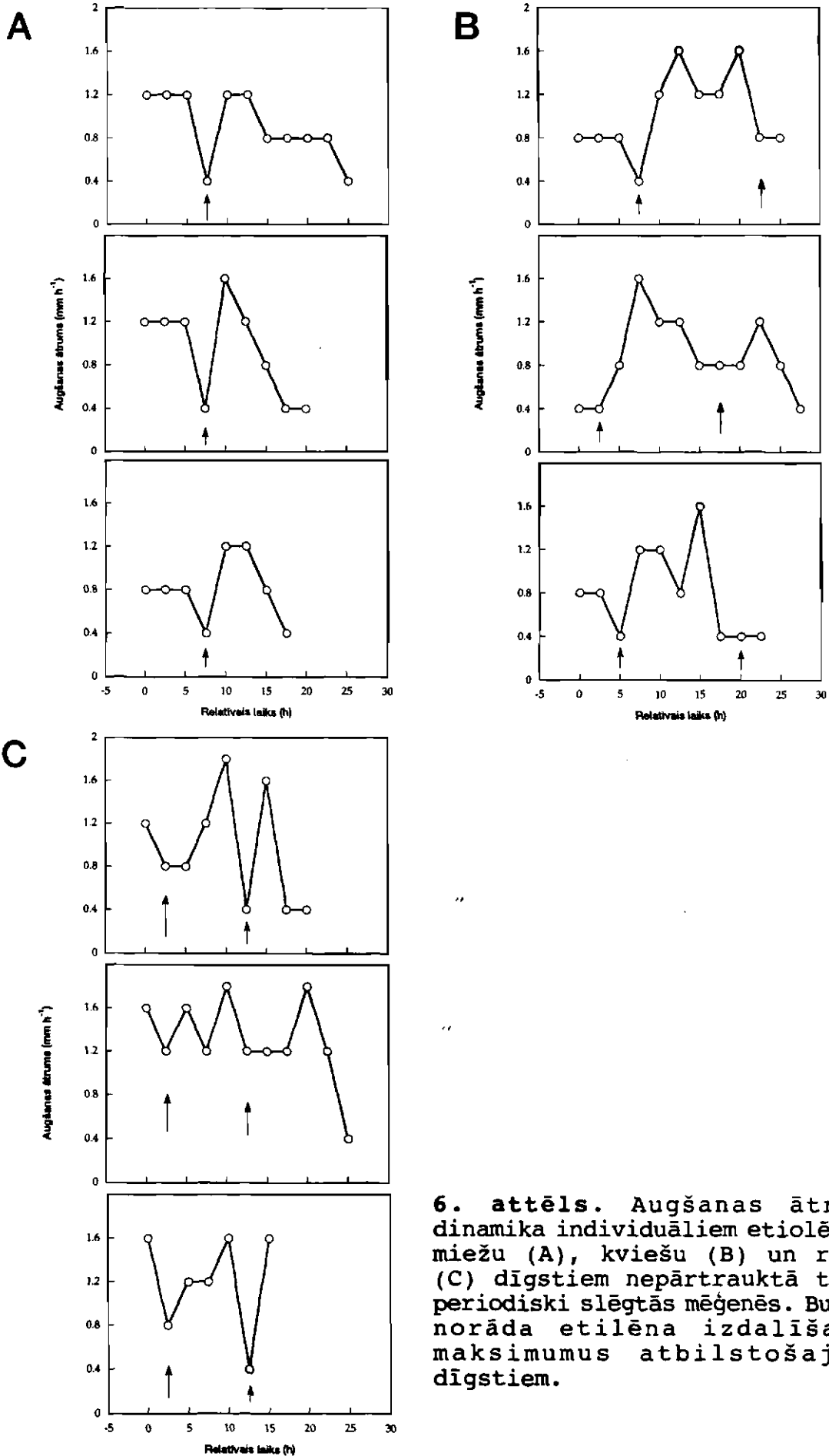
4. attēls. Sakarība starp masu un garumu individuāliem etiolētiem miežu dīgstiem.



5. attēls. Sakarība starp etilēna izdalīšanās intensitāti un dīgstu garumu etiolētiem miežu dīgstiem.

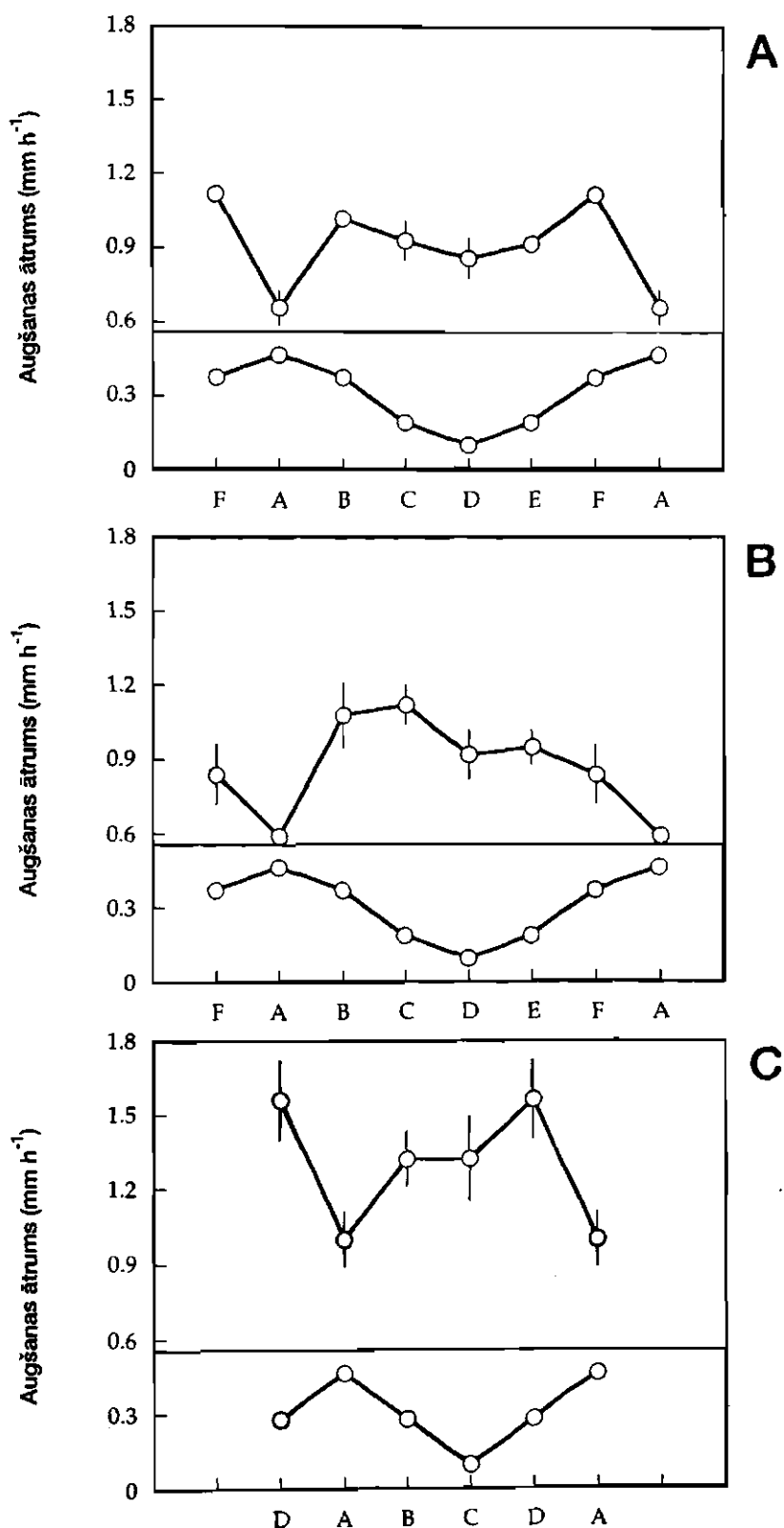
Tā kā starp graudzāļu dīgstu garumu un masu eksistē tieša lineāra sakarība (4. attēls), bija iespējams, ņemot vērā dīgstu garuma dinamiku, noteikt sakarību starp etilēna izdalīšanos uz masas vienību un dīgstu garumu. Kā redzams, neatkarīgi no tā, ka vidējais izdalītā etilēna daudzums no individuāliem dīgstiem līdz ar to garuma un masas pieaugumu izmainījās maz (3. attēls), etilēna veidošanās intensitāte uz masas vienību samazinājās desmitkārtīgi (5. attēls).

Paralēli etilēna izdalīšanās noteikšanai tika analizēta arī individuālo dīgstu augšanas dinamika. Kā redzams no datiem 6. attēlā, visu analizēto graudzāļu sugu dīgstiem bija novērojamas augšanas ātruma fluktuācijas, pie kam, augšanas minimuma periodiem bija tendence sakrist ar attiecīgo individuālo dīgstu etilēna izdalīšanās



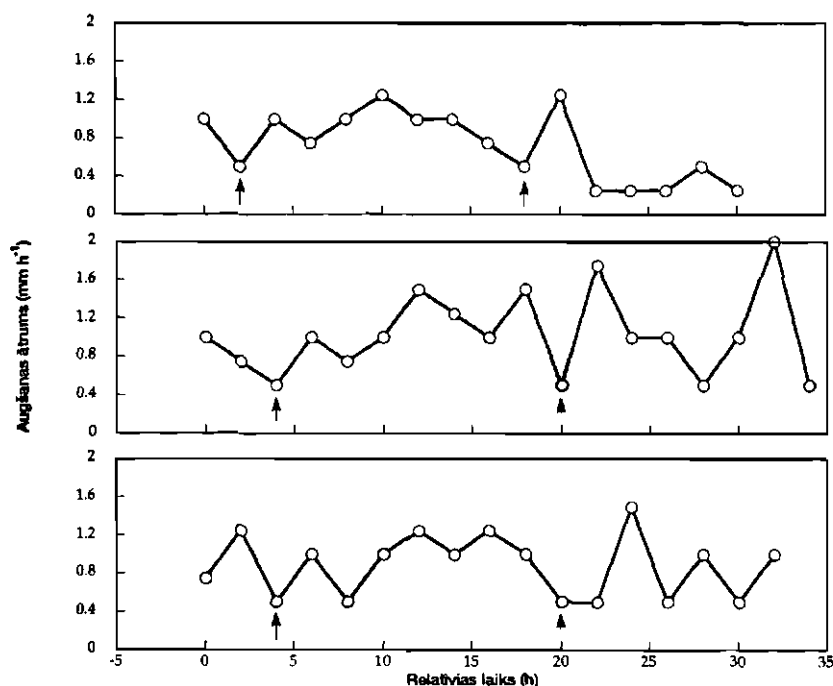
6. attēls. Augšanas ātruma dinamika individuāliem etioloģētiem miežu (A), kviešu (B) un rudzu (C) dīgšiem nepārtrauktā tumsā periodiski slēgtās mēģenēs. Bultas norāda etilēna izdalīšanās maksimumus atbilstošajiem dīgšiem.

maksimumiem. Aprēķinot vidējos augšanas ātrumus katrā noteiktā etilēna izdalīšanās cikla posmā, var konstatēt, ka vidējais augšanas ātrums etilēna izdalīšanās maksimuma laikā tiešām ir statistiski būtiski zemāks par augšanas ātrumu pārējā laika periodā (7. attēls).

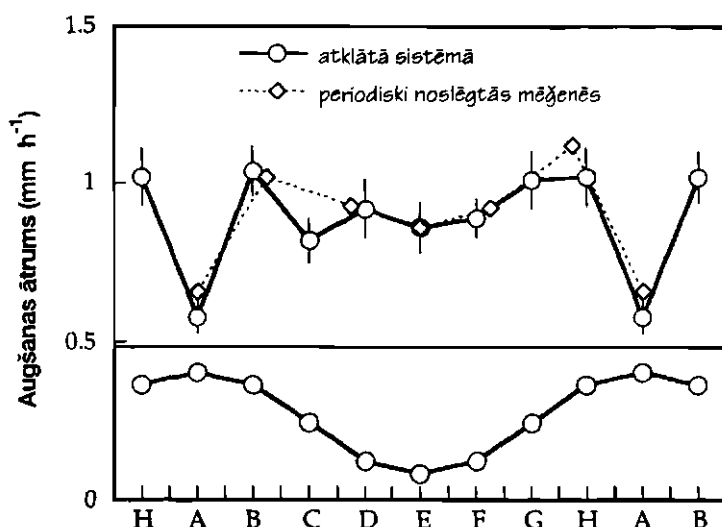


7. attēls. Sakarība starp etiolētu miežu (A), kviešu (B) un rudzu (C) dīgstu augšanas ātrumu un etilēna izdalīšanās ritmu fāzēm. Dati reprezentē vidējos no 50 dīgstiem \pm SE.

Lai pārbaudītu, vai augšanas ātruma fluktuācijas nav saistāmas ar mēģeņu periodisko slēgšanu/ventilēšanu dotā eksperimenta apstākļos, tika noteikta arī augšanas ātruma dinamika individuāliem miežu dīgstiem, kuri attīstījās atklātā sistēmā ar neierobežotu gāzu apmaiņu. Arī šādiem dīgstiem bija raksturīgas ievērojamas augšanas fluktuācijas (8. attēls). Uz augšanas ātruma dinamikas datu pamata tika atrasti attiecīgo dīgstu augšanas minimuma periodi, kuri atkārtojās ik pēc 16 stundām. Nosakot vidējos augšanas ātrumus lielākam skaitam dīgstu ($n=100$) atbilstoši hipotētiskajai etilēna izdalīšanās fluktuācijai, atklātās sistēmas apstākļos ieguva teorētisko augšanas ātruma



8. attēls. Augšanas ātruma dinamika etiolētiem miežu dīgstiem nepārtrauktā tumsā atklātā sistēmā.



9. attēls. Sakarība starp etiolētu miežu augšanas ātrumu atklātā sistēmā un hipotētisko etilēna izdalīšanās ritmu fāzi. Salīdzinājumam parādīta attiecīgā eksperimentāli iegūtā sakarība periodiski noslēgtās mēģenēs.

sadalījumu, kurš precīzi atbilda daļēji slēgtajā sistēmā iegūtajiem praktiskajiem rezultātiem (9. attēls). Tātad, veselīem tumsā augošiem graudzāļu dīgšiem raksturīgs etilēna izdalīšanās cikliskums, bet maksimālās etilēna izdalīšanās fāzē notiek dīgstu lineārās augšanas ātruma būtiska samazināšanās.

Balstoties uz šiem rezultātiem, var uzskatīt, ka etilēna izdalīšanās oscilācijas ir endogēnas un tiek inducētas reizē ar dīgšanas sākšanos un nav atkarīgas no citu ārējo faktoru darbības. Pretēji tam, līdz šim novērotais etilēna izdalīšanās ritmiskums bija diurnālas dabas, t.i., to inducēja gaismas-tumsas secīgas izmaiņas (*El-Beltagy et al.* 1976, *Rikin et al.* 1984, *Vanden Driessche et al.* 1988, *Morgan et al.* 1990).

Ir visai sarežģīti noteikt precīzu ritmiskās etilēna izdalīšanās lokalizāciju veselos graudzāļu dīgstos. Summāro etilēna izdalīšanās līmeni var veidot etilēns, kas izdalās no atsevišķām auga daļām, tai skaitā, arī no saknēm un sēklas. Tomēr, agrākie pētījumi mūsu un citās laboratorijās ir parādījuši, ka ievainojuma atkarīgā etilēna sintēze pastiprināti notiek tieši graudzāļu koleoptiles augšgalā (*Satler & Kende* 1985). Arī fakts, ka etilēna izdalīšanās oscilācijas tiek izjauktas pēc koleoptiles augšanas apstāšanās un lapas izaugšanas tās ārpusē (2. attēls), netieši norāda, ka etilēna izdalīšanās ritmiskums ir augošu koleoptiļu raksturīga iezīme.

Atklāts paliek jautājums par ritmiskās etilēna izdalīšanās fizioloģisko pamatu. Citos augos novērotos atsevišķu fermentu aktivitātes un olbaltuma satura cirkādos ritmus kontrolē ritmiska attiecīgo gēnu ekspresija (*Kloppstech* 1985, *Deng et al.* 1990). Tiek uzskatīts, ka oscilācijas etilēna izdalīšanā no kokvilnas dīgšiem ir saistītas ar svārstībām etilēna biosintēzes fermentu aktivitātē (*Rikin et al.* 1984). Alternatīva iespēja varētu būt dažādu etilēna biosintēzes endogēnu efektoru satura ritmiskas izmaiņas (*Yang & Hoffman* 1984).

Atrastā sakarība starp etilēna izdalīšanos un augšanas ātruma svārstībām ir saistīta ar visai būtiskas fizioloģiskas problēmas atrisināšanu. Lai arī etilēns ir vispārzināms lineārās augšanas inhibitors, tā fizioloģiskās funkcijas stresam nepakļautos veģetatīvajos audos ir pilnīgi neskaidras. Esošos pierādījumus par etilēna darbību attiecībā uz lineāro augšanu var grupēt sekojoši: pirmkārt, augšanas inhibēšana ir viena no atbildes reakcijām uz eksogēnā etilēna iedarbību. Otrkārt, etilēns ir viens no faktoriem, kas izraisa stresotu augu lineārās augšanas inhibēšanu (*Goeshl et al.* 1966). Treškārt, šāda sakarība starp etilēna izdalīšanos un augšanas inhibēšanu intakstos dīgstos līdz šim nav aprakstīta. Paradoksāls ir jau fakts, ka visvairāk etilēna producē tieši aktīvi dalošas un augošas šūnas (mūsu eksperimenti, *Abeles et al.* 1992). Dotie eksperimenti atklāj jaunu pieeju šīs problēmas risināšanā, saistot individuālu dīgstu etilēna veidošanās fluktuācijas ar to augšanas ātruma fluktuācijām. Šo sakarību cēloniskā pamata atklāšana ir turpmāko pētījumu mērķis.

3.1.2. Etilēna biosintēzes indukcija stresa ietekmē

Etilēna biosintēzes pieaugums mehāniskā ievainojuma rezultātā, piemēram, sadalot augu daļās, ir viena no visvairāk pētītajām parādībām etilēna fizioloģijā (Abeles *et al.* 1992). Tomēr, ievainojuma pakāpe, kas izraisa minimālo vai maksimālo etilēna atbildes reakciju ir sugas specifiska pazīme. Ir zināms, ka aktīvi augoši audi ļoti intensīvi izdala etilēnu (mūsu pētījumi – 5. attēls, Fuchs & Lieberman 1968, Saltveit & Dilley 1978, Satler & Kende 1985). Graudzāļu dīgstiem šādi lapas audi ir lokalizēti koleoptiles (pirmā lapa) vai aptverošās lapas iekšpusē (otrā un sekojošās lapas) (Kemp 1980). Var pieņemt, ka šāda lokalizācija ietekmē etilēna izdalīšanos no stresotiem graudzāļu dīgstiem. Tā piemēram, izdarot vienkāršu eksperimentu ar 4 dienas vecu kviešu dīgstu, kuram koleoptiles iekšpusē atrodas apslēptas augošās pirmā un otrā lapa, var pārliecināties, ka dīgsti, kuriem lapas secīgi atbrīvotas no sedzošo audu aptvēruma, izdala ievērojami vairāk etilēna, nekā dīgsti ar segtām lapām (1. tabula). Tātad, gadījumā ar graudzāļu dīgstiem nevar runāt vienkārši par ievainojuma stresa inducēto etilēna veidošanos. Šī parādība tika tuvāk pētīta eksperimentos ar rudzu dīgstiem.

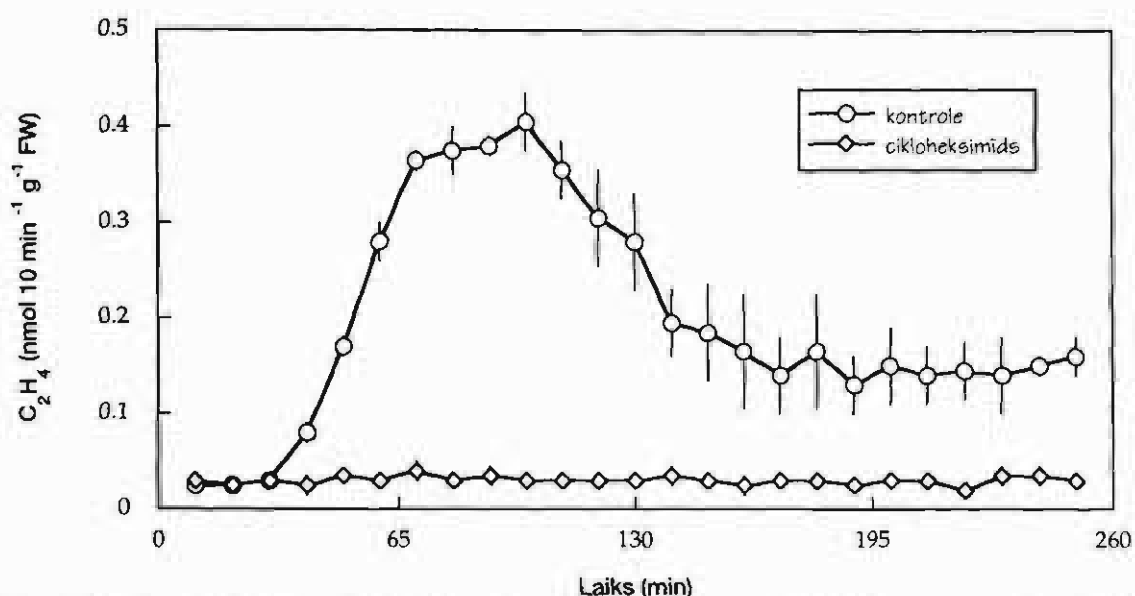
Gaismā augušu rudzu dīgstu sadalīšana sastāvdaļās izsauca etilēna veidošanās indukciju (2. tabula). Vairāk nekā 80 % summārā etilēna izdalīja pirmā lapa, tāpēc etilēna veidošanās dinamika tika pētīta nogrieztā rudzu lapā. Kā redzams no 10. attēla, apmēram 30 minūšu *lag* periods bija nepieciešams pēc lapas atdalīšanas, lai parādītos statistiski būtisks etilēna izdalīšanās intensitātes pieaugums. Maksimālais pieaugums

1. tabula. Sedzošo audu ietekme uz etilēna izdalīšanos no 4 dienas vecu kviešu dīgstu lapas un koleoptiles audiem. Dati parāda vidējos no 4 paraugiem \pm SE.

Augu materiāls	Etilēna veidošanās,	
	$\text{nmol hr}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FW}$	%
Lapas koleoptila iekšienē	0.16 ± 0.01	46
1. lapa atbrīvota no koleoptila	0.35 ± 0.04	100
1. & 2. lapa atbrīvota no koleoptila	0.48 ± 0.06	137

2. tabula. Etilēna izdalīšanās no vesela rudzu dīgsta un atsevišķām tā daļām. Dati parāda vidējos no 5 paraugiem \pm SE. Katra analīze tika izdarīta divas reizes.

Auga daļa	Etilēna izdalīšanās,	
	$\text{nmol hr}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FW}$	$\text{nmol hr}^{-1} \text{dīgsts}^{-1}$
Intakts dīgsts	0.15 ± 0.02	0.010 ± 0.001
Pirmā lapa	1.09 ± 0.26	0.025 ± 0.005
Koleoptīle	0.07 ± 0.01	0.002 ± 0.0
Sakne	0.11 ± 0.01	0.004 ± 0.001



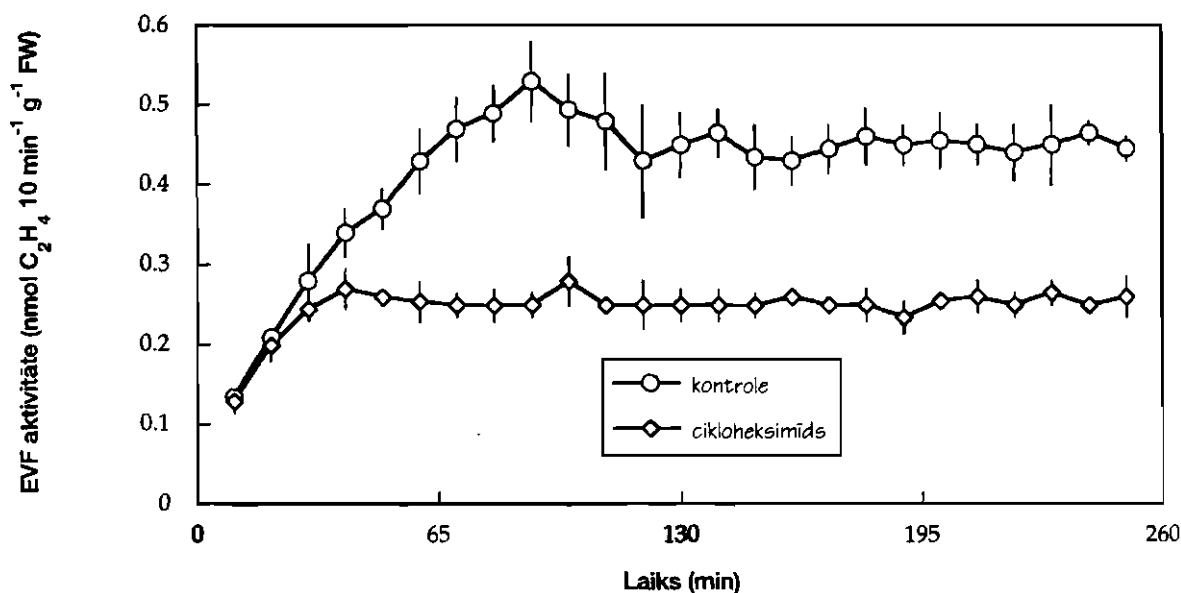
10. attēls. Etilēna izdalīšanās dinamika no atdalītām, no koleoptiles atbrīvotām fotosintētiski aktīvām 4 dienas vecām rudzu pirmajam lapām. Lapas inkubēja veselas vai pēc infiltrācijas ar 0.1 mM cikloheksimīdu. Dati rāda vidējos no 3 paraugiem, katrs 25 lapas, \pm SE, kur SE bija lielāks par simboliem.

14 reizes pārsniedza bāzes intensitāti. Lapu infiltrācija ar 0.01 mM cikloheksimīdu tūlīt pēc lapu nogriešanas pilnībā novērsa etilēna izdalīšanās pieaugumu, liecinot par olbaltumvielu *de novo* sintēzes piedalīšanos indukcijas procesā, kas novērota arī agrākos pētījumos (Abeles & Abeles 1972, Saltveit & Dilley 1979, Konze & Kwiatkowski 1981). ACKS sintēzes olbaltuma sintēze *de novo* ir aprakstīta audu ievainojuma rezultātā (Boller & Kende 1980). Jāatzīmē, ka šāda etilēna izdalīšanās dinamika principā atgādina literatūrā aprakstīto tipisko ievainojuma etilēna veidošanās dinamiku (Saltveit & Dilley 1978, Konze & Kwiatkowski 1981). Redzams, ka paralēli etilēna izdalīšanās pieaugumam atdalītās rudzu lapās tika inducēta ACKS sintēze, pie tam, process bija neatkarīgs no tā, vai lapa bija apsegta ar koleoptili, vai arī atbrīvota (3. tabula). ACKS saturs pieaugumu pilnībā bloķēja apstrāde ar cikloheksimīdu. Tomēr malonil-ACKS saturs bija augstāks tajās lapās, kas tika inkubētas, pārklātas ar koleoptili.

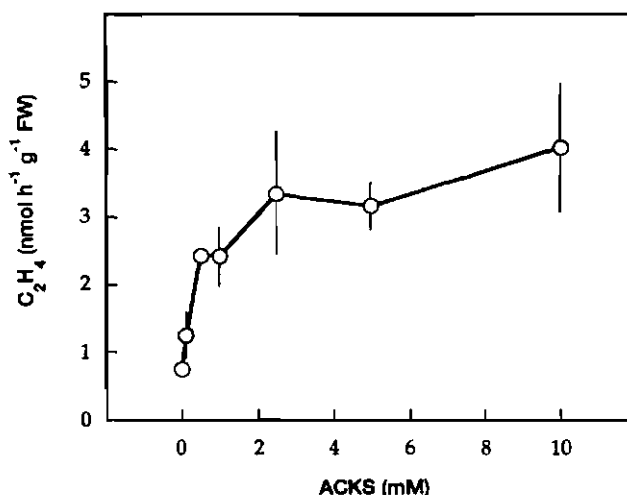
Etilēna izdalīšanās pieaugumu pavadīja EVF aktivitātes pieaugums (11. attēls), kuru noteica, infiltrējot rudzu lapas tūlīt pēc nogriešanas ar ACKS šķīdumu piesātinošā

3. tabula. Koleoptiles ietekme uz endogēno etilēna saturu, ACKS un malonil-ACKS līmeni pirmajās rudzu lapās, kas inkubētas mitrā kamerā. Vidējie no 3 paraugiem \pm SE.

Lapu vairogs	Laiks pēc nogriešanas,		C ₂ H ₄ , nmol g ⁻¹ FW	ACKS nmol g ⁻¹ FW	MACKS nmol g ⁻¹ FW
	min				
Segtas	0		0.12±0.04	3.60±0.0	5.20±0.30
	90		0.12±0.03	4.74±0.15	6.71±0.38
Atbrīvotas	90		0.13±0.02	4.46±0.18	5.06±0.30
Atbrīvotas + cikloheksimīds	90		0.12±0.04	3.48±0.20	5.13±0.32



11. attēls. EVF aktivitātes dinamika no atdalītām, no koleoptiles atbrīvotām fotosintētiski aktīvām 4 dienas vecām rudzu pirmajam lapām. Lapas inkubēja infiltrētas ar 1 mM ACKS vai pēc infiltrācijas ar 1 mM ACKS plus 0.1 mM cikloheksimīds. Dati rāda vidējos no 3 paraugiem, katrs 25 lapas, \pm SE.

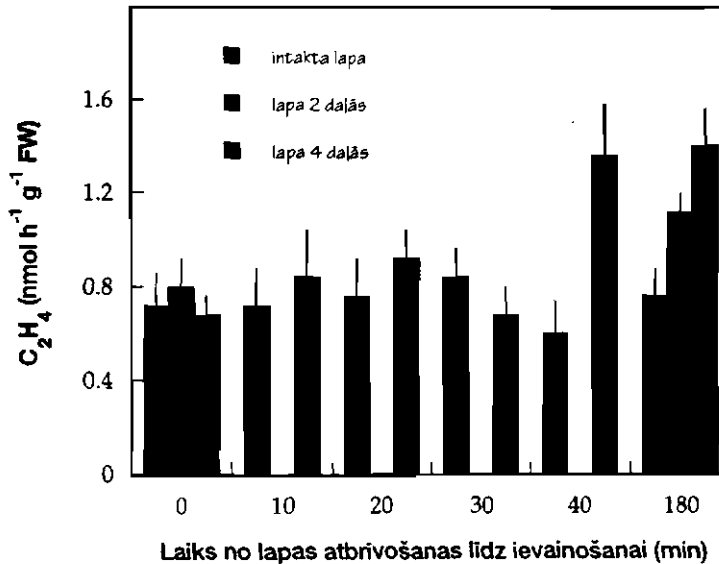


12. attēls. EVF aktivitātes *in situ* atkarība no ACKS koncentrācijas infiltrācijas šķīdumā. Dati rāda vidējos no 5 paraugiem \pm SE.

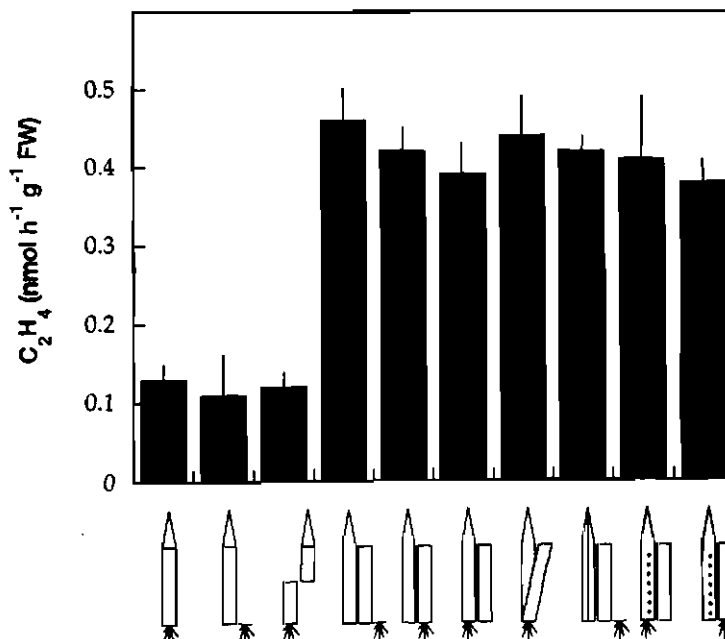
koncentrācijā (12. attēls). EVF aktivitātes pieaugums turpinājās 90 minūtes pēc lapas nogriešanas, un *lag* periods pirms tā netika novērots (11. attēls). Priekšapstrāde ar cikloheksimīdu novērsa apmēram pusi no EVF aktivitātes pieauguma. Jau agrāk tika novērota stresa atkarīgās EVF aktivitātes apspiešana ar cikloheksimīdu, liecinot par fermenta sintēzes indukciju *de novo* (Schierle et al. 1989, Boller 1990). Mūsu eksperimentos novērotais EVF aktivitātes pieaugums 30 min laikā pēc atdalīšanas (gan ar, gan bez cikloheksimīda apstrādes), acīmredzot, ir saistīts ar pakāpenisku fermentam pieejamās ACKS koncentrācijas palielināšanos, ko izraisa relatīvi lēna ACKS difūzija.

Audu ievainošanas pakāpes ietekme uz etilēna izdalīšanos ir parādīta 13. attēlā. Etilēna izdalīšanās intensitāte nebija atkarīga no audu ievainošanas pakāpes, ja lapas sadalīšana tika izdarīta 30 minūšu laikā pēc tās atdalīšanas. Tomēr, 40 un vairāk minūtes pēc lapas atdalīšanas, tās audu sadalīšana stimulēja etilēna veidošanos.

Rezultāti 14. attēlā ilustrē novērojumu, ka etilēna izdalīšanās pieaugumu lapā izsauc drīzāk koleoptila noņemšana no lapas, nevis vienkārši tās ievainošana atdalīšanas procesā, jo, piemēram, sakņu atdalīšana neizsauca etilēna izdalīšanās pastiprināšanos. Tajā pašā laikā, koleoptiles noņemšana bez vienlaicīgas lapas un



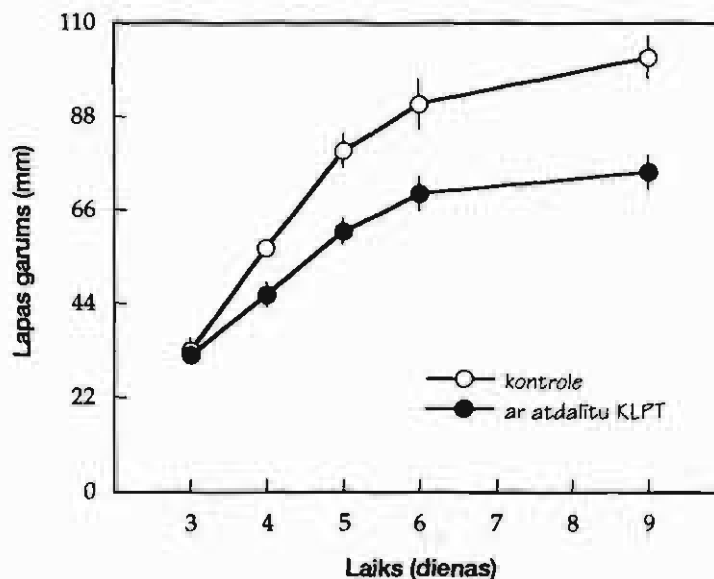
13. attēls. Audu ievainošanas pakāpes ietekme uz etilēna izdalīšanās intensitāti no rudzu lapām. Lapas nogrieza, atbrīvoja no koleoptiles un inkubēja mitrā kamerā 0-180 min, pēc tam izdarīja sadalīšanu segmentos. Dati rāda vidējos no 3 paraugiem ±SE.



14. attēls. Etilēna izdalīšanās no rudzu dīgstiem kā atbilde uz dažāda veida ievainojumu. Shēmas rāda ievainojuma veidu, kas izdarīts tieši pirms inkubēšanas. Dati ir vidējie no 4 paraugiem ±SE.

sakņu sistēmas savainošanas inducēja maksimālu etilēna veidošanās pieaugumu. Tāpēc tika pārbaudīta koleoptila noņemšanas ietekme uz intaktu dīgstu lapas augšanas dinamiku. Koleoptilu noņemšana no dīgstiem, kuriem pirmā lapa vēl nebija izaugusi koleoptila ārpusē, izraisīja to lineārās augšanas inhibēšanu, kāda ir tipiska eksogēnā etilēna iedarbībai (15. attēls).

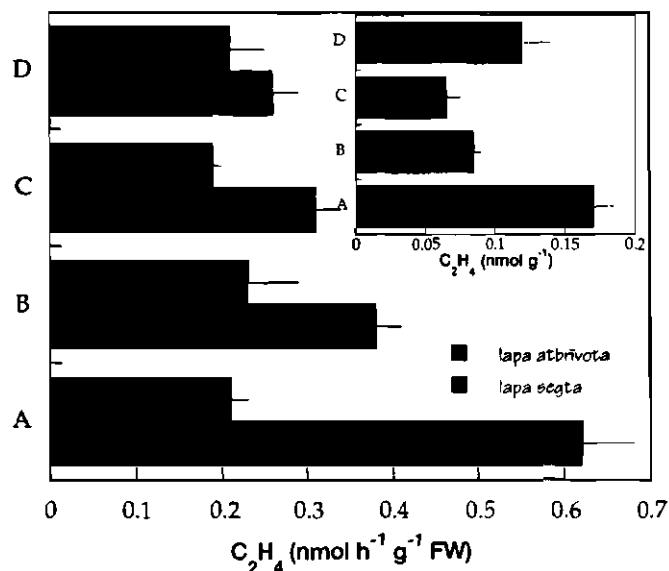
Vairāki novērojumi apstiprināja domu, ka koleoptile veido barjeru, kas aizkavē stresa etilēna veidošanos vai izdalīšanos. Tā kā ACKS, etilēna priekšteča, saturs pieaugums tika inducēts neatkarīgi no koleoptila klātbūtnes (3. tabula), varētu domāt, ka etilēna veidošanās tiek bloķēta pēdējā posmā ACKS par etilēnu pārvēršanās stadijā. Gan etilēna izdalīšanās intensitāte, gan EVF aktivitāte ar koleoptili segtās lapās bija tikai 39 % no tās, kāda novērojama atbrīvotās lapās (4. tabula). Tā kā EVF katalītiskajai darbībai nepieciešama skābekļa klātbūtne, atbrīvotas lapas tika inkubētas argona atmosfērā. Bezskābekļa apstākļos no atbrīvotām lapām izdalījās tikpat daudz etilēna, kā skābekļa vidē no segtām lapām, kas tieši liecina par EVF darbības inhibēšanu koleoptiles sega ietekmē. Bez tam, etilēna izdalīšanās intensitātes gradients, kas bija novērojams no koleoptiles atbrīvotā lapā un kas samazinājās virzienā no lapas



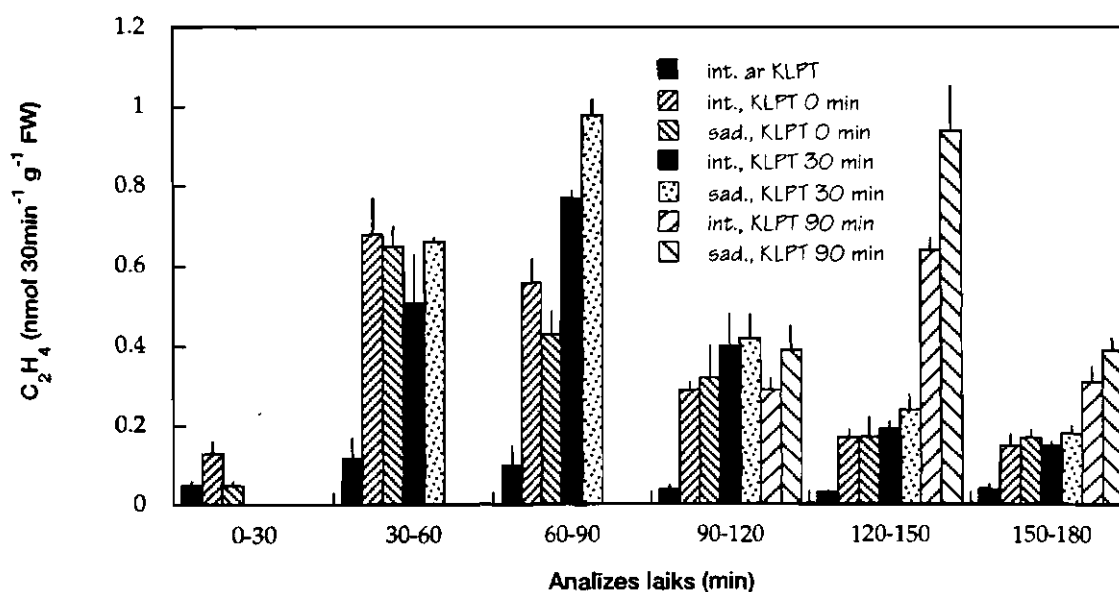
15. attēls. Koleoptiles noņemšanas ietekme uz pirmās lapas augšanas dinamiku. Koleoptili noņēma no 3 dienu vecu dīgstu lapām to gareniski iešķēlot un atvelkot uz sāniem. Dati ir vidējie no 4 paraugiem \pm SE.

4. tabula. Audu inkubēšanas vides ietekme uz etilēna izdalīšanos un EVF aktivitāti ar koleoptili segtās un atbrīvotās rudzu lapās. Vidējie no 3 paraugiem \pm SE.

Lapu tips	Etilēna izdalīšanās				EVF aktivitāte	
	Gaiss		Argons		Gaiss	
	$\text{nmol h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FW}$	%	$\text{nmol h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FW}$	%	$\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FW}$	%
Segtas	0.15 ± 0.01	39	0.14 ± 0.03	37	0.84 ± 0.05	39
Atbrīvotas	0.38 ± 0.06	100	0.13 ± 0.01	34	2.14 ± 0.38	100



16. attēls. Koleoptiles noņemšanas ietekme uz etilēna izdalīšanās gradientu 4 dienas vecu rudzu dīgstu lapā. Iekšējais grafiks rāda endogēnā etilēna satura gradientu lapā. A-D, secīgi lapas segmenti virzienā no pamatnes uz galotni. Dati ir vidējie no 5 paraugiem \pm SE.



17. attēls. Koleoptiles noņemšanas ietekme uz etilēna izdalīšanās dinamiku no rudzu lapas 1 cm pamatnes segmentiem. Segmentus atdalīja no lapas, kas pārklāta ar koleoptili, un inkubēja mitrā kamerā. Koleoptiles tika noņemtas dažādos laikos pēc segmenta atdalīšanas. Dati ir vidējie no 3 paraugiem \pm SE.

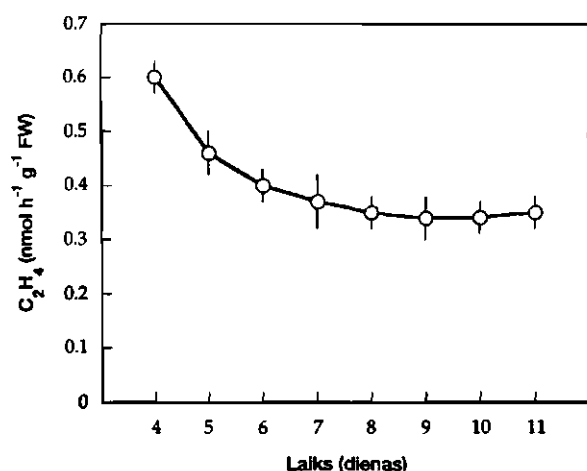
pamatnes uz galotni, neparādījās ar koleoptili pārklātā lapā (16. attēls). Tomēr, endogēnā etilēna satura sadalījums intaktā lapā principā atbilda etilēna veidošanās intensitātes sadalījumam, izņemot galotnes segmentu.

Tika arī pārbaudīts, kādu ietekmi uz etilēna izdalīšanos izsauc koleoptiles noņemšana no iepriekš ievainotām lapām. Šim nolūkam lapas apakšdaļas segmenti tika inkubēti mitrā vidē dažāda ilguma periodus pirms koleoptiles noņemšanas. Koleoptiles noņemšana izsauca pakāpenisku papildus etilēna veidošanās indukciju (17. attēls). Tomēr, šis papildus efekts bija novērojams tikai 30-90 minūtes pēc koleoptila

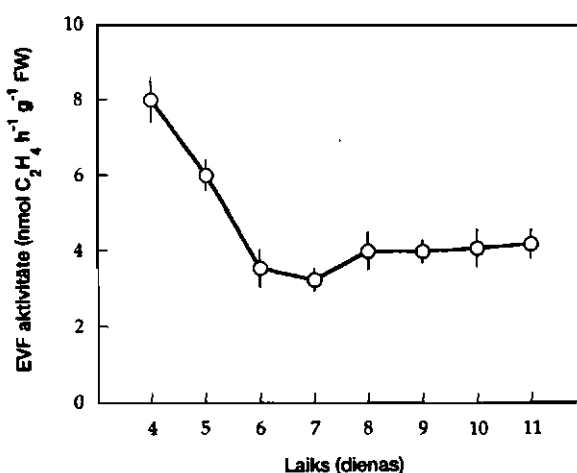
noņemšanas. Pie tam, ja vienlaicīgi ar lapas segmenta atbrīvošanu no koleoptiles tā tika sadalīta gareniski uz pusēm, etilēna izdalīšanās intensitāte bija lielāka, nekā no intaktas lapas.

Šeit aprakstītie eksperimenti skaidri parāda, ka ar koleoptili segtā lapā tās atdalīšanas rezultātā notiek etilēna biosintēzes indukcija ACKS sintēzes līmenī, taču bez papildus skābekļa pieplūdes, ko kavē sedzošie audi, nenotiek etilēna veidošanās, bet ACKS uzkrājas audos. Tomēr, iegūtie rezultāti ir nepietiekami, lai secinātu, vai dotā parādība ir saistīta vēl arī ar citu faktoru piedalīšanos. Jau agrāk ir bijis atzīmēts, ka zāļaugu lapa saskaras ar straujām apkārtējās vides izmaiņām, tai izaugot ārpus vecāko audu aizsardzības (Begg & Wright 1962). Tāpēc ir pamats uzskatīt, ka lapas izaugšana koleoptiles ārpusē ir sava veida stress lapas audiem. To apstiprina arī šajā darbā iegūtie dati par strauju īslaicīgu etilēna veidošanās pieaugumu no veselīgiem graudzāļu dīgstiem, kas saistīts ar lapas izaugšanu no koleoptiles (3. attēls).

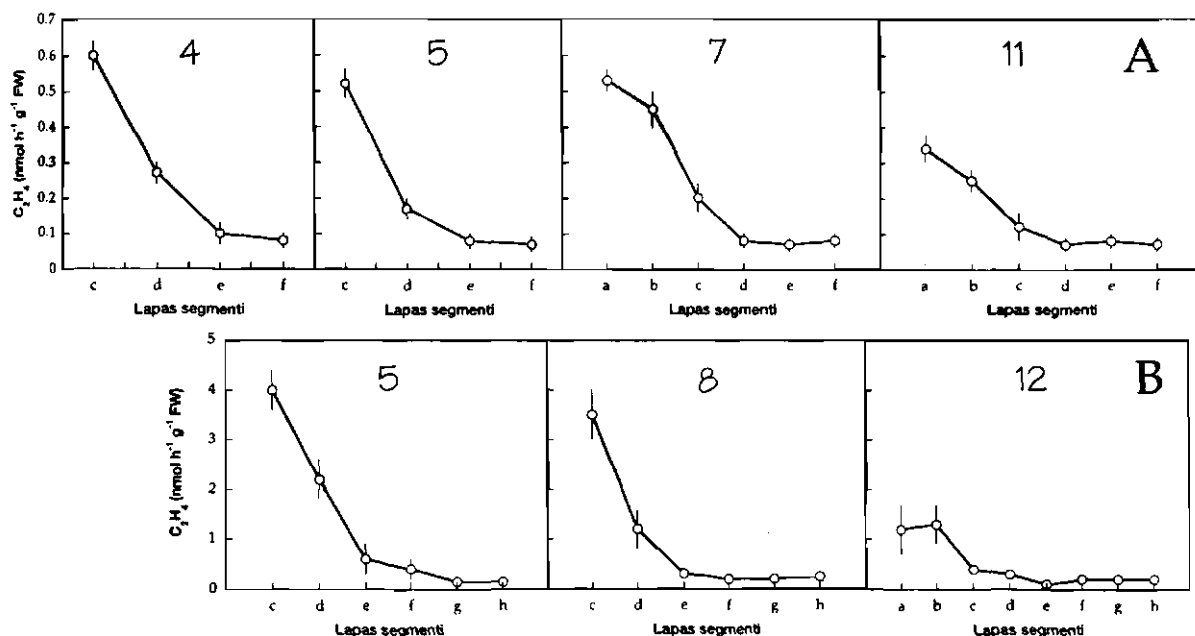
Tā kā literatūrā nebija datu par etilēna izdalīšanās intensitātes izmaiņām saistībā ar lineāro augšanu fotosintētiski aktīvos juvenilos veģetatīvajos audos, etilēna veidošanās intensitātes dinamika un gradients tika tuvāk pētīts fotoperioda apstākļos augošu rudzu dīgstu pirmajā lapā. Augošai lapai bija raksturīga augsta etilēna izdalīšanās intensitāte (18. attēls). Etilēna izdalīšanās pakāpeniski samazinājās, bet līdz ar lapas lineārās augšanas izbeigšanos (7. dienā dotajos eksperimenta apstākļos, 24. attēls) tā nostabilizējās bāzes līmenī. Arī EVF aktivitāte, noteikta *in situ* bija augsta strauji augošā lapā un samazinājās līdz ar lineārās augšanas procesu izbeigšanos (19. attēls). Arī gradienta pētījumi apstiprināja domu, ka tieši audi, kas satur aktīvi augošas šūnas, sintezē maksimālo daudzumu etilēna (20. attēls). Tomēr, EVF aktivitātes sadalījums lapā ievērojami atšķirās no etilēna intensitātes sadalījuma (21. attēls). Pilnīgi diferencētos lapas audos EVF aktivitāte sekundāri paaugstinājās, salīdzinot ar aktīvi augošiem audiem. Varētu domāt, ka šādas atšķirības ir saistītas ar EVF aktivitātes *in*



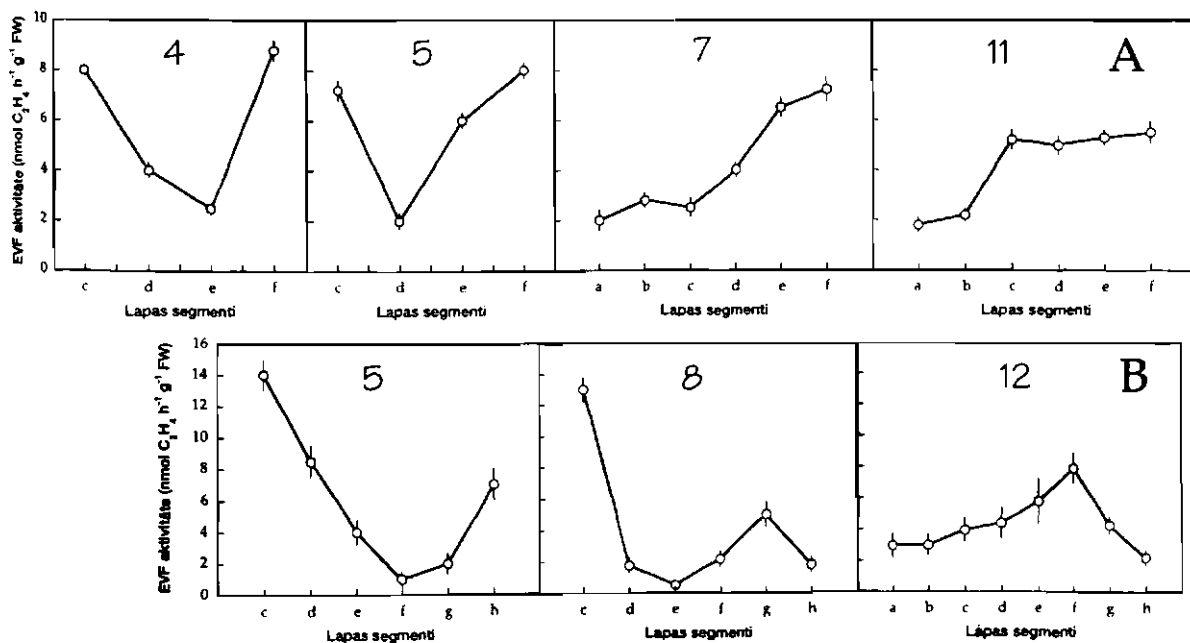
18. attēls. Etilēna izdalīšanās dinamika fotosintētiski aktīvas rudzu lapas augšanas laikā. Dati ir vidējie no 3 paraugiem \pm SE.



19. attēls. EVF aktivitātes dinamika fotosintētiski aktīvas rudzu lapas augšanas laikā. Dati ir vidējie no 3 paraugiem \pm SE.



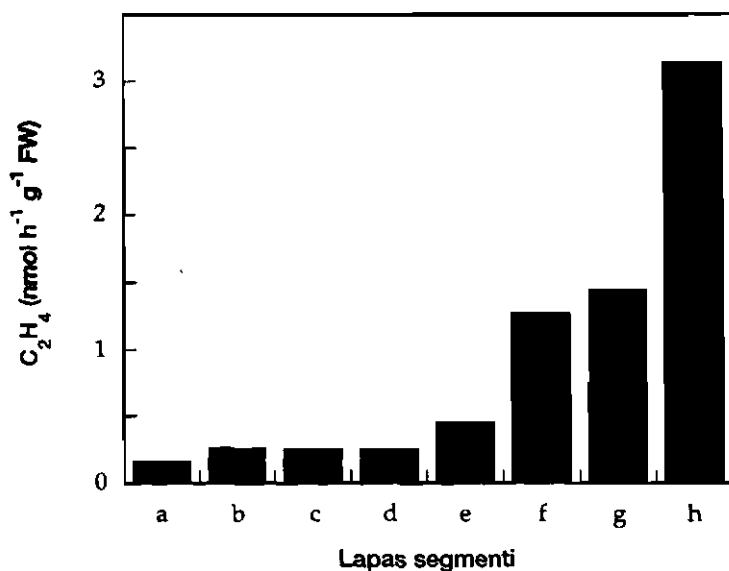
20. attēls. Etilēna izdalīšanās intensitātes gradients 4, 5, 7 un 11 dienas vecu rudzu dīgstu pirmajā lapā (A) un 5, 8 un 12 dienas vecu kviešu dīgstu pirmajā lapā (B). a-h, secīgie lapas segmenti virzienā no pamatnes uz galotni.



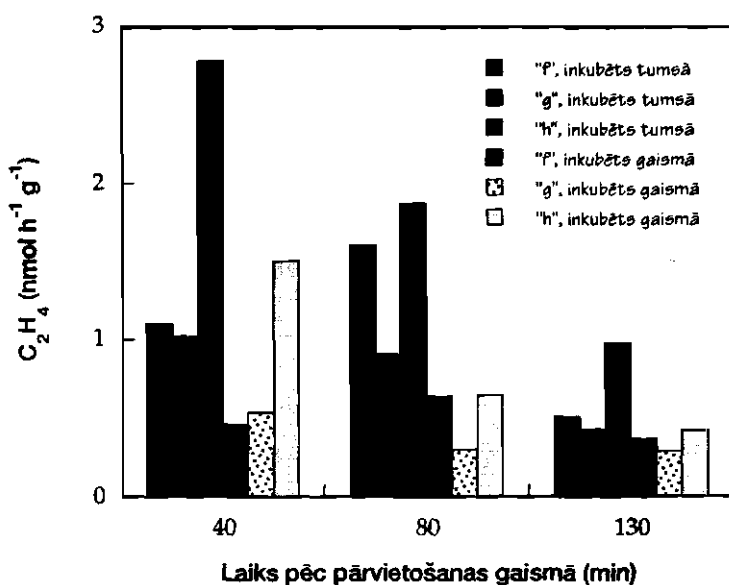
21. attēls. EVA aktivitātes gradients 4, 5, 7 un 11 dienas vecu rudzu dīgstu pirmajā lapā (A) un 5, 8 un 12 dienas vecu kviešu dīgstu pirmajā lapā (B). a-h, secīgie lapas segmenti virzienā no pamatnes uz galotni.

situ noteikšanas metodes nepilnībām, piemēram, ar eksogēnās ACKS uzņemšanas īpatnībām pilnīgi diferencētos audos.

Mūsu pētījumi ar intaktiem graudzāļu dīgšiem parādīja, ka gaismas/tumsas maiņa neizsauc principiālas etilēna izdalīšanās intensitātes izmaiņas. Tomēr, literatūrā ir sastopama informācija, ka gaisma inhibē etilēna veidošanos vairākām augu sugām (Weckx & Van Poucke 1989). Mūsu eksperimenti parādīja, ka etiolētu graudzāļu



22. attēls. Etilēna izdalīšanās intensitātes gradients 5 dienas vecu etiolētu miežu dīgstu pirmajā lapā. a-h, secīgie lapas segmenti virzienā no pamatnes uz galotni. Segmenti f, g un h lokalizēti koleoptiles ārpusē atrodošajā lapas daļā.



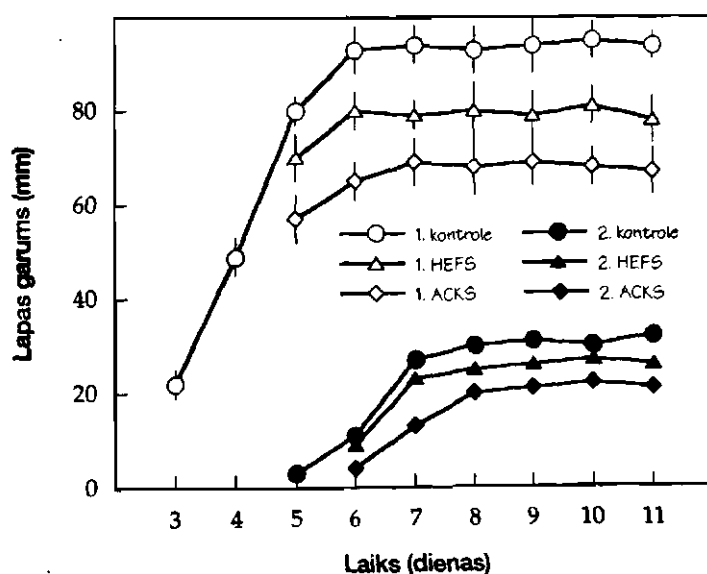
23. attēls. Etilēna izdalīšanās intensitātes izmaiņas miežu lapas galotnes daļā, pārejot no etiolēta stāvokļa uz fotosintēzi. Lapas segmentus atdalīja no lapas dažādos laikos pēc dīgstu pārvietošanas gaismā un etilēna izdalīšanos noteica sekojošo 2 h laikā gaismā vai tumsā.

dīgstu lapā stresa inducētā etilēna izdalīšanās intensitātes sadalījums ievērojami atšķiras no sadalījuma fotosintētiski aktīvā lapā (22. attēls). Principiāla atšķirība saistās tieši ar to lapas daļu, kas ir izaugusi ārpus koleoptiles. Šajā daļā vērojams izteikts etilēna izdalīšanās pieaugums uz lapas galotni, pie kam, intensitāte vairākkārtīgi pārsniedz etilēna izdalīšanās intensitāti no fotosintētiski aktīvām lapām. Var pieņemt, ka šāds specifisks sadalījums ir saistīts ar gaismas signāla iedarbības iztrūkumu, kuram dabiskos apstākļos jāiedarbojas tūlīt pēc lapas izaugšanas koleoptiles ārpusē. Par to liecina arī fakts, ka pēc etiolētu dīgstu parvietošanas gaismas apstākļos, lapas galotnes audu spēja pastiprināti sintezēt etilēnu pakāpeniski samazinājās (23. attēls). Tā kā intaktiem etiolētiem dīgstiem tumsas apstākļos šāds etilēna izdalīšanās pieaugums nav novērojams, var domāt, ka audu spēja sintezēt paaugstinātu daudzumu etilēna stresa rezultātā ilgstošas etiolācijas apstākļos ir saistīta ar kāda neidentificēta faktora uzkrāšanos šajos audos. Ļoti iespējams, ka šis faktors ir saistīts ar potenciālo gaismas signāla uztveršanu.

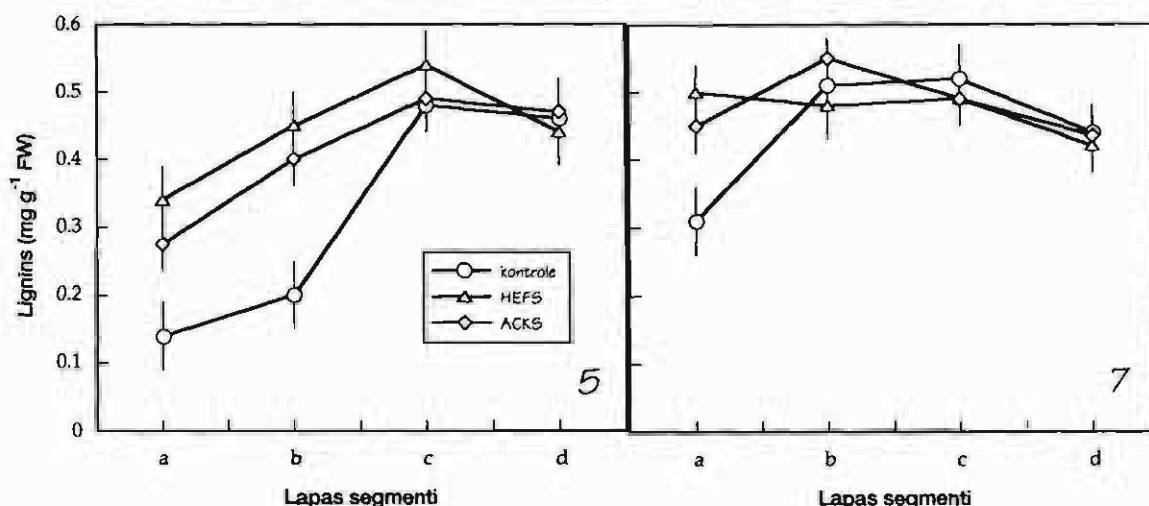
3.1.3. Dīgstu lineārās augšanas inhibēšana un lignifikācijas izmaiņas etilēna ietekmē

Fotosintētiski aktīvu rudzu dīgstu pirmās lapas plātnes lineārā augšana izbeidzas 6. dienā, bet lapas maksts augšana – 8. dienā (24. attēls). Intaktu dīgstu apstrāde caur lapām ar etilēnproducentu HEFS (10 mM) vai etilēna biosintētisko priekštecī ACKS (50 mM) izraisīja gan lapas plātnes, gan arī lapas maksts galējā garuma samazināšanos. Tā kā virkne pētījumu parāda zināmu sakarību starp etilēna veidošanos un lignifikāciju (*De Jaegher et al. 1985, Miller et al. 1985, Prasad & Cline 1987, Hagege et al. 1988*), varētu domāt, ka etilēnproducentu inhibējošā darbība uz rudzu dīgstiem mūsu eksperimentos ir saistīta ar lignifikācijas pastiprināšanos.

Lai varētu raksturot lignifikācijas norisi rudzu dīgstu lapas attīstības laikā, tika noteikts lignīna satura sadalījums augošā lapā (5. diena) un lapā, kur lineārā augšana bija izbeigusies (7. dienā). Redzams, ka augošā lapā bija novērojams izteikts lignīna gradients, ar ievērojami zemāku lignīna saturu tajos audos, kur lokalizētas šūnas dalīšanās un aktīvas stiepšanās fāzē (25. attēls). Nemainīgs lignīna līmenis lapas plātnes augšdaļā laikā no 5. līdz 7. dienai liecina par to, ka lignifikācijas process šajās lapas daļās 5. dienā bija jau beidzies. Pretēji tam, aktīvs lignifikācijas process 5. dienā norisinājās segmentā "b", bet segmentā "a" bija zema lignīna veidošanās intensitāte, kura pastiprinājās 7. dienā.



24. attēls. Fotosintētiski aktīvu rudzu dīgstu pirmās lapas plātnes (1., gaišie simboli) un maksts (2., tumšie simboli) augšanas dinamika un tās izmaiņas etilēnproducentu HEFS (10 mM) un ACKS (50 mM) apstrādes ietekmē. Dati ir vidējie no 30 dīgstiem katrā laika punktā katram variantam \pm SE.



25. attēls. Lignīna saturs gradientā 5 dienas un 7 dienas vecu rudzu dīgstu pirmās lapas plātnē un tā izmaiņas HEFS un ACKS apstrādes ietekmē. a-d, sekojošie lapas plātnes segmenti, virzienā no pamatnes uz virsotni. Dati rāda vidējos no 3 mērījumiem katrā laika punktā katrai apstrādei \pm SE.

Var secināt, ka apstrāde ar HEFS vai ACKS izsauca lignifikācijas intensifikāciju 5. dienā, taču tikai tajos segmentos, kur lignīna saturs nebija sasniedzis maksimālo līmeni (segmenti "a" un "b", 25. attēls). Redzams arī, ka HEFS un ACKS iedarbība uz lignifikāciju bija vienāda pēc rakstura. Varēja novērot tikai minimālas kvantitatīvās atšķirības. Tātad, gan HEFS, gan ACKS izraisīja īslaicīgu lignīna saturu pieaugumu lapas plātnē 5. dienā ar sekojošu izlīdzināšanos starp kontroles un apstrādātajām lapām 7. dienā. No tā var secināt, ka etilēnproducenti izsauc lignifikācijas paātrināšanos. Tā kā šūnapvalka lignifikācija tiek uzskatīta par vienu no faktoriem, kas ir saistīti ar šūnu stiepšanās pārtraukšanos (Whitmore 1971, Marigo & Boudet 1980), mūsu eksperimentos atklātā sakarība starp lapu lineārās augšanas inhibēšanu un lignifikācijas paātrināšanos etilēnproducentu ietekmē ļauj pieņemt, ka HEFS un ACKS izraisa šūnu stiepšanās paātrinātu izbeigšanos un saīsina pārejas periodu uz diferenciaciju.

5. tabula. ACKS un kobalta ietekme uz lignifikāciju un lapas plātnes garumu. Rudzu dīgstu apstrādāja ar 0.1 mM CoSO₄ sākot no 3. dienas un apmigloja ar 50 mM ACKS 4. dienā. Skaitļi iekavās rāda % no kontroles.

Parametrs	Laiks, dienas	Apstrāde			
		kontrolē	kobalts	ACKS	ACKS + kobalts
Lignīns (mg g ⁻¹ FW)	4	0.16	0.16 (100.0)	-	-
	5	0.30	0.31 (103.3)	0.41 (136.7)	0.32 (106.7)
	6	0.34	0.37 (108.8)	0.42 (123.5)	0.38 (111.8)
	7	0.45	0.47 (104.4)	0.48 (106.7)	0.49 (107.9)
Garums (mm)	8	84.2	85.5 (101.2)	65.7 (78.1)	74.1 (88.0)

Dati 5. tabulā parāda, ka ACKS efekts uz lignīna saturu samazinājās papildus apstrādes rezultātā ar 0.1 mM kobaltu, kas ir etilēna biosintēzes inhibitors. Līdzīgā veidā, ACKS apstrādātu dīgstu lapas galējais garums palielinājās kobalta iedarbībā. Tomēr, kobalts viens pats dotajā koncentrācijā neizsauca šo parametru izmaiņu. Šie rezultāti liecina par to, ka ACKS darbība ir saistīta tieši ar šī savienojuma pārvēršanos par etilēnu lapas audos, jo kobalta joni inhibē ACKS fermentatīvo pārvēršanos par etilēnu (*Abeles et al.* 1992).

Tā kā etilēns var izsaukt to gēnu aktivāciju augos, kuri piedalās normālās attīstības programmas realizācijā, kā arī aizsargmehānismos (*Ecker & Davis* 1987, *Maunder et al.* 1987), var pieņemt, ka etilēnproducentu darbība ir saistīta ar lignifikācijā iesaistīto fermentu gēnu īslaicīgu aktivāciju.

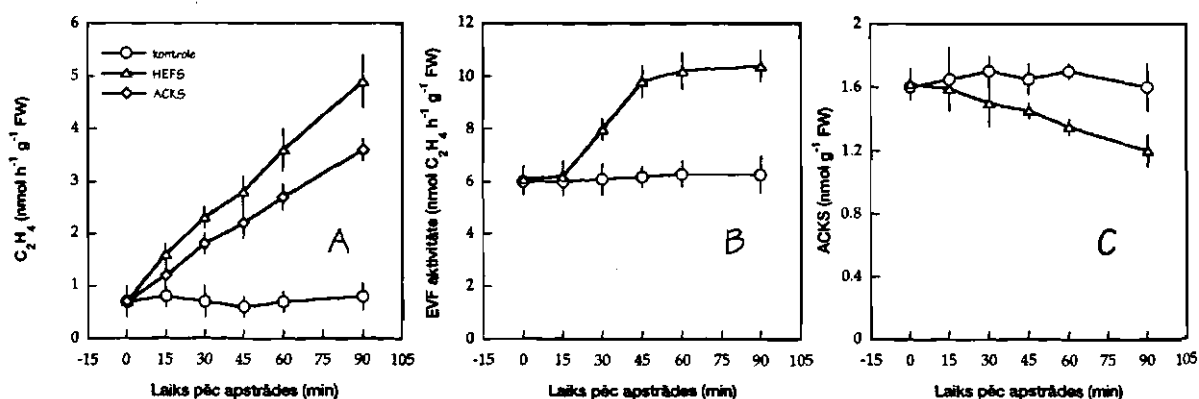
3.1.4. Etilēna biosintēzes autoregulācija

Etilēna autokatalītiskais efekts var parādīties abos etilēna biosintēzes posmos – etilēna priekšteča ACKS sintēzes reakcijā un ACKS pārvēršanas reakcijā par etilēnu. Visai daudz datu ir par eksogēnā etilēna iedarbību uz etilēna biosintēzi augļu nogatavošanās laikā vai saistībā ar veģetatīvo audu novecošanos (Abeles et al. 1992). Praktiski ļoti maz sastopama informācija par etilēna efektiem intaktos juvenilos augos.

Apsmidzinot intaktus rudzu dīgstus ar etilēnproducentu HEFS vai ar etilēna biosintētisko priekšteci ACKS, jau 15 minūtes pēc apstrādes novērojams etilēna izdalīšanās pieaugums no apstrādāto dīgstu lapām (26.A attēls). Paralēli etilēna izdalīšanās intensitātes pieaugumam, HEFS ietekmē bija novērojama arī EVF aktivitātes palielināšanās līdztekus ar ACKS satura samazināšanos (26.B,C attēls). Tā kā abos pēdējos gadījumos statistiski būtiskas atšķirības parādījās pēc lag perioda ilgāka par 15 min, var secināt, ka izmaiņu indukcijai bija nepieciešama kāda faktora, domājams, fermentatīvas dabas olbaltuma, sintēze.

Novērojot etilēna biosintēzes izmaiņas ilgākā laika periodā pēc apstrādes, var secināt, ka visizteiktākā etilēnproducentu ietekme uz etilēna veidošanos parādījās tieši laikā starp 1 un 24 stundām pēc apstrādes (6. tabula). 24 stundas pēc apstrādes etilēna izdalīšanās pieaugums bija sešas reizes, bet EVF aktivitātes pieaugums – 1.7 reizes. Tālākajā laikā apstrādes ietekme ievērojami samazinājās.

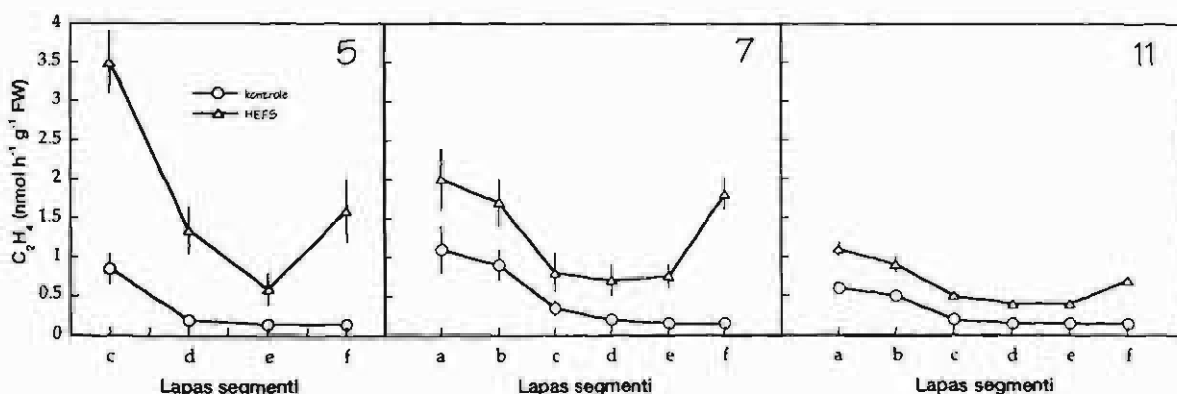
Tā kā etilēna izdalīšanās intensitāte bija atkarīga no lapas audos notiekošajiem augšanas procesiem (20. attēls), bija lietderīgi pārbaudīt, kurās lapas daļās notiek etilēna izdalīšanās pieaugums HEFS apstrādes ietekmē. Gradients noteikšanas eksperimenti parādīja, ka principiālais HEFS-inducētā etilēna izdalīšanās sadalījums atbilst etilēna izdalīšanās sadalījumam kontroles dīgstu lapā (27. attēls). Tomēr, galotnes segmentā bija novērojama būtiski paaugstināta etilēna izdalīšanās intensitāte. Savukārt, izsakot



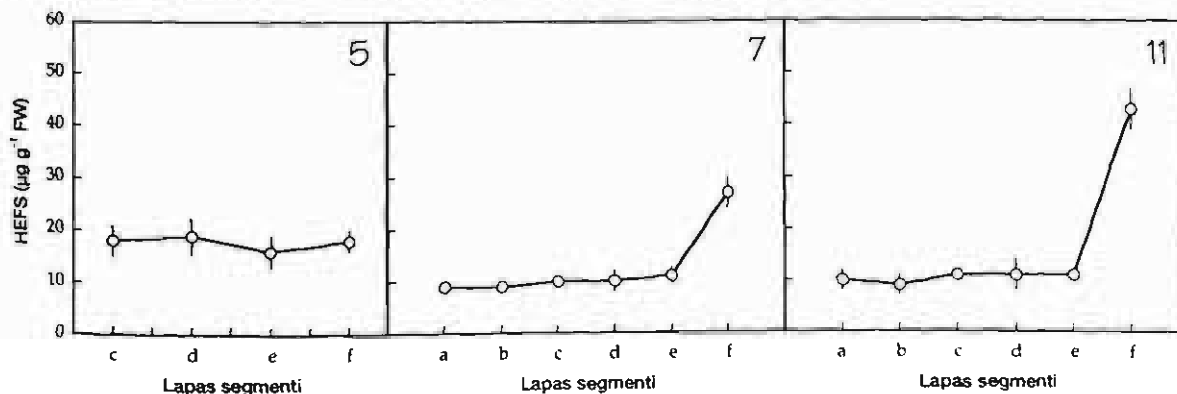
26. attēls. ACKS un HEFS inducētās etilēna izdalīšanās (A), EVF aktivitātes (B) un ACKS satura (C) agrās izmaiņas rudzu dīgstu pirmajā lapā. Dati ir vidējie no 3 analizēm katram laika punktam \pm SE.

6. tabula. Ilgstošais HEFS efekts uz etilēna izdalīšanās intensitāti, EVF aktivitāti un ACKS saturu rudzu dīgstu pirmajā lapā. Dati ir vidējie no 3 paraugiem ±SE.

Apstrāde	Laiks pēc apstrādes, h	C ₂ H ₄ , nmol h ⁻¹ g ⁻¹ FW	EVF aktivitāte, nmol C ₂ H ₄ hr ⁻¹ g ⁻¹ FW	ACC, nmol g ⁻¹ FW
Kontrola	1	0.54±0.10	6.0±0.5	1.83±0.04
	24	0.31±0.08	5.1±0.2	-
	72	0.22±0.03	4.7±0.2	-
	168	0.20±0.03	2.7±0.1	1.64±0.10
HEFS	1	3.24±0.10	10.0±0.4	1.31±0.20
	24	1.80±0.20	8.7±0.3	-
	72	0.60±0.05	6.0±0.2	-
	168	0.31±0.06	3.3±0.1	1.23±0.10



27. attēls. HEFS ietekme uz etilēna izdalīšanās gradientu rudzu pirmajā lapā. Dati ir vidējie no 3 paraugiem ±SE.

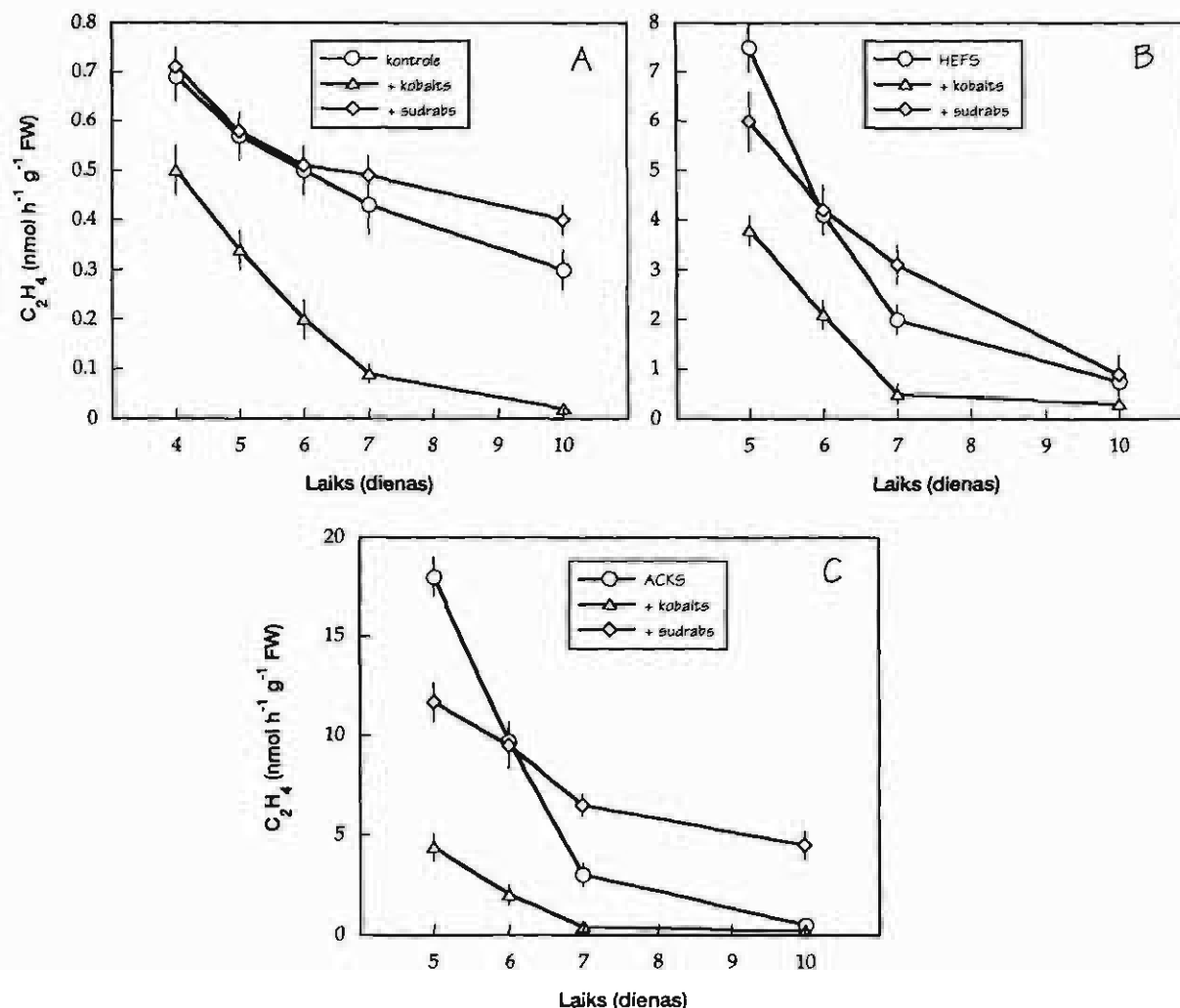


28. attēls. HEFS gradients rudzu pirmajā lapā. Dati ir vidējie no 3 paraugiem ±SE.

HEFS iedarbību attiecībā pret kontroles etilēna izdalīšanās intensitāti attiecīgajos segmentos, var secināt, ka proporcionāli vislielākais pieaugums ir galotnes segmentā "f" (vairāk nekā 10 reizes) un segmentā "d" (7 reizes), kurš satur šūnas aktīvās stiepšanās fāzē. Tā kā dotajā eksperimentā tieši galotnes segments ir tā lapas daļa, kas pie apstrādes saņem visu etilēnu producenta devu, varētu domāt, ka papildus etilēna izdalīšanās saistīta ar apstrādes stresa situāciju dotajos audos vai arī ar augstāku HEFS koncentrāciju

7. tabula. Gāzveida etilēna ietekme uz etilēna izdalīšanās intensitāti un ACKS saturu rudzu dīgstu pirmajā lapā. Dati ir vidējie no 3 paraugiem \pm SE.

Apstrāde	Laiks, dienas	C_2H_4 , $nmol\ h^{-1}\ g^{-1}\ FW$	ACKS, $nmol\ g^{-1}\ FW$
Kontrola	5	0.78 ± 0.08	2.06 ± 0.10
	7	0.48 ± 0.10	2.05 ± 0.10
Etilēns	5	1.52 ± 0.20	1.45 ± 0.08
	7	0.76 ± 0.14	1.31 ± 0.10



29. attēls. Etilēna izdalīšanās intensitātes izmaiņas rudzu pirmās lapas attīstības laikā (A) un HEFS (B) un ACKS (C) apstrādes ietekmē, papildus apstrādājot ar kobalta un sudraba joniem. No 3. dienas barības vidē pievienoja $CoCl_2$ (0.1 mM) vai sudraba tiosulfātu (1 mM). Dati ir vidējie no 4 paraugiem \pm SE katrā laika punktā katram variantam.

uzkrāšanos lapas galotnē. Tāpēc tika analizēts arī audu HEFS saturs lapās dažādos laikos pēc apstrādes. Iegūtie dati liecina, ka tieši lapas galotnes daļā notika ievērojama HEFS koncentrēšanās, kas īpaši izpaudās ilgāku laiku pēc apstrādes, kamēr HEFS saturs pārējās lapas daļās pakāpeniski samazinājās (28. attēls).

Lai pārbaudītu, vai aprakstītie efekti nav saistīti ar specifisku etilēnproducenta HEFS iedarbību, bet ir tieši eksogēnā etilēna darbības rezultāts audos, tika izdarīti papildus eksperimenti ar gāzveida etilēnu. Etilēns dīgstu augšanas vidē 0.8 ppm koncentrācijā izsauca tādus pašus efektus uz etilēna biosintēzi, kā HEFS, t.i., etilēna izdalīšanās intensitātes pieaugumu un ACKS satura samazināšanos (7. tabula). Tātad, var secināt, ka HEFS iedarbība uz etilēna sintēzi ir saistīta tieši ar etilēna darbību.

Papildus apstrāde ar kobaltu, ACKS pārvēršanās pār etilēnu inhibitoru, izsauca etilēna izdalīšanās intensitātes samazināšanos kā kontroles dīgstiem, tā arī dīgstiem, apstrādātiem ar HEFS un ACKS (29. attēls). Šis efekts bija ievērojami izteiktāks ACKS apstrādes gadījumā, apstiprinot, ka eksogēnā ACKS pēc iekļūšanas lapas audos aktīvi pārvēršas par etilēnu, kas arī izsauc aprakstītos fizioloģiskos efektus. Interesanti, ka sudraba, etilēna darbības antagonista, pielietošana maz ietekmēja etilēna izdalīšanos kontroles augiem, kā arī ar HEFS apstrādātiem augiem, taču ievērojami palēnināja etilēna izdalīšanās samazināšanos laika gaitā ar ACKS apstrādātiem dīgstiem. Varētu domāt, ka šī parādība ir saistīta ar sudraba jonu stabilizējošo iedarbību uz ACKS oksidāzi (Matto & Lieberman 1982).

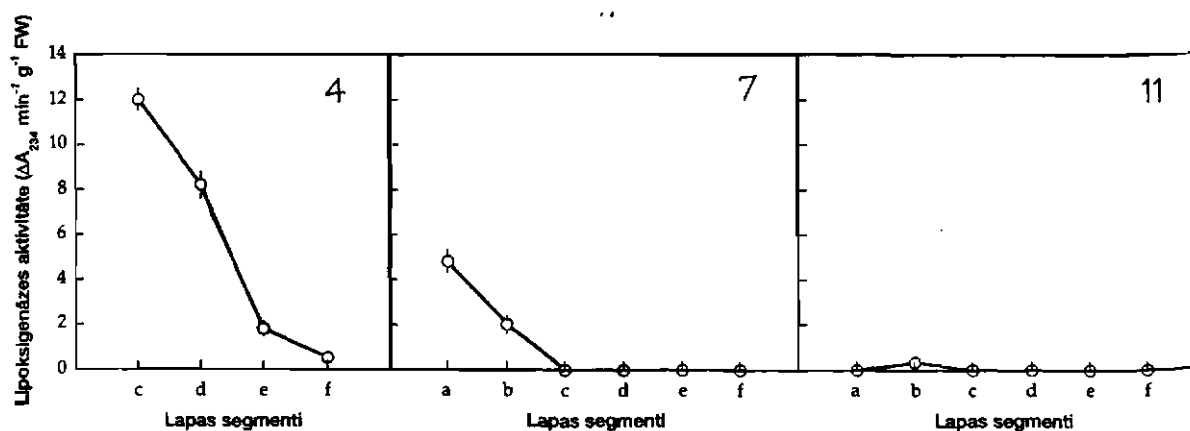
Aprakstītie rezultāti atklāj eksogēnā etilēna autokatalītisko darbību juvenilos veģetatīvajos audos un apstiprina pieņēmumu, ka ACKS oksidāze piedalās etilēna veidošanās pozitīvajā regulācijā. To apstiprina arī fakts, ka ACKS saturs samazinās paralēli EVF aktivitātes pieaugumam ar identiskiem *lag* periodiem. Jādomā, ka lielākā daļa etilēna izdalīšanās pieauguma HEFS apstrādes ietekmē ir saistīta ar audos uzņemtā etilēnproducenta sadalīšanos tā kā etilēna izdalīšanās pieaug 6 reizes, salīdzinot ar EVF aktivitātes pieaugumu 1.7 reizes. Atlikusī pieauguma daļa nāk no EVF aktivitātes pieauguma rezultātā veidotā etilēna no audos esošā pieejamā ACKS. Jādomā, ka ACKS sintēze netiek aktivēta eksogēnā etilēna iedarbībā, kā tas ir aprakstīts augļu nogatavošanās procesā (Sitrit et al. 1986) vai audu novecošanās situācijā (Riov & Yang 1982). Veģetatīvos audos līdzīgs HEFS efekts novērots tikai saulespuķes šūnu kultūrā, kur apstrāde ar etilēnproducentu izsauca vienlaicīgu etilēna izdalīšanās pieaugumu un ACKS satura samazināšanos (Sauerbrey et al. 1988).

3.1.5. Lipoksigenāzes saistība ar etilēna veidošanos

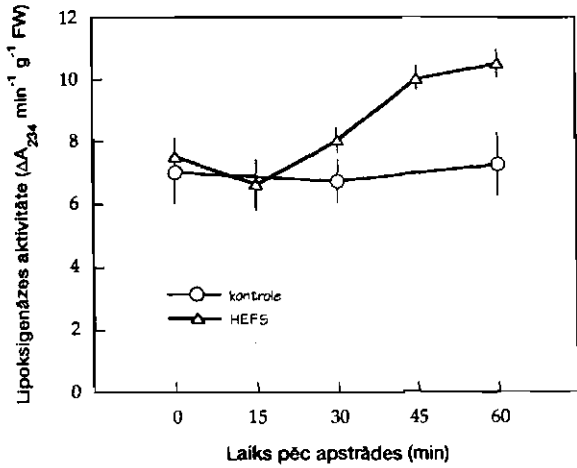
Augsta lipoksigenāzes aktivitāte ātri augošos audos ir labi aprakstīta parādība (Douillard 1979, Kubacka-Zebalska & Kacperska-Palacz 1980, Douillard & Bergeron 1981, Vernovy-Gerritsen et al. 1983). Tomēr lipoksigenāzes fizioloģiskā nozīme augos nav skaidra. Tā kā mūsu eksperimenti ir parādījuši, ka aktīvi augošiem graudzāļu lapas audiem raksturīga spēja intensīvi veidot etilēnu, varētu domāt, ka eksistē sakarība starp audu etilēna izdalīšanās līmeni un to lipoksigenāzes aktivitāti.

Šķīstošās lipoksigenāzes aktivitāte tika noteikta dažāda vecuma fotosintētiski aktīvu rudzu dīgstu pirmajā lapā. Visaugstākā lipoksigenāzes aktivitāte bija lokalizēta jaunākajos lapas segmentos pie augošas lapas pamatnes, krasi samazinoties pārejot uz diferencētiem audiem (30. attēls). Kā aprakstīts iepriekš, etilēna izdalīšanās intensitāte no rudzu lapas segmentiem izrādīja šādu pašu atkarību no audu vecuma un augšanas procesiem (20. attēls).

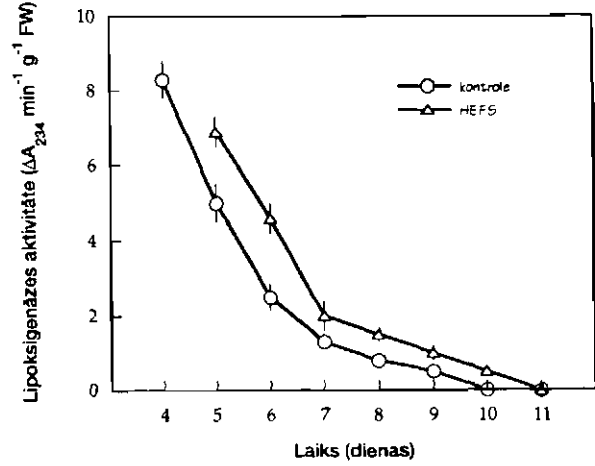
HEFS apstrādes iedarbība uz lipoksigenāzes aktivitāte tika analizēta 0-60 min pēc dīgstu apmigošanas ar 10 mM šķīdumu. Apstrādātos augos bija novērojams vismaz 15 min ilgs lag periods, pēc kura lipoksigenāzes aktivitāte krasi pieauga (31. attēls). Jau 60 min pēc apstrādes lipoksigenāzes aktivitāte pārsniedza kontroles aktivitātes līmeni par 60 %. Šāds ātrs aktivitātes pieaugums norāda uz to, ka ferments piedalās agrīnajā metaboliskajā regulācijā hormonu līdzsvara izmaiņu rezultātā. Līdzīga HEFS iedarbība novērota arī attiecībā uz EVF aktivitāti (26. attēls). Būtiska atšķirība lipoksigenāzes aktivitātē starp kontroles un HEFS-apstrādātiem augiem bija novērojama līdz pat rudzu lapas lineārās augšanas apstāšanās brīdim 7. dienā (32. attēls). Aktivitātes gradienta analīze HEFS un ACKS apstrādātu dīgstu lapā parādīja šo etilēnproducentu identisko iedarbību uz lipoksigenāzes aktivitāti (33. attēls). Aktivitātes pieaugums bija nedaudz izteiktāks ACKS apstrādes gadījumā.



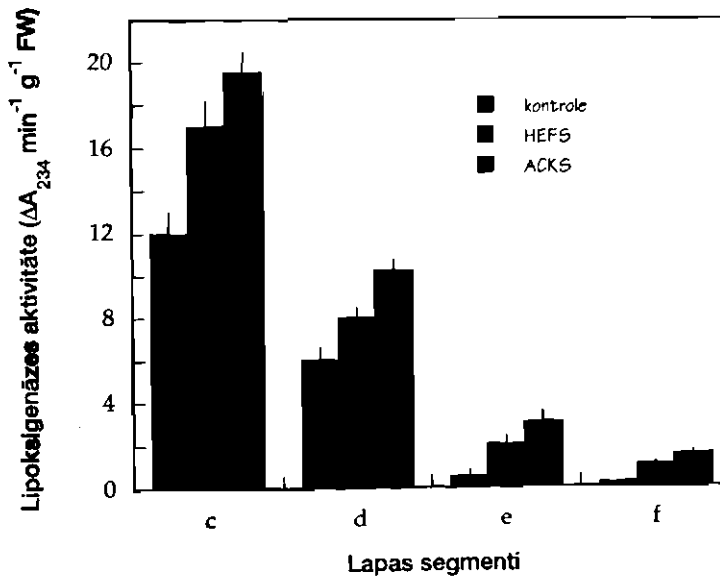
30. attēls. Šķīstošās lipoksigenāzes aktivitātes gradients fotosintētiski aktīvu 4, 7 un 11 dienas vecu rudzu dīgstu pirmajā lapā. a-b, secīgie lapas maksts segmenti; c-f, secīgie lapas plātnes segmenti. Dati ir vidējie no 2 paraugiem ±SE.



31. attēls. Lipoksigenāzes aktivitātes ātrās izmaiņas rudzu dīgstu pirmajā lapā pēc apstrādes ar HEFS. Dati ir vidējie no 2 paraugiem \pm SE.



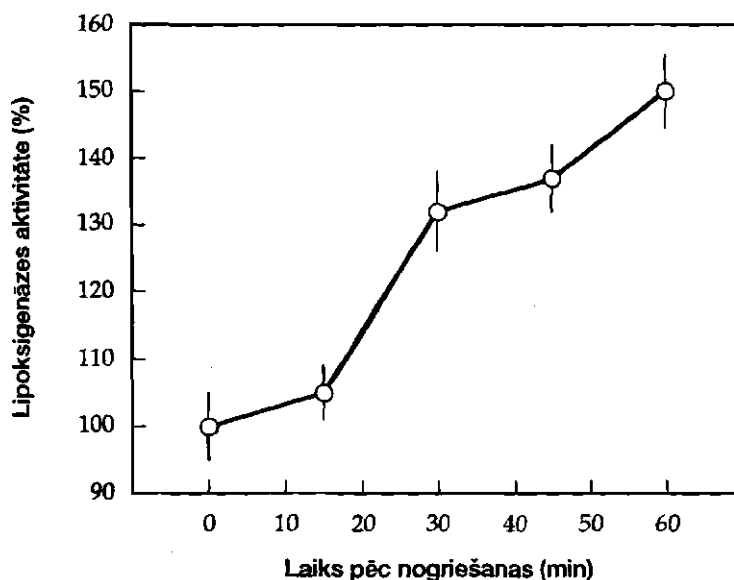
32. attēls. Lipoksigenāzes aktivitātes dinamika rudzu dīgstu pirmās lapas attīstības laikā. Apstrāde ar HEFS 4. dienā. Dati ir vidējie no 2 paraugiem \pm SE.



33. attēls. HEFS un ACKS apstrādes ietekme uz lipoksigenāzes aktivitātes gradientu 5 d.v. rudzu dīgstu pirmajā lapā. Dati ir vidējie no 3 paraugiem \pm SE katram variantam.

Agrās lipoksigenāzes aktivitātes izmaiņas nogrieztā un no koleoptila atbrīvotā rudzu lapā tika analizētas 60 min laikā. Lapu atdališana inducēja to lipoksigenāzes aktivitātes pieaugumu (34. attēls). Eksperimenta beigās lipoksigenāzes aktivitāte atdalītās lapās bija par 49 % augstāka nekā intaktās lapās.

Lai arī jau agrāk literatūrā ir aprakstīti eksperimenti par eksogēnā etilēna ietekmi uz lipoksigenāzes aktivitāti, mūsu rezultāti pirmo reizi parāda etilēnu producentu aktivējošo iedarbību uz lipoksigenāzes aktivitāti veģetatīvajos audos. Jādomā, ka etilēna efekts ir atkarīgs no lietotā augu materiāla specifikas, jo, piemēram, etiolētos zirņu dīgstos etilēns neietekmēja lipoksigenāzes aktivitāti (Duncan & Spencer 1987). Jāatzīmē



34. attēls. Lipoksigenāzes aktivitātes izmaiņas atdalītā rudzu dīgstu pirmajā lapā, kas inkubēta mitrā kamerā 60 min. Dati izteikti % no intaktas kontroles un ir vidējie no 3 paraugiem \pm SE.

arī, ka bez šķīstošās (citozola) lipoksigenāzes augos ir arī mitohondriālā lipoksigenāze. Abas formas var atšķirties pēc to jutības pret etilēnu.

Novērotā lipoksigenāzes aktivācija jau 15-30 minūtes pēc rudzu lapas nogriešanas atbilst etilēna biosintēzes indukcijai lapā (10. attēls) un apstiprina agrākos datus par fermenta pieaugumu stresotos augos (Kacperska & Kubacka-Zebalska 1989). Tomēr aktivācijas procesa daba paliek neskaidra. Ir izteikts pieņēmums, ka lipoksigenāzes aktivāciju izsauc stresa inducētā membrānu stabilizācija (Kacperska & Kubacka-Zebalska 1989), iespējams, saistībā ar hidroperoksīdu aktivāciju (de Grot et al. 1975, Sylvestre et al. 1989). Tomēr, mūsu rezultāti neizslēdz iespēju, ka fermenta aktivitātes pieaugums stresotās rudzu lapās un etilēnproducentu apstrādes rezultātā saistīts ar fermenta sintēzi *de novo*.

Lai arī ir aprakstīta iespēja, ka lipoksigenāze var veidot etilēnu no ACKS *in vitro* apstākļos (Bosquet & Thimann 1984, Lynch et al. 1985), natīvā ACKS oksidāze nav identiska ar lipoksigenāzi (John 1991). Tāpēc, lai arī mūsu un literatūras dati apstiprina pārsteidzoši ciešu paralelītāti starp etilēna veidošanās intensitāti un lipoksigenāzes aktivitāti, ir jāsecina, ka augsts etilēna izdalīšanās līmenis un augsta lipoksigenāzes aktivitāte ir neatkarīgas konsekvences, kas saistītas ar juvenilu, novecojošu vai stresotu audu īpašo metabolisko stāvokli.

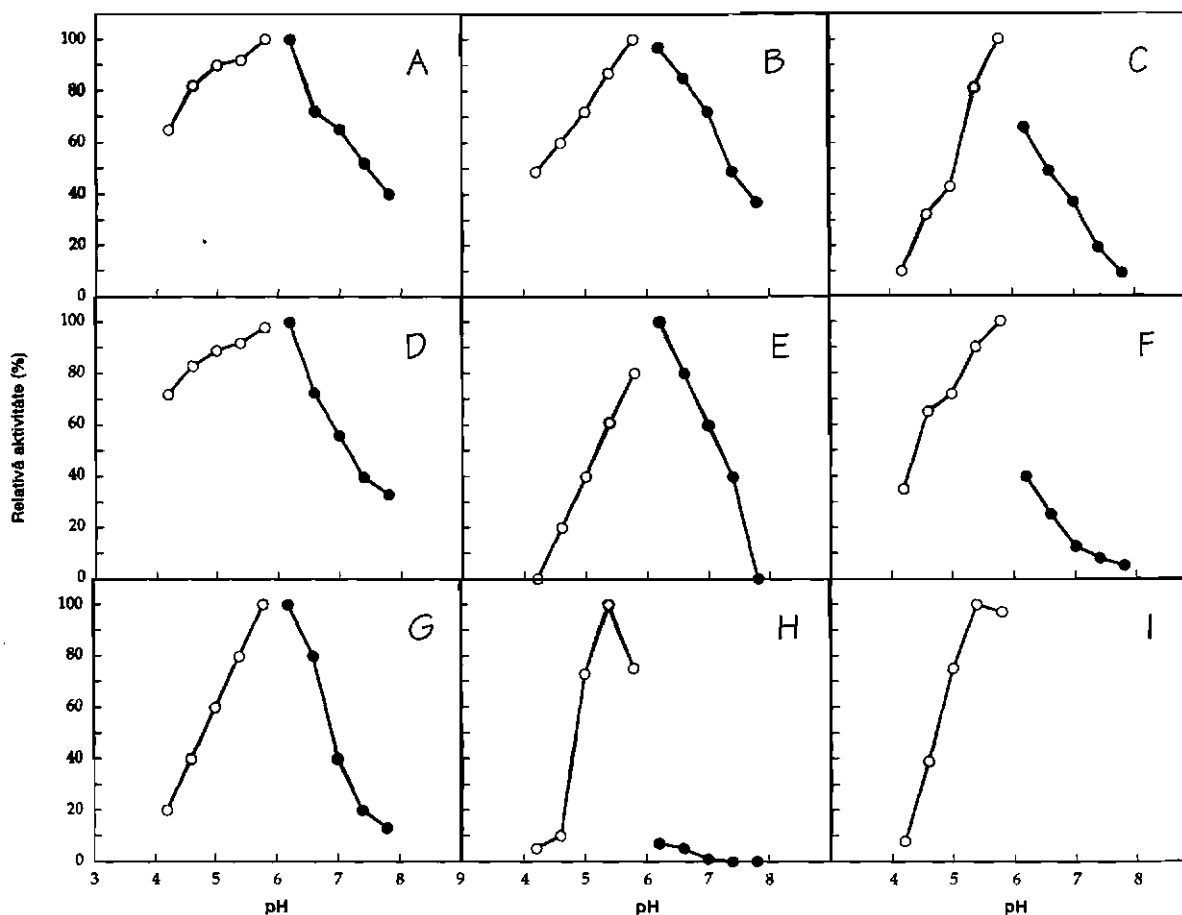
3.2. Peroksidāžu sistēmas izmaiņas graudzāļu dīgstu lapas attīstības gaitā

3.2.1. Peroksidāzes aktivitātes izmaiņas atkarībā no lietotā ūdeņraža donora

Peroksidāžu nespecifiskums attiecībā pret aktivitātes noteikšanai pielietotajiem ūdeņraža donoriem ir viens no iemesliem, kas apgrūtina konkrēto peroksidāžu bioloģisko funkciju noteikšanu (Gaspar 1986, Mäder et al. 1986). Lai arī attīstības atkarīgās peroksidāzes aktivitātes izmaiņas var mainīties atkarībā no noteikšanai lietotā ūdeņraža donora, tikai daži pētījumi salīdzina dažādus ūdeņraža donorus šinī aspektā (Chanda et al. 1986, Goldberg et al. 1986, Goldberg et al. 1986, Goldberg et al. 1989, Ros Barcelo et al. 1989). Tomēr, lielākajā daļā eksperimentu tika lietots tikai ierobežots ūdeņraža donoru daudzums, un bija novērojamas tikai minimālas vai arī graduālas atšķirības. Vienīgais izņēmums bija eksperimenti ar augošiem *Vigna radiata* hipokotiliem, kuros tika atklātas principiālas atšķirības gvajakola peroksidāzes un askorbāta peroksidāzes kompartmentācijā (Goldberg et al. 1989). Tādēļ arī mūsu eksperimentu ietvaros ar graudzāļu dīgstiem aktivitātes noteikšanai tika izmantoti praktiski visi pieejamie ūdeņraža donori, gan dabiski sastopami, gan sintētiskas dabas savienojumi – benzidīns, kafijskābe, katehols, o-dianizidīns, ferulskābe, gvajakols, p-fenilēndiamīns, vanilīns, askorbīnskābe.

Aktivitātes noteikšanai izmantotā bufera pH ietekme uz peroksidāzes aktivitāti tika noteikta ar visiem ūdeņraža donoriem divās buferu sistēmās – 0.1 M Na acetāta un 0.1 M Na fosfāta buferī. Kā redzams no datiem 35. attēlā, maksimālā aktivitāte tika atrasta pie pH vērtībām 5.4-6.2, ar nelielām atšķirībām atkarībā no lietotā ūdeņraža donora. Lielākā daļa aktivitātes pH-atkarības līkņu bija ar izteiktiem asiem maksimumiem, izņemot līknes gvajakola peroksidāzes un kafijskābes peroksidāzes gadījumā, kur tika novērota vairāk izlīdzināta aktivitātes atkarība no vides pH (35. attēls, A un B). Tikai dianizidīna un askorbāta peroksidāzes gadījumā parādījās atkarība no lietotā bufera tipa – Na fosfāta buferī šīs aktivitātes bija ievērojami zemākas, nekā Na acetāta buferī (35. attēls, F un H). Jāatzīmē, ka mūsu eksperimentos iegūtie pH optimumi bija tuvu tiem, kādi ir novēroti eksperimentos ar peroksidāzēm no dažādiem augiem (Kim et al. 1980, Wang & Luh 1983, Catala & Chamarro 1987).

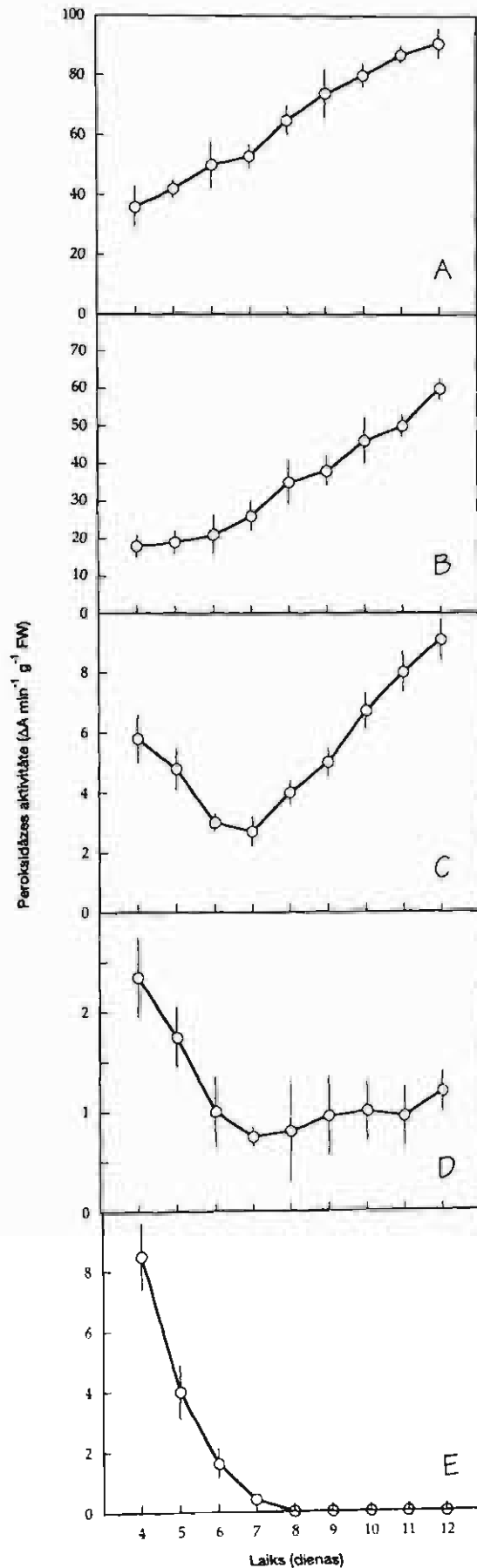
Lai noteiktu, kā aktivitātes noteikšanai lietotā ūdeņraža donora izvēle ietekmē peroksidāzes aktivitātes izmaiņas attīstības laikā, šķīstošās peroksidāzes aktivitātes dinamika rudzu dīgstu pirmās lapas plātnē tika analizēta, izmantojot visus ūdeņraža donorus. Būtiskas atšķirības aktivitātes dinamikā parādījās starp divām ūdeņraža donoru grupām. Ja peroksidāzes aktivitāti noteica, izmantojot pirmās grupas donorus (benzidīns, kafijskābe, dianizidīns, ferulskābe, gvajakols, fenilēndiamīns), bija novērojams konstants aktivitātes pieaugums visā lapas attīstības laikā. Kā piemēri



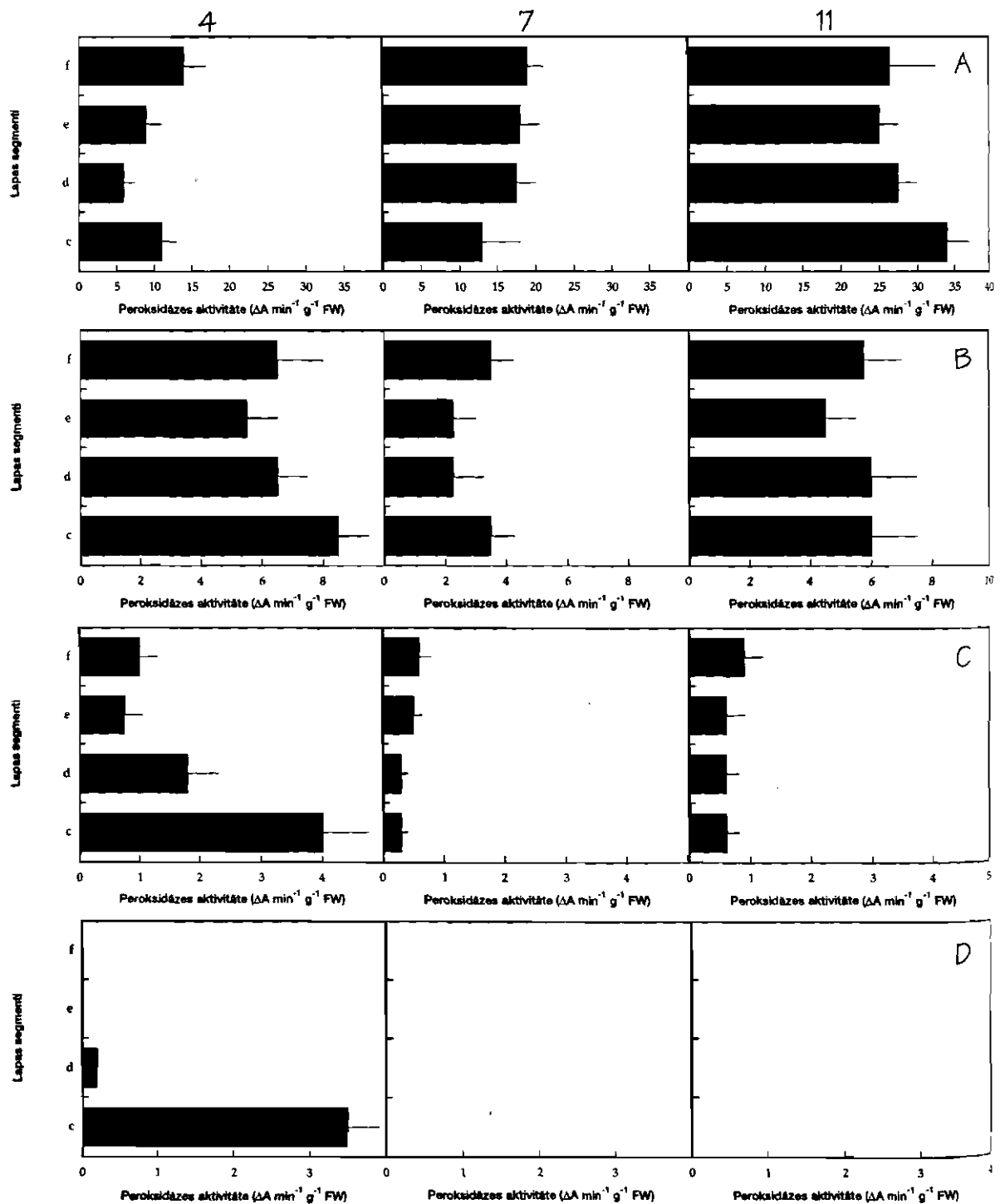
35. attēls. Bufera sastāva un pH ietekme uz kopējo šķīstošo peroksidāzes aktivitāti no 4. d.v. rudzu dīgstu pirmās lapas, kas noteikta ar gvajakolu (A), kafijskābi (B), ferulskābi (C), kateholu (D), vanilīnu (E), askorbīnskābi (F), p-fenilēndiamīnu (G), o-dianizidīnu (H), benzidīnu (I) kā ūdeņraža donoriem. Lietotie buferi: 0.1 M Na acetāta (baltie simboli); 0.1 M Na fosfāta (melnie simboli). Dati ir vidējie no 3 analīzēm.

aktivitātes izmaiņām ar šīs grupas ūdeņraža donoriem ir parādīta aktivitātes dinamika dianizidīna un gvajakola peroksidāzei (36. attēls, A un B). Ja aktivitāti noteica ar otrās grupas ūdeņraža donoriem (askorbīnskābe, katehols, vanilīns), peroksidāzes aktivitāte lapas plātnē samazinājās no attīstības 4. līdz 7. dienai (36. attēls, C, D un E), kad notika lapas plātnes lineārās augšanas izbeigšanās (24. attēls). Pēc 7. dienas katehola peroksidāzes aktivitāte pakāpeniski paaugstinājās (36. attēls, C), bet vanilīna peroksidāzes aktivitāte saglabājās vairāk vai mazāk stabilā līmenī līdz eksperimenta perioda beigām (36. attēls, D). Pretēji tam, askorbāta peroksidāzes aktivitāte lapas plātnē nebija nosakāma pēc 7. attīstības dienas (36. attēls, E).

Šādas pat atšķirības, lietojot attiecīgos ūdeņraža donorus, parādījās peroksidāzes aktivitātes sadalījumā gar pirmās lapas plātni. Visaugstākais askorbāta un vanilīna peroksidāzes aktivitātes līmenis bija lapas plātnes pamatnē, kur lokalizēti aktīvi augoši meristemātiskie audi (37. attēls, C un D). Peroksidāzes aktivitātes gradients starp meristemātiskajiem un diferencētajiem lapas audiem bija mazāk izteikts, ja aktivitāti



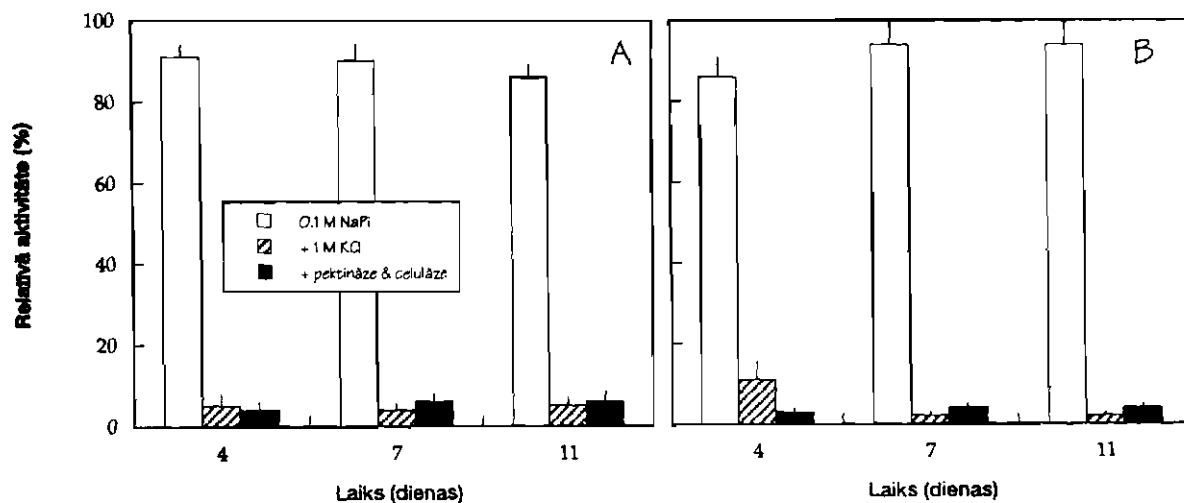
36. attēls. Peroxidāzes aktivitātes dinamika rudzu dīgstu pirmās lapas attīstības laikā ar dianizidīnu (A), gvajakolu (B), kateholu (C), vanilīnu (D), askorbīnskābi (E). Vidējie no 3 eksperimentiem \pm SE.



37. attēls. Peroxidāzes aktivitātes gradients 4 d.v., 7 d.v. un 11 d.v. rudzu dīgstu pirmajā lapā, kas noteikts ar gvajakolu (A), kateholu (B), vanilīnu (C), askorbīnskābi (D) kā ūdeņraža donoriem. c-f, secīgie lapas plātnes segmenti, no pamatnes uz galotni. Vidējie no 3 eksperimentiem \pm SE.

noteica ar kateholu (37. attēls, B) un, it īpaši, ar gvajakolu (37. attēls, A) un citiem pirmās grupas ūdeņraža donoriem (dati nav parādīti).

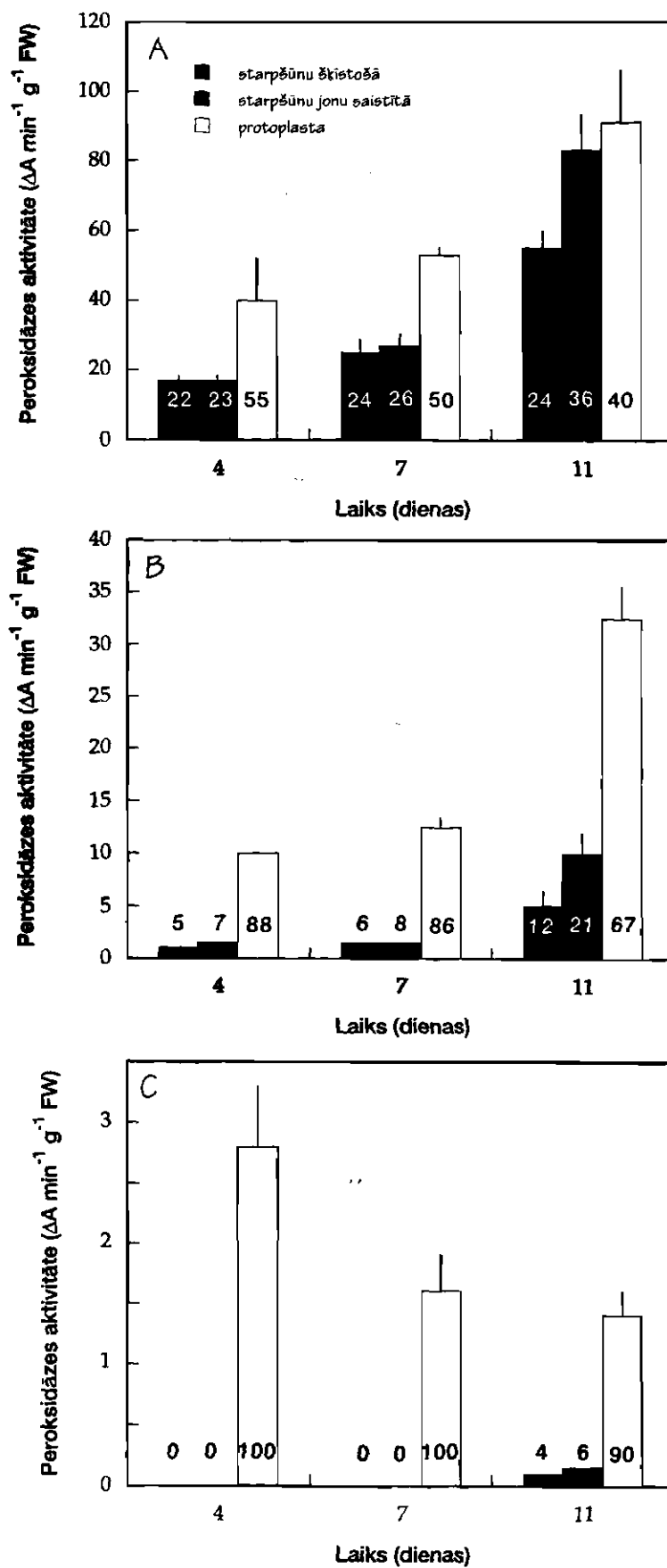
Peroxidāzes aktivitātes sadalījums olbaltumvielu frakcijās, kas atšķiras pēc saistības stingrības ar šūnas struktūrām, tika analizēts, izmantojot lapas audu secīgu ekstrakciju buferos ar pieaugošu jonu spēku (0.1 M Na fosfāta buferis, kam seko 1 M

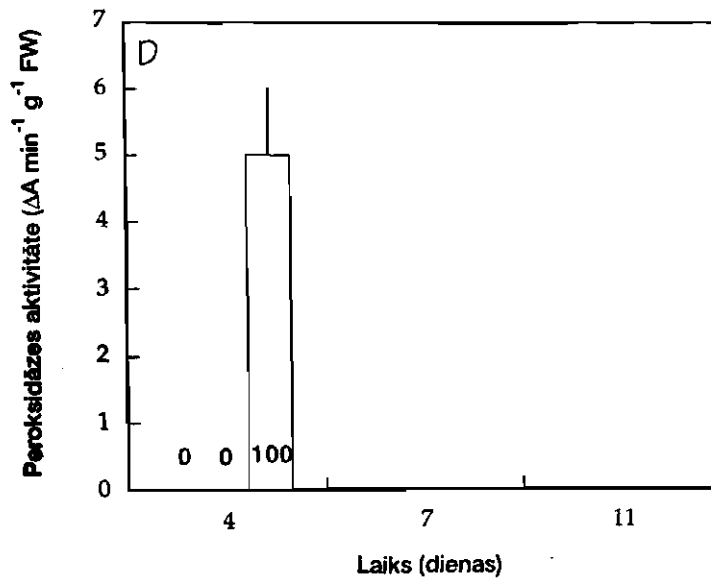


38. attēls. Peroksidāzes aktivitātes sadalījums olbaltumu frakcijās, kas atšķiras pēc saistības pakāpes ar šūnas struktūrām 4 d.v., 7 d.v. un 11 d.v. rudzu dīgstu pirmajā lapā, noteikta ar dianizidīnu (A) un gvajakolu (B) kā ūdeņraža donoriem. Olbaltumu frakcijas ieguva no viena un tā paša augu materiāla, to secīgi ekstrahējot ar 0.1 M Na fosfāta buferi, pH 7.8 (šķīstošā, neiekrāsotās kolonnas), Na fosfāta buferi ar 1 M KCl (jonu saistītā, svītrotās kolonnas), Na fosfāta buferi ar 2.5 % pektināzi un 0.5 % celulāzi (kovalenti saistītā, melnās kolonnas). Aktivitāte ir izteikta % no kopējās aktivitātes. Vidējie no 2 eksperimentiem \pm SE.

KCl), un, visbeidzot, sadalot šūnapvalka celulāzes-pektināzes iedarbībā. Kā redzams no datiem 38. attēlā, vienu stundu ilga lapas audu ekstrakcija ar 0.1 M Na fosfāta buferi (pH 6.8) atbrīvoja 86-91 % no kopējās peroksidāzes aktivitātes. Proporcijas starp šķīstošo (ekstrahēta ar 0.1 M Na fosfāta buferi), jonu saistīto (ekstrahēta ar 1 M KCl 0.1 M Na fosfātā) un kovalenti saistīto (ekstrahēta ar 2.5 % pektināzi plus 0.5 % celulāzi) peroksidāzes aktivitāti nedaudz mainījās atkarībā no lapas attīstības stadijas un lietota ūdeņraža donora.

Atsevišķus eksperimentus izdarīja, lai noteiktu peroksidāzes aktivitātes sadalījumu starp protoplastu un starpšūnu telpu ar infiltrācijas tehnikas palīdzību. peroksidāzes aktivitātes sadalījums starp abiem kompartmentiem būtiski atšķirās atkarībā no aktivitātes noteikšanai lietotā ūdeņraža donora (39. attēls). Novērotās atšķirības apstiprināja augstāk aprakstīto ūdeņraža donoru sadalījumu divās grupās. Nosakot aktivitāti ar pirmās grupas ūdeņraža donoriem (piemēram, dianizidīnu un gvajakolu), attiecīgi apmēram 45-60 % un 12-33 % kopējās peroksidāzes aktivitātes bija lokalizēta starpšūnu telpā (39. attēls, A un B). Ārpusšūnas aktivitātes proporcija ievērojami pieauga pēc lapas attīstības 7. dienas. Ja peroksidāzes aktivitāte tika noteikta ar otrās grupas ūdeņraža donoriem (piemēram, askorbīnskābi un vanilīnu), praktiski visa aktivitāte bija lokalizēta šūnas iekšienē (39. attēls, C un D). Tikai vanilīna peroksidāzes gadījumā apmēram 10 % kopējās aktivitātes parādījās lapas audu starpšūnu telpā 11. dienā (39. attēls, C).



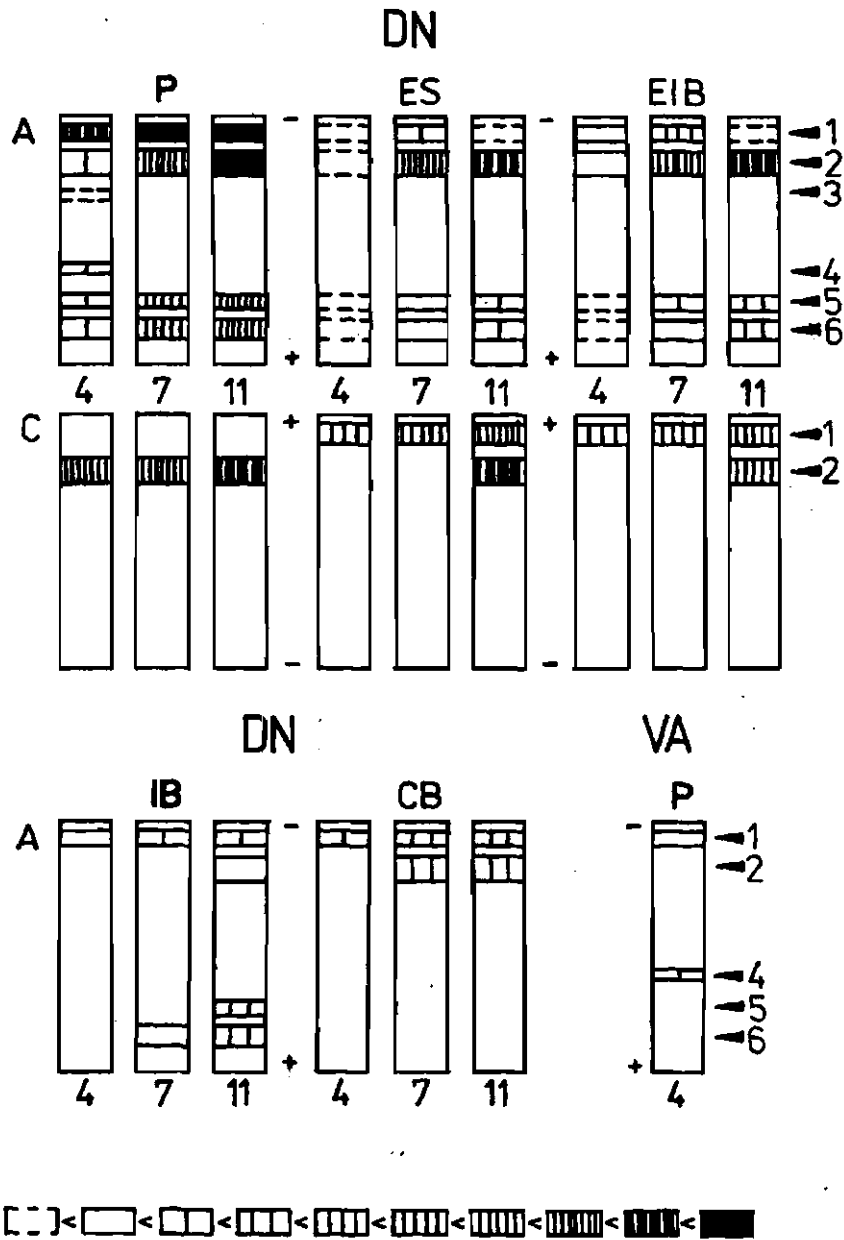


39. attēls. Peroksidāzes aktivitātes kompartmentācijas izmaiņas 4 d.v., 7 d.v. un 11 d.v. rudzu dīgstu pirmajā lapā, noteiktas ar dianizidīnu (A), gvajakolu (B), vanilīnu (C) un askorbīnskābi (D) kā ūdeņraža donoriem. Olbaltumu frakcijas ieguva no viena un tā paša augu materiāla, to secīgi infiltrējot ar 0.1 M Na fosfāta buferi (starpšūnu telpas šķīstošā, melnās kolonnas), Na fosfāta buferi ar 1 M KCl (starpšūnu telpas jonu saistītā, svītrotās kolonnas) un ekstrahējot saberztus audus 0.1 M Na fosfāta buferī (protoplastu, neiekrāsotās kolonnas). Skaitļi uz kolonnām parāda dotās frakcijas procentuālo aktivitāti no kopējās aktivitātes. Vidējie no 3 eksperimentiem \pm SE.

Izoperoksidāzes no visām frakcijām tika sadalītas ar poliakrilamīda gēla elektroforēzi gan anodajā, gan katodajā sistēmā (40. attēls). Gan anodās, gan katodās izoperoksidāzes bija lokalizētas abos kompartmentos – starpšūnu telpā un protoplastā. Tikai divas anodās izoformas, A3 un A4, no protoplastu frakcijas (P) nebija atrodamas starpšūnu telpas frakcijā (ES, EIB). Bez tam, izoperoksidāze A4 bija aktivākā no divām izoformām, kas vizualizējās ar vanilīnu (VA/P, 40. attēls). Tikai izoperoksidāze C1, kas bija lokalizēta starpšūnu telpā (ES, EIB), neparādījās protoplastu frakcijā (P). Nebija novērojamas atšķirības izoperoksidāžu spektrā starp šķīstošo (ES) un jonu saistīto (EIB) starpšūnu telpas frakciju, kas liek domāt, ka peroksidāžu atbrīvošanās starpšūnu telpā bija nepārtraukts, nevis pakāpenisks process.

Kopējās šķīstošās peroksidāzes aktivitātes pieaugums (skatīt 36. attēlu) bija saistīts ar visu esošo izoformu aktivitātes pieaugumu, izņemot A3 un A4, bet ne ar jaunu formu parādīšanos (40. attēls). Starpšūnu telpas peroksidāzes aktivitātes proporcijas straujais pieaugums, kas bija novērojams 11. dienā (skatīt 39. attēlu), sakrita ar izoperoksidāžu A2 un C2 aktivitātes pieaugumu (ES, EIB; 40. attēls).

Tikai ļoti zema katodās peroksidāzes aktivitāte bija lokalizēta jonu saistītajā un kovalenti saistītajā frakcijās (dati nav parādīti). Tomēr, šajās frakcijās katrā analizētajā lapas attīstības stadijā bija nosakāmas tikai tās anodās peroksidāzes, kuras sakrita ar visaktivākajām anodajām izoperoksidāzēm no protoplastu frakcijas dotajā stadijā (IB, CB; 40. attēls).



40. attēls. Dianizidīna peroksidāzes (DN) un vanilīna peroksidāzes (VA) izoformu kompartmentācija 4 d.v., 7 d.v. un 11 d.v. rudzu dīgstu pirmajā lapā. Protoplastu (P), starpšūnu telpas šķīstošo (ES), starpšūnu telpas jonu saistīto (EIB), jonu saistīto (IB) un kovalenti saistīto (CB) olbaltumu frakciju iegūva, kā attēliem 38. un 39. Peroksidāzes sadalīja ar poliakrilamīda gēla elektroforēzi anodajā (A) un katodajā (C) sistēmā. Fermentu ekstraktus izlīdzināja pēc aktivitātes atbilstoši audu masas vienībai. Ēnojuma pakāpe parāda salīdzinošo krāsojuma intensitāti.

Tātad, mūsu rezultāti no dinamikas un kompartmentācijas eksperimentiem skaidri parādīja, ka ūdeņraža donoru īpašības mainās pakāpeniski sekojošā kārtībā: dianizidīns (arī benzidīns, feruļskābe u.c.) – gvajakols – katehols – vanilīns – askorbīnskābe. Pretēji dianizidīna peroksidāzes aktivitātei, kura bija augstā līmenī jaunu audu starpšūnu frakcijā un krasi pieauga diferencētos audos, askorbāta peroksidāzes aktivitāte bija lokalizēta tikai meristemātisko audu protoplastos pie lapas pamatnes. Mūsu rezultāti apstiprina askorbāta kā peroksidāzes ūdeņraža donora īpašo lomu (*Nakano & Asada 1987, Goldberg et al. 1989*).

Līdz ar to, izvirzās jautājums par ūdeņraža donoru izvēli peroksidāzes aktivitātes noteikšanai fizioloģiskajos pētījumos. Parasti šim mērķim tiek izmantoti ūdeņraža donori, kas reaģē ar lielāko daudzumu izoperoksidāžu (piemēram, benzidīns un dianizidīns). Tomēr, pastāv iespēja, ka visas izoformas, kuras reaģē ar šiem ūdeņraža donoriem, nav t.s. īstās peroksidāzes. Bez tam, mūsu eksperimentos dianizidīna peroksidāzes aktivitātes fona līmeņa pieaugums rudzu lapas attīstības laikā izlīdzināja lapā eksistējošo aktivitātes gradientu. Tāpēc var secināt, ka ir izdevīgi lietot specifiskākus ūdeņraža donorus, vismaz atsevišķos gadījumos. Tā piemēram, lignīnu polimerizējošo peroksidāžu pētījumiem parasti tiek lietoti siringaldazīns un koniferilspirts (*Goldberg et al. 1983, Mäder et al. 1986*).

Pētījumi citās laboratorijās ir parādījuši, ka no dažādām peroksidāzes formām, kas atšķiras pēc to saistības spēka ar šūnas struktūrām, visaktīvākās ir tieši t.s. jonu saistītās peroksidāzes (*Chanda et al. 1986, Goldberg et al. 1986*). Pretēji tam, mūsu pētījumi parādīja, ka rudzu lapas audu ekstrakcija ar zema jonu spēka buferi atbrīvo lielāko daļu peroksidāzes aktivitātes. Izoperoksidāžu spektrs jonu un kovalenti saistītajās frakcijās, kur nebija novērojama specifisku izoformu parādīšanās, apstiprināja pieņēmumu, ka joniski saistītās peroksidāzes ir artefakts, kas radies peroksidāžu rekompartmentācijas procesā šūnu sagraušanas gaitā (*Mäder et al. 1986*).

Vēl viena peroksidāžu lokalizācijas problēma ir saistīta ar anodo un katodo izoformu specifisku atrašanos vai nu protoplastā, vai arī šūnapvalkā un starpšūnu telpā. Lai arī tiek uzskatīts, ka katodo peroksidāžu galējās lokalizācijas (darbības) vieta ir šūnas iekšpusē, bet anodās formas ir brīvi izšķīdušas starpšūnu telpā vai arī ar jonu spēku saistītas ar šūnapvalku (*Mäder et al. 1986, Schloss et al. 1987, Ros Barcelo et al. 1989*), vairāki pētījumi parādījuši zināmu katodo peroksidāžu aktivitāti arī starpšūnu telpā (*van den Berg & van Huystee 1984, Mäder et al. 1986, Schloss et al. 1987, Church & Galston 1988, Goldberg et al. 1989*). Ir izteikts pieņēmums, ka nēcīgs daudzums katodo izoperoksidāžu var parādīties starpšūnu telpā citoplazmātiskā materiāla pārnesanas rezultātā audu infiltrācijas un centrifugēšanas rezultātā (*Ros Barcelo et al. 1989*). Tomēr, rudzu lapā ievērojams daudzums izoperoksidāžu C1 un C2 bija lokalizēts starpšūnu telpā. Bez tam, C1 bija specifiski lokalizēta starpšūnu telpā un neparādījās protoplastu frakcijā.

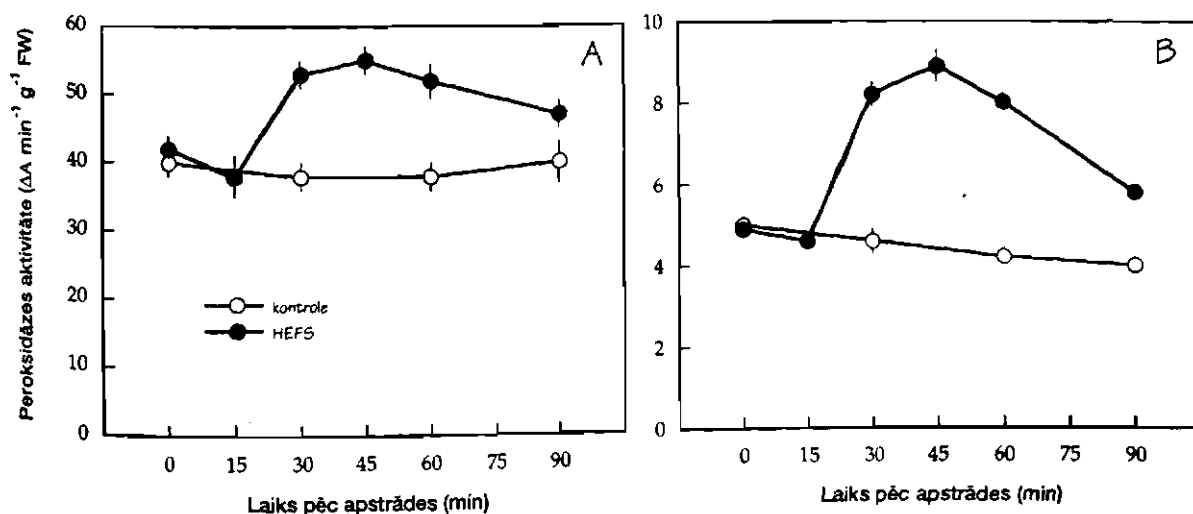
Mūsu eksperimentos ievērojama anodās peroksidāzes aktivitāte bija lokalizēta šūnas iekšpusē. Nevar ignorēt arī iespēju, ka starpšūnu telpas peroksidāzes proporcija bija pat lielāka, nekā parādīja eksperimentu rezultāti. Netieši to apstiprina arī fakts, ka izoperoksidāžu spektrs šķīstošajā (ekstraģēta ar zemas sāļu koncentrācijas buferi) un jonu saistītajā (ekstraģēta augstā sāļu koncentrācijā) bija praktiski vienāds. Šķiet, ka starpšūnu telpas peroksidāžu atbrīvošanās bija atkarīga drīzāk no infiltrācijas ciklu skaita, bet nevis no bufera jonu spēka. Ir tomēr neiespējami izdarīt galējo slēdzienu par to, vai liels daudzums aktīvo anodo izoperoksidāžu (A1, A2, A5, A6) pēc infiltrācijas/centrifugēšanas paliekošajā frakcijā tiešām bija lokalizētas protoplastā.

Askorbāta peroksidāzes aktivitātes gradients rudzu lapā (36. attēls, C) bija pretējs tam, kāds tika atklāts mūsu eksperimentos par lignīna satura pētījumiem (25. attēls). Varētu domāt, ka askorbāta un vanilīna peroksidāzes aktivitātes specifiskā kompartmentācija un sadalījums lapas attīstības laikā bija saistīta galvenokārt ar anodās izoperoksidāzes A4 aktivitāti, kura parādījās tikai aktīvi augošā lapā. Bez tam, vanilīna peroksidāzes un, it īpaši, askorbāta peroksidāzes aktivitātes dinamika lapas attīstības laikā bija līdzīgs etilēna izdalīšanās intensitātes (18. attēls) un lipoksigenāzes aktivitātes (32. attēls) dinamikai, kas norāda uz askorbāta un vanilīna peroksidāzes saistību ar noteiktiem fizioloģiskajiem procesiem.

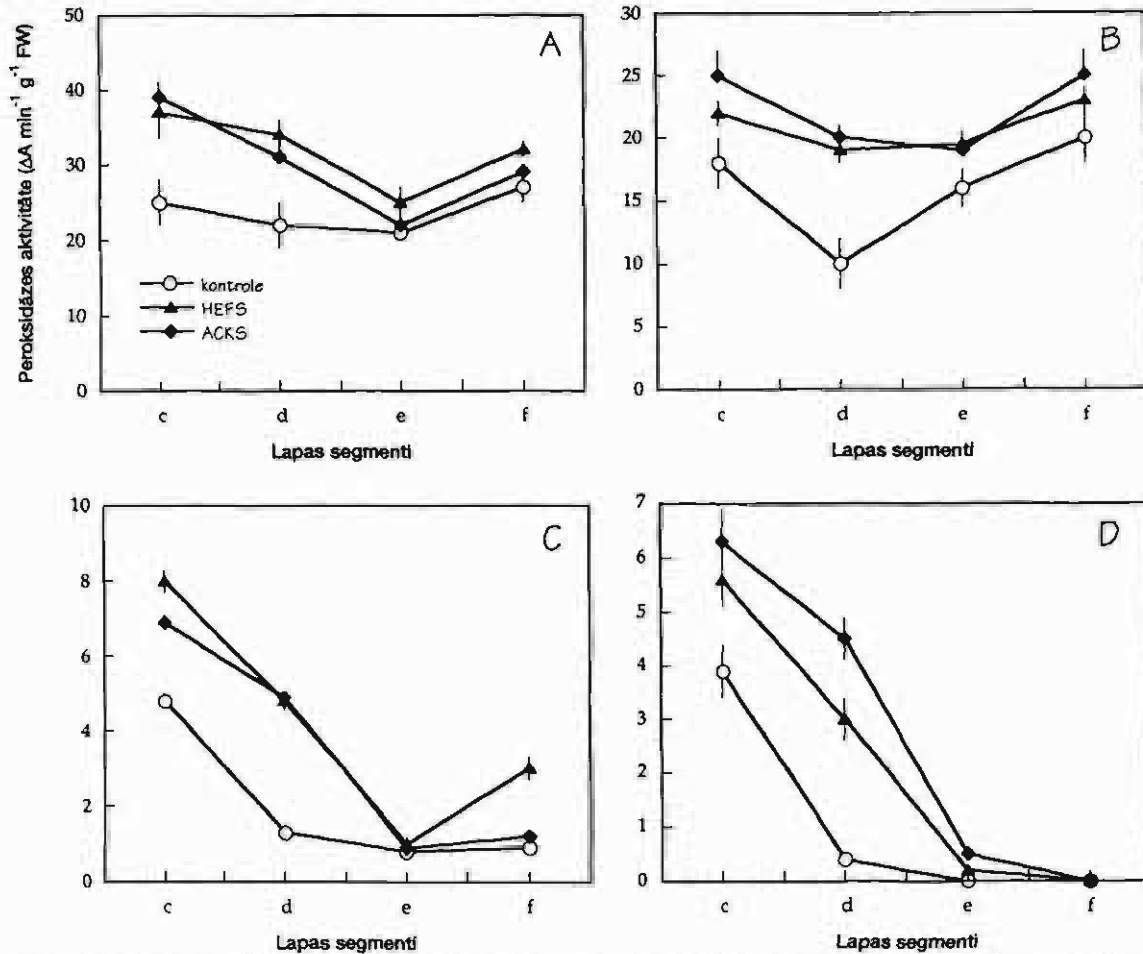
3.2.2. Eksogēnā etilēna ietekme uz peroksidāzes aktivitāti

Tā kā gan etilēnu ražojošais HEFS, gan etilēna biosintētiskais priekštecis ACKS mūsu eksperimentos izsauca graudzāļu dīgstu lineārās augšanas inhibēšanu, bija būtiski noskaidrot, vai šāda apstrāde izsauc arī peroksidāžu sistēmas aktivēšanos dīgstos. Jau 30 min pēc rudzu dīgstu apmigošanas ar HEFS to pirmajā lapā bija novērojams statistiski būtisks šķīstošās peroksidāzes aktivitātes pieaugums, kas liecina par eksogēnā etilēna tiešo ietekmi uz peroksidāžu sistēmu (41. attēls). Maksimālais aktivitātes pieaugums bija novērojams 45 min pēc apstrādes, bet vēlākā periodā tas sāka pakāpeniski samazināties. Šāda dinamika apstrādes ietekmē bija raksturīga peroksidāzes aktivitātei ar visiem lietotajiem ūdeņraža donoriem, kā tipiski piemēri parādītas gvajakola (41. attēls, A) un askorbāta (41. attēls, B) peroksidāzes aktivitātes izmaiņas. Visizteiktākais aktivitātes pieaugums HEFS apstrādes ietekmē bija askorbāta peroksidāzei – 218 % salīdzinot ar kontroli. Aktivitātes pieauguma pakāpe samazinājās rindā ferulskābe (167 %) – vanilīns (157 %) – fenilēndiamīns (148 %) – gvajakols (145 %) – dianizidīns (140 %) – kafijskābe (132 %).

Būtiska peroksidāzes aktivitātes paaugstināšanās lapā bija novērojama arī 24 h pēc apstrādes. Pieaugums bija raksturīgs aktivitātei ar visiem ūdeņraža donoriem, taču tas atšķīrās pēc intensitātes, un bija maksimālais askorbāta peroksidāzes aktivitātes gadījumā. Atšķirība starp apstrādātajiem un kontroles dīgstiem attiecībā uz to peroksidāzes aktivitātes līmeni saglabājās arī turpmākajās augšanas dienās, taču, izņemot askorbāta peroksidāzes aktivitāti, līdz ar kopējās aktivitātes pieaugumu, procentuālais aktivitātes pieaugums apstrādes ietekmē laika gaitā samazinājās.



41. attēls. Gvajakola peroksidāzes aktivitātes (A) un askorbāta peroksidāzes aktivitātes (B) izmaiņas rudzu dīgstu pirmajā lapā pēc apstrādes ar HEFS. Dati rāda vidējos no 3 paraugiem \pm SE.

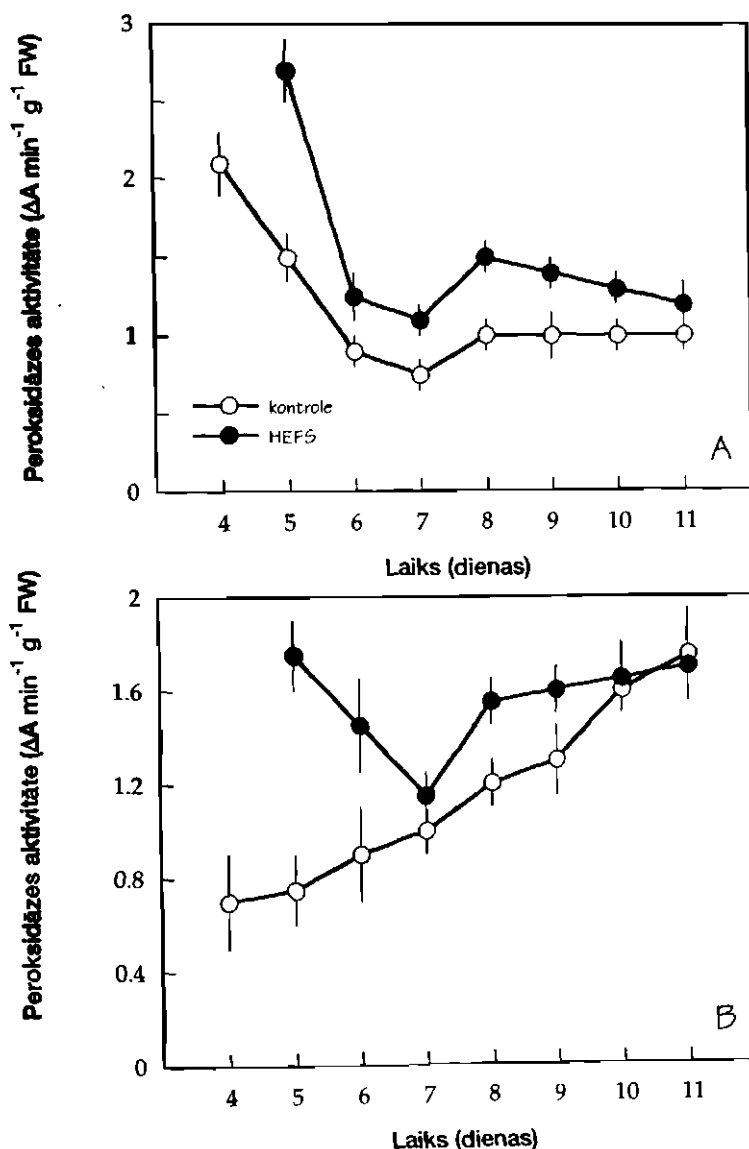


42. attēls. HEFS un ACKS ietekme uz peroksidāzes aktivitātes sadalījumu gar 5 d.v. rudzu dīgstu augošu pirmo lapu. Aktivitāte noteikta, izmantojot par ūdeņraža donoriem dianizidīnu (A), gvajakolu (B), vanilīnu (C), askorbīnskābi (D). c - f, secīgie lapas segmenti no pamatnes uz virsotni. Dati ir vidējie no 3 paraugiem \pm SE.

8. tabula. Kobalta jonu ietekme uz HEFS un ACKS inducēto gvajakola peroksidāzes aktivitāti 5 d.v. rudzu dīgstu pirmajā lapā.

Apstrāde	Peroksidāzes aktivitāte, %
Kontrole	100
0.1 mM CoSO ₄	100
0.01 M HEFS	139
0.01 M HEFS + 0.1 mM CoSO ₄	117
0.05 M ACKS	186
0.05 M ACKS + 0.1 mM CoSO ₄	126

Aktivitātes gradienta pētījumi augošā lapā (5. dienā) HEFS un ACKS apstrādes ietekmē tika izdarīti, lai noskaidrotu, kā lapas audu stāvoklis ietekmē aktivitātes izmaiņas. No rezultātiem 42. attēlā redzams, ka peroksidāzes aktivitātes izteiktāka palielināšanās HEFS un ACKS iedarbībā bija novērojama tieši jaunos, aktīvi augošos audos. Neparādījās principiālas atšķirības ietekmes sadalījumā atkarībā no eksogēnā etilēna avota (HEFS vai ACKS). Interesanti arī, ka abu veidu apstrādēs relatīvais



43. attēls. Jonu saistītās (A) un kovalenti saistītās (B) gvajakola peroksidāzes aktivitātes dinamikas izmaiņas rudzu dīgstu pirmajā laikā HEFS apstrādes ietekmē. Dati ir vidējie no 3 paraugiem \pm SE.

aktivitātes pieaugums bija vienāds un līdzīgs atbilstošo HEFS un ACKS koncentrāciju ietekmei uz lineārās augšanas inhibēšanu (skatīt 3.1.3.).

Lai noskaidrotu etilēnveidojošās sistēmas lomu peroksidāzes indukcijā HEFS un ACKS ietekmē, pārbaudīja kobalta jonu (ACKS oksidāzes inhibitors) ietekmi uz peroksidāzes aktivitāti apstrādātu dīgstu lapā. Papildus apstrāde ar 0.1 mM CoSO₄ pirms etilēnproducentu lietošanas būtiski samazināja peroksidāzes aktivitātes pieaugumu HEFS un ACKS ietekmē (8. tabula). HEFS gadījumā kobalts samazināja aktivitātes pieaugumu par 55 %, bet ACKS gadījumā – par 70 %. Kontroles dīgstu apstrāde ar kobaltu dotajā koncentrācijā neizsauca aktivitātes izmaiņas. Tā kā iepriekšējie eksperimenti parādīja etilēna autokatalītisko efektu rudzu dīgstos (skatīt 3.1.4.), var secināt, ka peroksidāzes aktivitātes pieaugums eksogēnā etilēna ietekmē ir atkarīgs gan no etilēna tiešās iedarbības, gan arī no etilēna biosintēzes aktivācijas.

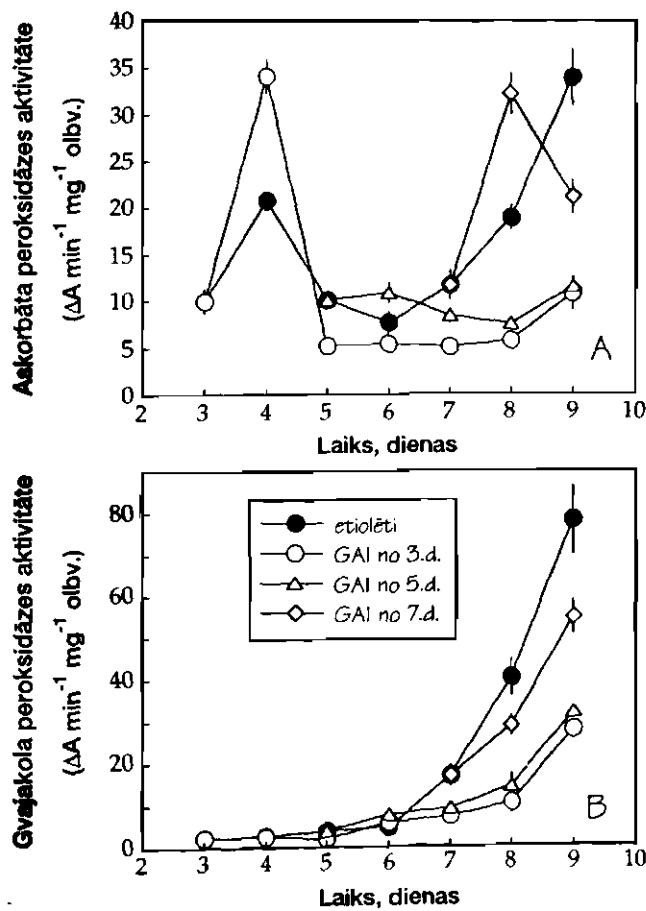
Atsevišķi eksperimenti tika izdarīti, lai noteiktu, kā eksogēnais etilēns ietekmē peroksidāzes aktivitāti citās frakcijās, kas atšķiras pēc saistības pakāpes ar šūnas struktūrām, jo rudzu lapās bez šķīstošās peroksidāzes ir iespējams noteikt arī t.s. jonu saistīto un kovalenti saistīto peroksidāzes aktivitāti (skatīt 3.2.1.). Peroksidāzes aktivitātes izmaiņas šajās frakcijās principiāli atšķirās atkarībā no apstrādes ar HEFS. Ja jonu saistītā gvajakola peroksidāzes aktivitāte apstrādātu dīgstu lapā bija konstanti paaugstināta attiecībā pret aktivitāti kontroles dīgstos, tad kovalenti saistītās peroksidāzes frakcijā statistiski būtisks pieaugums apstrādes ietekmē bija novērojams tikai līdz lapas lineārās augšanas apstāšanās brīdim 7. dienā (43. attēls). Pie tam, pieaugums kovalenti saistītāja frakcijā bija vairāk izteikts. Šie dati liecina par to, ka tieši kovalenti saistītās peroksidāzes frakcija piedalās lineārās augšanas inhibēšanā etilēnproducentu ietekmē.

Tā kā etilēns var paaugstināt peroksidāzes aktivitāti, izsaucot atbilstošo gēnu ekspresiju un olbaltumu sintēzi *de novo* (Abeles et al. 1988, Ishige et al. 1993, Ito et al. 1994), jādomā, ka arī graudzāļu dīgstos peroksidāzes aktivitātes pieaugums ir saistīts ar fermenta sintēzi. Tā kā aktivitātes pieaugums bija novērojams vienlaicīgi visās frakcijās, jāsecina, ka šis process nav saistīts ar peroksidāzes molekulu lokalizācijas maiņu, kas novērota atsevišķos gadījumos (Gaspar et al. 1985).

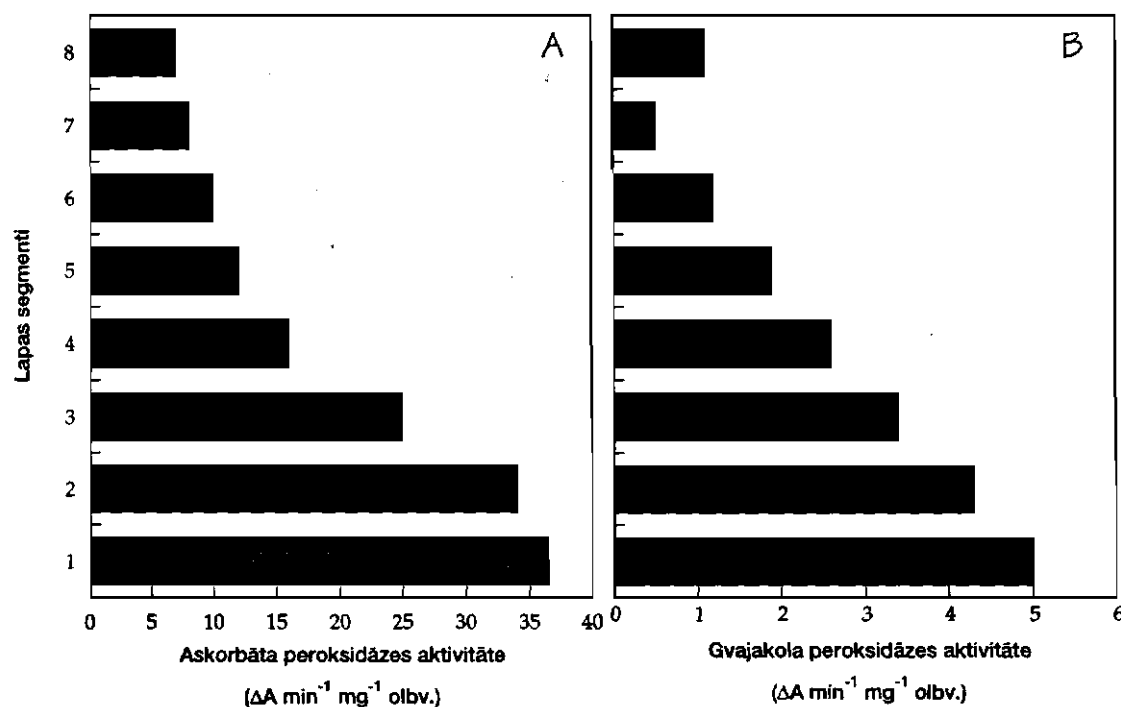
3.2.3. Gaismas ietekme uz peroksidāzes aktivitāti

Tā kā fotosintēzes process ir saistīts ar ūdeņraža peroksīda rašanos, bet askorbāta peroksidāze ir galvenais peroksīdu pārtverošais ferments hloroplastos (Asada 1992), augu pārejai no etiolācijas stāvokļa uz aktīvu fotosintēzi, kas norisinās augu normālas attīstības gaitā, tiem parādoties augsnes virspusē, būtu jāizsauc askorbāta peroksidāzes indukcija. Dotā darba ietvaros šis process tika pētīts miežu dīgstu modeļsistēmā, analizējot pirmajā lapā notiekošās peroksidāzes aktivitātes izmaiņas gaismas faktora ietekmē.

Kā jau tas bija sagaidāms, etiolētu miežu dīgstu pārvietošana gaismā izraisīja īslaicīgu, bet būtisku askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugumu to pirmajā lapā (44. attēls, A). Šāds efekts, pārvietojot dīgstus gaismā arī vēlākā periodā, parādījās neatkarīgi no askorbāta peroksidāzes dinamikas izmaiņām etiolētos augos to attīstības gaitā. Interesanti, ka askorbāta peroksidāzes dinamika etiolētos un gaismā augošos



44. attēls. Askorbāta peroksidāzes aktivitātes (A) un gvajakola peroksidāzes aktivitātes (B) izmaiņas miežu dīgstu pirmajā lapā pēc etiolētu augu pārvietošanas fotoperioda apstākļos. Dīgsti pārvietoti gaismā 3., 5. un 7. dienā no audzēšanas sākuma. Dati rāda vidējos no 4 paraugiem \pm SE.



44. attēls. Askorbāta peroksidāzes aktivitātes (A) un gvajakola peroksidāzes aktivitātes (B) gradients gar 4 d.v. etiolētu miežu dīgstu pirmo lapu. 1 – 8, secīgi lapas segmenti no pamatnes uz virsotni. Dati rāda vidējos no 4 paraugiem.

augos bija atšķirīga, pie tam, aktivitāte ilgstošos fotosintēzes apstākļos bija ievērojami zemāka, nekā etiolācijas apstākļos (44. attēls, A). Var pieņemt, ka izteiktais askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugums ieilgušas etiolācijas apstākļos bija saistīts ar endogēnā oksidatīvā stresa attīstību enerģētisko procesu disbalansa rezultātā.

Pretēji gaismas faktora induktīvajam efektam uz askorbāta peroksidāzes aktivitāti, gvajakola peroksidāzes aktivitāte samazinājās, pārvietojot dīgstus gaismā (44. attēls, B). Tātad, fotooksidatīvā stresa situācija specifiski inducē askorbāta peroksidāzi.

Gaismas stimulējošā efekta uz askorbāta peroksidāzi īslaicīgā izpausme miežu dīgstu pirmajā lapā ir visai atšķirīga no literatūrā aprakstītās gaismas iedarbības uz askorbāta peroksidāzi. Tā piemēram, sinepju dīgstu dīgļlapās gaisma izsauca ilgstošu fitohroma atkarīgu askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugumu (Thomsen *et al.* 1992). Jādomā, ka šādu atšķirību izsauc katrā konkrētā gadījumā analizēto auga daļu fizioloģiskais stāvoklis – miežu lapai aktīvas lineārās augšanas fāzē ir citādas fizioloģiskās funkcijas, nekā augšanu izbeigušai sinepes dīgļlapai, kur gaisma, domājams, aktivē arī paātrinātu audu novecošanos uz aktīvas fotosintēzes fona. Jādomā arī, ka askorbāta peroksidāzes indukcija gaismas ietekmē ir atkarīga no gaismas intensitātes, kas tieši ietekmē fotosintēzes intensitāti un, sekojoši, ūdeņraža peroksīda veidošanos (Schoner & Krause 1990, Cakmak & Marschner 1992). Tāpēc, pie mērenas gaismas intensitātes, kurai augi ir adaptēti, pāreja no etiolācijas uz fotosintēzi izsauc tikai īslaicīgu iekššūnas stresu, bet vēlākā laika periodā esošā askorbāta peroksidāzes sistēma spēj pārtvert visu mēreni izdalošos H₂O₂ daudzumu. Tikai papildus stresa

apstākļos rodas fotooksidatīvā stresa situācija ar sekojošu askorbāta peroksidāzes indukciju.

Būtisks ir arī jautājums par attīstības regulētajām askorbāta peroksidāzes aktivitātes izmaiņām etiolētu miežu dīgstu pirmās lapas augšanas laikā. Kā zināms, etiolācija izraisa pastiprinātu dīgstu stiepšanos garumā, salīdzinot ar tāda paša vecuma fotosintētiski aktīviem augiem (Mosejev *et al.* 1990). Askorbāta peroksidāzes aktivitātes gradients gar etiolētu augošu lapu pēc rakstura sakrita ar gradientu, kāds iepriekš bija novērots gaismā augošu rudzu lapās (skatīt 3.2.1.) – būtiska askorbāta peroksidāzes aktivitāte bija nosakāma aktīvas šūnu dalīšanās un stiepšanās zonās, bet ar pāreju uz diferenciāciju tās līmenis strauji samazinājās (45. attēls, A). Jāatzīmē, ka atšķirībā no divdīgļlapjiem, kur visā dīgstu attīstības laikā atrasta paralelitāte starp askorbāta peroksidāzes un gvajakola peroksidāzes aktivitātēm (Goldberg *et al.* 1989), graudzālēm šāda sakarība ir spēkā tikai aktīvi augošos orgānos, bet ar augšanas pārtraukšanos novērojams krass gvajakola peroksidāzes aktivitātes pieaugums (45. attēls, B). Būtiski arī, ka etiolētu dīgstu pirmajā lapā šūnu stiepšanās zona ir ievērojami garāka, nekā tāda paša vecuma fotosintezējošiem dīgstiem, kas arī izraisa peroksidāzes aktivitātes sadalījuma atšķirības no iepriekš novērotajām.

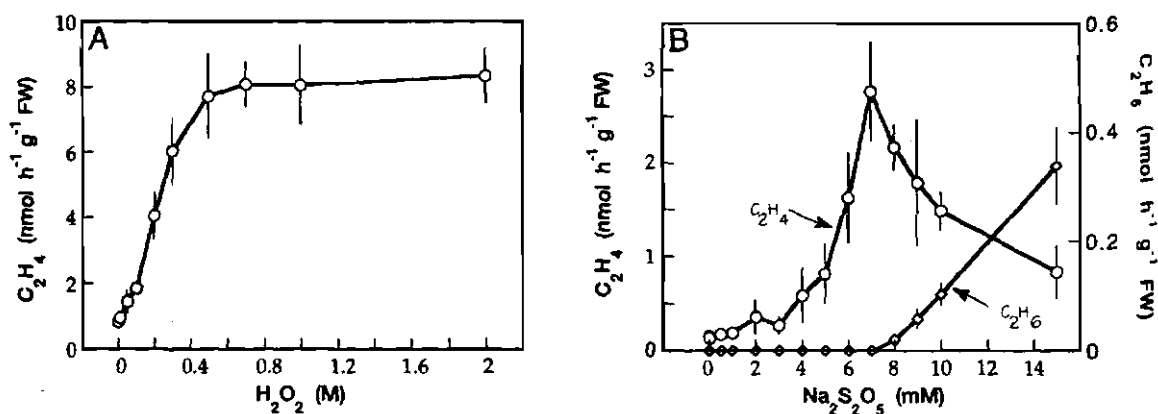
3.3. Etilēna biosintēze un oksidatīvā stresa pretreakcijas skujukociem

3.3.1. Etilēna biosintēzes indukcija

Lai gan stresa inducētā ACKS sintēzes ekspresija translācijas līmenī ir pirmā vispārzināmā atbildes reakcija stresa atkarīgā etilēna veidošanās procesā (Nakajima *et al.* 1990, Van der Straeten *et al.* 1990), virkne pēdējā laika pētījumu ir parādījuši alternatīva etilēna veidošanās ceļa eksistenci augstākajos augos (Mattoo *et al.* 1986, Chen *et al.* 1990, Chen & Wellburn 1991, Mattoo *et al.* 1992). Tā piemēram, organiskie peroksīdi tiek uzskatīti par visticamākajiem priekštečiem ACKS neatkarīgā etilēna veidošanās procesā ar skābo lietu apstrādātās egļu skujās (Chen *et al.* 1990). Pieņem, ka šāds pats etilēna veidošanās mehānisms darbojas arī zaļās egles skujās līdztekus parastajam ACKS atkarīgajam ceļam (Chen & Wellburn 1991).

Lai pārbaudītu alternatīvā etilēna sintēzes ceļa eksistenci skujukociem, tika uzsākti pētījumi par stresa atkarīgā etilēna biosintēzi priežu skujās, pievēršot īpašu uzmanību iespējai izmantot etilēna biosintēzes un lipīdu peroksidācijas inhibitorus, lai atšķirtu dažādus etilēna veidošanās ceļus.

Etilēna izdalīšanās bāzes līmenis no atdalītām priežu skujām, inkubējot tās ūdenī, bija 0.15 līdz 0.50 nmol stundā uz gramu dzīvās masas, nosakot intensitāti 10-12 stundas pēc atdalīšanas (dati nav parādīti). Gan H_2O_2 , gan $Na_2S_2O_5$ inducēja etilēna izdalīšanās pieaugumu skujās, kuras lielums bija atkarīgs no lietotās koncentrācijas (46. attēls). Tikai neliela indukcija bija novērojama skujās H_2O_2 koncentrācijās, kas zemākas par 0.1 M (46. attēls, A). Jau 0.2 M koncentrācijā H_2O_2 apstrāde izsauca pirmo statistiski būtisko etilēna izdalīšanās pieaugumu. Koncentrācija, kas izsauca maksimālo atbildi bija 0.5 M, kas norāda, ka priežu skuju audos darbojas efektīva



46. attēls. Etilēna un etāna izdalīšanās intensitātes priežu skujās atkarība no H_2O_2 (A) un $Na_2S_2O_5$ (B) koncentrācijas inkubācijas vidē. Etilēna un etāna izdalīšanos noteica 10 līdz 12 h pēc inkubācijas sākuma nepārtrauktā gaismā. Etāns neveidojās H_2O_2 ietekmē. Dati rāda vidējos no 4 paraugiem $\pm SD$ katrai koncentrācijai.

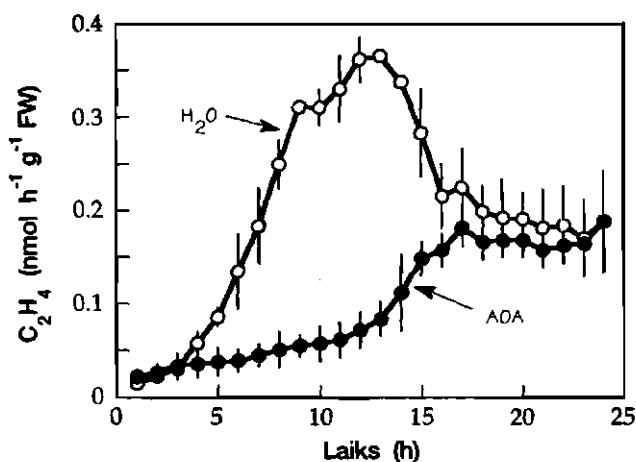
9. tabula. Etilēna sintēzes inhibitoru ietekme uz stresa inducēto etilēna izdalīšanos priežu un egļu skuļās. Izdalīto etilēnu uzkrāja 16 h laikā no inkubācijas sākuma nepārtrauktā gaismā. Dati ir vidējie no diviem atsevišķiem eksperimentiem, pa 4 paraugiem katrā eksperimentā katram apstrādes variantam. Kontroles etilēna izdalīšanās intensitāte bija 0.046 ± 0.015 , 0.329 ± 0.037 un 0.192 ± 0.022 $\text{nmol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ dzīvās masas, inkubējot attiecīgi ar H_2O , H_2O_2 un $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$.

Inkubēšanas vide	C_2H_4 , Inhibēšanas %	
	Priede	Egļe
H_2O	0	0
+ AVG (0.1 mM)	51	-
+ AOA (2 mM)	49	61
+ Co^{2+} (5 mM)	58	73
H_2O_2 (0.88 M)	0	0
+AVG	74	-
+ AOA	78	52
+ Co^{2+}	72	73
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (6 mM)	0	-
+ AOA	76	-

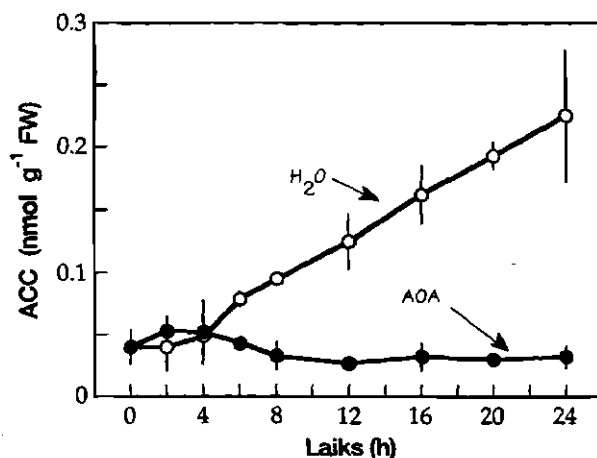
H_2O_2 -sadalošā sistēma. Skujas, kas bija inkubētas peroksīdā, veidoja tikai niecīgu daudzumu etāna (mazāk par 10 pmol stundā uz gramu dzīvās masas; dati nav parādīti). $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ koncentrācijās virs 4 mM bija efektīvs etilēna izdalīšanās stimulators (46. attēls, B). Tomēr, pieaugot lietotajai $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ koncentrācijai virs 8 mM, etilēna izdalīšanās intensitāte pakāpeniski samazinājās paralēli būtiskam etāna izdalīšanās intensitātes pieaugumam (46. attēls, B).

Skuju inkubēšana tumsā būtiski neietekmēja etilēna izdalīšanās intensitāti no atdalīšanas rezultātā un ar $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ stresotām skuļām (dati nav parādīti). Tomēr, H_2O_2 atkarīgā etilēna izdalīšanās stimulācija bija ievērojami izteiktāka tumsā, nekā gaismā.

ACKS sintēzes inhibitori ir tikuši lietoti, lai mēģinātu pierādīt etilēna veidošanās alternatīvā ceļa eksistenci (Chen & Wellburn 1991, Mattoo et al. 1992). Inhibitoru nejutīgās etilēna izdalīšanās intensitātes esamība (apmēram 60 līdz 70 % no kopējā limeņa) ir izmantota kā pierādījums ACKS neatkarīgā etilēna veidošanās ceļa darbībai egļu skuļās (Chen & Wellburn 1991). Mūsu eksperimentos atdalītas priežu skuļas inkubēja 16 stundas dažādās vidēs gan ķīmisko stresa aģentu, gan etilēna biosintēzes inhibitoru klātbūtnē. Gan aminoetoksiviniļglicīns (AVG), gan aminooksietilskābe (AOA), zināmi ACKS sintēzes inhibitori (Yu et al. 1979, Yu & Yang 1979), reducēja etilēna izdalīšanos apmēram par 50 % ūdenī inkubētās skuļās un apmēram par 75 % skuļās, ko inkubēja H_2O_2 vai $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (9. tabula). Inhibitors ACKS pārvēršanai par etilēnu, Co^{2+} (Yu & Yang 1979), izsauca līdzīgu inhibējošo iedarbību uz pamata un ķīmiskā stresa inducētā etilēna izdalīšanās intensitāti (9. tabula). Šie rezultāti apstiprina inhibitoru nejutīgās etilēna veidošanās eksistenci priežu skuļās. Tomēr, jāsecina, ka šādu efektu var izsaukt vai nu ACKS neatkarīgā ceļa darbība, vai arī ACKS atkarīgā ceļa darbība, kurš ir nejutīgs pret lietotajiem inhibitoriem. Lai pārbaudītu šīs hipotēzes,



47. attēls. Skuju atdalīšanas inducētās etilēna izdalīšanās dinamika. Skujas atdalīja laikā "0" un inkubēja ūdenī vai 2 mM AOA nepārtrauktā gaismā. Dati rāda vidējos no 4 paraugiem \pm SD.

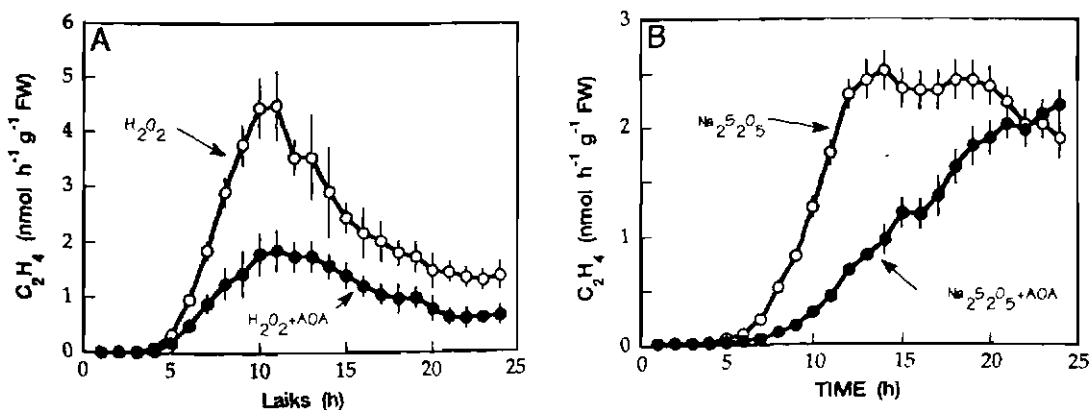


48. attēls. Skuju atdalīšanas ietekme uz ACKS saturu. Skujas inkubēja ūdenī vai 2 mM AOA nepārtrauktā gaismā. Dati rāda vidējos no 4 paraugiem \pm SD.

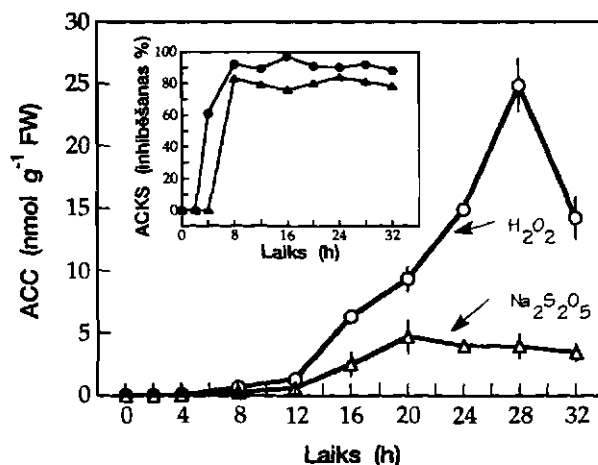
tika izdarīta virkne etilēna biosintēzes dinamikas eksperimentu ar stresotām priežu skujām.

Atdalīšanas stresa ietekmi uz etilēna biosintēzi analizēja, nosakot etilēna izdalīšanās, ACKS satura un ACKS oksidāzes kapacitātes izmaiņas 24 stundas inkubējot skujas ūdenī. Maksimālā etilēna izdalīšanās intensitāte bija novērojama 11 līdz 13 stundas pēc skuju atdalīšanas (47. attēls). ACKS pamatlīmenis intaktās skujās bija ļoti zems (apmēram 0.05 nmol g^{-1} dzīvās masas). Pirmais būtiskais ACKS daudzuma pieaugums ūdenī inkubētās priežu skujās bija novērojams 6 stundas pēc atdalīšanas (48. attēls), ar sekojošu lineāru pieaugumu tālākajās 18 inkubēšanas stundās. AOA pievienošana inkubācijas videi novērsa ACKS līmeņa pieaugumu (48. attēls). Bez tam, ja AOA pievienoja dažādos laikos pēc skuju atdalīšanas, etilēna izdalīšanās intensitāte strauji kritās 3 stundu laikā līdz līmenim, kāds bija skujām, kuras jau ilgstoši tika inkubētas AOA klātbūtnē (dati nav parādīti).

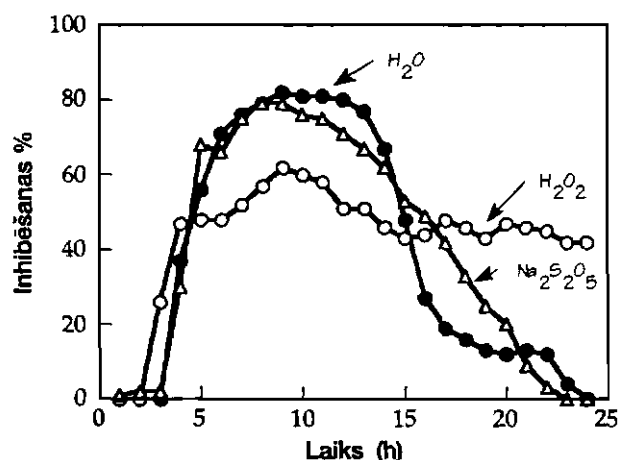
Etilēna izdalīšanās no skujām 0.88 M H_2O_2 klātbūtnē sekoja tai pašai dinamikai, kā etilēna izdalīšanās atdalīšanas rezultātā, taču atbildes intensitāte bija vairāk kā 10 reizes augstāka (49. attēls, A). ACKS līmenis lēni pieauga 12 stundu inkubācijas laikā H_2O_2 , sasniedza maksimumu pēc 28 stundām (vairāk kā 100 reizes pārsniedzot kontroles līmeni) un pēc tam samazinājās (50. attēls). Etilēna izdalīšanās intensitāte pieauga 7 reizes skujās, kas bija ievietotas 6 mM $Na_2S_2O_5$, ar lag periodu apmēram 5 stundu ilgumā, un sasniedza maksimālo līmeni 12 stundas pēc apstrādes sākuma (49. attēls, B). ACKS pieauga līdz maksimumam 20 stundu laikā no apstrādes sākuma ar $Na_2S_2O_5$. Gan H_2O_2 , gan $Na_2S_2O_5$ inducēto ACKS pieaugumu efektīvi inhibēja AOA pievienošana, attiecīgi apmēram par 90 % un 80 % (50. attēls, iekšējais grafiks). No ACKS uzkrāšanās neatkarīgā etilēna izdalīšanās dinamika H_2O_2 apstrādātās skujās bija paralēla kopējai etilēna izdalīšanās dinamikai (49. attēls, A). AOA inhibēja tikai apmēram 45 % no H_2O_2 inducētā etilēna visā inkubācijas perioda laikā, ar nelielu izteiktāku iedarbību no 8 līdz 11 stundām, kas sakrita ar etilēna izdalīšanās maksimumu (51. attēls). Pretēji tam, etilēna izdalīšanās inhibēšana no skujām, kas bija apstrādātas ar $Na_2S_2O_5$ vienlaicīgi ar AOA, pēc rakstura bija līdzīga tai, kāda tika novērota no atdalītām skujām, apstrādātām ar AOA (51. attēls). Šie rezultāti nevar pilnībā pierādīt alternatīvā etilēna veidošanās ceļa indukciju stresotās priežu skujās. Pret AOA nejutīgo etilēna izdalīšanos priežu skuju sistēmā var izskaidrot arī bez alternatīvā ceļa piedalīšanās, piemēram, ar ACKS sintāzes inhibitoru netiešiem vai blakus efektiem. Tik tiešām, AOA ir labi zināms piridoksāl-fosfāta atkarīgo fermentatīvo reakciju inhibitors (Rando 1974). Ir aprakstīts, ka AOA inhibē fenilalanīna amonijliāzes aktivitāti (Amrhein et al. 1976) un H_2S veidošanos no cisteīna gan *in vivo*, gan *in vitro* (Sekiya et al. 1982). Bez tam, pēdējā laika dati apstiprina, ka AOA var stabilizēt ACKS sintēzes olbaltumu *in vivo* (Kim & Yang 1992, Wang & Arteca 1992). Tāpēc ir pilnīgi iespējams, ka AOA līdztekus ACKS sintēzes inhibēšanai izsauc papildus efektu uz ACKS atkarīgo



49. attēls. Ķīmiskā stresa inducētās etilēna izdalīšanās dinamika priežu skujās. Etilēna izdalīšanos iniciēja ar 0.88 M H_2O_2 (A) un 6 mM $Na_2S_2O_5$ (B). Skujas inkubēja 2 mM AOA klātbūtnē vai bez tā nepārtrauktā gaismā. Etilēnu noteica ar 1 h gariem intervāliem. Dati rāda vidējos no 4 paraugiem $\pm SD$.



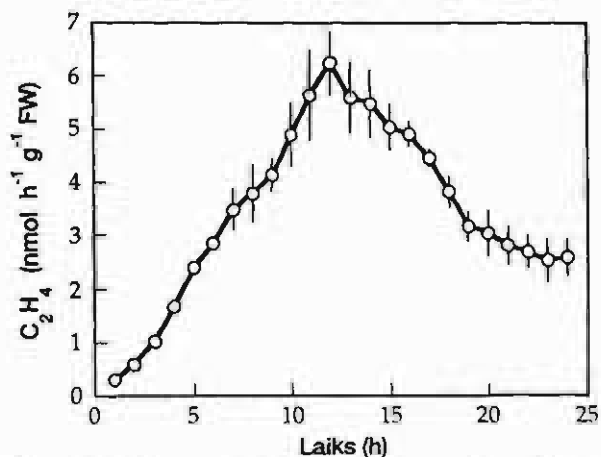
50. attēls. Ķīmiskā stresa ietekme uz ACKS saturu atdalītās priežu skuļās. Skuļas tika inkubētas 0.88 M H_2O_2 vai 6 mM $Na_2S_2O_5$ klātbūtnē. Dati rāda vidējos no 3 paraugiem katrā punktā $\pm SD$. Iekšējais grafiks parāda H_2O_2 un $Na_2S_2O_5$ inducētās ACKS sintēzes inhibēšanu ar 2 mM AOA.



51. attēls. Stresa etilēna izdalīšanās inhibēšanas ar AOA dinamika. Skuļas tika inkubētas H_2O , 0.88 M H_2O_2 vai 6 mM $Na_2S_2O_5$. Dati aprēķināti no rezultātiem 47. un 49. attēlos.

etilēna veidošanās sistēmu, kas padara ar šā inhibitora lietošanu iegūto datu interpretāciju visai sarežģītu. Jāatzīmē arī, ka AOA izraisīja etilēna izdalīšanās indukciju no priežu skuļām (dati nav parādīti).

Mūsu pētījumos ACKS saturs pieaugums bija obligāts posms stresa atkarīgā etilēna izdalīšanās indukcijai ar visiem lietotajiem stresoriem (48. un 50. attēls), kas parāda parastā stresa vadītā etilēna biosintēzes ceļa piedalīšanos ar ACKS sintēzi kā galveno fermentu (Yang & Hoffman 1984). Tā kā būtisks ACKS līmenis, kas vēl turpināja pieaugt, bija novērojams atdalītās skuļās 12 stundas no inkubācijas sākuma, kad sāka parādīties etilēna izdalīšanās samazināšanās, tika analizēta ACKS oksidāzes kapacitāte *in vivo*, lietojot atdalītas skuļas, kas inkubētas 1 mM ACKS klātbūtnē. Skuju audu ACKS-etilēna pārvēršanas kapacitāte pieauga lineāri pirmo 12 inkubēšanas stundu laikā (52. attēls). ACKS oksidāzes aktivitātes samazināšanās pēc 12 stundām (52. attēls) sakrita ar etilēna izdalīšanās intensitātes kritumu (47. attēls), parādot, ka etilēna izdalīšanās intensitāti



52. attēls. ACKS oksidāzes aktivitātes dinamika atdalītās priežu skujās. Skujas inkubēja 1 mM ACKS nepārtrauktā gaismā. Dati ir vidējie no 4 paraugiem \pm SD.

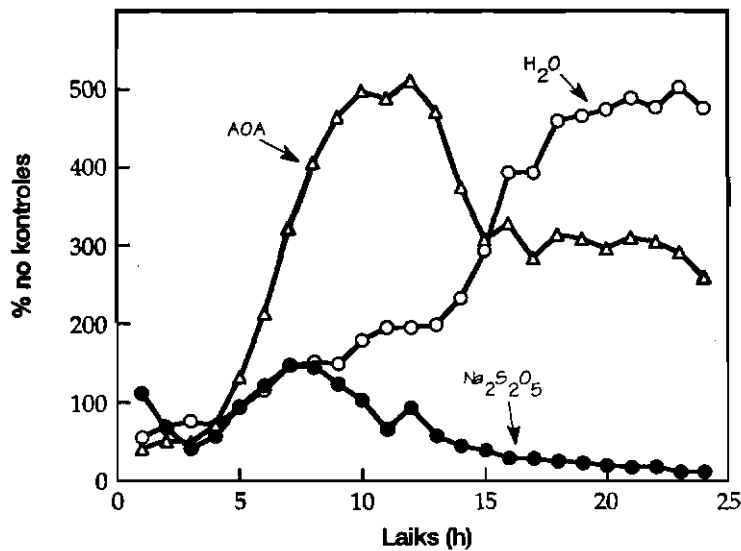
10. tabula. Cikloheksimīda ietekme uz stresa inducēto etilēna izdalīšanos priežu skujās. Galējās ķīmikāliju koncentrācijas inkubācijas vidē bija sekojošas: 0.1 mM cikloheksimīds, 2 mM AOA, 0.88 M H₂O₂, 6 mM Na₂S₂O₅. Etilēna izdalīšanās intensitāti noteica 10 līdz 12 h no inkubācijas sākuma nepārtrauktā gaismā. Rezultāti parāda vidējos no 4 paraugiem \pm SD.

Inkubēšanas vide	C ₂ H ₄ , nmol h ⁻¹ g ⁻¹ FW
H ₂ O	0.26 \pm 0.01
+CHI	0.43 \pm 0.08
AOA	0.08 \pm 0.02
+CHI	0.19 \pm 0.01
H ₂ O ₂	4.62 \pm 0.05
+CHI	0.42 \pm 0.01
H ₂ O ₂ + AOA	1.89 \pm 0.20
+CHI	0.20 \pm 0.01
Na ₂ S ₂ O ₅	1.38 \pm 0.19
+CHI	2.26 \pm 0.04
Na ₂ S ₂ O ₅ + AOA	0.68 \pm 0.10
+CHI	0.66 \pm 0.07

šajā laikā ierobežoja zemā ACKS oksidāzes aktivitāte. Iespējamā ACKS oksidāzes piedalīšanās ķīmiskā stresa inducētā etilēna izdalīšanās intensitātes krituma laikā netika pētīta. Tomēr, etilēna izdalīšanās dinamika (49. attēls A) un ACKS saturs izmaiņas H₂O₂ inkubētās skujās (50. attēls) liecina, ka ACKS oksidāze bija limitējošais faktors abos gadījumos. Līdzīga ACKS oksidāzes ierobežojošā loma stresa etilēna biosintēzē ir bijusi aprakstīta jau agrāk (Evensen 1984).

Jāatzīmē, ka novērotais ACKS oksidāzes kapacitātes pieaugums stresa iedarbības laikā (52. attēls) ir vienkāršākais izskaidrojums etilēna izdalīšanās pieaugumam inhibitoru klātbūtnē, neraugoties uz nemainīgu ACKS saturu.

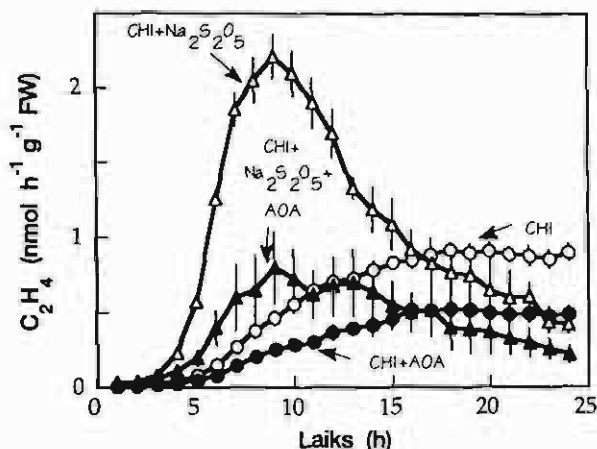
Lai noteiktu, vai stresa inducētajai etilēna biosintēzei priežu skujās ir nepieciešama olbaltumvielu sintēze, tika pētīta cikloheksimīda iedarbība. Cikloheksimīda pievienošana gandrīz pilnībā inhibēja gan kopējo, gan AOA-nejutīgo



53. attēls. Stresa etilēna izdalīšanās inhibēšanas ar 0.1 mM cikloheksimīdu dinamika. Etilēna izdalīšanos inducēja ar atdalīšanu (H_2O), $Na_2S_2O_5$ vai AOA. Dati aprēķināti no 4 paraugiem katram apstrādes variantam.

etilēna izdalīšanos H_2O_2 ietekmē (10. tabula), parādot, ka olbaltumu sintēze *de novo* bija nepieciešama, lai inducētu etilēna izdalīšanos ar H_2O_2 . Tomēr, izskatījās, ka cikloheksimīdam ir pozitīva iedarbība uz etilēna izdalīšanos no skujām, kuras inkubētas ūdenī vai $Na_2S_2O_5$ klātbūtnē (10. tabula). Lai noteiktu cikloheksimīda iedarbību šajās sistēmās, tika izdarīti dinamikas eksperimenti. Cikloheksimīds būtiski inhibēja etilēna izdalīšanos pirmajās 4 inkubēšanas stundās (53. attēls). Tālākajā inkubācijas periodā bija novērojams stimulējošs cikloheksimīda efekts uz etilēna izdalīšanos gan no ūdenī, gan $Na_2S_2O_5$ inkubētām skujām (53. attēls). Lai gan cikloheksimīda apstrāde ievērojami stimulēja AOA nejutīgo etilēna izdalīšanos no atdalītām skujām (53. attēls), AOA savukārt izsauca gan cikloheksimīda, gan cikloheksimīda plus $Na_2S_2O_5$ inducēto etilēna izdalīšanos (54. attēls). Neskatoties uz to, ka olbaltumvielu sintēze ir nepieciešama gan ACKS sintāzes (Boller & Kende 1980), gan ACKS oksidāzes (mūsu pētījumi, 11. attēls; Spanu & Boller 1989) indukcijai stresotos augu audos, šeit aprakstītie rezultāti apstiprina iepriekšējos novērojumus par cikloheksimīda papildus iedarbību uz etilēna veidošanos, to skaitā, stimulējot stresa inducēto etilēna izdalīšanos (Abeles & Abeles 1972, Hogset et al. 1981, Mattoo et al. 1992).

Selenometionīns ir ticis lietots etilēna izdalīšanās stimulēšanai, kas notiek pamata biosintēzes ceļā (Konze & Elstner 1978, Konze & Kende 1979). Tā kā selenometionīns ir labi zināms lipīdu peroksidācijas inhibitors (Tappel 1965), to lietoja, lai atšķirtu ACKS atkarīgo un ACKS neatkarīgo etilēna veidošanās ceļus (Mattoo et al. 1992). Atdalītās priežu skujās selenometionīns ievērojami stimulēja atdalīšanos un 6 mM $Na_2S_2O_5$ inducēto etilēna izdalīšanos, tikai nedaudz palielinot etilēna izdalīšanos H_2O_2 apstrādes gadījumā (10. tabula). Pretēji tam, etilēna izdalīšanās AOA klātbūtnē no 6 mM un 10 mM $Na_2S_2O_5$ apstrādātām skujām, kā arī bez AOA no $Na_2S_2O_5$



54. attēls. Cikloheksimīda inducētās etilēna izdalīšanās dinamika priežu skujuās. Skujas inkubēja cikloheksimīdā un cikloheksimīdā + Na₂S₂O₅ 2 mM AOA klātbūtnē vai bez tā nepārtrauktā gaismā. Etilēnu noteica ar 1 h gariem intervāliem. Dati rāda vidējos no 4 paraugiem ±SD.

11. tabula. Selenometionīna (SeMet) ietekme uz stresa inducēto etilēna un etāna izdalīšanos priežu skujuās. Galējā selenometionīna koncentrācija inkubācijas vidē bija 2.5 mM. Citu vielu koncentrācijas bija kā 10. tabulā, vai kā norādītas zemāk. Dati rāda vidējos no 4 paraugiem ±SD.

Inkubēšanas vide	Analīzes laiks, h	Etilēna izdalīšanās,		Etāna izdalīšanās,	
		nmol h ⁻¹ g ⁻¹ FW	%	nmol h ⁻¹ g ⁻¹ FW	%
H ₂ O	11-13	0.33±0.02	100	0	0
+ SeMet		1.20±0.09	364	0	0
CHI	11-13	0.42±0.07	100	0	0
+ SeMet		0.44±0.03	105	0	0
AOA	11-13	0.07±0.01	100	0	0
+ SeMet		0.16±0.05	229		
H ₂ O ₂	10-12	3.56±0.07	100	0	0
+ SeMet		4.16±0.07	117	0	0
H ₂ O ₂ + AOA	10-12	2.15±0.31	100	0	0
+ SeMet		4.05±0.55	188	0	0
Na ₂ S ₂ O ₅ (6 mM)	20-22	1.87±0.21	100	0.040±0.008	100
+ SeMet		4.73±0.12	253	0.098±0.010	245
Na ₂ S ₂ O ₅ (6 mM) + AOA	20-22	1.70±0.44	100	0.086±0.012	100
+ SeMet		1.16±0.36	68	0.054±0.020	63
Na ₂ S ₂ O ₅ (10 mM)	20-22	1.28±0.14	100	0.091±0.013	100
+ SeMet		0.40±0.08	30	0.034±0.008	37
Na ₂ S ₂ O ₅ (10 mM) + AOA	20-22	0.30±0.03	100	0.063±0.017	100
+ SeMet		0.07±0.01	23	0.032±0.002	51

apstrādātām skujuām, tika krasi apspiesta ar selenometionīnu (11. tabula), parādot, ka priežu skuju sistēmā tikai etilēna izdalīšanās, ko inducē Na₂S₂O₅ koncentrācijā virs 8 mM varētu būt saistīta ar lipīdu peroksidāciju. Vienādā selenometionīna iedarbība gan uz etilēna, gan etāna izdalīšanos apstiprina šo izskaidrojumu (11. tabula). Vairāki pētnieki ir ziņojuši par vienlaicīgu etilēna un etāna izdalīšanos no augu audiem SO₂ vai bisulfīta iedarbībā (Bressan et al. 1979, Kimmerer & Kozłowski 1982, Peiser &

12. tabula. Etilēna izdalīšanās izmaiņas priežu skuju veģetācijas perioda laikā. 1. skuju vecuma grupa - jaunas, aktīvi augošas skujas; 2. skuju vecuma grupa - izaugušas skujas veģetācijas perioda beigās; 3. skuju vecuma grupa - skujas miera perioda beigās. Dati rāda vidējos no 10 priežu sējeņu visām skujām katrā attiecīgajā veģetācijas perioda brīdī katram variantam \pm SE.

Skuju vecuma grupa		Kontrole		H ₂ O ₂		ACKS		pieaug., reizes
		ng	var. koef. (%)	ng	var. koef. (%)	ng	var. koef. (%)	
1	C ₂ H ₄ uz g	79.6 \pm 12.3	35 \pm 3	114.8 \pm 17.4	32 \pm 3	-	-	-
	C ₂ H ₄ uz skuju skujas svars	1.58 \pm 0.24	31 \pm 3	2.48 \pm 0.34	29 \pm 3	-	-	-
		-	9 \pm 1	-	-	-	-	-
2	C ₂ H ₄ uz g	32.7 \pm 8.5	49 \pm 4	-	-	397.0 \pm 20.0	28 \pm 3	12.1
	C ₂ H ₄ uz skuju skujas svars	2.28 \pm 0.40	50 \pm 4	-	-	31.40 \pm 1.74	31 \pm 3	13.8
		-	12 \pm 2	-	-	-	-	-
3	C ₂ H ₄ uz g	19.0 \pm 2.6	53 \pm 6	-	-	87.1 \pm 10.5	56 \pm 14	4.6
	C ₂ H ₄ uz skuju skujas svars	2.55 \pm 0.36	56 \pm 7	-	-	11.63 \pm 1.70	61 \pm 13	4.6
		-	16 \pm 2	-	-	-	-	-

Yang 1979). Ir vispārējs uzskats, ka stresotos augos šīs abas gāzes veidojas ar dažādu atšķirīgu mehānismu starpniecību (Bressan et al. 1979, Elstner & Konze 1976, Peiser & Yang 1979, Nanaiah & Anderson 1992). Šinī aspektā priežu skuju sistēma varētu būt atšķirīga no iepriekš aprakstītajām sistēmām. Jāatzīmē arī, ka ūdensaugš *Spirodela oligorrhiza*, apstrādāts ar Cu²⁺, var veidot etilēnu membrānu bojājumu rezultātā, kas ietver nepiesātināto taukskābju peroksidāciju (Mattoo et al. 1986). Tomēr, selenometionīns, tāpat kā AOA, var izsaukt papildus efektus priežu skuju sistēmā, piemēram, vispārējo stresa reakciju indukciju, tādējādi ietekmējot etilēna sintēzi vienlaicīgi vairākos veidos.

Tātad, mūsu rezultāti, lai arī parāda AOA nejutīgā etilēna veidošanās komponenta eksistenci stresotās priežu skujās, nevar ne apstiprināt ne noliegt alternatīvā etilēna biosintēzes ceļa pastāvēšanu priežu skujās. Inhibitoru papildus efekti neļauj atšķirt, vai inducēts tiek alternatīvais (ACKS neietverošais), vai arī no ACKS tūlītējās sintēzes neatkarīgais ceļš. Tāpēc ir jāsecina, ka ar inhibitoru pievienošanu vien nevar pārbaudīt alternatīvā etilēna sintēzes ceļa esamību priežu skuju sistēmā. Jāatzīmē arī, ka ir jāievēro arī blakus efektu iespēja eksperimentos, kur inhibitori tiek lietoti etilēna biosintēzes apspiešanai.

Tā kā literatūrā ir sastopami dati par to, ka etilēna izdalīšanās intensitāte skujukokiem pieaug līdz ar skuju vecuma palielināšanos (Telewski 1992), priežu skuju paraugi tika ievākti dažādās veģetācijas perioda stadijās. Kā redzams, etilēna izdalīšanās intensitātes izmaiņas līdztekus ar skuju vecuma palielināšanos bija atkarīgas no parametra, kas tika lietots izdalītā etilēna daudzuma izteikšanai (12. tabula). Uzrādot etilēna daudzumu ng uz g dzīvās skuju masas, kas ir visbiežāk etilēna mērījumos

lietotā vienība, etilēna izdalīšanās intensitāte bija augsta jaunās skuju veģetācijas perioda sākumā un samazinājās līdz ar aktīvu skuju augšanas procesu izbeigšanos vēlākās stadijās. Šādi dati apstiprina faktu, ka lineārās augšanas fāzē auga orgāniem raksturīga augsta etilēna biosintēzes intensitāte, kas samazinās līdz ar pāreju uz pilnīgu šūnu diferenciaciju (19. un 20. attēls). Pretēji tam, etilēna izdalīšanās intensitāte uz vienu skujū būtiski nemainījās veģetācijas perioda laikā, izrādot tendenci palielināties paralēli skuju masas pieaugumam. Likumsakarīgi izmainījās arī doto parametru variācijas koeficienti veģetācijas perioda laikā (12. tabula). Etilēna izdalīšanās intensitātes variācijas koeficients līdz ar skuju vecuma pieaugumu ievērojami palielinājās, un tā izmaiņas bija proporcionālas skuju svara variācijas koeficienta izmaiņām šajā pašā laika periodā, lai arī to skaitliskās vērtības atšķīrās vairāk kā trīskārtīgi (12. tabula). Tātad, var secināt, ka etilēna izdalīšanās pazīmes izkliedes intensitātes palielināšanās netieši atspoguļo skujā notiekošo metabolisma pamatprocesu izmaiņas.

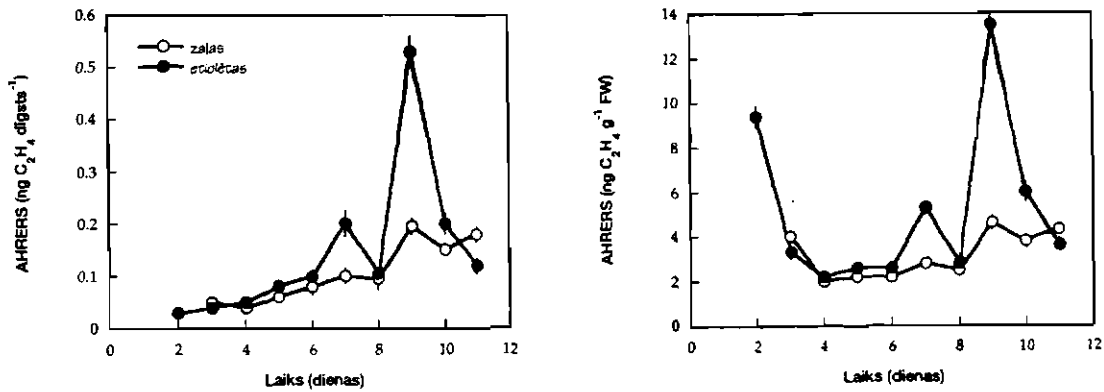
Ievērojami variēja arī H_2O_2 inducētā un ACKS atkarīgā etilēna izdalīšanās intensitāte (12. tabula). Būtiski atzīmēt arī, ka līdz ar skuju vecuma palielināšanos, to vidējā etilēna veidošanās spēja no ACKS samazinājās. Ja 2. vecuma grupas skujām ACKS oksidāzes aktivitātes variācijas koeficients bija apmēram 30 %, kas bija mazāks nekā šo pašu skuju etilēna izdalīšanās intensitātes variācijas koeficients, tad miera stāvoklī esošām skujām (3. vecuma grupa) ACKS oksidāzes variācijas koeficients palielinājās līdz līmenim, kāds bija etilēna izdalīšanās variācijas koeficientam.

3.3.2. Etilēna izdalīšanās no audiem sārma hidrolīzes gaitā

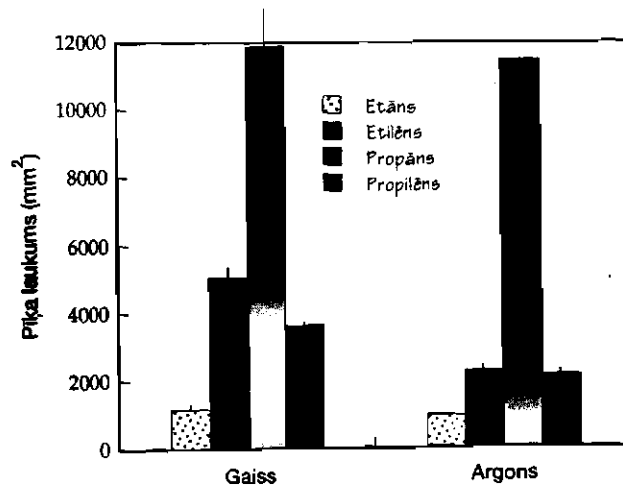
Etilēna veidošanās augstākajos augos ir saistīta ar dzīvu šūnu metabolisko aktivitāti un ievērojami pastiprinās stresa situācijās (Yang & Hoffman 1984). Gadījumā, ja stresa izraisītais ievainojums izsauc šūnu bojāeju, etilēna izdalīšanās izbeidzas (Eltner & Konze 1976). Tomēr, ļoti dažādi savienojumi var izdalīt etilēnu ķīmiskā ceļā (Abeles et al. 1992). Ievietojot augu audu materiālu nefizioloģiskos apstākļos karstā sārma, var novērot intensīvu etilēna izdalīšanos (13. tabula). Pētījumi ar graudzāļu dīgstiem parādīja, ka etilēna izdalīšanās intensitāte no audiem sārma hidrolīzes gaitā ir atkarīga no attīstības stadijas un stresa faktoru ietekmes (55. attēls). Tātad, var pieņemt, ka augu audi satur noteiktus savienojumus, kuri sadalās sārma hidrolīzes gaitā, izdalot etilēnu. Varētu domāt, ka šādi savienojumi var izdalīt etilēnu no dzīviem audiem stipra stresa apstākļos. Tuvāku pētījumu nepieciešamību īpaši aktualizē rezultāti par etilēna izdalīšanos no organiskajiem peroksīdiem egļu skujās stresa apstākļos (Chen et al. 1990, Chen & Wellburn 1991). Tā kā etilēna biosintēzes indukcija priežu skujās tika detalizēti izpētīta iepriekšējos eksperimentos (3.3.1.), tālāko pētījumu mērķis bija

13. tabula. AHRERS saturs (etilēna izdalīšanās sārma hidrolīzes laikā) dažādu augu audos. Dati ir vidējie no 3 līdz 5 paraugiem \pm SE. min., etilēna izdalīšanās minimālā daudzumā.

Auga suga	Paraugs	AHRERS, $ng\ C_2H_4\ g^{-1}\ DW$
<i>Hordeum vulgare</i>	graudi	25.0 \pm 1.0
	graudi bez apvalka	min.
<i>Secale cereale</i>	salmi	70.0 \pm 7.0
	graudi	12.0 \pm 0.4
<i>Trifolium pratense</i>	salmi	min.
	ziedi	34.0 \pm 2.0
<i>Trifolium arvense</i>	ziedi	280.0 \pm 13.0
$ng\ C_2H_4\ g^{-1}\ FW$		
<i>Solanum tuberosum</i>	bumbuli	1.2 \pm 0.6
	etiolēti dzinumī	1.6 \pm 0.1
	lapas	7.0 \pm 0.2
<i>Lycopersicon esculentum</i>	augļi	26.0 \pm 15.0
<i>Beta vulgaris</i>	sakne	5.2 \pm 0.1
	dzinums	2.9 \pm 1.2
<i>Secale cereale</i>	pirmā lapa	2.6 \pm 0.1
	dzinums	4.0 \pm 1.0
<i>Phaseolus vulgaris</i>	lapas	3.1 \pm 0.6
	saknes	3.8 \pm 0.4
<i>Citrus limon</i>	augļa mikstums	1.8 \pm 0.1
	augļa miza	1.9 \pm 0.1
	sēklas	4.0 \pm 0.2
<i>Dryopteris carthusiana</i>	lapas	17.7 \pm 0.9
<i>Equisetum hiemale</i>	dzinums	2.5 \pm 0.2



55. attēls. AHRERS saturs dinamika rudzu dīgstu pirmajā lapā attīstības laikā. Rezultāti izteikti uz vienu dīgstu (A) vai uz masas vienību (B). Dati ir vidējie no 3 paraugiem ±SE katrā laika punktā.



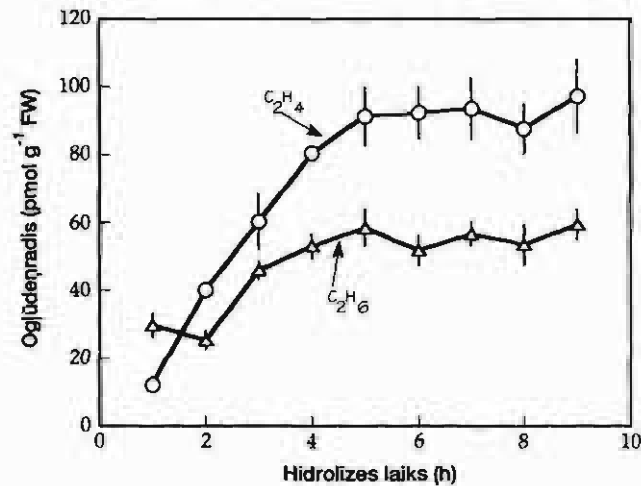
56. attēls. Oglūdeņražu gāzu izdalīšanās no intaktām priežu skuju sārma hidrolīzes laikā. Paraugus hidrolizēja gaisa vai argona atmosfērā. Dati parāda vidējās vērtības no 4 paraugiem ±SE.

noteikt, vai vielas, kuras izdala etilēnu sārma hidrolīzes laikā no skuju, piedalās (a) audu fizioloģiskajā atbildē uz etilēnu vai arī (b) ir starpsavienojumi etilēna bioloģiskajā sintēzē.

Priežu skuju audu sārma hidrolīzes laikā veidojās dažādi daudzumi ogļūdeņražu gāzu, gan piesātinātas (etāns un propāns), gan nepiesātinātas (etilēns un propilēns) dabas (56. attēls). Lai noteiktu, vai šo gāzu izdalīšanās procesam ir nepieciešams skābeklis, daļa skuju paraugu tika hidrolizēti argona atmosfērā. Ir redzams, ka etilēna un propilēna izdalīšanās vismaz daļēji bija atkarīga no skābekļa klātbūtnes, pretēji piesātināto gāzu veidošanās procesam (56. attēls).

Etilēna un etāna izdalīšanās kinētika hidrolīzes laikā parādīja, ka iespējamo priekšteču savienojumu sadalīšanās ir pilnīga 5 h inkubēšanas laikā (57. attēls). Tāpēc šāds hidrolīzes ilgums tika lietots tālāko eksperimentu gaitā.

Etilēna daudzumi, kas izdalījās dažādu vielu klātbūtnē no skuju materiāla un bez tā, ir parādīti 14. tabulā. Redzams, ka H₂O₂ pievienošana koncentrācijā, kas desmitkārtīgi pārsniedza *in vivo* apstrādēm lietoto, stimulēja etilēna izdalīšanos.



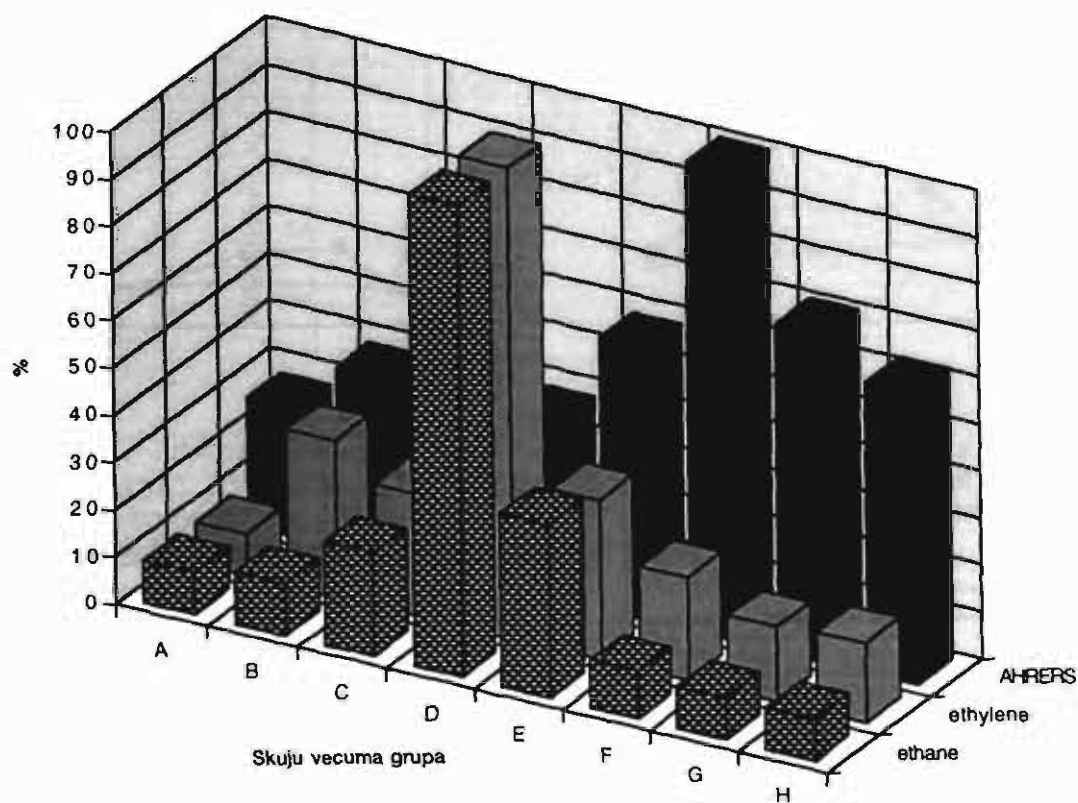
57. attēls. Etilēna un etāna izdalīšanās dinamika no priežu skuju hidrolīzes laikā. Katram punktam izmantoja 4 paraugus. Dati parāda vidējās vērtības \pm SE.

14. tabula. Etilēna izdalīšanās sārma hidrolīzes laikā no intaktām priežu skuju vai dažādiem ķīmiskajiem savienojumiem. Dati ir vidējie no 5 paraugiem \pm SE.

	C ₂ H ₄ , nmol
Skuju audi	0.138 \pm 0.005
+ 0.45 nmol H ₂ O ₂	0.160 \pm 0.008
+ 4.5 nmol H ₂ O ₂	1.202 \pm 0.047
+ 10 μ mol Co ²⁺	0.156 \pm 0.012
+ 10 μ mol Fe ²⁺	0.155 \pm 0.021
Linolskābe (10 μ mol)	0
Metionīns (10 μ mol)	0
ACKS (0.05 nmol)	<0.001
ACKS (25 nmol)	0.063 \pm 0.003

Divvērtīgo metālu joni izsauca tikai nebūtisku etilēna izdalīšanās pieaugumu. Ja hidrolīzes vide saturēja tikai metionīnu vai linolskābi, etilēna izdalīšanās nebija novērojama. Tikai niecīgs daudzums etilēna izdalījās, hidrolizējot 0.05 nmol ACKS, kas atbilst tam ACKS daudzumam, kāds satur 1 g intaktu priežu skuju (mūsu pētījumi, 48. attēls). ACKS daudzums, kāds atrodas 1 g ar ūdeņraža peroksīdu apstrādātu priežu skuju (25 nmol, 50. attēls), izdalīja mazāk par pusi tā etilēna daudzuma, kāds veidojās kontroles skuju sārma hidrolīzes laikā. Dotajos hidrolīzes apstākļos ACKS pārvēršanās par etilēnu efektivitāte bija tikai 0.25 %. Tāpēc var secināt, ka etilēna izdalīšanās no skuju hidrolīzes laikā ir saistīta galvenokārt ar citu savienojumu sadalīšanos, kas nav identiski ar ACKS.

Hidrolīzes atkarīgo etilēnu izdalošo savienojumu (AHRERS) sadalījums tika noteikts gar priežu koku dzinumu un vienu gadu vecos priežu sējeņos otrā veģetācijas gada sākumā. Viengadīgās skuju attiecīgā dzinuma pamatnē izdalīja vairāk etilēna un etāna kā blakus esošās skuju (58. attēls). Pretēji tam, AHRERS saturs bija augstāks divgadīgajās skuju, salīdzinot ar viengadīgajām. Eksperimenti ar priežu sējeņiem

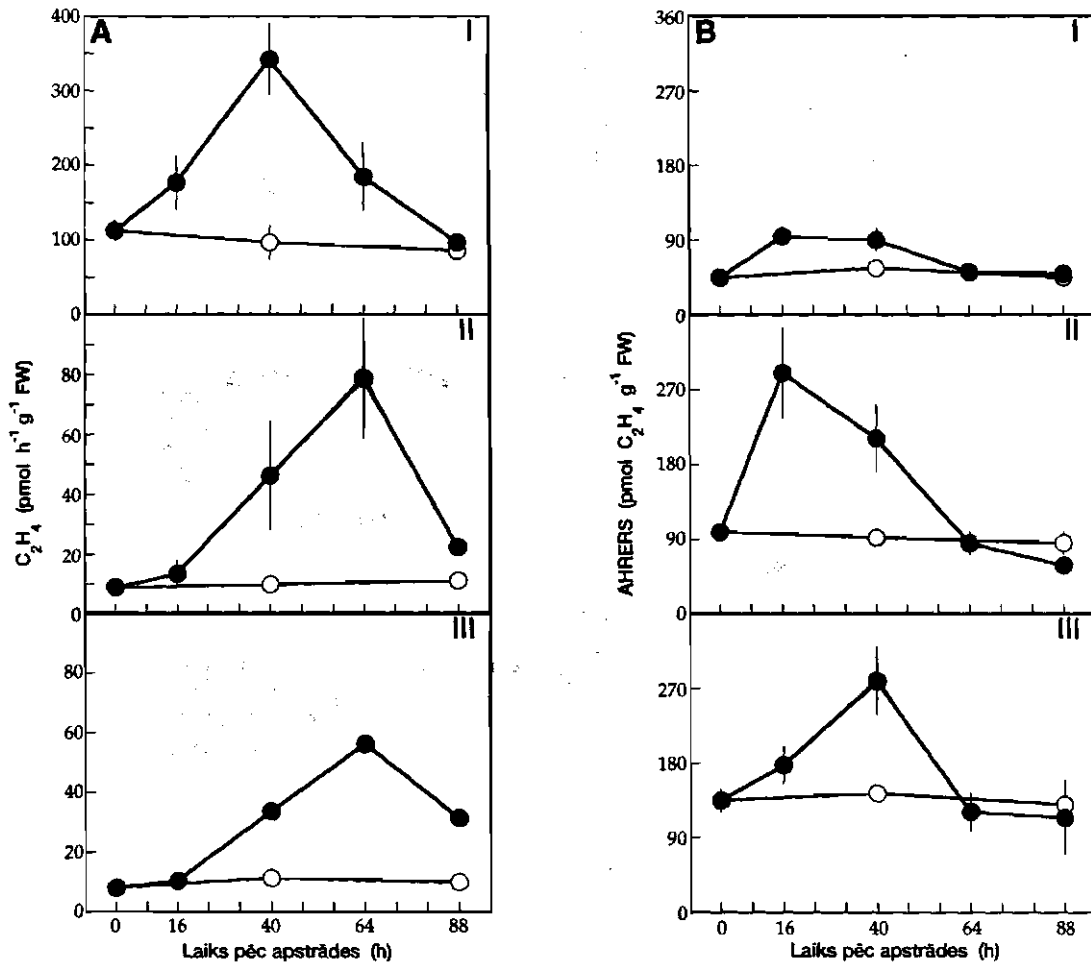


58. attēls. Etilēna un etāna izdalīšanās un AHRERS gradients gar divgadīgu priežu dzinumumu. A-D, viengadīgās skujas, no galotnes uz pamatni; E-H, atbilstošie divgadīgo skuju paraugi. Kontroles līmeņi (100 %) bija sekojoši: 0.93 ± 0.14 nmol etilēna $h^{-1} g^{-1}$ FW un 2.15 ± 0.21 nmol etāna $h^{-1} g^{-1}$ FW ogļūdeņražu izdalīšanai un 0.33 ± 0.09 nmol etilēna g^{-1} FW AHRERS saturam.

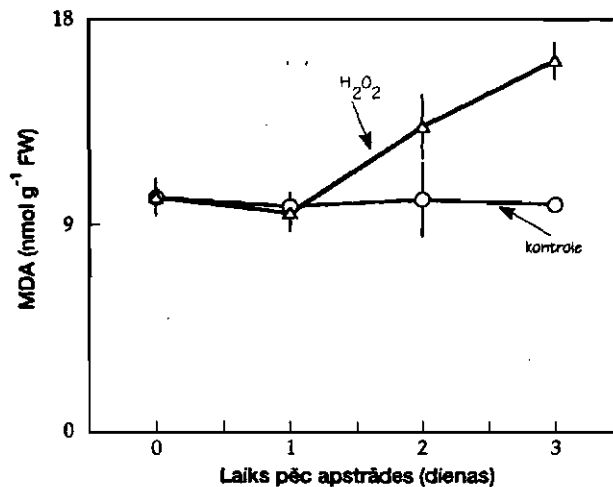
apstiprināja apgrieztas sakarības esamību starp etilēna izdalīšanos un AHRERS saturu dažāda vecuma nestresotās skujās (59. attēls). Kamēr aktīvi augošas tekošā gada skujas izdalīja etilēnu ar intensitāti, kas 10 līdz 15 reizes pārsniedza intensitāti iepriekšējā gada skujās, AHRERS saturs augošās skujās bija tikai 30 līdz 45 % no satura iepriekšējā gada skujās.

Intaktu priežu dīgstu apstrāde ar 1 M H_2O_2 stimulēja lipīdu peroksidāciju skujās, kā parādīja malondialdehīda satura izmaiņas (60. attēls). Tomēr, lag periods bija vismaz 24 h. Pretēji stabilam lipīdu peroksidācijas pieaugumam ar H_2O_2 apstrādātu sējeņu skujās, AHRERS pieaugums peroksīda ietekmē bija tikai īslaicīgs (59. attēls).

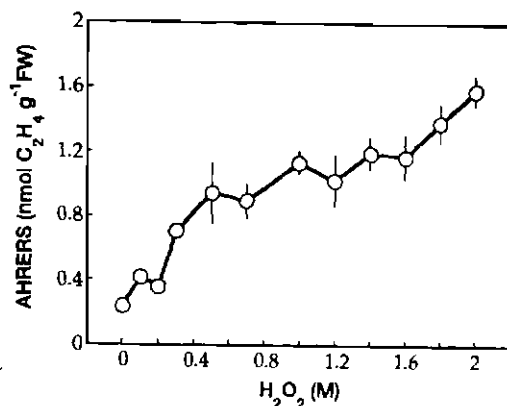
Detalizēti eksperimenti par peroksīda apstrādes izraisītajām AHRERS satura izmaiņām tika izdarīti ar atdalītām priežu skujām. Līdzīgi, kā tas bija gadījumā ar etilēna izdalīšanos (46. attēls A), 0.5 M H_2O_2 koncentrācija bija nepieciešams, lai inducētu pirmo būtisko AHRERS pieaugumu (61. attēls). Tomēr, pretēji etilēna izdalīšanās atbildei, AHRERS satura pieaugumu tālāk stimulēja H_2O_2 koncentrācijas virs 1.6 M. Skujās, kas bija inkubētas H_2O_2 48 h, AHRERS saturs pārsniedza kontroles līmeni divas reizes (62. attēls). Iedarbības lag periods bija amēram 16 h. Malondialdehīda satura pieaugumam bija līdzīgs raksturs (63. attēls).



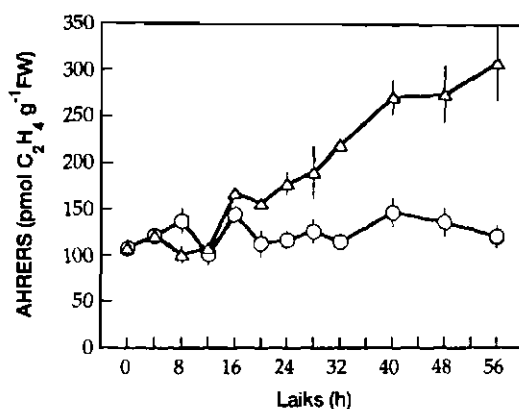
59. attēls. H_2O_2 iedarbība uz etilēna izdalīšanos (A) un AHRERS saturu (B) dažādās intaktu priežu sējeņu daļās. I, jaunās tekošā gada skujas; II, pirmā gada skujas uz jaunā dzinuma; III, pirmā gada skujas uz vecā dzinuma. Dīgstus apmigloja ar H_2O (neiekrāsotie simboli) vai 1 M H_2O_2 (melnie simboli). Katrā laika punktā analizēja sešus skuju paraugus. Dati ir vidējie \pm SE.



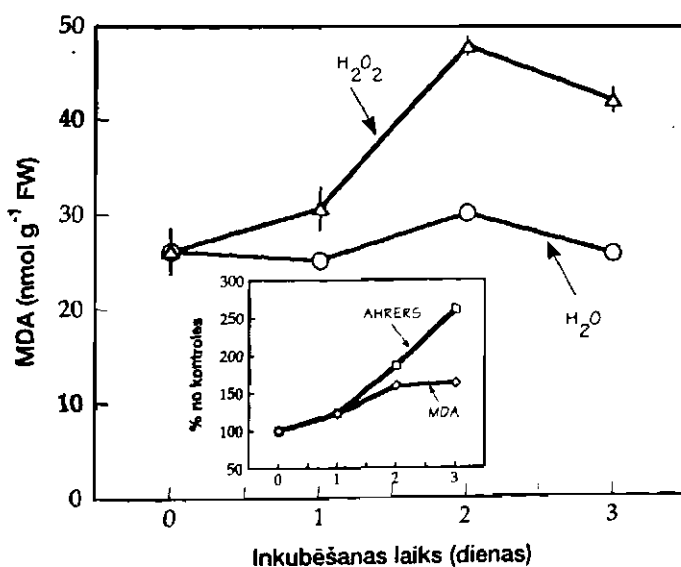
60. attēls. H_2O_2 iedarbība uz malondialdehīda saturu intaktu priežu sējeņu skuju. Dati ir vidējie no 3 sējeņiem katrā laika punktā \pm SE.



61. attēls. AHRERS saturs izmaiņas atdalītās priežu skuļās atkarībā no inkubācijai lietotās H₂O₂ koncentrācijas. Skuju paraugus inkubēja noteiktās koncentrācijas šķīdumā 24 h nepārtrauktā gaismā. Dati parāda vidējās vērtības no 4 paraugiem ±SE.



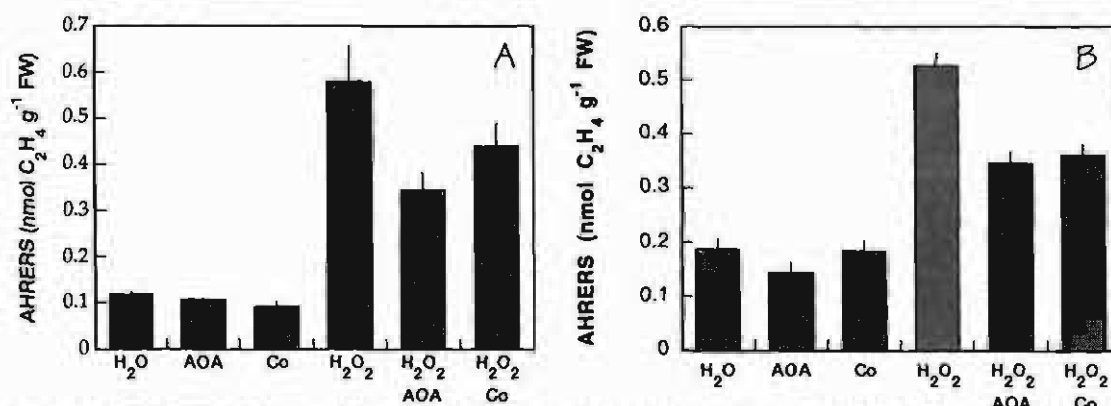
62. attēls. H₂O₂ ietekme uz AHRERS saturu atdalītās priežu skuļās. Skuju paraugus inkubēja nepārtrauktā gaismā H₂O vai 1 M H₂O₂. Dati parāda vidējās vērtības no 4 paraugiem katrā laika punktā ±SE.



63. attēls. H₂O₂ ietekme uz malondialdehīda saturu atdalītās priežu skuļās. Skuju paraugi tika inkubēti nepārtrauktā gaismā H₂O vai 1 M H₂O₂. Dati parāda vidējās vērtības no 4 paraugiem katrā laika punktā ±SE. Iekšējais grafiks rāda salīdzinošās proporcionālās AHRERS un malondialdehīda saturs izmaiņas H₂O₂ apstrādes ietekmē.

15. tabula. Cikloheksimīda priekšapstrādes ietekme uz etilēna izdalīšanos un AHRERS saturu atdalītās priežu skuļās. Skuju paraugus inkubēja H_2O vai 0.1 mM cikloheksimīdā 1 h, tad inkubēja H_2O vai 1 M H_2O_2 nepārtrauktā gaismā 16 h un 24 h, atbilstoši etilēna izdalīšanās un AHRERS satura analīzei. Dati ir vidējie no 4 paraugiem $\pm SE$.

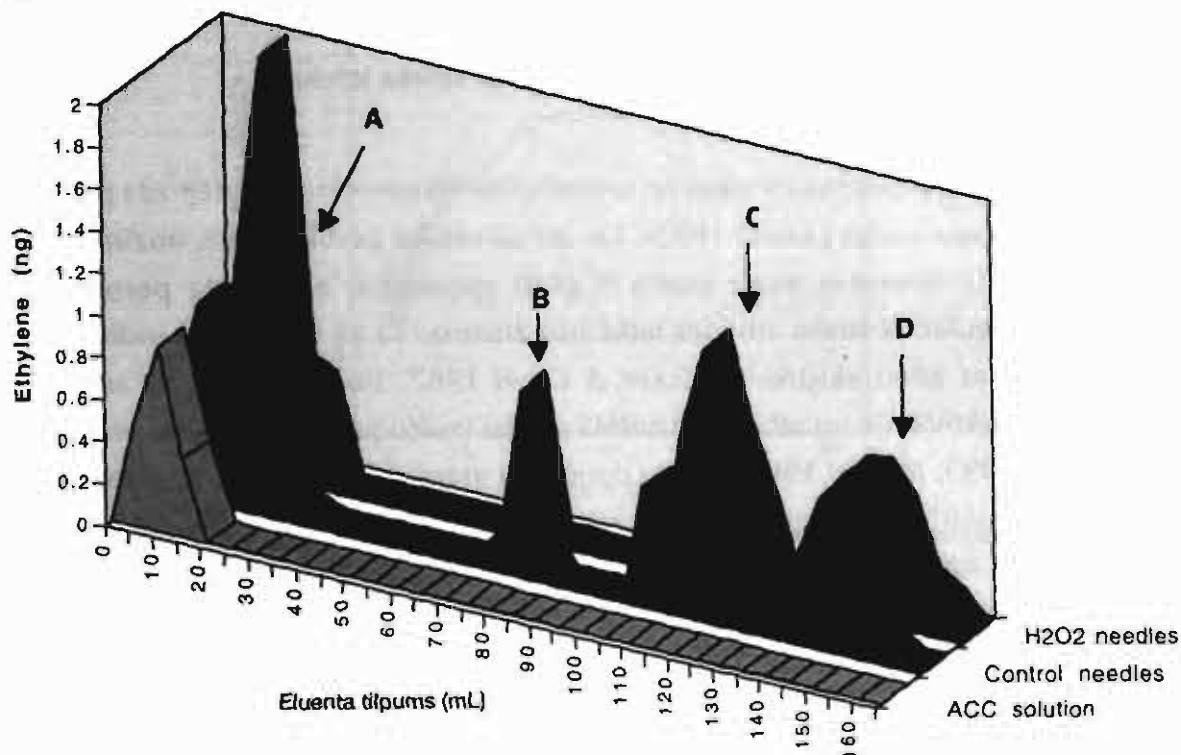
Inkubēšanas vide	C_2H_4 , nmol $h^{-1} g^{-1} FW$	AHRERS, nmol $C_2H_4 g^{-1} FW$
H_2O	0.26 \pm 0.01	0.30 \pm 0.07
$H_2O + CHI$	0.43 \pm 0.08	0.34 \pm 0.03
H_2O_2	4.82 \pm 0.05	1.11 \pm 0.06
$H_2O_2 + CHI$	0.42 \pm 0.01	0.37 \pm 0.04



64. attēls. Etilēna biosintēzes inhibitoru ietekme uz AHRERS saturu atdalītās priežu skuļās (A) un egļu skuļās (B). Skuju paraugus inkubēja atbilstošā vidē nepārtrauktā gaismā 24 h. Dati parāda vidējās vērtības no 4 paraugiem $\pm SE$.

Lai novērtētu olbaltuma sintēzes un endogēnā etilēna veidošanās iespējamo piedalīšanos peroksīda inducētajā AHRERS pieaugumā, tika izdarīti eksperimenti ar dažādiem inhibitoriem. Cikloheksimīds, translācijas inhibitors, inhibēja gan etilēna izdalīšanās pieaugumu, gan AHRERS satura palielināšanos, ko izraisīja apstrāde ar H_2O_2 (15. tabula). Gan aminooksietīkskābe, ACKS sintēzes inhibitors, gan Co^{2+} , ACKS oksidācijas inhibitors, daļēji novērsa peroksīda izsaukto AHRERS satura pieaugumu priežu un egļu skuļās (64. attēls). Tātad, olbaltumvielu sintēze *de novo* ir nepieciešams priekšnoteikums AHRERS pieaugumam peroksīda ietekmē. Tas, savukārt, apliecina, ka novērotais etilēna izdalīšanās pieaugums sāma hidrolīzes laikā no skuļām, kas apstrādātas ar H_2O_2 nav saistīts ar attiecīgo priekšteču ķīmiskās sadalīšanās pātrināšanos hidrolīzes procesā *in vitro*, bet gan ar šo savienojumu daudzuma pieaugumu. Tomēr nav iespējams pilnībā izslēgt tiešu stimulējošo peroksīda ietekmi uz hidrolīzi koncentrācijās virs 1.6 M (61. attēls).

Lai pārlicinātos, vai etilēna izdalīšanās pieaugums sāma hidrolīzes laikā no skuļām, kas apstrādātas ar H_2O_2 , ir saistīts ar noteiktu AHRERS formu satura pieaugumu, priežu skuju ekstrakti no kontroles un peroksīda apstrādātām skuļām tika sadalīti, hromatografējot uz *Sephadex G-15*. Gan kontroles, gan apstrādātu skuju ekstraktos izdalījās četri AHRERS pīķi (65. attēls). Kā tas bija paredzams, visi AHRERS



65. attēls. Kontroles un H_2O_2 apstrādātu priežu skuju ekstraktu un ACKS šķīduma hromatogrāfijas profili, atbilstošās frakcijas pakļaujot sārma hidrolīzei. Skuju paraugi tika inkubēti H_2O vai 1 M H_2O_2 nepārtrauktā gaismā 24 h. Atbilstošo paraugu ūdens ekstraktus (8 ml) vai ACKS šķīdumu ($10 \text{ ng } 5 \text{ ml}^{-1}$) uznesa uz Sephadex G-15 kolonnas ($12 \times 150 \text{ mm}$). Frakcijas eluēja secīgi ar H_2O (frakcijas 0–50 ml), 0.5 M K-Na fosfāta buferi, pH 7.0 (frakcijas 55–85 ml), 0.5 M K-Na fosfāta buferi, pH 10 (frakcijas 90–170 ml). Savāca frakcijas 5 ml tilpumā, izlīdzināja to pH un izdarīja sārma hidrolīzi.

piķi bija lielāki variantā ar H_2O_2 apstrādi. Bez tam, tikai piķis "A" saturēja aminoskābes un savienojumus, kas izdalīja etānu, propānu un propilēnu hidrolīzes laikā (dati nav parādīti). Hromatografējot 25 nmol ACKS šajā pašā sistēmā ar sekojošu frakciju sārma hidrolīzi, etilēns izdalījās tikai no tām frakcijām, kuras atbilda piķim "A" (65. attēls).

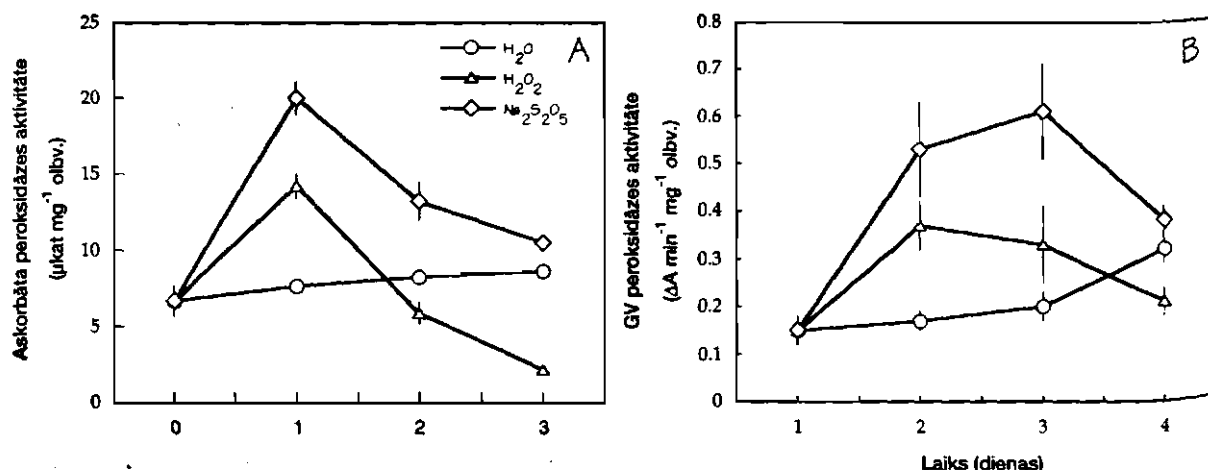
Novērotā saistība starp AHRERS saturs pieaugumu un malondialdehīda līmeņa kāpumu, kurš atspoguļo lipīdu peroksidācijas pakāpi membrānu bojājumu rezultātā (Dhindsa et al. 1981), apstiprina hipotēzi par to, ka AHRERS veidošanās indukcija ir daļa no vispārējās stresa atbildes priežu skuju H_2O_2 ietekmē. Lai arī etilēna izdalīšanās un AHRERS indukcijas atkarība no lietotās H_2O_2 koncentrācijas bija vienāda, dinamiskie eksperimenti parādīja būtiskas šo parametru pieauguma atšķirības atkarībā no laika pēc apstrādes. Tāpēc būtu jāsecina, ka AHRERS nepiedalās H_2O_2 atkarīgajā etilēna izdalīšanās procesā no priežu skuju. Tā kā inhibitoru eksperimenti parādīja zināmu AHRERS indukcijas atkarību no etilēna biosintēzes skuju, apstrādātās ar peroksīdu (62. attēls), varētu domāt, ka AHRERS piedalās etilēna atkarīgās atbildes reakcijās. Tomēr, tā kā mūsu eksperimenti parādīja etilēna biosintēzes inhibitoru blakusiedarbību priežu skuju sistēmā (3.3.1.), galējos secinājumus izdarīt nav iespējams.

3.3.3. Peroksidāzes indukcija stresa ietekmē

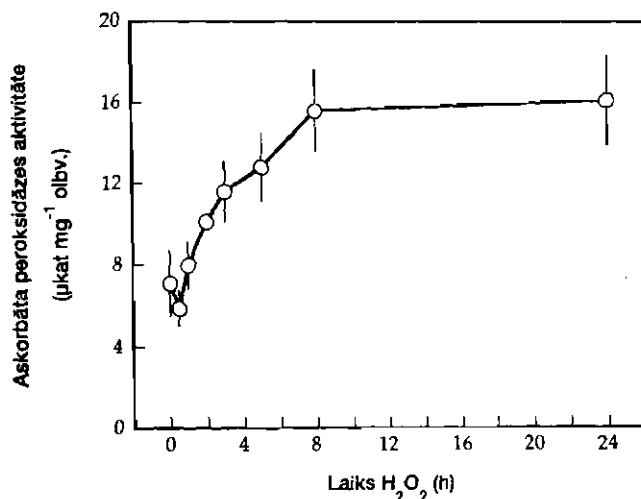
Askorbāta peroksidāze ir viens no centrālajiem faktoriem liekā ūdeņraža peroksīda sadalīšanai augu audos (Asada 1992). Lai arī askorbāta peroksidāzes nozīme H_2O_2 detoksifikācijā stresotos augu audos ir plaši aprakstīta, askorbāta peroksidāzes indukcijas regulācija stresa atbildes laikā nav zināma. Tā kā etilēns var inducēt augu aizsargsistēmas gēnu ekspresiju (Ecker & Davis 1987, Boller 1991), kā arī izsaukt peroksidāžu aktivāciju un atbilstošo mRNS sintēzi (mūsu pētījumi; Abeles et al. 1988, Ishige et al. 1993, Ito et al. 1994), varētu domāt, ka stresa situācijās veidotais endogēnais etilēns ir regulatīvais faktors stresa atkarīgajā peroksidāzes aktivācijā. Tā kā priežu skuļās H_2O_2 apstrāde izsauca 500-kārtīgu ACKS satura pieaugumu ar sekojošu 200-kārtīgu etilēna izdalīšanās aktivāciju (49. un 50. attēls), ir iespējams, ka etilēns vai ACKS var būt signāls stresa atbildes reakcijās stresotās priežu skuļās.

Sākot eksperimentus ar askorbāta peroksidāzi no priežu skuļām, vispirms tika noteikti fermenta ekstrakcijas optimālie apstākļi. Pretēji iepriekš aprakstītajam saldēšanas jutīgumam, kas raksturīgs askorbāta peroksidāzei no egles skuļām (Polle et al. 1990), priežu skuju uzglabāšana $-20^{\circ}C$ temperatūrā neietekmēja to askorbāta peroksidāzes aktivitāti. Ja ekstrakcijas videi netika pievienots *Triton X-100* vai arī polivinilpolipirrolidona koncentrācija bija zemāka par 3 %, aktivitāte ekstraktos nebija nosakāma, kas norāda uz mazmolekulāru inhibējošo savienojumu klātbūtni neattīrītā skuju ekstraktā. Lai iegūtu maksimālo askorbāta peroksidāzes aktivitāti, ekstraktā bija nepieciešama 1 mM askorbāta klātbūtne.

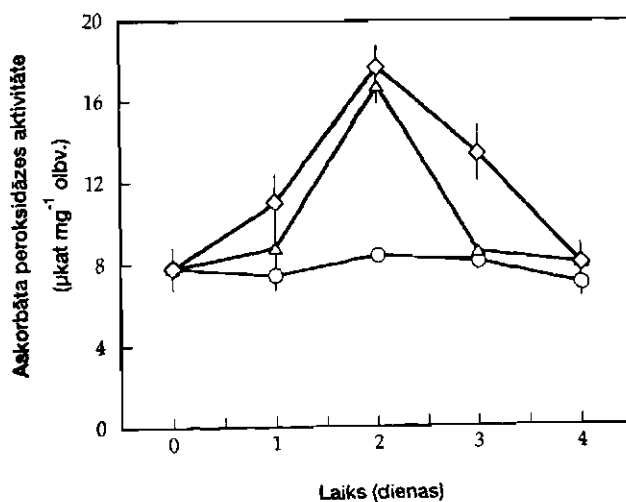
Atdalītas priežu skuļās bija novērojams būtisks askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugums, inkubējot tās 24 h 1 M H_2O_2 vai 5 mM $Na_2S_2O_5$ (66. attēls A). Tālāka inkubēšana peroksidāzē izsauca askorbāta peroksidāzes aktivitātes kritumu līdz kontroles



66. attēls. H_2O_2 un $Na_2S_2O_5$ ietekme uz askorbāta peroksidāzes (A) un gvajakola peroksidāzes (B) aktivitāti atdalītās priežu skuļās. Skujas tika inkubētas 1 M H_2O_2 vai 5 mM $Na_2S_2O_5$ šķīdumā nepārtrauktā gaismā. Dati ir vidējie no 4 paraugiem $\pm SE$ katrā laika punktā.



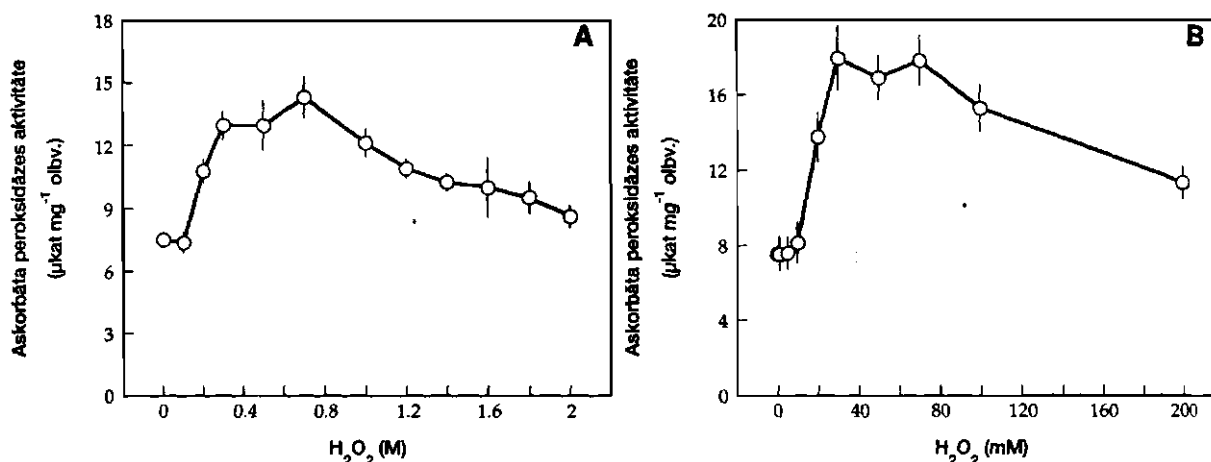
67. attēls. Inkubācijas laika ietekme uz H₂O₂ inducēto askorbāta peroksidāzes aktivitāti atdalītās priežu skuļās. Dati ir vidējie no 4 paraugiem ±SE katrai koncentrācijai.



68. attēls. H₂O₂ un Na₂S₂O₅ ietekme uz askorbāta peroksidāzes aktivitāti intaktās priežu skuļās. Priežu sējeņi tika apsmidzināti ar 1 M H₂O₂ vai 5 mM Na₂S₂O₅ šķīdumu fotoperioda apstākļos. Dati ir vidējie no 4 paraugiem ±SE katrā laika punktā.

līmenim nākamo 24 h laikā, kam sekoja tālāka tās pazemināšanās līdz pat 25 % no kontroles līmeņa sekojošo 24 h laikā. Pretēji tam, gvajakola peroksidāzes aktivitāte, kuras pieaugums arī tika inducēts apstrādes ietekmē, nebija tik jutīga pret ilgstošu peroksīda iedarbību (66. attēls B). Skujās, kas tika inkubētas Na₂S₂O₅ šķīdumā, askorbāta peroksidāzes aktivitātes atgriešanās kontroles līmeni notika lēnāk. Lai inducētu maksimālo askorbāta peroksidāzes atbildi, bija nepieciešama vismaz 8 h ilga skuju inkubācija H₂O₂ šķīdumā (67. attēls). Ja apstrāde ar ķīmiskajiem stresoriem notika, apsmidzinot intaktus priežu sējeņus, maksimālā askorbāta peroksidāzes indukcija bija novērojama 48 h pēc apstrādes ar sekojošu aktivitātes atgriešanos kontroles līmeni nākošo 48 h laikā (68. attēls).

Lai inducētu būtisku askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugumu atdalītās priežu skuļās, bija nepieciešama 0.2 M H₂O₂ koncentrācija inkubācijas vidē (69. attēls A).

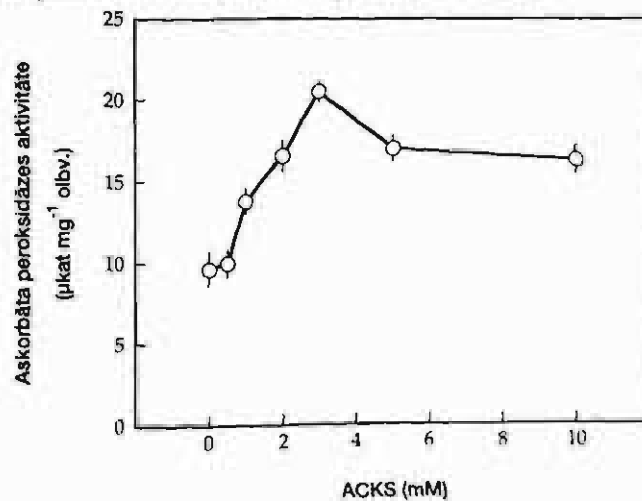


69. attēls. Askorbāta peroksidāzes aktivitātes priēžu skujās atkarība no H₂O₂ koncentrācijas inkubācijas vidē. Skuju paraugus inkubēja 24 h nepārtrauktā gaismā atbilstošās koncentrācijas H₂O₂ bez 0.1 M aminotriazola (A) vai ar tā pievienošanu (B). Dati ir vidējie no 4 paraugiem ±SE katrai koncentrācijai.

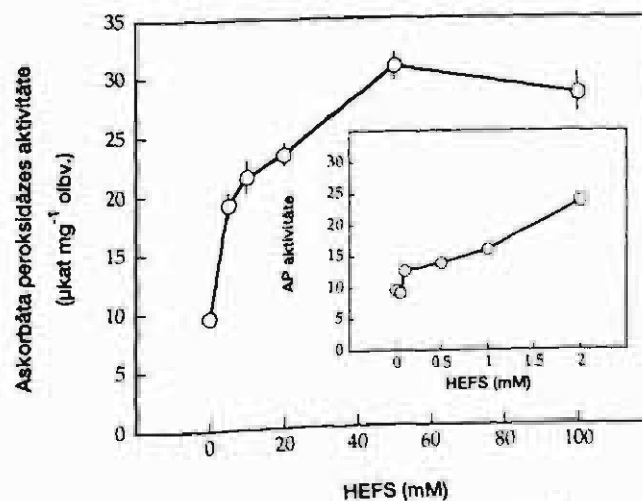
Līdzīga H₂O₂ koncentrācija bija nepieciešama, lai inducētu etilēna izdalīšanos no skujām (skatīt 46. attēlu). Jāatzīmē arī, ka vairākas stundas pēc skuju materiāla ievietošanas H₂O₂ šķīdumā varēja novērot aktīvu gāzes izdalīšanos burbulīšu veidā no skuju pamatnēm. Tas viss norāda uz to, ka priēžu skuju audos darbojas ļoti efektīva H₂O₂ sadalošā sistēma, kas, iespējams, saistīta ar fermenta katalāzes darbību. Lai par to pārliecinātos, atdalītās skujas tika papildus apstrādātas, ievietojot tās pirms inkubēšanas peroksīdā uz 3 h 0.1 M aminotriazola šķīdumā, kas ir specifisks katalāzes inhibitors (Margoliash et al. 1960). Katalāzes aktivitātes inhibēšana ar aminotriazolu samazināja askorbāta peroksidāzes aktivēšanai nepieciešamo minimālo H₂O₂ koncentrāciju apmēram desmitkārtīgi, bet maksimālā askorbāta peroksidāzes atbildi skujās, kas bija apstrādātas aminotriazolā un peroksīdā, bija vairāk izteikta, nekā skujās bez aminotriazola apstrādes (69. attēls B). Aminotriazols neietekmēja kontroles skuju askorbāta peroksidāzes līmeni. No tā var secināt, ka priēžu skuju audos ir lokalizēta aktīva katalāze, kura efektīvi sadala pat augstas koncentrācijas H₂O₂. Līdzīgi tam, sojas dīgstos eksogēno H₂O₂ detoksificēja katalāze (Montillet & Degousee 1991). Tomēr pat tajā gadījumā, kad katalāzes aktivitāte bija inhibēta ar aminotriazolu, 20 mM augsta H₂O₂ koncentrācija bija nepieciešama būtiska askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieauguma izsaukšanai. Tā kā endogēnā H₂O₂ koncentrācija stresotos audos var sasniegt 15 µmol uz g dzīvās masas (Okuda et al. 1994, Prasad et al. 1994), pastāv ievērojama atšķirība starp eksperimentāli sasniegtajām iekššūnas peroksīda koncentrācijām šajos eksperimentos un tām, kādas rodas reālā stresa apstākļos. Iespējams izskaidrojums augstajai nepieciešamajai H₂O₂ koncentrācijai varētu būt H₂O₂ koncentrācijas gradienta pastāvēšana (Montillet & Degousee 1991). Ir zināms arī, ka gan endogēni, gan eksogēni paaugstināts H₂O₂ iekššūnas līmenis inducē vienādas metaboliskās reakcijas (Prasad et al. 1994). Mūsu rezultāti, kas rāda askorbāta peroksidāzes aktivitātes kritumu ilgstošas H₂O₂ inkubācijas laikā apstiprina uzskatu,

ka H_2O_2 var darboties kā mesendžeris tikai šaurā koncentrāciju diapazonā (Prasad *et al.* 1994).

Apmiglojot intaktus priežu sēņus ar 1 mM ACKS vai ar 10 mM HEFS, etilēna izdalīšanās intensitāte no atdalītām skužām pieauga attiecīgi 32 un 42 reizes, kam sekoja divkārtīgs askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugums 24 h pēc apstrādes (dati nav parādīti). Atdalītas priežu skužas tika inkubētas dažādās ACKS un HEFS koncentrācijās 24 h, lai noteiktu aktīvo koncentrāciju diapazonu askorbāta peroksidāzes indukcijai. Askorbāta peroksidāze tika inducēta ACKS koncentrācijās virs 1 mM, bet maksimālais pieaugums bija novērojams 3 mM koncentrācijā (120 % pieaugums virs kontroles līmeņa, 70. attēls). HEFS inducēja askorbāta peroksidāzes pieaugumu 0.1 mM koncentrācijā, taču tikai 25 % virs kontroles skuju līmeņa (71. attēls, iekšējais grafiks). Lai izsauktu divkārtīgu aktivitātes pieaugumu, bija nepieciešama 2 mM HEFS koncentrācija (71. attēls). Vēl izteiktāks pieaugums (vairāk kā trīs reizes) parādījās HEFS koncentrācijās virs 50 mM.



70. attēls. Askorbāta peroksidāzes aktivitātes atkarība no ACKS koncentrācijas inkubācijas vidē. Dati ir vidējie no 4 paraugiem ±SE katrai koncentrācijai.



71. attēls. Askorbāta peroksidāzes aktivitātes atkarība no HEFS koncentrācijas inkubācijas vidē. Dati ir vidējie no 4 paraugiem ±SE katrai koncentrācijai.

16. tabula. Inhibitoru ietekme uz askorbāta peroksidāzes aktivitātes indukciju atdalītās priežu skuļās. Starpību starp askorbāta peroksidāzes aktivitāti, kas noteikta pēc inkubēšanas atbilstošajā efektorā šķīdumā mīnus aktivitāte H₂O₂ inkubācijā apzīmēja par 100 % aktivitātes pieaugumu. Salīdzinošie peroksidāzes aktivitātes līmeņi bija sekojošie: 13.0±1.2 (H₂O₂), 20.0±1.1 (Na₂S₂O₅), 20.5±0.7 (ACKS), 21.6±1.4 (HEFS) µkat g⁻¹ FW. Dati ir vidējie no 3 paraugiem ±SE.

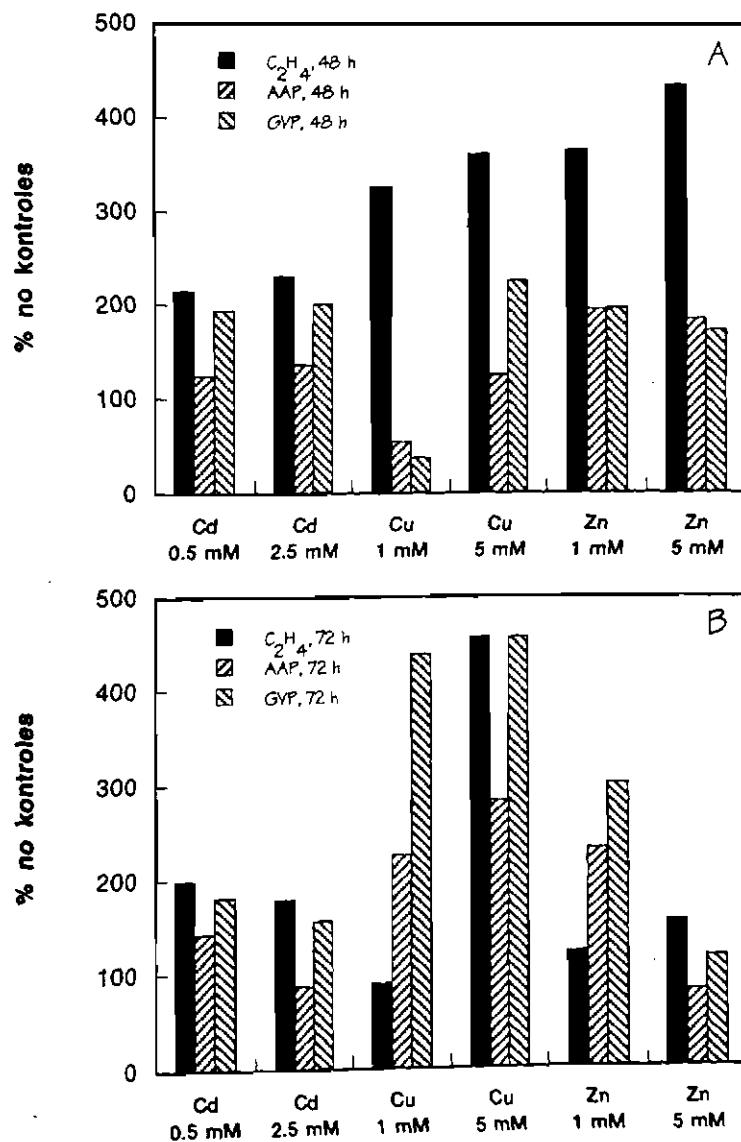
	Askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugums, %			
	H ₂ O ₂	Na ₂ S ₂ O ₅	ACKS	HEFS
	(0.5 M)	(5 mM)	(3 mM)	(10 mM)
	100±18	100±14	100±11	100±9
Cikloheksimīds (50µM)	32±6	44±9	9±4	23±6
Aktinomicīns D (2 µM)	86±8	7±3	23±6	13±5
Kordicepīns (0.1 mM)	48±5	25±6	-	-
AOA (2 mM)	18±4	14±4	-	-
Sudraba tiosulfāts (4 mM)	14±3	42±7	7±2	39±2

Hipotēze, ka askorbāta peroksidāzes aktivācija notiek caur fermenta olbaltuma sintēzi tika pārbaudīta, pievienojot olbaltuma sintēzes inhibitorus inkubācijas videi 3 h pirms efektoru pievienošanas (16. tabula). Translācijas inhibitors cikloheksimīds ievērojami samazināja visu efektoru induktīvo ietekmi, taču inhibēšanas pakāpe atšķīrās atkarībā no efektorā dabas. Aktinomicīns D, DNS-atkarīgās RNS sintēzes inhibitors, novērsa mazāk kā 15 % no H₂O₂ inducētās askorbāta peroksidāzes aktivitātes, taču Na₂S₂O₅ inducētais askorbāta peroksidāzes pieaugums tika pilnīgi apspiests aktinomicīna D ietekmē. Aktinomicīns D reducēja arī ACKS un HEFS inducēto aktivitātes pieaugumu. Kordicepīns, posttranslācijas RNS procesinga inhibitors, arī daļēji bloķēja ķīmiskā stresa inducēto askorbāta peroksidāzes aktivitāti. Tātad, askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugums priežu skuļās ir saistīts ar fermenta sintēzi *de novo*. Tomēr, uz iegūto datu pamata nav iespējams izdarīt secinājumu par to, vai RNS sintēze bija nepieciešama askorbāta peroksidāzes indukcijai ar H₂O₂. Askorbāta peroksidāzes aktivitātes H₂O₂-atkarīgo pieaugumu aktinomicīna D klātbūtnē ir iespējams izskaidrot ar ilgstoši aktīvo mRNS formu eksistenci, kuras kodē doto askorbāta peroksidāzes olbaltumu. Pretēji tam, gan RNS, gan olbaltuma sintēze bija nepieciešama Na₂S₂O₅ inducētajam askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugumam. Visai ierobežotie rezultāti, kas balstās uz molekulārajiem pētījumiem, liek domāt, ka citozoliskās askorbāta peroksidāzes regulācija notiek gan transkriptu nepārtrauktas uzkrāšanās līmenī, gan arī regulējot olbaltuma biosintēzi (Mittler & Zilinskas 1994).

Vispārzināmi etilēna biosintēzes inhibitori tika lietoti, lai novērtētu iespējamo etilēna piedalīšanos askorbāta peroksidāzes aktivācijā ķīmiski stresotās skuļās. Aminooksietīkskābe, kas inhibēja apmēram 90 % no H₂O₂ inducētās ACKS sintēzes un 80 % no Na₂S₂O₅ inducētās (skatīt 50. attēlu), efektīvi bloķēja askorbāta peroksidāzes aktivitāti abos apstrādes gadījumos (15. tabula). Askorbāta peroksidāzes pieaugumu reducēja arī apstrāde ar sudraba tiosulfātu.

Virkne eksperimentu tika izdarīta ar skujām, kuras inkubēja dažādu smago metālu sāļu šķīdumos. Smago metālu aktivējošā ietekme uz etilēna biosintēzi ir plaši aprakstīta (Abeles *et al.* 1992). Ir zināms arī, ka smago metālu joni var izraisīt peroksidāzes aktivāciju (Van Assche *et al.* 1988, Tarvainen *et al.* 1991, Pandolfini *et al.* 1992). Tāpēc varētu domāt, ka aizsargmehānismu indukcija pie smago metālu stresa ir saistīta ar etilēna darbību.

Kā jau bija sagaidāms, visi lietotie smago metālu joni (kadmijs, varš, cinks) izsauca gan etilēna izdalīšanās, gan askorbāta un gvajakola peroksidāzes aktivitātes indukciju (72. attēls). Tomēr, efekts bija dažāds atkarībā no lietotā jona, tā koncentrācijas un analizējama parametra, kā arī mainījās laikā. Kadmijs, kurš tiek uzskatīts par vistoksiskāko metālu (Fuhrer 1982), izsauca tikai divkārtīgu etilēna izdalīšanās pieaugumu neatkarīgi no lietotās koncentrācijas (0.5 mM vai 2.5 mM). Askorbāta



72. attēls. Smago metālu jonu ietekme uz etilēna izdalīšanos, askorbāta peroksidāzes aktivitāti un gvajakola peroksidāzes aktivitāti priežu skujās 48 h (A) un 72 h (B) no inkubācijas sākuma nepārtrauktā gaismā. Dati ir vidējie no 4 paraugiem \pm SE katrai apstrādei.

peroksidāzes pieaugums kadmija jonu ietekmē bija neliels, apmēram divkārtīga palielināšanās bija novērojama gvajakola peroksidāzes gadījumā, rādot ciešu sakarību ar etilēna veidošanās indukciju dotā jona ietekmē.

Visizteiktākā atšķirība starp etilēna un peroksidāzes indukciju bija novērojama ar 1 mM Cu apstrādātām skujām 48 stundas no darbības sākuma. Šajā laikā uz vairāk kā trīskārtīga etilēna izdalīšanās pieauguma fona bija novērojams būtisks askorbāta un gvajakola peroksidāzes aktivitātes pazeminājums. Savukārt, vēl pēc 24 stundām etilēna izdalīšanās intensitāte bija nostabilizējusies kontroles līmenī, kamēr askorbāta peroksidāzes aktivitāte bija pieaugusi vairāk nekā divas reizes, bet gvajakola peroksidāzes aktivitāte – 4.5 reizes. Savukārt, apstrādājot skuju ar 5 mM Cu jonu šķīdumu, peroksidāzes aktivitātes samazināšanās pēc 48 stundām un etilēna izdalīšanās kritums pēc 72 stundām netika novērots. Var pieņemt, ka vara jonu kā stresora darbība ir saistīta ar spēju izsaukt lipīdu peroksidācijas procesus fotosintētiskajās membrānās (Sandmann & Boger 1980).

Arī cinka jonu pielietošanas gadījumā bija novērojama efekta atkarība no laika, it īpaši, attiecībā uz etilēna izdalīšanos. Literatūrā ir informācija, ka arī cinka fitotoksiskais efekts pirmām kartām saistīts ar tā iedarbību uz membrānu lipīdiem caur peroksidācijas indukciju (Gora & Clijsters 1989).

Kā zināms, dažādu metālu jonu fitotoksiskie efekti ir atkarīgi no to primārās iedarbības vietas un veida, lai arī tiek uzskatīts, ka to darbība ir būtiski atkarīga no spējas inducēt membrānu caurlaidības izmaiņas (Pandolfini et al. 1992). Gadījumā ar priežu skujām ir skaidri redzams, ka nevar izslēgt arī konkrēto metālu jonu tiešās iedarbības efektus uz etilēna biosintēzes un peroksidāzes fermentu sistēmām, kas apgrūtina galīgu secinājumu izdarīšanu par etilēna un oksidatīvā stresa lomu peroksidāzes atbildes indukcijā.

Dati par to, ka gan eksogēnā ACKS, gan HEFS stimulēja askorbāta peroksidāzes aktivitāti, kā arī rezultāti par etilēna biosintēzes un darbības inhibitoru reducējošo ietekmi uz tās aktivitāti liecina, ka endogēnais etilēns piedalās askorbāta peroksidāzes aktivitātes regulēšanā stresotu priežu skuju audos. Lai arī sakarība starp askorbāta peroksidāzes indukciju un peroksīda atkarīgo etilēna izdalīšanos priežu skujās ir acīmredzama, dotajā eksperimentu pakāpē ir grūti secināt, vai sekojošā indukcijas sekvenca stresors–H₂O₂–etilēns–askorbāta peroksidāze darbojas *in vivo* apstākļos. Pirmkārt, etilēna biosintēzes inhibitoru lietošana priežu skujās, lai pētītu etilēna piedalīšanos stresa atbildes reakciju regulēšanā, ir visai apšaubāma, jo dotajiem inhibitoriem šajā sistēmā parādās blakus efekti (3.3.1.). Otrkārt, peroksidāžu aktivācija ar etilēnu ir sen zināma parādība, kas norāda uz novecošanās paātrināšanos etilēna ietekmē (Morgan & Fowler 1972, Abeles et al. 1988). Etilēns inducē vairākus gēnus virknei augu sugu (Abeles et al. 1988, Ishige et al. 1993, Ito et al. 1994). Novecošanās laikā etilēns var inducēt lipīdu peroksidāciju (Sylvestre et al. 1989). Bez tam, etilēns var inducēt lipoksigenāzes aktivāciju (3.1.5.). Jāatzīmē arī, ka divu peroksidāzes mRNS

limenis rīsu augos pieauga vienādi gan ievainošanas, gan H_2O_2 vai HEFS ietekmē (Ito et al. 1994). Treškārt, atsevišķi HEFS efekti, ko lietoja kā eksogēnā etilēna avotu, var nebūt saistīti ar etilēna darbību (Lawton et al. 1994). Pie tam, nesen tika izvirzīts pieņēmums, ka etilēnam un tā priekštecim, ACKS, varētu būt pretējas funkcijas aizsargsistēmas kontrolē (Siefert et al. 1994). Tātad, etilēna piedalīšanās stresa atbildes reakcijās ir visai kompleksa.

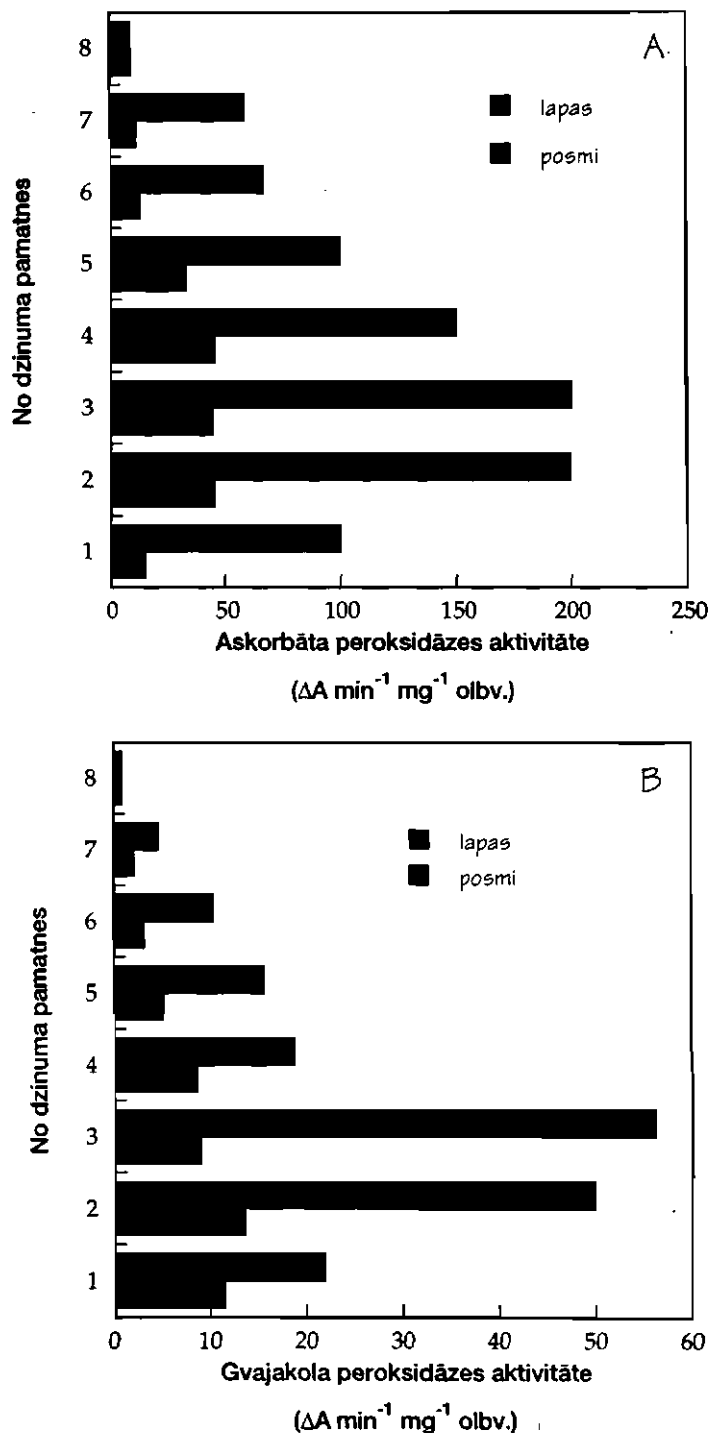
Kopumā ņemot, var secināt, ka gan H_2O_2 , gan etilēns piedalās askorbāta peroksidāzes indukcijā stresotās priežu skujās, taču etilēns drīzāk pilda askorbāta peroksidāzes atbildes modulatora, nevis induktora lomu. Līdzīgi secinājumi par etilēna lomu aizsargreakciju kontrolē ir izdarīti arī pētījumos citās augu sistēmās (Mauch et al. 1984, Weiss & Bevan 1991).

3.4. Askorbāta peroksidāzes aktivitātes izmaiņas kartupeļu dzinumū *in vitro* kultūrā

Neraugoties uz ļoti aktīviem askorbāta peroksidāzes pētījumiem pēdējos gados, var atrast pārsteidzoši maz informācijas par askorbāta peroksidāzes izmaiņām augu *in vitro* kultūrās (Hagege et al. 1992). Pretoksidatīvās aizsardzības mehānismu pētījumiem augu šūnu un audu kultūrās ir ļoti svarīga nozīme sekojošu iemeslu dēļ: pirmkārt, izprotot tās reakcijas, kas nodrošina rezistenci suboptimālos kultivēšanas apstākļos, var uzlabot rezultātus praktiskajā pavairošanā; otrkārt, tā kā ir pierādījumi, ka relatīvi augstāks antioksidatīvo fermentu saturs norāda uz augstāku aizsargspēju pret aktīvā skabekļa savienojumiem (Mittler & Zilinskas 1991, Gossett et al. 1994), šādi pētījumi varētu stimulēt rezistentu klonu atlasīšanu ar uzlabotām īpašībām masveida pavairošanas vajadzībām. Šī darba ietvaros tika pētītas askorbāta peroksidāzes izmaiņas kartupeļu eksplantu kultūrā, īpašu uzmanību pievēršot etilēna efektiem.

Tā kā klonēšanai izmantoja dažādus segmentus un lapas attiecībā pret to atrašanās vietu gar dzinumū, tika analizēts askorbāta peroksidāzes un gvajakola peroksidāzes aktivitātes gradients augošā dzinumā, kurš kultivēts normālas gāzu maiņas apstākļos līdz 8 posmu stadijai. Dati 73. attēlā parāda, ka gar augošu kartupeļu dzinumū *in vitro* eksistē ļoti izteikts askorbāta peroksidāzes un gvajakola peroksidāzes gradients, kurš izpaužas gan lapās, gan posmos. Kopīga likumsakarība bija abu peroksidāzes aktivitāšu palielināšanās līdz ar audu vecumu, lai gan posmos aktivitātes līmenis bija ievērojami augstāks, nekā lapās. Tomēr, askorbāta peroksidāzes aktivitātes gradients gan lapas, gan posmos virzienā no dzinuma galotnes uz pamatni pieauga straujāk (73. attēls, A), nekā gvajakola peroksidāzes aktivitātes gradients (73. attēls, B). Augsta askorbāta peroksidāzes aktivitāte jauno kartupeļu dzinumū aktīvi stiepijošos audos sakrīt ar iepriekš aprakstītajiem rezultātiem par askorbāta peroksidāzes lokalizāciju rudzu digstu aktīvi augošajos audos (skatīt 3.2.1.). Tā kā augsta etilēna izdalīšanās intensitāte ir cita raksturīga pazīme šūnu dalīšanās un stiepšanās fāzē (skatīt 3.1.2.), ir pilnīgi iespējams, ka etilēns ir viens no faktoriem, kas regulē askorbāta peroksidāzes aktivitāti *in vivo*. Ņemot vērā atklātās atšķirības, tālākajiem eksperimentiem tika izvēlēti posmi un lapas no dzinuma vidusdaļas.

Jau agrāk literatūrā ir aprakstīti eksperimenti ar audu kultūrām, kuros tika izmantoti dažādi audu kultivēšanā lietoto konteineru slēguma veidi, kas nodrošina audu izdalīto gāzu uzkrāšanos (Huxter et al. 1981, De Proft et al. 1985, Righetti et al. 1990, Kevers et al. 1992). Tā piemēram, eksperimentos ar rožu dzinumū kultūrām tika parādīts, ka endogēni veidojies etilēns, uzkrājoties kultivēšanas atmosfērā, var darboties eksogēni un būtiski ietekmēt organoģenēzes procesu norisi (Kevers et al. 1992). Dotā darba ietvaros tika izmantoti dažādi audu kultivēšanai izmantoto mēģeņu un stikla pudeļu slēguma veidi, lai izmainītu etilēna saturu gāzu vidē. Etilēnproducents HEFS tika ieslēgts augšanas vidē, lai salīdzinātu endogēni producētā etilēna un eksogēnā etilēna efektus.



73. attēls. Askorbāta peroksidāzes aktivitātes (A) un gvajakola peroksidāzes aktivitātes (B) gradients lapās un posmos gar augošu kartupeļu dzinumū kultivētu *in vitro*.

Kā redzams no 17. tabulā parādītajiem datiem, tādējādi bija iespējams manipulēt gāzu vides etilēna saturu visai plašā diapazonā. Etilēna izdalīšanās dinamikas pētījumi apstiprināja, ka pārsvarā viss etilēna daudzums, kas uzkrājās gāzu vidē divu nedēļu kultivēšanas periodā, bija saistīts ar audu atdalīšanas ievainojuma stimulētā etilēna sintēzi 24 stundu laikā pēc kultivēšanas sākuma (dati nav parādīti).

17. tabula. Kultivēšanas trauku slēguma veida un HEFS pievienošanas barības vidē ietekme uz etilēna koncentrāciju gāzu vidē 24 h pēc kartupeļu posmu eksplantu ieviešanas kultūrā.

Slēguma veids	Etilēna saturs gāzu vidē,	
	ng ml ⁻¹	
Marles aizbāznis	0.012	
Korķis ar atvērumu	0.024	
Korķis	0.081	
Marles aizbāznis + HEFS	0.012	
Korķis ar atvērumu + HEFS	0.190	
Korķis + HEFS	2.00	

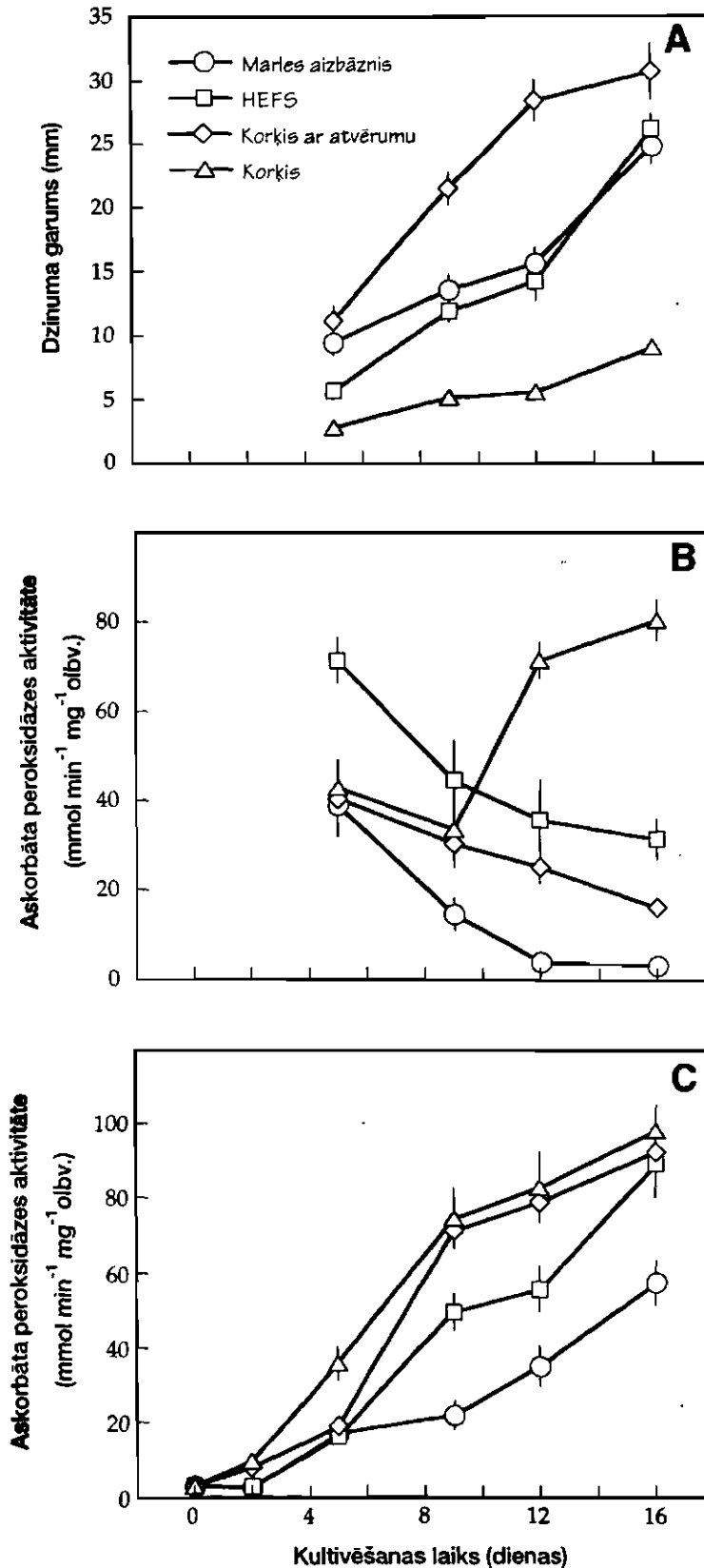
Jaunie dzinumi uz kartupeļa posmu eksplantiem *Murashige-Skoog* bezhormonu vidē sāka augt 3 dienā pēc klonēšanas. Gan kultivēšanas trauku ciešais slēgums, gan HEFS pievienošana vidē izsauca jauno dzinumu stiepšanās augšanas inhibēšanu (74. attēls, A). Tomēr, HEFS apstrādes gadījumā efekts bija tikai īslaicīgs. Zemas etilēna koncentrācijas daļēji slēgtajos traukos stimulēja lineāro augšanu.

Askorbāta peroksidāzes aktivitātes dinamika jaunajos attīstošies dzinumos dažādos augšanas apstākļos ir parādīta 74. attēlā B. Netraucētas gāzu maiņas apstākļos askorbāta peroksidāzes aktivitāte nepārtraukti samazinājās visā eksperimenta perioda laikā. Tikai dzinumos, kas bija auguši HEFS klātbūtnē, askorbāta peroksidāzes aktivitāte 4. dienā būtiski pārsniedza kontroles līmeni, bet abi gāzu apmaiņu ierobežojošie slēguma veidi izraisīja vienkārši palēninātu fermenta aktivitātes kritumu, salīdzinot ar kontroli. Tomēr, pilnīga gāzu apmaiņas novēršana izsauca asu askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugumu 12. dienā.

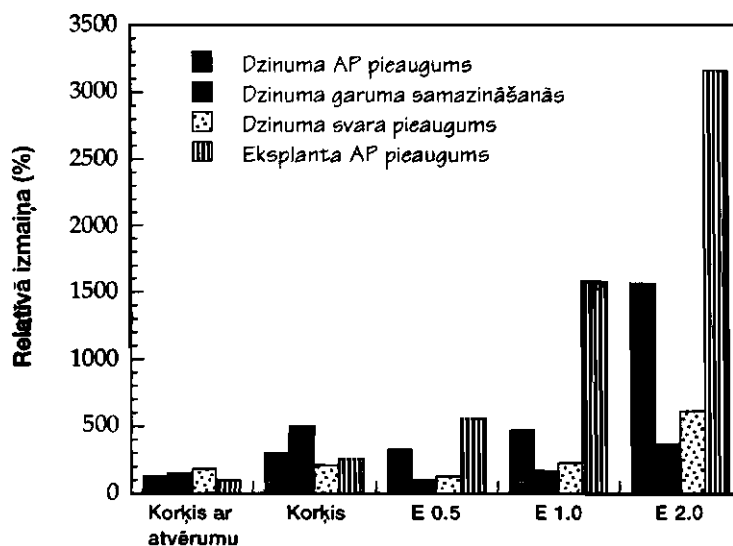
Nepārtraukts askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugums bija novērojams vecajos eksplantos kultivēšanas laikā (74. attēls, C). Visas apstrādes izraisīja askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugumu, bet atbildes *lag* periods un tās intensitāte bija tieši proporcionāla etilēna koncentrācijai gāzu vidē.

Slēguma veida un HEFS koncentrācijas ietekme uz dzinumu un eksplantu askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugumu un dzinuma lineārās augšanas inhibēšanu (noteikta kā dzinuma garuma samazināšanās un relatīvā svara pieaugums) ir parādīta 75. attēlā. Gan dzinumu, gan eksplantu askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugums korelēja ar dzinuma stiepšanās inhibēšanu. Tomēr, HEFS saturošajā vidē askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugums bija vairāk izteikts, nekā lineārās augšanas inhibēšanas pakāpe, norādot uz HEFS papildus efektu uz fermenta aktivitāti.

Lai noteiktu, vai kartupeļu posmu eksplantu kultivēšanai ierobežotas gāzu maiņas apstākļos ir ilgstoša iedarbība uz askorbāta peroksidāzi, posmu segmentus no jaunajiem dzinumiem, kas bija attīstījušies attiecīgā slēguma apstākļos, pārklonēja un tālāk audzēja apstākļos ar neierobežotu gāzu apmaiņu. Etilēna izdalīšanos un askorbāta peroksidāzes aktivitāti noteica dažādās jauno dzinumu daļās. Gan etilēna izdalīšanās



74. attēls. Slēguma veida un HEFS pievienošanas kultivēšanas videi ietekme uz jaunattīstīto dzinumu augšanu (A), askorbāta peroksidāzes aktivitāti dzinumā (B) un askorbāta peroksidāzes aktivitāti posmu eksplantos (C) kartupeļu *in vitro* kultūrā Murashige-Skoog bezhormonu vidē. HEFS galējā koncentrācija kultūras vidē bija 0.5 mg l⁻¹. Dati ir vidējie ±SE no 3 paraugiem (10 eksplanti katrs) katram laika punktam.



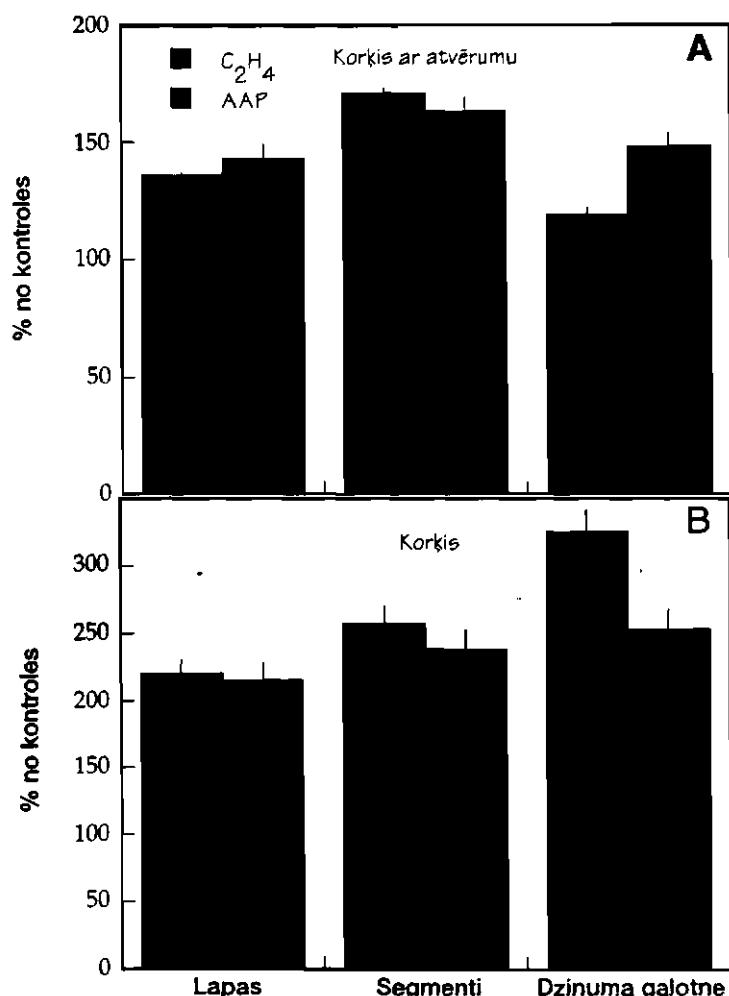
75. attēls. Jaunattīstīto dzinumu askorbāta peroksidāzes aktivitātes, garuma un dzīvās masas izmaiņas, kā arī izejas eksplantu askorbāta peroksidāzes aktivitātes izmaiņas 14 d.v. kartupeļu *in vitro* kultūrā, kas saistītas ar kultūras trauku slēguma veidu un HEFS pievienošanu kultivēšanas videi. Rezultāti ir izteikti % salīdzinājumā ar kontroles apstākļiem (eksplanti kultivēti traukos, kas slēgti ar vates aizbāzni), pamatojoties uz 3 atkārtojumiem katram variantam (10 eksplanti katrā atkārtojumā). HEFS pievienoja kultūras vidē galējā koncentrācijā 0.5 mg l⁻¹ (E 0.5), 1.0 mg l⁻¹ (E 1.0) un 2.0 mg l⁻¹ (E 2.0).

intensitāte, gan askorbāta peroksidāzes aktivitāte šajos dzinumos bija proporcionāla tai etilēna koncentrācijai, kādā bija attīstījušies klonēšanai izmantotie priekšteču eksplanti (76. attēls). Jauno dzinumu lapās un segmentos noteiktie parametri apmēram 1.6 reizes (korķis ar atvērumu) un 2.4 reizes (korķis) pārsniedza kontroles līmeni.

Kad atdalītas lapas vai posmi bez pumpuriem tika kultivēti neierobežotas gāzu maiņas apstākļos, askorbāta peroksidāzes aktivitāte audos būtiski nemainījās 7 dienu laikā (77. attēls). Tālākajā periodā bija novērojams nepārtraukts aktivitātes pieaugums. Lapās un posmu eksplantos, kas tika kultivēti slēgtos traukos vai arī HEFS klātbūtnē, askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugums bija ātrāks un izteiktāks.

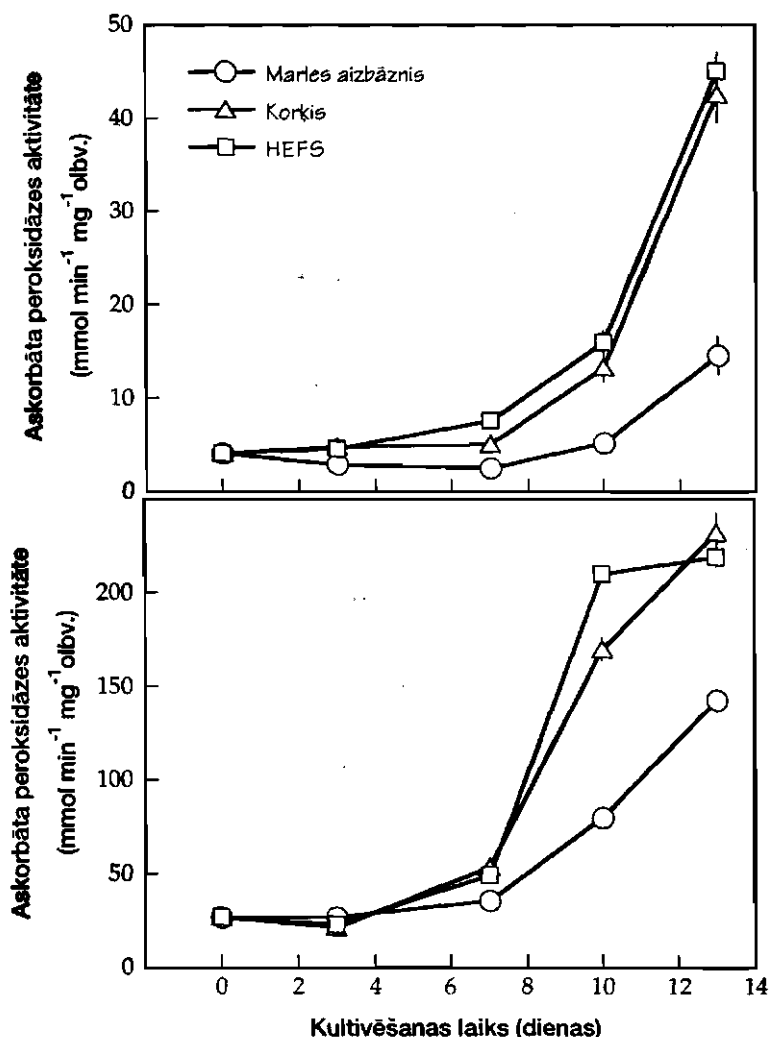
Tā kā H₂O₂ var inducēt gan etilēna biosintēzi (skatīt 3.3.1.), gan askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugumu (skatīt 3.3.3.), kartupeļu eksplantu kultūra tika apstrādāta ar 1 M H₂O₂ stadijā, kad jaunveidotajiem dzinumiem bija 6 līdz 7 starpposmi. Apstrāde būtiski paaugstināja *in vivo* etilēna izdalīšanās intensitāti no intaktiem kultivētajiem augiem (78. attēls, iekšējais grafiks). Askorbāta peroksidāzes aktivitāte pieauga vairāk nekā 2 reizes ar H₂O₂ apstrādātu eksplantu lapās (78. attēls). Tomēr, apstrādāto eksplantu posmu segmentos bija novērojams statistiski būtisks askorbāta peroksidāzes aktivitātes kritums.

Aprakstītajos eksperimentos ar kartupeļu stublāju eksplantu kultūru gan gāzu apmaiņas ierobežošana, gan apstrāde ar etilēnproducentu HEFS, kas abos gadījumos izraisīja etilēna koncentrācijas palielināšanos un lineārās augšanas inhibēšanu, izsauca



76. attēls. Kartupeļu nodālo posmu segmentu kultivēšanas ierobežotas gāzu vides apstākļos pēcietekme uz etilēna izdalīšanos un askorbāta peroksidāzes aktivitāti jaunajos dzinumos, kas attīstījušies vidē ar neierobežotu gāzu apmaiņu. Eksplantus kultivēja traukos, kas slēgti ar vates aizbāžņiem (kontrolē), silikona korķiem ar atvērumu (A) vai silikona korķiem bez atvēruma (B) 14 dienas. Nodālos segmentus no attiecīgajos apstākļos attīstījušajiem dzinumiem izdalīja un subkultivēja traukos, kas slēgti ar vates aizbāžņiem 10 dienas, pēc tam izdarīja analīzes jaunveidoto dzinumu attiecīgajās daļās. Dati ir vidējie \pm SE no 3 paraugiem (10 eksplanti katrs).

arī askorbāta peroksidāzes aktivitātes indukciju. Kamēr askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugumu etilēna ietekmē eksplantu lapās un audos varētu attiecināt uz neatgriezeniskām izmaiņām šūnu metabolismā pastiprinātās novecošanās apstākļos (77. attēls), askorbāta peroksidāzes aktivitātes indukcija jaunattīstītajos dzinuma audos bija cieši saistīta ar etilēna inducēto augšanas inhibēšanu (74. attēls). Šajos pētījumos tika konstatēts arī ilgstošs etilēna efekts uz askorbāta peroksidāzes limeni audos. Askorbāta peroksidāzes aktivitātes līmenis jaunajos dzinumos, kas attīstījās uz eksplantiem pēc to pārklonēšanas neierobežotas gāzu maiņas apstākļos, bija tieši saistīts ar etilēna koncentrāciju vidē, kur šie eksplanti bija attīstījušies iepriekšējās kultivēšanas laikā (76. attēls). Tātad, lielākajā daļā gadījumu novērojama tieša askorbāta

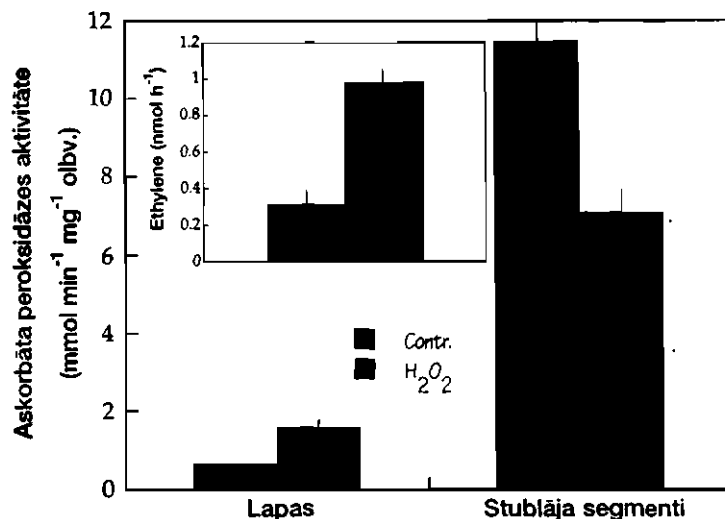


77. attēls. Askorbāta peroksidāzes aktivitātes dinamika lapu eksplantos (A) un dzinumus neveidojošos posmu eksplantos (B) kultivēšanas laikā dažāda slēguma apstākļos un HEFS (0.5 mg l^{-1}) pievienošanas ietekmē. Dati ir vidējie \pm SE no 3 paraugiem (30 eksplanti katrs) katrai apstrādei katrā laika punktā.

peroksidāzes aktivitātes atkarība no kultivēšanas gāzu vides etilēna koncentrācijas.

Askorbāta peroksidāzes aktivācijas mehānisms etilēna ietekmē netika īpaši pētīts aprakstītajos eksperimentos. Tomēr, tā kā lielākajā daļā gadījumu etilēns inducē peroksidāzes aktivitāti caur atbilstošo gēnu aktivāciju, kas savukārt izsauc fermentatīvā olbaltuma sintēzi *de novo* (Morgens *et al.* 1990, Ishige *et al.* 1993, Ito *et al.* 1994), var domāt, ka kartupeļu audos ierobežotas gāzu maiņas apstākļi un HEFS apstrāde izsauc askorbāta peroksidāzes gēna ekspresiju.

Tiek uzskatīts, ka augi ar augstu antioksidatīvo fermentu līmeni ir ievērojami tolerantāki pret endogēnā oksidatīvā stresa bojājumiem, nekā augi ar zemu līmeni (Gossett *et al.* 1994). Pētījumi liecina, ka pat mazas askorbāta peroksidāzes aktivitātes izmaiņas ir pietiekamas, lai pārtvertu ievērojami paaugstinātu H_2O_2 daudzumu (Mittler & Zilinskas 1994). Tāpēc, balstoties uz iegūtajiem rezultātiem, var pieņemt, ka kartupeļu audu kultivēšana vidē ar paaugstinātu etilēna koncentrāciju var izsaukt



78. attēls. H₂O₂ apstrādes ietekme uz askorbāta peroksidāzes aktivitāti lapās un stublāja segmentos un etilēna izdalīšanos *in vivo* (iekšējais grafiks). Posmu eksplantus kultivēja 35 ml tilpuma mēģenēs neierobežotas gāzu maiņas apstākļos līdz jaunveidotajiem dzinumiem attīstījās 6 līdz 7 starpposmi. Apstrādi izdarīja ar 0.5 M H₂O₂, 1 ml uz mēģeni. Mēģenes noslēdza ar silikona korķiem uz 24 h un noteica uzkrātā etilēna daudzumu. Pēc analīzes, atbilstošos audu paraugus izmantoja askorbāta peroksidāzes aktivitātes noteikšanai. Dati ir vidējie ±SE no 5 atkārtojumiem.

paaugstinātu stresa toleranci, kura ir vairāk vai mazāk stabila tālākās pārklonēšanas gaitā. Etilēna veidošanās un askorbāta peroksidāzes vienlaicīga indukcija audos, kas apstrādāti ar H₂O₂, sakrīt ar iepriekš publicētajiem rezultātiem (Mehlhorn 1990) un apliecina, ka H₂O₂ piedalās dotās atbildes reakcijas regulēšanā. Nesenie pētījumi par stresa toleranci ir parādījuši, ka H₂O₂ veidošanās pieaugums kalpo par īslaicīgu signālu pretoksidatīvo fermentu indukcijai un ir svarīgs adaptācijas reakciju attīstībai (Prasad *et al.* 1994).

Tātad, pielietojot etilēna apstrādi augu audu kultūrās, tās var lietot stresa tolerances mehānismu pētīšanai.

4. DISKUSIJA

Etilēns ir viena no visvienkāršākajām organiskajām molekulām, kurai piemīt bioloģiskā aktivitāte. Līdz pat septiņdesmito gadu sākumam praktiski nebija informācijas par to, kā notiek etilēna biosintēze, kā tiek regulēta tā veidošanās un kā augi uztver etilēna klātbūtni gaisā necīgā daudzumā. Pēdējo divdesmit gadu laikā, līdz ar molekulārās bioloģijas metožu plašu pielietojumu augu fizioloģijā, uzkrājies ievērojams daudzums bioķīmisko un ģenētisko datu par šiem jautājumiem.

Etilēna biosintēzes ceļa atklāšana septiņdesmito gadu beigās pavēra ceļu turpmākajiem etilēna veidošanās mehānismu bioķīmiskajiem un ģenētiskajiem pētījumiem. Kopš tā laika ir aprakstīti vairāki mēģinājumi pierādīt t.s. alternatīvā etilēna veidošanās ceļa esamību augstākajos augos, kas saistīts ar membrānu lipīdu peroksidāciju neatkarīgi no ACKS veidošanās un oksidēšanās. Šādos eksperimentos par pierādījumu ACKS-neatkarīgam etilēna veidošanās ceļam tiek minēta pret etilēna biosintēzes inhibitoriem nejūtīgas etilēna izdalīšanās intensitātes saglabāšanās, kas atsevišķos gadījumos var būt 60 līdz 70 % no kopējās intensitātes (Chen & Wellburn 1991). Vielas, kas inhibē S-adenozilmetionīna pārvēršanos par ACKS, pilnībā novērsa ACKS satura pieaugumu priežu skuļās, kas bija inkubētas ūdenī, un par 80 līdz 90 % bloķēja ACKS indukciju ķīmiskajam stresam pakļautajās skuļās (Levinsh & Tillberg 1995; 3.3.1.). Neskatoties uz to, būtiska daļa etilēna izdalīšanās intensitātes priežu skuļās bija nejūtīga pret šiem inhibitoriem (25 līdz 55 % no kopējā līmeņa). Šādi rezultāti liek secināt, ka etilēna biosintēzes inhibitoriem bez tiešās inhibitorās iedarbības var būt papildus efekti uz etilēna veidošanos, kas saistās ar zināmu induktīvo efektu, it īpaši, kombinācijā ar citiem ķīmiskajiem stresoriem. Tā piemēram, inhibitors aminooksietīkskābe izsauca etāna izdalīšanās stimulāciju, kas ir tipisks membrānu lipīdu bojājumu rādītājs (Levinsh & Tillberg 1995). Viena no iespējām ir tā, ka aminooksietīkskābe izraisa ACKS sintēzes olbaltuma, kurš ir pazīstams kā visai labils ferments, stabilizāciju *in vivo* (Kim & Yang 1992, Wang & Artega 1992). Cits izskaidrojums varētu būt saistīts ar inhibitoru stimulējošo ietekmi uz ACKS oksidāzes aktivitāti. Pamatojoties uz eksperimentiem ar lipīdu peroksidācijas selenometionīna izmantošanu, var secināt, ka nātrija bisulfīts augstās koncentrācijās (virs 8 mM) specifiski izraisa etilēna izdalīšanos membrānu lipīdu sadalīšanās rezultātā (Levinsh & Tillberg 1995). Principiāli izšķirošu atbildi par alternatīvā etilēna veidošanās ceļa darbību varētu iegūt eksperimentos ar radioaktīvo etilēna veidošanās priekšteču pielietojumu.

Ir pamats uzskatīt, ka etilēna veidošanās īpatnības, kas izpaužas kā novirzes no pamata biosintēzes ceļa, ir novērojamas tikai atsevišķu augu grupu pārstāvjiem, un ir saistītas vai nu ar to ekoloģiskajām īpatnībām (ūdensaugi *Spirodela oligorrhiza*, Mattoo *et al.* 1986), vai arī ar specifisku filoģenētisko stāvokli (skujukoki). Šinī sakarībā jāpiemin fakts, ka olbaltumvielu biosintēzes translācijas inhibitors cikloheksimīds izraisīja etilēna izdalīšanās stimulāciju priežu skuļās; pie kam, šis efekts bija vismaz daļēji atkarīgs no ACKS veidošanās, jo to apspieda aminooksietīkskābe (Levinsh & Tillberg 1995; 3.3.1.).

Pēdējā laika pētījumi citās laboratorijās ir parādījuši, ka cikloheksimīds inducē ACKS sintāzes gēna ekspresiju atsevišķām augu sugām (*Liang et al.* 1992, *Zarembinski & Theologis* 1993). Tas liecina, ka atsevišķām augu sugām ACKS sintāzes gēns atrodas labilu represoru molekulu kontrolē, vai arī tā traskripti ir nestabili. Līdz ar to jāsecina, ka attiecībā uz etilēna fizioloģijas pētījumiem, kuros izmanto dažādus savienojumus etilēna veidošanās un olbaltuma sintēzes manipulēšanai, ir pilnībā jāizslēdz specifisko etilēna biosintēzes inhibitoru, kā arī vispārīgo inhibitoru darbības blakus efekti uz etilēna veidošanās sistēmu. Pretējā gadījumā, kā rāda mūsu pētījumi, iegūto rezultātu interpretācija kļūst visai apšaubāma (*levinsh & Tillberg* 1994).

Lai arī etilēna biosintēzes indukcija ir viena no vislabāk izpētītajām stresa atbildes reakcijām, stresa etilēna funkcijas augos pilnībā nav skaidras. Pamatojoties uz pētījumiem, kuros lietoti etilēna biosintēzes un darbības inhibitori, kā arī izmantojot eksogēno etilēnu, ir izdarīts secinājums par to, ka endogēni veidojies stresa etilēns piedalās augu stresa adaptācijas reakciju regulācijā. Mūsu eksperimentos novēroto graudzāļu dīgstu lapas augšanas priekšlaicīgu apstāšanos eksogēnā etilēna ietekmē ar vienlaicīgu lignifikācijas paātrināšanos var uzskatīt par tipisku etilēna atkarīgās adaptācijas reakcijas piemēru (*levinsh & Romanovskaya* 1991; 3.1.3.). Situācijā, kad aktīvi augošas visa dīgsta fotosintēzi nodrošinošas lapas audi tiek ievainoti, dīgsta attīstības programmas sekmīgai izpildei ir nepieciešama maksimāla nākošo lapu attīstības un augšanas stimulēšana, ko var panākt, pārnesot metabolītu plūsmu uz sekojošās lapas augšanas centru. Tā kā aktīvi augošas šūnas ir atraģējošais centrs, plūsmas pārslēgšanai nepieciešama ievainotās lapas augšanas paātrināta izbeigšanās. Šāda faktora lomu izpilda etilēns, kurš stimulē paātrinātu lignifikāciju, stimulējot lignīna biosintēzes fermentu priekšlaicīgu aktivēšanos. Tomēr, uz mūsu datu pamata nav iespējams izdarīt galējo secinājumu par to, vai paātrināta lignifikācija etilēna ietekmē ir šūnu stiepšanās izbeigšanās cēlonis, vai arī tikai tās sekas.

Principiāli jauns atklājums ir saistīts ar pētījumiem par stresa etilēna izdalīšanos inducējošiem faktoriem graudzāļu dīgstu lapās. Dotā objekta uzbūves specifika ir saistīta ar apstākli, ka aktīvi augošie lapas audi ir lokalizēti aptverošo audu iekšpusē (*Kemp* 1980). Pirmo lapu nosedz koleoptils, bet otro un sekojošās lapas – iepriekšējo lapu makstis. Tā kā veģetatīvajos audos visaktīvāk etilēna biosintēze notiek šūnās, kuras atrodas dalīšanās un stiepšanās fāzē (*Saltveit & Dilley* 1978, *Satler & Kende* 1985, *levinsh et al.* 1991), loģisks ir jautājums, kā šāds uzbūves princips ietekmē etilēna veidošanos un izdalīšanos no graudzāļu dīgstiem. Mūsu pētījumu rezultātā ir iegūti pierādījumi par to, ka graudzāļu dīgstu ievainošana inducē to lapās ACKS sintēzi, taču situācijā, kad lapas audi atrodas aptverošo audu segumā, etilēna veidošanās tiek bloķēta (*levinsh et al.* 1993; 3.1.2.). Jādomā, ka tas notiek tieši ACKS oksidācijas stadijā nepietiekama skābekļa pieplūduma rezultātā, tomēr galējos pierādījumus varētu iegūt, izdarot eksperimentus par lapas audu skābekļa saturu un koleoptila caurlaidību attiecībā pret skābekli. No otras puses, iegūtie dati liek domāt, ka graudzāļu dīgstu pirmās lapas izaugšana koleoptila ārpusē ir saistīta ar endogēnā

oksidatīvā stresa situācijas attīstīšanos lapas audos. Par to liecina arī fakts, ka lapas izaugšanas brīdī etilēna izdalīšanās intensitāte no intaktiem dīgšiem krasi bet īslaicīgi paaugstinās (*levinsh & Kreicbergs* 1992; 3.1.1.).

Atkarībā no auga sugas un pētītajiem audiem, stresa atkarīgais etilēna veidošanās pieaugums var būt no dažām reizēm līdz vairākiem simtiem reižu. Etilēna atkarīgās atbildes reakcijas, kas pētītas, izmantojot eksogēno etilēnu, parāda tipisku atbildes intensitātes atkarību no lietotas etilēna koncentrācijas (*Abeles et al.* 1992). Pretēji tam, līdz šim literatūrā nav aprakstīti pētījumi, kuros būtu parādītas tās endogēnā etilēna veidošanās intensitātes robežas, kas ir nepieciešamas noteiktas atbildes reakcijas indukcijai. Nav arī skaidrs, vai ACKS satura pieaugums vienmēr obligāti atspoguļo etilēna izdalīšanās intensitātes pieaugumu. Priežu skujās apstrāde ar eksogēno H₂O₂ izsauca 500-kārtīgu ACKS satura pieaugumu ar vienlaicīgu 200-kārtīgu etilēna izdalīšanās pieaugumu (*levinsh & Tillberg* 1995; 3.3.1.). Tajā pašā laikā, askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugums H₂O₂ ietekmē, kurš bija atkarīgs gan no etilēna biosintēzes, gan darbības, bija tikai 2.4 reizes (*levinsh et al.* 1995; 3.3.3.). Šādas pašas intensitātes askorbāta peroksidāzes aktivēšanos izsauca apstrāde ar etilēnproduktu etefonu vai ACKS koncentrācijā, kas vienlaicīgi inducēja attiecīgi 40-kārtīgu un 30-kārtīgu etilēna izdalīšanās intensitātes pieaugumu (3.3.1.). Tātad, secīgajā etilēna biosintēzes–atbildes reakcijas pārnesei ķēdē notiek ievērojama signāla pavājināšanās. Mūsu eksperimentos ar priežu skujām starpība starp ACKS indukcijas pakāpi un etilēna izdalīšanās aktivēšanās intensitāti varētu būt saistīta ar to, ka maksimālās ACKS indukcijas momentā reālā etilēna izdalīšanās intensitāte bija samazinājusies ACKS oksidāzes aktivitātes kritumā rezultātā (*levinsh & Tillberg* 1995; 3.3.1.).

Jautājumu par stresa etilēna induktīvo lomu sarežģī novērojumi par to, ka, lai arī etilēna biosintēzes aktivācija ir nespecifiska atbildes reakcija uz praktiski jebkāda veida stresa faktoru iedarbību, ne visi stresa veidi izraisa atbilstošu etilēna atkarīgo atbildes reakciju fermentu aktivēšanās indukcijas veidā. Jautājumu varētu pārfrazēt arī sekojoši – vai etilēna biosintēzes pieaugums stresa ietekmē ir pietiekams nosacījums stresa atbildes reakciju aktivēšanai. Pozitīvas atbildes gadījumā varētu secināt, ka etilēns tiešām piedalās stresa adaptācijas reakciju aktivēšanā kā vispārēja signālmolekula. Pretējā gadījumā, etilēns būtu jāuzskata par stresa situācijas simptomu, neizslēdzot zināmu regulatīvo ietekmi uz stresa atbildes reakcijām. Lai arī peroksidāzes aktivitātes pieaugums eksogēnā etilēna ietekmē gēnu aktivācijas līmeni ir labi aprakstīta parādība (*Abeles et al.* 1988, *Ishige et al.* 1993, *Ito et al.* 1994), ņemot vērā etilēna induktīvo ietekmi uz novecošanos, kas saistīta ar peroksidāžu aktivāciju, šādi dati nepierāda etilēna tiešo ietekmi. Bez tam, lietojot etefonu (HEFS) kā eksogēnā etilēna avotu, pastāv iespēja, ka atsevišķi etefona efekti nav saistīti ar etilēna darbību (*Lawton et al.* 1994). Pastāv arī iespēja, ka induktors stresa reakcijām varētu būt nevis etilēns kā tāds, bet gan endogēnās ACKS koncentrācijas izmaiņas. Tā piemēram, etilēnam un ACKS ir pretēja ietekme uz hitināzes gēna ekspresiju un aktivitātes līmeni stresa aizsargreakciju laikā (*Siefert et al.* 1994). Šādi dati liek domāt, ka stresa

atkarīgais etilēns nav viennozīmīgi uzskatāms par obligātu induktoru, bet gan drīzāk par stresa atbildes reakciju modulātoru.

Principiāla problēma pašreizējā zināšanu attīstības līmenī ir arī jautājums par to, kādas ir etilēna funkcijas intaktu augu aktīvi augošos veģetatīvajos audos. Ir pilnīgi skaidrs, ka endogēnā etilēna darbību nav iespējams pētīt, vienkārši lietojot eksogēno etilēnu, jo tā izsauktās atbildes reakcijas ir attiecināmas uz stresa etilēna inducētajām izmaiņām (*Levinsh & Romanovskaya* 1991). Šāda principa neievērošana izraisa būtiskas pretrunas starp etilēna biosintēzes lokalizācijas un iespējamās darbības vietām. Tā piemēram, graudzāļu dīgstu lapās maksimālā etilēna veidošanās notiek meristemātiskos audos (*Levinsh et al.* 1991; 3.1.2.). Tā kā šajos audos ir arī lielākā endogēnā etilēna koncentrācija, nevar arī uzskatīt, ka notiktu ievērojama etilēna difūzija (3.1.2.). Tajā pašā laikā, etilēna darbības vieta lignifikācijas indukcijā ir tajos lapas audos, kur notiek šūnu stiepšanās pārtraukšanās (*Levinsh & Romanovskaya* 1991; 3.1.3.). Jādomā, ka endogēnais etilēns augošos veģetatīvajos audos izpilda citas, no regulācijas viedokļa intīmākas funkcijas. Uz šādām iespējamām funkcijām norāda novērotā sakarība starp aktīvu etilēna biosintēzi meristemātiskajos audos, no vienas puses, un relatīvi visaugstāko lipoksigenāzes (*Levinsh* 1992b; 3.1.5.) un askorbāta peroksidāzes aktivitāti (*Levinsh* 1992a; 3.2.1., 3.4.) šajos audos, no otras. Zināms arī, ka agrās šūnu augšanas stadijās notiek visintensīvākā aktīvo skābekļa formu, tai skaitā, arī H_2O_2 , veidošanās (*Puntarulo* 1994). Varētu domāt, ka lipoksigenāzes un askorbāta peroksidāzes konstanta ekspresija agrās augšanas stadijās ir saistīta tieši ar pastiprinātu ūdeņraža peroksīda veidošanos aktīva šūnu metabolisma rezultātā. Tā kā ūdeņraža peroksīds var izsaukt askorbāta peroksidāzes olbaltuma sintēzi *de novo*, kas ir atkarīga gan no etilēna biosintēzes, gan darbības (*Levinsh et al.* 1995; 3.3.3., 3.4.), var secināt, ka aktīvi augošos veģetatīvajos audos darbojas regulatīvā sekvenca H_2O_2 – etilēns – askorbāta peroksidāze/ lipoksigenāze. Šādas paša regulācijas ceļa darbību var postulēt arī stresotos augos, taču šajā gadījumā attiecīgo gēnu ekspresija ir īslaicīga.

Būtiski svarīgu informāciju endogēnā etilēna funkciju izpratnei veselos augos dod arī eksperimenti par etilēna izdalīšanos no augošiem graudzāļu dīgstiem. Šo eksperimentu rezultātā pirmo reizi aprakstīti endogēnā etilēna izdalīšanās ritmi no intaktiem etioloģiem dīgstiem (*Levinsh & Kreicbergs* 1992; 3.1.1.). Pretstatā līdz šim zināmajām etilēna veidošanās oscilācijām, kuru ekspresijai nepieciešama indukcija gaismas vai cita vides apstākļu maiņas signāla veidā, un kuras ir diurnālas dabas (*El-Beltagy et al.* 1976, *Rikin et al.* 1984, *Morgan et al.* 1990), etilēna izdalīšanās no graudzāļu dīgstiem ritmi tiek iekšēji vadīti. Turklāt, individuāli dīgsti neizrāda sinhronitāti attiecībā pret etilēna izdalīšanās maksimuma un minimuma punktiem. Šādu ritmisku etilēna veidošanās intensitātes svārstību fizioloģiskā jēga kļūst saprotama, analizējot attiecīgo individuālo dīgstu augšanas ātruma svārstības – maksimālās etilēna izdalīšanās periodos koleotilu augšanas ātrums krasi samazinās, salīdzinot ar pārējām etilēna izdalīšanās fāzēm (*Levinsh & Kreicbergs* 1992; 3.1.1.). Varētu domāt, ka etilēna izdalīšanās ritmiskuma kontrole notiek etilēna biosintēzes

kontroles līmenī. Kā zināms, dažu fermentu aktivitātes un olbaltuma līmeņa cirkādie ritmi ir atkarīgi no attiecīgo gēnu ritmiskas ekspresijas (*Kloppstech 1985, Deng et al. 1990*). Ir arī izteikts pieņēmums, ka etilēna izdalīšanās oscilācijas kokvilnas dīgstos atspoguļo ACKS sintēzes oscilācijas (*Rikin et al. 1984*). Tomēr, bez papildus pētījumiem nevar noliegt arī iespēju, ka dažādu etilēna biosintēzes efektoru satura fluktuācijas varētu vadīt novērotos etilēna izdalīšanās ritmus graudzāļu dīgstos.

Individuālo dīgstu etilēna izdalīšanās intensitātes analīze izgaismo vēl vienu problēmu, kas ir svarīga no populāciju ekoloģijas un augu attīstības regulācijas evolucionāro aspektu viedokļa. Kā zināms, bioloģiskā daudzveidība ir tas faktors, kas nodrošina attīstību globālā izpratnē. Arī vienas augu sugas un tās populācijas ietvaros katra atsevišķā indivīda fizioloģiskie un bioķīmiskie parametri ir variabli. Lai arī tiek uzskatīts, ka vides apstākļu izmaiņas laikā un telpā ir tas faktors, kas nosaka fizioloģisko parametru variāciju rašanos starp individuāliem organismiem (*Hara & Yokozawa 1994*), pat kontrolējamos optimālos apstākļos atsevišķie augi izrāda ievērojamu variabilitāti. Tā piemēram, graudzāļu dīgsti atšķiras pēc to dīgšanas sākuma brīža, augšanas ātruma (*Liptay & Davidson 1971; 3.1.1.*), kā arī pēc to etilēna izdalīšanās intensitātes (*Levinsh & Kreicbergs 1992; 3.1.1.*). Jautājumu vēl vairāk sarežģī fakts, ka augi strukturāli sastāv no konstruktīvu subvienību atkārtojumiem (piemēram, meristēmas, saknes, lapas u.t.t.). Individuālo komponentu telpiskais sadalījums un tā nozīme fizioloģisko un bioķīmisko parametru variācijās viena auga robežās ir praktiski neizpētīts jautājums (*Smith et al. 1994*). Tomēr, informācija par bioķīmisko parametru telpiskā sadalījuma īpatnībām individuālā augā var būt ar kritisku nozīmi fizioloģisko pētījumu rezultātu izvērtēšanā. Tā piemēram, eksperimentos ar priežu dīgstiem parādījās ārkārtīgi liela variācija starp atsevišķo skuju etilēna izdalīšanās intensitātēm viena dīgsta robežās – līdz pat 60 % (3.3.1.). Tajā pašā laikā, atsevišķo skuju svārstības koeficients bija tikai līdz 16 %. Jaunākie pētījumu mūsu laboratorijā ir parādījuši, ka etilēna izdalīšanās variabilitāte no atsevišķām skujām vēl vairāk palielinās, ja etilēna biosintēze tiek inducēta ar H_2O_2 . Jādomā, ka šādas atšķirības ir saistītas ar individuālo skuju atšķirīgo spēju sadalīt audos iekļuvušo H_2O_2 , un ir saistītas ar skuju endogēnā stresa rezistences reakcijām. Aprakstītās parādības ir tieši saistītas ar bioloģisko variabilitāti kā plastiskās attīstības un adaptācijas fundamentālo pamatu visos augu valsts organizācijas līmeņos, kam tikai nesen ir pievērsta pienācīga uzmanība (*Bradford & Trewavas 1994*). Šinī sakarībā atšķirības atsevišķo augu individuālo subvienību (šūnu, audu, lapu) variācijas atbildes reakcijas pakāpē uz vides apstākļu izmaiņu ir pamats plastiskumam, kas nodrošina eksistenci mainīgas ārējās vides apstākļos. Ļoti iespējams, ka etilēns ir viens no būtiskākajiem aģentiem, kas nodrošina atbildes reakciju variabilitāti augos.

Antioksidatīvo fermentu aktivitātes pieaugums, kas novērots daudzos fizioloģiskajos pētījumos, skaidri parāda, ka pretoksidatīvo fermentu līmeņa regulācija dod augiem papildus stresa aizsardzības iespēju. Uz šādu novērojumu pamata pēdējos gados ir attīstījusies hipotēze par to, ka stresa toleranci var uzlabot, paaugstinot augu endogēnu

pretoksidatīvo kapacitāti. Šī hipotēze balstās uz novērojumu, ka toksisko skābekļa formu pieaugums, līdzīgi etilēna biosintēzes aktivācijai, ir vispārīga atbilde uz praktiski visu veidu stresa situācijām. Virkne novērojumu apstiprina tās pareizību. Pirmkārt, stresa laikā vai pēc tā notiek membrānu un citu šūnas sastāvdaļu oksidatīvas dabas bojājumi. Otrkārt, stresa situācijās pieaug aktīvā skābekļa formu un brīvo radikālu ekstraģējamie daudzumi. Treškārt, noteiktos stresa apstākļos ievērojami paaugstinās pretoksidatīvo fermentu aktivitātes un askorbāta un glutaciona līmenis. Atsevišķu fermentu aktivitātes, kuri piedalās pretoksidatīvās aizsardzības sistēmā, ietekmē dažādi vides faktori, kuri palielina aktīvā skābekļa formu saturu. Lielākajā daļā gadījumu var novērot tikai relatīvi nelielas fermentu aktivitātes izmaiņas (*Edwards et al.* 1993). Tomēr, ņemot vērā visai ievērojamo lapas audu apjomu, nelielas kopējās fermenta aktivitātes izmaiņas var atbilst ievērojamām izmaiņām noteiktā mazā šūnas struktūras komponentā. Ceturtkārt, var parādīties krusteniskā tolerance pret dažādām stresa formām, ja pretoksidatīvās aizsardzības sistēma ir aktivēta.

Jādomā, ka antioksidatīvās aizsardzības sistēma augos ir visai ierobežota tās spējā atbildēt uz stresa iedarbību. Tas arī ir saprotams, jo augstāko augu kā modulāras sistēmas aizsardzības pamatprincips ir audu pašdestrukcija ievērojamo bojājumu gadījumā. Jaunākie pētījumi, lietojot molekulārās bioloģijas metodes, liek domāt, ka antioksidatīvās aizsardzības sistēma neatbild uz potenciālā bojājuma iespēju ar ātru fermentu gēnu indukciju, bet gan reaģē tikai reālu bojājumu parādīšanās gadījumā. Iespējams, ka tas ir saistīts ar aktīvā skābekļa formu piedalīšanos signālu pārnešanas sistēmā. Šādā gadījumā ātra antioksidatīvo fermentu aktivitātes palielināšanās novestu pie signālu pārnešanas bremsēšanas un kavētu vispārējās stresa atbildes reakcijas. Ņemot vērā pašreizējo zināšanu līmeni, stresa atkarīgās etilēna biosintēzes loma augu aizsargkapacitātes regulēšanā šajā kontekstā ir visai hipotētiska. Fizioloģiskie dati rāda, ka eksogēnais etilēns inducē pretoksidatīvo fermentu aktivitātes pieaugumu, bet ķīmiskā stresa inducētais aktivitātes pieaugums ir atkarīgs no etilēna biosintēzes un darbības (*Levinsh et al.* 1995; 3.3.3.). Tomēr, galvenā problēma šajā gadījumā saistās ar cēloņsakarību atklāšanu, nevis vienkārši ar sakritību novērošanu laikā un telpā. Līdz šim nav zināmi dati par to, vai eksistē tieša koncentrācijas atkarība starp endogēnā etilēna līmeni un pretoksidatīvo toleranci. Pēdējā laika pētījumos ar transgēniem augiem ir atrasti pierādījumi tam, ka viena fermenta gēna pastiprināta ekspresija izsauc paralēlu citu pretoksidatīvo fermentu aktivitātes pieaugumu (*Gupta et al.* 1993). Tas norāda uz to, ka aizsargsistēma ir atkarīga no vienota kontroles mehānisma. Līdzīgi tam, jaunākie pētījumi mūsu laboratorijā ir parādījuši, ka priežu skuļās eksogēnā etilēna ietekmē līdztekus askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugumam novērojams arī būtisks superoksidismutāzes aktivitātes pieaugums.

Šajā kontekstā interesanti ir rezultāti, kas iegūti kartupeļu dzinumumu eksplantu kultūrā. Jauno dzinumumu attīstība kultūras traukos ar ierobežotu gāzu apmaiņu ar apkārtējo vidi, kā arī etilēnproducenta etefona klātbūtnē, izsauc ilgstošu askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugumu, kurš saglabājās arī vairāku sekojošu pārkultivēšanu gaitā (3.4.). Tā kā pēdējā

laika pētījumi mūsu laboratorijā ir parādījuši, ka šādiem augiem bija pastiprināta tolerance pret aktīvo skābekli ģenerējošo herbicīdu parakvatu (metilviologēnu), var secināt, ka kartupeļu dzinumu kultivēšana vidē ar paaugstinātu etilēna saturu var izsaukt paliekošu izturību pret endogēno oksidatīvo stresu. Šie novērojumi ir visai būtiski praktiskajā augu mikropavairošanā, jo augu audu kultūras to ieviešanas un uzturēšanas gaitā ir pakļautas vairākkārtīgu stresu iedarbībai. Tālākajos pētījumos ir būtiski noskaidrot, vai līdz ar askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugumu endogēnā oksidatīvā stresa rezistence saistīta arī ar citu antioksidatīvo fermentu (superoksīddismutāze, glutationreduktāze) aktivitātes pieaugumu. Tā kā dažādu aktivētā skābekļa formu līdzsvara nodrošināšanai ir nepieciešamas korelatīvas visu šo fermentu aktivitātes izmaiņas, ir nepieciešams noskaidrot, vai šo fermentu aktivitātes pieaugums notiek tiešā etilēna iedarbībā, vai arī ir netieši saistīts ar etilēna inducētajām bioķīmiskajām un fizioloģiskajām izmaiņām audos. Principiāli svarīga ir H₂O₂ funkciju noskaidrošana stresa tolerances nodrošināšanā, jo kartupeļu dzinumu kultūrā ūdeņraža peroksīds izsauc gan etilēna biosintēzes aktivāciju, gan arī askorbāta peroksidāzes aktivitātes indukciju (3.4.).

5. SECINĀJUMI

1. Etilēna biosintēze likumsakarīgi izmainās augu augšanas un attīstības laikā. Juvenīliem, aktīvi augošiem audiem paralēli ar maksimālo askorbāta peroksidāzes un lipoksigenāzes aktivitāti un minimālo lignīna saturu raksturīga augsta etilēna veidošanās intensitāte, kas samazinās līdz ar šūnu diferenciēšanos. Līdz ar audu vecuma palielināšanos, tajos pieaug kopējā peroksidāzes aktivitāte, kas ir saistīta ar visu esošo izoformu aktivitātes pieaugumu. Veseliem etiolētiem graudzāļu dīgstiem raksturīga ritmiska etilēna izdalīšanās. Maksimālās etilēna izdalīšanās fāzē notiek dīgstu lineārās augšanas ātruma būtiska samazināšanās.
2. Dažāda veida stresa faktoru iedarbība (audu ievainošana, fotooksidatīvais stress, ķīmiskais stress u.c.) izsauc etilēna biosintēzes aktivāciju 1-aminociklopropān-1-karbonskābes (ACKS) sintēzes līmeni, kas ir atkarīga no olbaltuma sintēzes *de novo*. Etilēnveidojošā fermenta aktivitātes indukcija ir saistīta ar stresa atkarīgo etilēna izdalīšanās pieaugumu. Stresa iedarbībā notiek peroksidāžu sistēmas aktivācija ar īpaši izteiktu askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugumu gēnu ekspresijas indukcijas rezultātā, kas ir tieši atkarīgs no etilēna biosintēzes, kā arī lipoksigenāzes aktivitātes palielināšanās.
3. Augu audu apstrāde ar eksogēno etilēnu vai ACKS izraisa etilēna izdalīšanās krasu pieaugumu, kas daļēji saistīts ar etilēna autokatalītisko darbību, un inducē askorbāta peroksidāzes aktivitātes pieaugumu uz kopējās peroksidāžu sistēmas aktivācijas fona, kā arī izsauc lipoksigenāzes aktivitātes palielināšanos. Fermentu aktivācija notiek olbaltuma sintēzes līmenī. Augošos audos eksogēnā etilēna un ACKS ietekmē notiek lineārās augšanas inhibēšana un vienlaicīga lignifikācijas pastiprināšanās paralēli ar specifisku peroksidāzes formu aktivāciju, ko var uzskatīt par vienu no faktoriem, kas piedalās šūnu stiepšanās bremsēšanā. Ilgstoša paaugstinātas etilēna koncentrācijas klātbūtne inducē audos paliekošu paaugstinātu endogēnā oksidatīvā stresa toleranci.
4. Nav iespējams lietot etilēna biosintēzes, olbaltuma sintēzes un lipīdu peroksidācijas inhibitorus, lai pierādītu alternatīvā, no ACKS sintēzes neatkarīgā, etilēna veidošanās ceļa darbību augu audos, jo šie savienojumi izrāda blakus efektus uz etilēna izdalīšanos. Savienojumi, kas izdala etilēnu no augu audiem sārma hidrolīzes apstākļos, nav identiski ar ACKS un nevar piedalīties etilēna veidošanā stresam nepakļautos audos, bet ir saistīti ar etilēna atkarīgajām stresa atbildes reakcijām.
5. Uz iegūto datu pamata var secināt, ka gan juvenilos nestresotos audos, gan arī audos, kas pakļauti stresa iedarbībai, intensīva etilēna biosintēze ir atkarīga no aktīvas H₂O₂ veidošanās. Etilēns, savukārt, nodrošina askorbāta peroksidāzes un citu pretoksidatīvā stresa fermentu gēnu ekspresiju, kas izsauc attiecīgo fermentatīvo olbaltumu sintēzi *de novo* un paaugstina to aktivitāti. Tomēr, etilēna regulatīvās funkcijas nestresotos un stresam pakļautos audos ir atšķirīgas.

6. IZMANTOTĀS LITERATŪRAS SARAKSTS

- Abeles AL, Abeles FB (1972) Biochemical pathway of stress-induced ethylene. *Plant Physiol* 50:496-498
- Abeles FB (1973) Ethylene in Plant Biology. Academic Press, NY. 360p.
- Abeles FB, Dunn LJ, Morgens P, Callahan A, Dinterman RE, Schmidt J (1988) Induction of 33-kD and 60-kD peroxidases during ethylene-induced senescence of cucumber cotyledons. *Plant Physiol* 87:609-615
- Abeles FB, Morgan PW, Saltveit ME (1992) Ethylene in Plant Biology. 2nd Edition. Academic Press, San Diego. 414p.
- Abeles FB, Rubinstein B (1964) Regulation of ethylene evolution and leaf abscission by auxin. *Plant Physiol* 39:963-969
- Acaster MA, Kende H (1983) Properties and partial purification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. *Plant Physiol* 72:139-145
- Adams WR, Galston AW (1974) Differential effects of ethylene on pith peroxidase of intact tobacco plants and excised tissue. *Plant Physiol* 53:931-933
- Aharoni N, Lieberman M, Sisler HD (1979) Patterns of ethylene production in senescing leaves. *Plant Physiol* 64:796-800
- Alibert G, Boudet A (1979) La lignification chez le Poplier. I. Mise au point d'une methode de dosage et d'analyse monomerique des lignines. *Physiol Veg* 17:67-74
- Allen RD (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol* 107:1049-1054
- Alscher RG (1989) Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiol Plant* 77: 457-464
- Altman A, Gülsen Y, Goren R (1982) Growth and metabolic activity of lemon juice vesicle explants *in vitro*. *Plant Physiol* 69:1-6
- Amrhein N, Godeke KH, Kefeli VI (1976) The estimation of relative intercellular phenylalanine ammonia-lyase (PAL)-activities and the modulation *in vivo* and *in vitro* by competitive inhibitors. *Ber Deutsch Bot Ges* 89:247-259
- Amrhein N, Wenker D (1979) Novel inhibitors of ethylene production in higher plants. *Plant Cell Physiol* 20:1635-1642
- Anderson JV, Chevone BI, Hess JL (1992) Seasonal variation in the antioxidant system of eastern white pine needles. Evidence for thermal dependence. *Plant Physiol* 98: 501-508
- Apostol I, Heinsteinst PF, Low PS (1989) Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. Role in defense and signal transduction. *Plant Physiol* 90: 109-116

- Arnison PG, Boll WG (1976) The effect of 2,4-D and kinetin on peroxidase activity and isoenzyme pattern in cotyledon cell suspension cultures of bush bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Contender). *Can J Bot* 54:1857-1867
- Arora YK, Bajaj KL (1981) Activities of enzymes of polyphenol metabolism in *Phaseolus aureus* seedlings germinated in the presence of 2-chloroethylphosphonic acid. *Biol Plant* 23:141-144
- Arrigoni A, De Gara L, Tommasi F, Liso R (1992) Changes in the ascorbate system during seed development of *Vicia faba* L. *Plant Physiol* 99: 235-238
- Arteca RN, Bachman JM, Mandava NB (1988) Effects of indole-3-acetic acid and brassinosteroid on ethylene biosynthesis in etiolated mungbean hypocotyl segments. *J Plant Physiol* 133:430-435
- Arteca RN, Tsai D-S, Schlagnhauer C, Mandava NB (1983) The effect of brassinosteroid on auxin-induced ethylene production by etiolated mung bean segments. *Physiol Plant* 59:539-544
- Asada K (1991) Molecular properties of ascorbate peroxidase in chloroplasts. *Biochemical, Molecular, and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. University of Geneva, Switzerland, pp.147-158
- Asada K (1992) Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant* 85: 235-241
- Asada K (1994) Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. pp.77-104
- Asada K, Miyake C, Sano S, Amako K (1993) Scavenging of hydrogen peroxide in photosynthetic organisms - from catalase to ascorbate peroxidase. *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*. University of Copenhagen and University of Geneva, pp. 243-250
- Asada K, Takahashi M (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. *Topics in Photosynthesis*, vol. 9. Elsevier, Amsterdam, pp. 227-288
- Atwell BJ, Drew MC, Jackson MB (1988) The influence of oxygen deficiency on ethylene synthesis 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid levels and aerenchyma formation in roots of *Zea mays*. *Physiol Plant* 72:15-22
- Badiani M, Schenone G, Paolacci AR, Fumagalli I (1993) Daily fluctuations of antioxidants in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves as affected by the presence of ambient air pollutants. *Plant Cell Physiol* 34: 271-279
- Begg JE, Wright MJ (1962) Growth and development of leaves from intercalary meristems in *Phalaris arundinacea* L. *Nature* 194:1097-1098

- Bell E, Mullet JE (1993) Characterization of an *Arabidopsis* lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiol* 103:1133-1137
- Belver A, Roldan M, Rodriguez MP, Donaire JP (1988) Plant senescence in relation to some endogenous factors. *Grasas Aceites* 39:182-194
- BeMiller JM, Colilla W (1972) Mechanism of corn indole-3-acetic acid oxidase *in vitro*. *Phytochemistry* 11:3392-3402
- Beyer EM (1976) A potent inhibitor of ethylene action in plants. *Plant Physiol* 58:268-271
- Bhattacharya RN, Chattopadhyay KK, Basu PS (1986) Auxin activity of 3-hydroxymethyl oxindole and 3-methylene oxindole in oat. *Biol Plant* 28:219-226
- Bleecker AB, Estelle MA, Somerville SC, Kende H (1988) Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 241:1086-1089
- Blowers DP, Trewavas A (1989) Second messengers: their existence and relationship to protein kinases. In: second messengers in plant growth and development. Alan R. Liss, Inc., New York, pp.1-28
- Boller T (1990) Regulation of the biosynthetic pathway of ethylene in response to pathogen stress. *Physiol Plant* 79:A150
- Boller T (1991) Ethylene in pathogenesis and disease resistance. *The Plant Hormone Ethylene*. CRC Press, Boca Raton, pp.293-314
- Boller T, Gehri A, Mauch F, Vogeli U (1983) Chitinase in bean leaves: Induction by ethylene, purification, properties and possible function. *Planta* 157:22-31
- Boller T, Kende H (1970) Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant cells. *Plant Physiol* 63:1123-1132
- Boller T, Kende H (1980) Regulation of wound ethylene synthesis in plants. *Nature* 286:259-260
- Borchert R (1978) Time course and spatial distribution of phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase activity in wounded potato tubers. *Plant Physiol* 62:789-793
- Bosquet JF, Thimann KV (1984) Lipid peroxidation forms ethylene from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and may operate in leaf senescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:1724-1727
- Boudet AM, Lapierre C, Grimapettenati J (1995) Biochemistry and molecular biology of lignification. *New Phytol* 129:203-236

- Bowling AC, Crowden RK (1973) Peroxidase activity and lignification in the pod membrane of *Pisum sativum* L. *Austr J Biol Sci* 26:679-684
- Boyer N, Desbiez M-O, Hofinger M, Gaspar T (1983) Effect of lithium on thigmomorphogenesis in *Bryonia dioica* ethylene production and sensitivity. *Plant Physiol* 72:522-525
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Bradford KJ, Trewavas AJ (1994) Sensitivity thresholds and variable time scales in plant hormone action. *Plant Physiol* 105:1029-1036
- Bredemeijer GMM, Burg HCJ, Sree Ramulu K, Dijkhuis P (1985) Release of peroxidases by cultured potato cells. *Acta Bot Neerl* 34:325-335
- Brennan T, Frenkel C (1977) Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. *Plant Physiol* 59:411-416
- Bressan RA, LeCureux L, Wilson LG, Filner P (1979) Emission of ethylene and ethane by leaf tissue exposed to injurious concentrations of sulfur dioxide or bisulfite ion. *Plant Physiol* 63:924-930
- Bryant SD, Lane FE (1979) Indole-3-acetic acid oxidase from peas. I. Occurrence and distribution of peroxidative and nonperoxidative forms. *Plant Physiol* 63:696-699
- Bunning E (1956) Endogenous rhythms in plants. *Annu Rev Plant Physiol* 7:71-90
- Burg SP, Stolwijk (1959) A highly sensitive katharometer and its application to the measurement of ethylene and other gases of biological importance. *J Biochem Microbiol Technol Engl* 1:245-259
- Burg SP, Thimann KV (1959) The physiology of ethylene formation in apples. *Proc Natl Acad Sci USA* 45:335-344
- Cakmak I, Marschner H (1992) Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiol* 98: 1222-1227
- Cakmak I, Strbac D, Marschner H (1993) Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. *J Exp Bot* 44: 127-132
- Castillo FJ (1992) Peroxidases and stress. *Plant Peroxidases 1980-1990*. University of Geneva, Switzerland, pp. 187-203
- Castillo FJ, Greppin H (1988) Extracellular ascorbic acid and enzyme activities related to ascorbic acid metabolism in *Sedum album* L. leaves after ozone exposure. *Environ Exp Bot* 28: 231-238

- Castillo FJ, Miller PR, Greppin H (1987) Extracellular biochemical markers of photochemical oxidant air pollution damage to Norway spruce. *Experientia* 43: 111-220
- Catala C, Chamarro J (1987) Purificación parcial y propiedades de las isoperoxidasas aniónicas y catiónicas del flavedo de paranas Valencia Late. *Rev Agroquim Tecnol Aliment* 27:509-518
- Catesson AM, Imberty A, Goldberg R, Czaninski Y (1986) Nature, localization and specificity of peroxidases involved in lignification processes. *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. Geneva, pp.189-198
- Chadwick AV, Burg SP (1970) Regulation of root growth by auxin-ethylene interaction. *Plant Physiol* 45:192-200
- Chanda SV, Joshi AK, Krishnan PN, Vaishnav PP, Singh YD (1986) Distribution of indoleacetic acid oxidase, peroxidase, and esterase activities in relation to elongation growth in pearl millet internode. *J Plant Physiol* 122:373-383
- Chang C, Kwok SF, Bleeker AB, Meyerowitz EM (1993) *Arabidopsis* ethylene-response gene ETR1: Similarity of product to two-component regulators. *Science* 262:539-599
- Chkanikov DI, Makoveichuk AY, Mikityuk OD, Artemenko EN (1985) Redistribution of auxin and ethylene in pea seedlings as affected by decapitation. *Fiziol Rast* 32:1014-1016
- Chappet A, Dubouchet J (1972) Activite isoperoxydasique et variations d'elongation. *CR Acad Sci* 274:889-892
- Chappet A, Dubouchet J (1975) Variations de l'activite des isoperoxydases du coleoptile de Ble pendant l'auxesis. *Phys Veget* 13:153-162
- Cheignon M, Schaefferbeke J (1970) Relations entre la composition en isoperoxydases et l'elongation cellulaire. *CR Acad Sci* 270:615-618
- Chen G-X, Asada K (1989) Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two enzymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant Cell Physiol* 30: 987-998
- Chen G-X, Asada K (1992) Inactivation of ascorbate peroxidase by thiols requires hydrogen peroxide. *Plant Cell Physiol* 33:117-123
- Chen G-X, Sano S, Asada K (1992) The amino acid sequence of ascorbate peroxidase from tea has a high degree of homology to that of cytochrome c peroxidase from yeast. *Plant Cell Physiol* 33: 109-116
- Chen Y-M, Lucas PW, Wellburn AR (1991) Relationship between foliar injury and changes in antioxidant levels in red and Norway spruce exposed to acidic mists. *Environ Pollut* 69: 1-15

- Chen Y-M, Tabner BJ, Wellburn AR (1990) ACC-independent ethylene formation in brown Norway spruce needles involves organic peroxides rather than hydroperoxides as possible precursors. *Physiol Mol Plant Pathol* 37:323-337
- Chen Y-M, Wellburn AR (1991) Ethylene release from green spruce needles involves a combination of ACC-dependent and independent pathways. *Plant Growth Reg* 10:153-162
- Chen Z, Silva H, Klessig DF (1993) Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262:1883-1886
- Chin C-K, Frenkel C (1977) Upsurge in respiration and peroxide formation in potato tubers as influenced by ethylene, propylene, and cyanide. *Plant Physiol* 59:515-518
- Church DL, Galston AW (1988) 4-Coumarate: CoA ligase activity in isolated *Zinnia* mesophyll cells differentiating to tracheary elements. *Plant Physiol* 86:573
- Cook EL, van Staden (1988) Manipulating carnation petal senescence. II. The influence of benzyladenine on indoleacetic acid metabolism and ethylene production. *J Plant Physiol* 133:470-474
- Cooper JB, Varner JE (1983) Insolubilization of hydroxyproline-rich cell wall glycoprotein in aerated carrot root slices. *Biochem Biophys Res Commun* 112:161-167
- Cottle W, Kolattukudy PE (1982) Abscisic acid stimulation of suberization: induction of enzymes and deposition of polymeric components and associated waxes in tissue cultures of potato tuber. *Plant Physiol* 70:775-780
- Creelman RA, Bell E, Mullet JE (1992) Involvement of a lipoxygenase-like enzyme in abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiol* 99:1258-1260
- Creelman RA, Mullet JE (1995) Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4114-4119
- Croft KPC, Voisey CR, Slusarenko AJ (1990) Mechanism of hypersensitive cell collapse: correlation of increased lipoxygenase activity with membrane damage in leaves of *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with an avirulent race of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Physiol Mol Plant Pathol* 36:49-62
- Cumming BG, Wagner E (1968) Rhythmic processes in plants. *Annu Rev Plant Physiol* 19:381-416

- Dalton DA, Hanus FJ, Rusell SA, Evans HJ (1987) Purification, properties, and distribution of ascorbate peroxidase in legume root nodules. *Plant Physiol* 83:789-794
- De Gara L, De Tullio M, Paciolla C, Liso R, Arrigoni O (1993) Cytosolic ascorbate peroxidase in angiosperms and the different expressions of its isoforms in maize embryos during germination. *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*, pp.251-255.
- De Gara L, Paciolla C, Liso R, Stefani A, Arrigoni O (1991) Correlation between ascorbate peroxidase activity and some anomalies of seedlings from aged caryopses of *Dasypyrum villosum* (L.) Borb. *J Plant Physiol* 137: 697-700
- de Grot JJ, Veldim GA, Vliegenthart JF, Boldingh J, Wever R, Van Gelden BF (1975) Demonstration by EPR spectroscopy of the functional role of iron in soybean lipoxygenase-1. *Biochim Biophys Acta* 377:71-79
- De Jaegher G, Boyer N (1986) Purification et roles physiologiques des peroxydases de la Bryone. *J Int Groupe Polyphenols* 216-221
- De Jaegher G, Boyer N, Gaspar T (1985) Thigmomorphogenesis in *Bryonia dioica*: Changes in soluble and cell wall peroxidases, phenylalanine ammonia-lyase activity, cellulose, lignin content and monomeric constituents. *Plant Growth Regul* 3:133-148
- De Jong DW (1966) Speculation on the mechanism of ion transport in roots based upon indirect evidence for histochemical studies. *Bot Gaz* 127:17-26
- De Proft MP, Maene LJ, Debergh PC (1985) Carbon dioxide and ethylene evolution in the culture atmosphere of *Magnolia* cultured *in vitro*. *Physiol Plant* 65:375-379
- Dean JFD, Eriksson KEL (1994) Laccase and the deposition of lignin in vascular plants. *Holzforschung* 48:21-33
- Deng M-D, Moreaux T, Leydecker M-T, Caboche M (1990) Nitrate-reductase expression is under the control of a circadian rhythm and is light inducible in *Nicotiana tabacum* leaves. *Planta* 180:257-261
- Desbiez M-O, Boyer N, Gaspar T (1981) Hypocotyl growth and peroxidases of *Bidens pilosus*. Effect of cotyledonary prickings and lithium pretreatment. *Plant Physiol* 68:41-43
- Devlin WS, Gustine DL (1992) Involvement of the oxidative burst in phytoalexin accumulation and the hypersensitive reaction. *Plant Physiol* 100: 1189-1195
- Dhindsa RS, Plumb-Dhindsa P, Thorpe TA (1981) Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J Exp Bot* 33:93-101

- Douillard R (1979) Activite lipoxygenasique foliaire: localisation chloroplastique et variations en fonction de l'age des jeunes plantes. *Physiol Veg* 17:457-476
- Douillard R, Bergeron E (1981) Lipoxygenase activities of young wheat leaves. *Physiol Plant* 51:335-338
- Droillard M-J, Roudet-Mayer M-A, Bureau J-M, Lauriere C (1993) Membrane-associated and soluble lipoxygenase isoforms in tomato pericarp. Characterization and involvement in membrane alterations. *Plant Physiol* 103:1211-1219
- Duncan I, Spencer M (1987) Changes in respiration of mitochondria isolated from cotyledons of ethylene-treated pea seedlings. *Planta* 170:44-48
- Dunford HB (1986) Catalytic mechanisms of plant peroxidases: with emphasis on reactions of compounds I and II. Molecular and physiological aspects of plant peroxidases. University of Geneva, Switzerland, pp.15-23
- Ecker JR, Davis RW (1987) Plant defense genes are regulated by ethylene. *Biochemistry* 84: 5202-5206
- Edreva AM, Georgieva ID, Cholakova NI (1989) Pathogenic and non-pathogenic stress effects on peroxidases in leaves of tobacco. *Environ Exp Bot* 29:365-377
- Edwards EA, Enard C, Creissen GP, Mullineaux PM (1993) Synthesis and properties of glutathione reductase in stressed peas. *Planta* 192:137-141
- Eisinger W, Corner LJ, Taiz L (1983) Ethylene-induced lateral expansion of etiolated pea stems. *Plant Physiol* 73:407-412
- El-Beltagy AS, Kapuya JA, Modkour MA, Hall MA (1976) A possible endogenous rhythm in internal ethylene levels in the leaves of *Lycopersicon esculentum* Mill. *Plant Sci Lett* 6:175-180
- Elstner EF, Konze JR (1976) Effect of point freezing on ethylene and ethane production by sugar beet leaf disks. *Nature* 263:351-352
- Elstner EF, Osswald W (1994) Mechanisms of oxygen activation during plant stress. *Proc Roy Soc Edinburgh Sect B* 102:131-154
- Elstner EF, Osswald W, Youngman RJ (1985) Basic mechanisms of pigment bleaching and loss of structural resistance in spruce (*Picea abies*) needles: advances in phytomedical diagnostics. *Experientia* 41:591-597
- Elstner EF, Wagner GA, Schutz W (1988) Activated oxygen in green plants in relation to stress situations. *Curr Top Plant Biochem Physiol* 7: 159-187
- Endress AG, Suarez SF, Taylor OC (1980) Peroxidase activity in plant leaves exposed to gaseous HCl or ozone. *Environ Pollut* A22:47-58

- Espelie KE, Franchesci VR, Kolattukudy PE (1986) Immunocytochemical localization and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wound-healing potato tuber tissue. *Plant Physiol* 81:487-492
- Espelie KE, Kolattukudy PE (1985) Purification and characterization of an abscisic acid-inducible anionic peroxidase associated with suberization in potato (*Solanum tuberosum*). *Arch Biochem Biophys* 240:539-545
- Eun J-S, Kuraishi S, Sakurai N (1989) Changes in levels of auxin and abscisic acid and evolution of ethylene in squash hypocotyls after treatment with brassinolide. *Plant Cell Physiol* 30:807-810
- Evans JJ (1970) Spectral similarities and kinetic differences of two tomato plant peroxidase isoenzymes. *Plant Physiol* 45:66-69
- Evans JJ (1990) Cell wall bound and soluble peroxidases in normal and dwarf tomato. *J Agric Food Chem* 38:948-951
- Evensen KB (1984) Calcium effects on ethylene and ethane production and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content in potato disks. *Physiol Plant* 60:125-128
- Everdeen DS, Kiefer S, Willard JJ, Muldoon EP, Dey PM, Li XB, Lamport DTA (1988) Enzymic crosslinkage of monomeric extensin precursors in vitro. *Plant Physiol* 87:616-621
- Fleuriet A, Deloire A (1982) Aspects histochimiques et biochimiques de la cicatrisation des fruits de Tomato blesses. *Z Pflanzenphysiol* 107:259-268
- Flott BE, Moerschbacher BM, Reisener HJ (1989) Peroxidase isoenzyme patterns of resistant and susceptible wheat leaves following stem rust infection. *New Phytol* 111:413-421
- Foyer CH, Descourvieres P, Kunert KJ (1994) Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environm* 17:507-523
- Freudenberg K, Reznik H, Boesenberg H, Rasenack D (1952) Das an der Verholzung beteiligte Fermentsystem. *Chem Ber* 85:641-647
- Fridovich I (1986) Biological effects of superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 247:1-11
- Fry SC (1980) Gibberellin-controlled pectinic acid and protein secretion in growing cells. *Phytochemistry* 19:735-740
- Fry SC (1982a) Isodityrosine, a new cross-linking amino acid from plant cell-wall glycoprotein. *Biochem J* 204:449-455

- Fry SC (1982b) Phenolic components of the primary cell wall. Feruloylated disaccharide of D-galactose and L-arabinose from spinach polysaccharide. *Biochem J* 203:493-504
- Fuchs Y, Lieberman M (1968) Effects of kinetin, IAA, and gibberellin on ethylene production, and their interactions in growth of seedlings. *Plant Physiol* 43:2029-2036
- Fuhrer J (1982) Ethylene biosynthesis and cadmium toxicity in leaf tissue of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). 70: 162-167
- Fukuda H, Komamine A (1982) Lignin synthesis and its related enzymes as markers of tracheary-element differentiation in single cells isolated from the mesophyll of *Zinia elegans*. *Planta* 155:423-430
- Fuse T, Iba K, Satih H, Nishimura M (1993) Characterization of a rice mutant having an increased susceptibility to light stress at high temperature. *Physiol Plant* 89:799-804
- Gahagan HE, Holm RE, Abeles FB (1968) Effect of ethylene on peroxidase activity. *Physiol Plant* 21:1270-1279
- Gardiner MG, Cleland R (1974) Peroxidase isoenzymes of the *Avena* coleoptile. *Phytochemistry* 13:1707-1711
- Gaspar T (1986) Integrated relationships of biochemical and physiological peroxidase activities. Molecular and physiological aspects of plant peroxidases. University of Geneva, Switzerland, pp.455-468
- Gaspar T, Kevers C, Penel C, Crevecoeur M, Greppin H (1988) Biochemical characterization of normal and habituated sugarbeet calli. *Potsdamer Forschungen B-57:20-30*
- Gaspar T, Penel C, Castillo FJ, Greppin H (1985) A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. *Physiol Plant* 64:418-423
- Gaspar T, Penel C, Hagege D, Greppin H (1991) Peroxidases in plant growth, differentiation, and development. Biochemical, molecular, and physiological aspects of plant peroxidases. University of Geneva, Switzerland, pp. 249-280
- Gaspar T, Penel C, Thorpe T, Greppin H (1982) Peroxidases 1970-1980. Geneve: Univ. Geneve, 324 p.
- Gaudreault P-R, Tyson H (1988) Elimination of differences in the mobility of flax isoperoxidases on PAGE by digestion with mannosidase. *Plant Physiol* 86:288-292

- Geissman TA, Neukom H (1973) On the composition of the water-soluble wheat flour pentosans and their oxidative gelation. *Lebensm-WissTechnol* 6:59-62
- Gepstein S, Thimann KV (1981) The role of ethylene in the senescence of oat leaves. *Plant Physiol* 68:349-354
- Gianetti A, Cantoni M, Lorenzoni C, Salamini F, Marocco A (1993) Altered levels of antioxidant enzymes associated with two mutations in tomato. *Physiol Plant* 89:157-164
- Gidrol X (1989) Accumulation de peroxyde d'hydrogene et vieillissement accelere des semences de soja. *CR Acad Sci* 308:223-228
- Goeschl JD, Rappaport DL, Pratt HK (1966) Ethylene as a factor regulating the growth of pea epicotyls subjected to physical stress. *Plant Physiol* 41:877-884
- Goldberg R, Catesson A-M, Czaninski Y (1983) Some properties of syringaldazine oxidase, a peroxidase specifically involved in the lignification processes. *Z Pflanzenphysiol* 110:267-279
- Goldberg R, Imberty A, Chu-Ba J (1986) Development of isoperoxidases along the growth gradient in the mung bean hypocotyl. *Phytochemistry* 25:1271-1274
- Goldberg R, Kevers C, Gaspar T (1989) Guaiacol and ascorbate peroxidase compartmentation and gradient along the growing mung bean hypocotyl. *Biochem Physiol Pflanzen* 184:155-161
- Goldberg R, Le T, Catesson A-M (1985) Localization and properties of cell wall enzyme activities related to the final stages of lignin biosynthesis. *J Exp Bot* 36:503-510
- Goliber TE (1989) Gravitational stress and lignification in aerial vs. submerged shoots of *Hippuris vulgaris*. *Physiol Plant* 75:355-361
- Gonzalez A, Rodriguez R, Sanchez Tames R (1993) Rooting in relation to ethylene, peroxidase and polyphenol oxidases in hazelnut shoots. *Physiol Plant* 31:411-420
- Gora L, Clijsters H (1989) Effect of copper and zinc on the ethylene metabolism in *Phaseolus vulgaris* L. *Biochemical and physiological aspects of ethylene production in lower and higher plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp.219-228
- Gossett DR, Millhollon EP, Lucas MC, Banks SW, Marney MM (1994) The effects of NaCl on antioxidant enzyme activities in callus tissue of salt-tolerant and salt-sensitive cotton cultivars (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Rep* 13:498-503

- Grison R, Pilet P-E (1985) Maize root peroxidases: relationship with polyphenol oxidases. *Phytochemistry* 24:2519-2521
- Grison R, Pilet P-E (1985) Properties of syringaldazine oxidase/peroxidase in maize roots. *J Plant Physiol* 118:201-208
- Gross AJ, Sizer IW (1959) The oxidation of tyramine, tyrosine and related compounds by peroxidase. *J Biol Chem* 234:1611-1614
- Gude H, van der Plas HW (1985) Endogenous ethylene formation and the development of the alternative pathway in potato tuber discs. *Physiol Plant* 65:57-62
- Guy M, Kende H (1984) Conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by isolated vacuoles of *Pisum sativum* L. *Planta* 160:281-287
- Hagege D, Kevers C, Boucaud J, Gaspar T (1988) Activites peroxydasiques, production d'ethylene, lignification et limitation de croissance chez *Suaeda maritima* cultivate an l'absence de NaCl. *Plant Physiol Biochem* 26:609-614
- Hagege D, Kevers C, Salabert P, Gaspar T (1991) Protective systems against activated oxygen species compared in normal and fully habituated nonorganogenic sugarbeet calluses. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 28: 143-147
- Halliwell B (1978) Lignin synthesis: the generation of hydrogen peroxides and superoxide by horseradish peroxidase and its stimulation by manganese (II) and phenols. *Planta* 140:81-88
- Hamilton AJ, Lycett GW, Grierson D (1990) Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature* 346:284-286
- Hara T, Yokozawa M (1994) Effects of physiological and environmental variations on size-structure dynamics in plant populations. *Ann Bot* 73:39-51
- Harkin JM, Obst JR (1973) Lignification in trees: indication of exclusive peroxidase participation. *Science* 180:44-46
- Heat RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 125:189-198
- Hernandez JA, Corpas FJ, Gomez M, del Rio LA, Sevilla F (1993) Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. *Physiol Plant* 89:103-110
- Hertel H, Hieke B, Schewe T, Hoffmann P (1987) Lipoxygenase activity in *Triticum aestivum* seedlings during early stages of development. *Biochem Physiol Pflanzen* 182:443-447

- Higuchi T (1957) Biochemical studies of lignin formation. III. *Physiol Plant* 10:633-648
- Hildebrand DF (1989) Lipoxygenases. *Physiol Plant* 76:249-253
- Hirsch A-M, Fortune D (1986) Peroxidases as markers of organogenesis and dioecism in tissue of *Actinidia chinensis* L. planchon cultured in vitro. *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. Geneve, p.361-366
- Hirsch A-M, Fortune D (1984) Peroxidase activity and isoperoxidase composition in cultured stem tissue, callus and cell suspension of *Actinidia chinensis*. *Z Pflanzenphysiol* 113:129-139
- Hofinger M, Gaspar T, Menard D (1980) Effets de l'acide abscisique, de la kinetine, de l'acide indolylacrylique et du methyleneoxindole sur la croissance et la production d'ethylene par des racines de Lentille. *CR Acad Sci* 290:139-142
- Hogsett WE, Raba RM, Tingey DT (1981) Biosynthesis of stress ethylene in soybean seedlings: Similarities to endogenous ethylene biosynthesis. *Physiol Plant* 53:307-314
- Hossain MA, Asada K (1984) Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide: Its protection by ascorbate. *Plant Cell Physiol* 25:1285-1295
- Hoyle MC (1972) Indoleacetic acid oxidase: a dual catalytic enzyme? *Plant Physiol* 50:15-18
- Hoyle MC (1977) High resolution of peroxidase-indoleacetic acid oxidase isoenzymes from the horseradish by isoelectric focusing. *Plant Physiol* 60:787-793
- Hu C, Van Huystee RB (1989) Role of carbohydrate moieties in peanut peroxidases. *Biocem J* 263:129-135
- Huff J (1982) Peroxidase-catalyzed oxidation of chlorophyll by hydrogen peroxide. *Phytochemistry* 21:261-265
- Huxter TJ, Reid DM, Thorpe TA (1979) Ethylene production by tobacco (*Nicotiana tabacum*) callus. *Physiol Plant* 46:374-380
- Huxter TJ, Thorpe TA, Reid DM (1981) Shoot initiation in light- and dark-grown tobacco callus: the role of ethylene. *Physiol Plant* 53:319-326
- Hyodo H, Fujinami H (1989) The effects of 2,5-norbornadiene on the induction of the activity of phenylalanine ammonia-lyase in wounded mesocarp tissue of *Cucurbita maxima*. *Plant Cell Physiol* 30:857-860

- Ievinsh G, Iljin V, Kreicbergs O, Romanovskaya O (1990) Effect of ethephon on the activity of the ethylene-forming enzyme and the biosynthesis of ethylene in winter rye seedlings. *Biochem Physiol Pflanzen* 186:221-228
- Ievinsh G, Romanovskaya O (1991) Accelerated lignification as a possible mechanism of growth inhibition in winter rye seedlings caused by ethephon and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Plant Physiol Biochem* 29:327-331
- Ievinsh G (1992) Characterization of the peroxidase system in winter rye seedlings: compartmentation and dependence on leaf development and hydrogen donors used. *J Plant Physiol* 140:257-263
- Ievinsh G (1992) Soluble lipoxygenase activity in rye seedlings as related to endogenous and exogenous ethylene and wounding. *Plant Sci* 82:155-159
- Ievinsh G, Kreicbergs O (1992) Endogenous rhythmicity of ethylene production in growing intact cereal seedlings. *Plant Physiol* 100:1389-1391
- Ievinsh G, Iljin V, Kreicbergs O (1993) Coleoptile removal-induced ethylene production in winter rye seedlings. *Biol Plant* 35:229-236
- Ievinsh G, Tillberg E (1994) Does inhibitor studies can be used to distinguish between the different pathways of ethylene biosynthesis? *Plant Physiol* 105:S143
- Ievinsh G, Tillberg E (1995) Stress-induced ethylene biosynthesis in pine needles: a search for the putative 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid-independent pathway. *J Plant Physiol* 145:308-314
- Ievinsh G, Valcina A, Ozola D (1995) Induction of ascorbate peroxidase activity in stressed pine (*Pinus sylvestris* L.) needles: a putative role for ethylene. *Plant Sci* 112:167-173
- Imaseki H, Uritani I, Stahmann MA (1968) Production of ethylene by injured sweet potato tissue. *Plant Cell Physiol* 9:757-768
- Imberty A, Goldberg R, Catesson A-M (1985) Isolation and characterization of *Populus* isoperoxidases involved in the last step of lignin formation. *Planta* 164:221-226
- Inze D, Van Montagu M (1995) Oxidative stress in plants. *Curr Opin Biotechnol* 6:153-158
- Irigoyen JJ, Emerich DW, Sanchez-Diaz M (1992) Alfalfa leaf senescence induced by draught stress: photosynthesis, hydrogen peroxide metabolism, lipid peroxidation and ethylene evolution. *Physiol Plant* 84:67-72
- Ishige F, Mori H, Yamazaki K., Imaseki H (1993) Identification of a basic glycoprotein induced by ethylene in primary leaves of azuki bean as a cationic peroxidase. *Plant Physiol* 101:193-199

- Ito H, Kimizuka F, Ohbayashi A, Matsui H, Honma M, Shinmyo A, Ohashi Y, Caplan AB, Rodriguez RL (1994) Molecular cloning and characterization of two complimentary DNAs encoding putative peroxidases from rice (*Oryza sativa* L.) shoots. *Plant Cell Rep* 13:361-366
- Jaeger-Wenderer M (1980) Aktivitäten der Peroxidasen, Polyphenoloxidasen und IES-oxidasen während der differenzierung der Zellen von *Riella heliophylla* (Bory et Mont.) Mont. *Z Pflanzenphysiol* 98:189-201
- John P (1991) How plant molecular biologists revealed a surprising relationship between two enzymes, which took an enzyme out of a membrane where it was not located, and put it into the soluble phase where it could be studied. *Plant Mol Biol Rep* 9:192-194
- Johnson DB, Moore WE, Zank LC (1961) The spectrophotometric determination of lignin in small wood samples. *TAPPI* 44:793-798
- Johnson-Flanagan EM, Owens JN (1985) Peroxidase activity in relation to suberization and respiration in white spruce [*Picea glauca* (Moensh) Voss] seedling roots. *Plant Physiol* 79:103-107
- Jupe SC, Scott IM (1989) The slender phenotype of pea: stem growth, peroxidase levels and ethylene responses. *Physiol Plant* 77:59-66
- Kacperska A, Kubacka-Zebalska M (1989) Formation of stress ethylene depends both on ACC synthesis and on the activity of free radical-generating system. *Physiol Plant* 77:231-237
- Kahlem G (1976) Isolation and localization by histoimmunology of isoperoxidasen specific for male flowers of the dioecious species *Mercurialis annua*. *Developm Biol* 50:58-67
- Kato M, Shimizu S (1987) Chlorophyll metabolism in higher plants. VI. Involvement of peroxidase in chlorophyll degradation. *Plant Cell Physiol* 26:1291-1301
- Kay LE, Basile DV (1987) Specific peroxidase isoenzymes are correlated with organogenesis. *Plant Physiol* 84:99-105
- Ke D, Saltveit ME (1988) Plant hormone interaction and phenolic metabolism in the regulation of russet spotting in iceberg lettuce. *Plant Physiol* 88:1136-1140
- Kemp DR (1980) The location and size of the extension zone of emerging wheat leaves. *New Phytol* 84:729-737
- Kende H (1993) Ethylene biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 44:283-307

- Ketsa S, Herner RC (1989) A negative feedback of wound ethylene production by fruit pericarp tissue of rin mutant tomato. *Thai J Agric Sci* 22:223-232
- Kevers C, Boyer N, Couduroux J-C, Gaspar T (1992) The influence of ethylene on proliferation and growth of rose shoot cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 28:175-181
- Kevers C, Goldberg R, van den Driessche T, Gaspar T (1991) A relationship between ascorbate peroxidase activity and the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid into ethylene. *J Plant Physiol* 139: 379-381
- Kevers C, van den Driessche T, Gaspar T (1989) Relationship between ethylene and ethane production by whole *Acetabularia mediterranea* cells and by microsomal fractions. *Saussurea* 19:121-123
- Kieber JJ, Ecker JR (1993) Ethylene gas: It's not just for ripening any more! *Trends Genet* 9:356-362
- Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldman KA, Ecker JR (1993) *CTR1*, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis* encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Biochem Sci* 58:474-480
- Kiefer S, Penel C (1985) Ca^{2+} and Mn^{2+} mediated binding of the glycoprotein peroxidase to membranes of *Pharbitis cotyledons*. *Plant Sci* 39:37-41
- Kiefer S, Penel C, Greppin H, Wagner E (1987) Association de peroxydases aux membranes de courgettes de raifort et de *Pharbitis nil*. *Arch Sci* 40:369-378
- Kim SS, Wender SH, Smith EC (1980) Isolation and characterization of two isoperoxidases from tobacco tissue cultures. *Phytochemistry* 19:165-168
- Kim WT, Yang SF (1992) Turnover of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase protein in wounded tomato fruit tissue. *Plant Physiol* 100:1126-1131
- Kimmerer TW, Kozlowski TT (1982) Ethylene, ethane, acetaldehyde, and ethanol production by plants under stress. *Plant Physiol* 69:840-847
- Klapheck S, Zimmer I, Cosse H (1990) Scavenging of hydrogen peroxide in the endosperm of *Ricinus communis* by ascorbate peroxidase. *Plant Cell Physiol* 31:1005-1032
- Klisurska D, Dencheva A (1983) Peroxidase and IAA-oxidase in crude and partially purified enzyme extracts of growing and differentiating root cells. *Biol Plant* 25:110-116
- Kloppstech K (1985) Diurnal and circadian rhythmicity in the expression of light-induced plant nuclear messenger RNAs. *Planta* 165:958-979

- Knypl JS (1973) No effect of plant growth retarding compounds and growth stimulators on indolo-3-acetic acid oxidase activity in greening cucumber cotyledons. *Acta Soc Bot Pol* 42:441-451
- Koch E, Meier BM, Eiben HG, Slusarenko A (1992) A lipoxygenase from leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) is induced in response to plant pathogenic Pseudomonads. *Plant Physiol* 99:571-576
- Konze JR, Elstner EF (1978) Ethane and ethylene formation by mitochondria as indication of aerobic lipid degradation in response to wounding of plant tissue. *Biochem Biophys Acta* 528:213-221
- Konze JR, Kende H (1979) Ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in homogenates of etiolated pea seedlings. *Planta* 146:293-301
- Konze JR, Kwiatkowski GMK (1981) Enzymatic ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid by manganese, a protein fraction and a cofactor of etiolated pea shoots. *Planta* 151:320-326
- Konze JR, Kwiatkowski GMK (1981) Rapidly induced ethylene formation after wounding is controlled by the regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthesis. *Planta* 151:327-330
- Kossatz VC, van Huystee RB (1976) The specific activities of peroxidase and aminolevulinic acid dehydratase during the growth cycle of peanut suspension culture. *Can J Bot* 54:2089-2094
- Ku HS, Yang SF, Pratt HK (1967) Enzymic evolution of ethylene from methional by a pea seedling extract. *Arch Biochem Biophys* 118:756-758
- Ku HS, Yang SF, Pratt HK (1970) Ethylene production and peroxidase activity during tomato fruit ripening. *Plant Cell Physiol* 11:241-246
- Kubacka-Zebalska M, Kacperska-Palacz A (1980) Lipoxygenase, an enzyme involved in plant growth? *Physiol Veg* 18:339-347
- Kubo A, Saji H, Tanaka K, Kondo K (1992) Cloning and sequencing of a cDNA encoding ascorbate peroxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 18:691-701
- Kumar GNM, Knowles NR (1993) Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radical scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum*) seed-tubers. *Plant Physiol* 102:115-124
- Lagrimini LM, Rothstein S (1987) Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* 84:438-442

- Lampart DTA, Epstein L (1983) A new model for the primary cell wall: a concatenated extensine-cellulose network. *Curr Top Plant Biochem Physiol* 73-83
- Lauriere C (1983) Enzymes and leaf senescence. *Physiol Veg* 21:1159-1177
- Lawton KA, Potter SL, Uknes S, Ryals J (1994) Acquired resistance signal transduction in *Arabidopsis* is ethylene independent. *Plant Cell* 6:581-588
- Lee TT (1982) regulation of enzymic oxidation of indole-3-acetic acid by phenols: structure-activity relationships. *Phytochemistry* 21:517-523
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79:583-593
- Liang X, Abel S, Keller JA, Shen NF, Theologis A (1992) The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11046-11050
- Liu Y, Hoffman NE, Yang SF (1985) Ethylene-promoted malonylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid participates in autoinhibition of ethylene synthesis in grapefruit flavedo discs. *Planta* 164:565-568
- Liptay A, Davidson D (1971) Coleoptile growth: variation in elongation patterns of individual coleoptiles. *Ann Bot* 35:991-1002
- Lizada MCC, Yang SF (1979) A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Anal Biochem* 100:140-145
- Lynch DV, Sridhara S, Thompson JE (1985) Lipoxygenase-generated hydroperoxides account for the nonphysiological features of ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid by microsomal membranes of carnations. *Planta* 164:121-125
- MacAdam J, Nelson CJ (1989) Quantitation of peroxidase activity during grass leaf development. *Plant Physiol* 89:103
- Machackova I, Zmrhal Z (1976) Comparison of the effect of some phenolic compounds on wheat coleoptile section growth with their effect on IAA-oxidase activity. *Biol Plant* 18:147-151
- Machackova I, Zmrhal Z (1981) Is peroxidase involved in ethylene biosynthesis? *Physiol Plant* 53:479-482
- Macnicol PK (1966) Peroxidases of the Alaska pea (*Pisum sativum* L.). Enzymic properties and distribution within the plant. *Arch Biochem Biophys* 117:347-356
- Mäder M (1992) Compartmentation of peroxidase isoenzymes in plant cells. *Plant Peroxidases 1980-1990*. Geneva, pp.37-46

- Mäder M, Amberg-Fisher V (1982) Role of peroxidase in lignification of tobacco cells. I. Oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide and formation of hydrogen peroxide by cell wall peroxidases. *Plant Physiol* 70:1128-1131
- Mäder M, Nessel A, Schloss P (1986) Cell compartmentation and specific roles of isoenzymes. *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. Geneva, pp.247-260
- Margoliash E, Novgorodsky A, Schejter A (1960) Irreversible reaction of 3-amino-1,2,4-triazole and related inhibitors with the protein of catalase. *Biochem J* 73:339-350
- Marigo G, Boudet AM (1980) Relations polyphenols-croissance: Lignification et limitation de croissance chez *Lycopersicon esculentum*. *Physiol Plant* 49:425-430
- Martin MN, Cohen JD, Saftner RA (1995) A new 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid-conjugating activity in tomato fruit. *Plant Physiol* 109:917-926
- Martin MN, Saftner RA (1995) Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid N-malonyltransferase from tomato fruit. *Plant Physiol* 108:1241-1249
- Martins-Loucao MA, Rodriguez-Barrueco C (1983) Ethylene production by carob (*Ceratonia siliqua*) callus cultures on varying media. *Physiol Plant* 58:204-208
- Masuda H, Fukuda H, Komamine A (1983) Changes in peroxidase isoenzyme patterns during tracheary element differentiation in a culture of single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Z Pflanzenphysiol* 112:417-426
- Matile P (1980) Calabolism of chlorophyll: involvement of peroxidase? *Z Pflanzenphysiol* 99:475-478
- Mattoo AK, Lieberman M (1982) Role of silver ions in controlling senescence and conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. *Plant Physiol* 69:18
- Mattoo AK, Baker JE, Moline HE (1986) Induction by copper ions of ethylene production in *Spirodela oligorrhiza*: evidence for a pathway independent of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *J Plant Physiol* 123:193-202
- Mattoo AK, Mehta RA, Baker JE (1992) Copper-induced ethylene biosynthesis in terrestrial (*Nicotiana tabacum*) and aquatic (*Spirodela oligorrhiza*) higher plants. *Phytochemistry* 31:405-409

- Mauch F, Hadwiger LA, Boller T (1984) Ethylene: symptom, not signal for the induction of chitinase and β -1,3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitors. *Plant Physiol* 76:607-611
- Maunder MJ, Holdsworth MJ, Slater A, Knapp JE, Bird CR, Schuch W, Grierson D (1987) Ethylene stimulates the accumulation of ripening-related mRNAs in tomatoes. *Plant Cell Env* 10:177-184
- Mayne RG, Kende H (1986) Ethylene biosynthesis in isolated vacuoles of *Vicia faba* L. – requirement for membrane integrity. *Planta* 167:159-165
- Mazza G, Ricard J, Bouchet M (1970) Potentiels de demi-reduction et activite "auxine-oxidasique" de peroxydases de Navet (*Brassica napus* L.). *CR Acad Sci* 270:2492-2494
- McDougall GJ (1992) Plant peroxidases and cell differentiation. *Plant Peroxidases 1980-1990*. Geneva, pp.101-115
- Mehlhorn H (1990) Ethylene-promoted ascorbate peroxidase activity protects plants against hydrogen peroxide, ozone and paraquat. *Plant Cell Environ* 13: 971-976
- Mehlhorn H, Kunert KJ (1986) Ascorbic acid, phenolic compounds, and plant peroxidases: a natural defence system against peroxidative stress in higher plants? In: *Molecular and physiological aspects of plant peroxidases*, pp.437-440. University of Geneva, S
- Mehlhorn H, Seufert G, Schmidt A, Kunert KJ (1986) Effect of SO₂ and O₃ on production of antioxidants in conifers. *Plant Physiol* 82:336-338
- Mehlhorn H, Wellburn AR (1987) Stress ethylene formation determines plant sensitivity to ozone. *Nature* 324:417-418
- Messner B, Boll M (1994) Extracellular peroxidases of suspension culture cells of spruce (*Picea abies*). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 39:69-78
- Metraux J-P, Kende H (1984) The cellular basis of the elongation response in submerged deep-water rice. *Planta* 160:73-77
- Meyer A, Muller P, Sembdner G (1987) Air pollution and plant hormones. *Biochem Physiol Pflanz* 182: 1-21
- Michiyama H, Saka H (1988) Endogenous ethylene levels in leaf sheath and panicle of rice plant. *Japan J Crop Sci* 57:366-370
- Miidla H, Padu E, Kolk Ū, Sossaar A (1987) Biochemical changes in primary wheat leaves during growth and senescence. *Biol Plant* 29:445-452
- Miller AR, Crawford DL, Roberts LW (1985) Lignification and xylogenesis in *Lactuca* pith explants cultured in vitro in the presence of auxin and cytokinin: a role for endogenous ethylene. *J Exp Bot* 36:110-118

- Mills AK, Crowden RK (1968) Distribution of soluble proteins and enzymes during early development of *Pisum sativum*. *Austr J Biol Sci* 21:1131-1141
- Minocha SC, Halperin W (1976) Enzymatic changes and lignification in relation to tracheid differentiation in cultured tuber tissue of jerusalem artichone (*Helianthus tuberosus*). *Can J Bot* 54:79-89
- Mitchell T, Porter AJR, John P (1988) Autentic activity of the ethylene-forming enzyme observed in membranes obtained from kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *New Phytol* 109:313-319
- Mittler R, Pitcher LH, Zilinskas BA (1993) Molecular biology of pea cytosolic ascorbate peroxidase and its response to oxidative stress. *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*. University of Copenhagen and university of Geneva, pp.263-270
- Mittler R, Tel-Or E (1991) Oxidative stress response and shock proteins in the unicellular *Cyanobacterium synechococcus* R2 (PCC-7942). *Arch Microbiol* 155:125-130
- Mittler R, Zilinskas BA (1991a) Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiol* 97: 962-968
- Mittler R, Zilinskas BA (1991b) Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. *FEBS Lett* 289:257-259
- Mittler R, Zilinskas BA (1992) Molecular cloning and characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. *J Biol Chem* 267:21802-21807
- Mittler R, Zilinskas BA (1994) Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *Plant J* 5:397-405
- Miyake C, Asada K (1992) Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant Cell Physiol* 33:541-553
- Miyake C, Cao W-H, Asada K (1993) Purification and properties of the thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 34:881-889
- Moerschbacher BM (1992) Plant peroxidases: involvement in response to pathogens. *Plant Peroxidases 190-1990*. Geneva, pp.91-99
- Moerschbacher BM, Flott BE, Noll U, Reisener H-J (1989) On the specificity of an elicitor preparation from stem rust which induces lignification in wheat leaves. *Plant Physiol Biochem* 27:305-314

- Moerschbacher BM, Nole U, Gorrichon L, Reisener H-J (1990) Specific inhibition of lignification breaks hypersensitive resistance of wheat to stem rust. *Plant Physiol* 93:465-470
- Montillet J-C, Degousee N (1991) Hydroperoxides induce glyceollin accumulation in soybean. *Plant Physiol Biochem* 29:689-694
- Morgan PW, Fowler JL (1972) Ethylene: modification of peroxidase activity and isozyme complement in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Physiol* 13:727-736
- Morgan PW, He CJ, De Greef JA, De Proft MP (1990) Does water deficit stress promote ethylene synthesis by intact plants? *Plant Physiol* 94:1616-1624
- Morgens PH, Callahan AM, Dunn LJ and Abeles FB (1990) Isolation and sequencing of cDNA clones encoding ethylene-induced putative peroxidases from cucumber cotyledons. *Plant Molec Biol* 14: 715-725
- Mosejev VV, Romanovskaya OI, Iljin VV, Kreitsbergs O (1990) Effect of ethephon on cell proliferation and cell expansion in winter rye seedlings. *J Plant Physiol* 136:740-745
- Nakajima N, Mori H, Yamazaki K, Imaseki H (1990) Molecular cloning and sequence of a complementary DNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase induced by tissue wounding. *Plant Cell Physiol* 31:1021-1029
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22: 867-880
- Nakano Y, Asada K (1987) Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation on ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiol* 28: 131-140
- Nanaiah GK, Anderson JA (1991) Electrolyte leakage and evolution of ethylene and ethane from pepper leaf disks following temperature stress and fatty acid infiltration. *J Amer Soc Hort Sci* 117:846-851
- Nee M, Chiu L, Eisinger W (1978) Induction of swelling in pea internode tissue by ethylene. *Plant Physiol* 62:902-906
- Nose M, Bernards MA, Furlan M, Zajicek J, Eberhardt TL, Lewis NG (1995) Towards the specification of consecutive steps in macromolecular lignin assembly. *Phytochemistry* 39:71079
- Ogawa S, Shiro Y, Marishima I (1979) Calcium binding by horseradish peroxidase c and the heme environmental structure. *Biochem Biophys Res Commun* 90:674-678

- Ogier G, Greppin H, Castillo FJ (1991) Ascorbate and guaiacol peroxidase capacities from apoplastic and cell material extracts of Norway spruce needles after long-term ozone exposure. *Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*, pp.391-400
- Ohme-Takagi M, Shinshi H (1995) Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell* 7:173-182
- Ohta H, Shida K, Peng Y-L, Furusawa I, Shishiyama J, Aibara S, Morita Y (1990) The occurrence of lipid hydroperoxide-decomposing activities in rice and the relationship of such activities to the formation of antifungal substances. *Plant Cell Physiol* 31:1117-1122
- Okuda T, Matsuda Y, Sagisaka S (1994) Formation of hydroxyl radicals in the stems of winter wheat treated with freezing temperature. *Biosci Biotechnol Biochem* 58:1189-1190
- Olson PD, Varner JE (1993) Hydrogen peroxide and lignification. *Plant J* 4:887-892
- Osswald WF, Schütz W, Elstner EF (1989) Indole-3-acetic acid and p-hydroxyacetophenone driven ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid catalysed by horseradish peroxidase. *J Plant Physiol* 134:510-513
- Osswald WF, Kraus R, Hippeli S, Benz B, Volpert R, Elstner EF (1992) Comparison of the enzymatic activities of dehydroascorbic acid reductase, glutathione reductase, catalase, peroxidase and superoxide dismutase of healthy and damaged spruce needles (*Picea abies* (L.) Karst.). *J Plant Physiol* 139:742-748
- Owens LD, Lieberman L, Kunishi A (1971) Inhibition of ethylene production by rhizobitoxin. *Plant Physiol* 48:1-4
- Pandolfini T, Gabrielli R, Comparini C (1992) Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. *Plant Cell Env* 15:719-725
- Paradies I, Konze JR, Elstner EF, Paxton J (1980) Ethylene: indicator but not inducer of phytoalexin synthesis in soybean. *Plant Physiol* 66:1106-1109
- Parish RW (1969) Studies on wheat peroxidase. *Aust J Biol Sci* 22:261-266
- Parups EV (1984) Free radical and free radical scavenger effects on indole-3-acetic acid levels and ethylene production. *Physiol Plant* 60:149-153
- Pastori GM, Trippi VS (1993) Antioxidative protection in a drought-resistant maize strain during leaf senescence. *Physiol Plant* 87:227-231
- Peiser GD, Yang SF (1979) Ethylene and ethane production from sulfur dioxide-injured plants. *Plant Physiol* 63:142-145

- Penel C, Darimont E, Greppin H, Gaspar T (1979) Role du calcium dans l'association de peroxydases a des membranes de racines de Lentille. CR Acad Sci 289:529-532
- Perrey R, Hauser MT, Wink M (1989) Cellular and subcellular localization of peroxidase isoenzymes in plants and cell suspension cultures from *Lupinus polyphyllus*. Z Naturforsch 44c:931-936
- Pfanz H, Oppmann B (1991) The possible role of apoplastic peroxidases in detoxifying the air pollutant sulfur dioxide. Biochemical, Molecular, and Physiological Aspects of Plant Peroxidases. Geneva, pp.401-417
- Philosoph-Hadas S, Aharoni N, Yang SF (1986) Carbon dioxide enhances the development of the ethylene forming enzyme in tobacco leaf discs. Plant Physiol 82:925-929
- Philosoph-Hadas S, Meir S, Aharoni N (1985) Autoinhibition of ethylene production in tobacco leaf discs: enhancement of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid conjugation. Physiol Plant 63:431-437
- Philosoph-Hadas S, Meir S, Aharoni N (1994) Role of ethylene in senescence of watercress leaves. Physiol Plant 90:553-559
- Pilet PE, Lavanchy P, Sevhonkian S (1970) Interactions between peroxidases, polyphenoloxidases and auxin-oxidases. Physiol Plant 23:800-804
- Pitcher LH, Brennan E, Hurley A, Dunsmuir P, Tepperman JM, Zilinskas BA (1991) Overproduction of petunia chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase does not confer ozone tolerance in transgenic tobacco. Plant Physiol 97:452-455
- Polle A, Chakrabarti K, Chakrabarti S, Seifert F, Schramel P, Rennenberg H (1992) Antioxidants and manganese deficiency in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.) trees. Plant Physiol 99:1084-1089
- Polle A, Chakrabarti K, Schurmann W, Rennenberg H (1990) Composition and properties of hydrogen peroxide decomposing systems in extracellular and total extracts from needles of Norway spruce (*Picea abies* L., Karst.). Plant Physiol 94:312-319
- Porat R, Halvy AH, Serek M, Borochoy A (1995) An increase in ethylene sensitivity following pollination is the initial event triggering an increase in ethylene production and enhanced senescence of *Phalaenopsis* orchid flowers. Physiol Plant 93:778-784
- Porter AJR, Borlakoglu FT, John P (1986) Activity of the ethylene-forming enzyme in relation to plant cell structure and organization. J Plant Physiol 125:207-216

- Prasad TK, Anderson MD, Stewart CR (1994) Acclimation, hydrogen peroxide, and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings. *Plant Physiol* 105:619-627
- Prasad TK, Cline MG (1986) The control of apical dominance: localization of the growth region of the *Pharbitis nil* shoot. *J Plant Physiol* 125:185-190
- Prasad TK, Cline MG (1987) Shoot inversion inhibition of stem elongation in *Pharbitis nil*. A possible role for ethylene-induced glycoprotein and lignin. *Plant Physiol* 85:104-108
- Puntarulo S, Sanchez RA, Boveris A (1988) Hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset of germination. *Plant Physiol* 86:626-630
- Rabinowitch HD, Fridovich I (1983) Superoxide radicals, superoxide dismutases and oxygen toxicity in plants. *Photochem Photobiol* 37:679-690
- Rando RR (1974) Chemistry and enzymology of kcat inhibitors. *Science* 185:320-324
- Rasmussen GK, Jones JW (1969) Evolving ethylene from calamondin fruits and seedlings treated with ascorbic acid. *HortScience* 4:60-61
- Rathmell WG, Sequeira L (1974) Soluble peroxidase in fluid from the intercellular spaces of tobacco leaves. *Plant Physiol* 53:317-318
- Raz V, Fluhr R (1993) Ethylene signal is transduced via protein phosphorylation events in plants. *Plant Cell* 5:523-530
- Reinecke DM, Bandurski RS (1988) Oxidation of indole-3-acetic acid to oxindole-3-acetic acid by an enzyme preparation from *Zea mays*. *Plant Physiol* 86:868-872
- Ride JP (1975) Lignification in wounded wheat leaves in response to fungi and its possible role in resistance. *Physiol Plant Pathol* 5:125-134
- Ridge I (1973) The control of cell shape and rate of cell expansion by ethylene: Effects on microfibril orientation and cell wall extensibility in etiolated peas. *Acta Bot Neerl* 22:144-158
- Ridge I (1987) Ethylene and growth control in amphibious plants. *Brit Ecol Soc* 5:53-76
- Ridge I, Osborne D (1970) Regulation of peroxidase activity by ethylene in *Pisum sativum*. Requirements for protein and RNA synthesis. *J Exp Bot* 21:720-734
- Ridge I, Osborne DI (1970) Hydroxyproline and peroxidases in cell walls of *Pisum sativum*: regulation by ethylene. *J Exp Bot* 21:843-856

- Righetti B, Magnanini E, Infante R, Predieri S (1990) Ethylene, ethanol, acetaldehyde and carbon dioxide released by *Prunus avium* shoot cultures. *Physiol Plant* 78:507-510
- Rikin A, Chalutz E, Anderson JD (1984) Rhythmicity in ethylene production in cotton seedlings. *Plant Physiol* 75:493-495
- Riov J, Yang SF (1982) Autoinhibition of ethylene production in citrus peel discs. Suppression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthesis. *Plant Physiol* 69:687-690
- Rittinger PA, Biggs AR, Peirson DR (1987) Histochemistry of lignin and suberin deposition in boundary layers formed after wounding in various plant species and organs. *Can J Bot* 65:1886-1892
- Robbins JA, Reid MS, Paul JL, Rost TL (1985) The effect of ethylene on adventitious root formation in mung bean (*Vigna radiata*) cuttings. *J Plant Growth Regul* 4:147-157
- Roberts JA, Osborne DJ (1981) Auxin and the control of ethylene production during the development and senescence of leaves and fruits. *J Exp Bot* 32:875-887
- Roby D, Toppan A, Esquerre-Tugaye MT (1985) Cell surfaces in plant microorganism interactions. V. Elicitors of fungal and oi plant origin trigger the synthesis of ethylene and of cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein in plants. *Plant Physiol* 77:700-7
- Rohwer J, Mäder M (1981) The role of peroxidase in ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Z Pflanzenphysiol* 104:363-372
- Ros Barcelo A, Munoz R, Sabater F (1987) Lupin peroxidases. I. Isolation and characterization of cell-wall bound isoperoxidase activity. *Physiol Plant* 71:448-454
- Ros Barcelo A, Pedreno MA, Munoz R, Sabater F (1988) Lupin peroxidases. II. Binding of acidic isoperoxidases to cell walls. *Physiol Plant* 73:238-244
- Ros Barcelo A, Pedreno MA, Munoz R, Sabater F (1989) Physiological significance of the binding of acidic isoperoxidases to cell walls of lupin. *Physiol Plant* 75:267-274
- Rubery PH, Fosket DE (1969) Changes in phenylalanine ammonia-lyase activity during xylem differentiation in *Coleus* and soybean. *Planta* 87:54-62
- Salin ML (1987) Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiol Plant* 72:681-689
- Saltveit ME, Dilley DR (1978) Rapidly induced wound ethylene from excised segments of etiolated *Pisum sativum* L., cv. Alaska. I. Characterization of the response. *Plant Physiol* 61:447-450

- Saltveit ME, Diley DR (1979) Studies of rapidly induced wound ethylene synthesis by excised sections of etiolated *Pisum sativum* L. cv. Alaska. IV. Requirement of a water-soluble, heat-stable factor. *Plant Physiol* 64:417-420
- Saltveit ME, Larson RA (1983) Effect of mechanical stress and inhibitors of protein synthesis on leaf epinasty in mechanically stressed poinsettia plants. *J Amer Soc Hort sci* 108:253-257
- Sandmann G, Boger P (1980) Copper-mediated lipid peroxidation processes in photosynthetic membranes. *Plant Physiol* 66: 797-800
- Satler SO, Kende H (1985) Ethylene and the growth of rice seedlings. *Plant Physiol* 79:194-198
- Sauerbrey E, Grossmann K, Jung J (1988) Ethylene production by sunflower cell suspensions. Effects of plant growth retardants. *Plant Physiol* 87:510-513
- Sawamura M, Miyazaki T (1989) Effects of exogenous ethylene on ethylene production in discs of mume fruits. *J Hort Sci* 64:633-638
- Schierle J, Rohwer F, Bopp M (1989) Distribution of ethylene synthesis along the etiolated pea shoot and its regulation by ethylene. *J Plant Physiol* 134:331-337
- Schierle J, Schwark A (1988) Assymmetric synthesis and concentrations of ethylene in the hypocotyl hook of *Phaseolus vulgaris*. *J Plant Physiol* 133:325-331
- Schloss P, Walter C, Mader M (1987) Basic peroxidases in isolated vacuoles of *Nicotiana tabacum* L. *Planta* 170:225-229
- Schoner S, Krause H (1990) Protective systems against active oxygen species in spinach: response to cold acclimation in excess light. *Planta* 180:383-389
- Sekiya J, Schmidt A, Wilson GL, Filner P (1982) Emission of hydrogen sulfide by leaf tissue in response to L-cysteine. *Plant Physiol* 70:430-436
- Sekizawa Y, Haga M, Hirabayashi E, Takeuchi N, Takino Y (1987) Dynamic behavior of superoxide generation in rice leaf tissue infected with blast fungus and its regulation by some substances. *Agric Biol Chem* 51: 763-770
- Sekizawa Y, Haga M, Iwata M, Hamamoto A, Chihara C, Takino Y (1985) Probenazole and burst of respiration in rice leaf tissue infected with blast fungus. *J Pesticide Sci* 10: 225-231
- Sekizawa Y, Haruyama T, Kano H, Urushizaki S, Saka H, Matsumoto K, Haga M (1990) Dependence on ethylene of the induction of peroxidase and lipoxygenase activity in rice leaf infected with blast fungus. *Agric Biol Chem* 54: 471-478

- Sembdner G, Parhier B (1993) The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 44:569-589
- Sen Gupta A, Heinen JL, Holaday AS, Burke JJ, Allen RD (1993a) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1629-1633
- Sen Gupta A, Webb RP, Holaday AS, Allen RD (1993b) Overexpressing of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. Induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase-overexpressing plants. *Plant Physiol* 103:1067-1073
- Sequeira L, Mineo L (1966) Partial purification and kinetics of indoleacetic acid oxidase from tobacco roots. *Plant Physiol* 41:1200-1208
- Sergeeva LI, Podolnyi VZ, Pole P, Aksenova NP, Chailakhyan MC (1984) Change of peroxidase and polyphenoloxidase activities as related to plants transition to flowering. *Dokl Akad Nauk SSSR* 274:504-508
- Shimokawa K (1983) An ethylene-forming enzyme in *Citrus unshiu* fruits. *Phytochemistry* 22:1903-1908
- Shingo S, Imaseki H (1971) Auxin-induced ethylene production by mungbean hypocotyl segments. *Plant Cell Physiol* 12:349-359
- Shinshi H, Noguchi M (1975) Relationships between peroxidase, IAA-oxidase and polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 14:1255-1258
- Siedow JN (1991) Plant lipoxygenase: structure and function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42:145-188
- Siefert F, Langebartels C, Boller T, Grossmann K (1994) Are ethylene and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid involved in the induction of chitinase and -1,3-glucanase activity in sunflower cell-suspension cultures? *Planta* 192:431-440
- Sijmons PC (1986) Cellular localization and organ specificity of the suberin-associated isoperoxidase. *Physiological and Molecular Aspects of Plant Peroxidases*. Geneve, p.221-229
- Sijmons PC, Kolattukudy PE, Bienfait HF (1985) Iron deficiency decreases suberization in bean roots through a decrease in suberin-specific peroxidase activity. *Plant Physiol* 78:115-120
- Sisler EC, Wood C (1988) Competition of unsaturated compounds with ethylene for binding and action in plants. *Plant Growth Regul* 7:181-191

- Sitrit Y, Riov J, Blumenfeld A (1986) Regulation of ethylene biosynthesis in avocado fruit during ripening. *Plant Physiol* 81:130-135
- Smith GS, Gravet IM, Edwards CM, Curtis JP, Buwalda JG (1994) Spatial analysis of the canopy of kiwifruit vines as related to the physical, chemical and postharvest attributes on the fruit. *Ann Bot* 73:99-111
- Spanu P, Boller T (1989) Ethylene biosynthesis in tomato plants infected by *Phytophthora infestans*. *J Plant Physiol* 134:533-537
- Spector (1978) Refinement of Coomassie blue method for protein quantitation. *Anal Biochem* 86:142-146
- Srivastava OP, van Huystee RB (1973) Evidence for close association of peroxidase, polyphenol oxidase, and IAA oxidase isozymes of peanut suspension culture medium. *Can J Bot* 51:2207-2215
- Srivastava OP, van Huystee RB (1977) IAA oxidase and polyphenol oxidase activities of peanut peroxidase isozymes. *Phytochemistry* 16:1527-1530
- Srivastava OP, van Huystee RB (1977) Interactions among phenolics and peroxidase isoenzymes. *Bot Gaz* 138:457-464
- Stafford HA (1960) Differences between lignin-like polymers formed by peroxidation of eugenol and ferulic acid in leaf sections of phleum. *Plant Physiol* 35:108-114
- Stafford HA (1967) Biosynthesis of phenolic compounds in first internodes of sorghum: lignin and related products. *Plant Physiol* 42:450-455
- Stafford HA, Bravinder-Bree S (1972) Peroxidase isozymes of first internodes of *Sorghum*. Tissue and intracellular localization and multiple peaks of activity isolated by gel filtration. *Plant Physiol* 42:950-956
- Stead A (1992) Pollination-induced flower senescence: a review. *Plant Growth Reg* 11:13-20
- Stephan D, van Huystre RB (1980) Peroxidase biosynthesis as part of protein synthesis by cultured peanut cells. *Can J Biochem* 58:715-719
- Sticher L, Penel C, Greppin H (1981) Calcium requirement for the secretion of peroxidases by plant cell suspensions. *J Cell Sci* 48:345-353
- Street HE (1977) Differentiation in cell and tissue cultures - regulation at the molecular level. *Regulation of Development Processes in Plants*. Halle p.192-218
- Suttle JC (1988) Effect of ethylene treatment on polar IAA transport, net IAA uptake and specific binding of N-1-naphthylphthalamic acid in tissues and microsomes isolated from etiolated pea epicotyls. *Plant Physiol* 88:795-799

- Svalheim O, Robertsen S (1993) Elicitation of H₂O₂ production in cucumber hypocotyl segments by oligo-1,4- γ -D-galacturonides and an oligo- γ -glucan preparation from cell walls of *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. *Physiol Plant* 88:675-681
- Sylvestre I, Drillard MJ, Burear JM, Paulin A (1989) Effects of ethylene rise on the peroxidation of membrane lipids during senescence of cut carnations. *Plant Physiol Biochem* 27:407-413
- Tanahashi M, Higuchi T (1981) Dehydrogenative polymerization of monolignols by peroxidase and H₂O₂ in a dialysis tube. I. Preparation of highly polymerized DHPs. *Wood Res* 67:29-42
- Tanaka K, Suda Y, Kondo N, Sugahara K (1985) O₃ tolerance and the ascorbate-dependent H₂O₂ decomposing system in chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 26:1425-1431
- Tappel AL (1965) Free-radical lipid peroxidation damage and its inhibition by vitamin E and selenium. *Fed Proc* 24:73-78
- Tarvainen O, Ahonen-Jonnarth U, Markkola AIM, Vare H (1991) The influence of Al, Cu and Ni on peroxidase activity in seedlings of *Pinus sylvestris* and mycelia of *Suillus variegatus*. *Biochemical, Molecular, and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. Geneva, pp.443-445
- Taylor JE, Grosskopf DG, McGaw BA, Horgan R, Scott IM (1988) Apical localization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and its conversion to ethylene in etiolated pea seedlings. *Planta* 174:112-114
- Telawski FW (1992) Ethylene production by different age class ponderosa and Jeffrey pine needles as related to ozone exposure and visible injury. *Trees* 6:195-198
- Terashima N, Fukushima K, He LF, Takabe K (1993) Comprehensive model of the lignified plant cell wall. *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. Madison, pp.247-269
- Thaker VS, Sarvop S, Vaishnav PP, Singh YD (1986) Role of peroxidase and esterase activities during cotton fiber development. *J Plant Growth Reg* 1:17-27
- Thompson JE (1988) The molecular basis of membrane deterioration during senescence. *Senescence and Aging in Plants*, Academic Press, San Diego, pp.51-83
- Thomsen B, Drumm-Herrel H, Mohr H (1992) Control of the appearance of ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11) in mustard seedling cotyledons by phytochrome and photooxidative treatments. *Planta* 186:600-608

- Thorpe TA, Tran Thanh Van M, Gaspar T (1978) Isoperoxidases in epidermal layers of tobacco and changes during organ formation in vitro. *Physiol Plant* 44:388-394
- Timm H, Hughes DL, Weaver ML (1986) Effect of exposure time of ethylene on potato sprout development. *Amer Potato J* 63:655-663
- Tingey DT, Fites RC, Wickliff C (1975) Activity changes in selected enzymes from soybean leaves following ozone exposure. *Physiol Plant* 33:316-320
- Tomasi F, De Gara L, Riso R, Arrigoni O (1987) Presenza di ascorbico perossidasi nel regno vegetale. *Boll Soc Ital Biol Sper* 63:779-786
- Trewavas A (1981) How do plant growth substances work? *Plant Cell Env* 4:203-228
- Trewavas A-J (1983) Plant growth substances - metabolic flywheels for plant development. *Cell Biol Int Rep* 7:569-575
- Upadhyaya A, Davis TA, Sankhla N (1986) Some biochemical changes associated with paclobutrazol-induced adventitious root formation on bean hypocotyl cuttings. *Ann Bot* 57:309-315
- Ushimaru T, Shibasaka M, Tsuji H (1992) Development of the O₂⁻ detoxification system during adaptation to air of submerged rice seedlings. *Plant Cell Physiol* 33:1065-1071
- Van Assche F, Cardinaels C, Clijsters H (1988) Induction of enzyme capacity in plants as a result of heavy metal toxicity: Dose-response relations in *Phaseolus vulgaris* L., treated with zinc and cadmium. *Environm Poll* 52:103-115
- Van den Berg BM, van Huystee RB (1984) Rapid isolation of plant peroxidase. Purification of peroxidase a from *Petunia*. *Physiol Plant* 60:299-304
- Van der Straeten D, van Weimeersch L, Goodman HM, van Montagu M (1990) Cloning and sequence of two different cDNAs encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4859-4863
- Vanden Driessche T, Kevers C, Collet M, Gaspar T (1988) *Acetabularia mediterranea* and ethylene: production in relation with development, circadian rhythms in emission, and response to external application. *J Plant Physiol* 133:635-639
- Varshney SRK, Varshney CK (1985) Response of peroxidase to low levels of SO₂. *Environ Exp Bot* 25:107-114
- Vernovy-Gerritsen M, Bos ALM, Veldink GA, Vleigenthart JFG (1983) Localization of lipoxygenase 1 and 2 in germinating soybean seeds by an indirect immunofluorescence technique. *Plant Physiol* 73:262-267

- Ververidis P, John P (1991) Complete recovery *in vitro* of ethylene-forming enzyme activity. *Phytochemistry* 30:725-727
- Vick BA, Zimmerman DC (1987) The lipoxygenase pathway. *Metab Struct Funct Plant Lipids* 383-390
- Vioque A, Albi MA, Vioque B (1981) Role of IAA-oxidase in the formation of ethylene from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Phytochemistry* 20:1473-1479
- Vioque B, Vioque A (1985) Accion del sistema acido indoleaceticooxidasa/ peroxidasa del olivo sobre el acido 1-aminociclopropano-1-carboxylico. *Grasas Aceites* 36:35-41
- Wang TW, Arteca R (1992) Effects of low O₂ root stress on ethylene biosynthesis in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Heinz 1350). *Plant Physiol* 98:97-100
- Wang Z, Luh BS (1983) Characterization of soluble and bound peroxidases in green asparagus. *J Food Sci* 48:1412-1417
- Warner HL, Leopold AC (1971) Timing of growth regulator responses in peas. *Biochem Biophys Res Comm* 44:989-994
- Weckx J, Van Poucke M (1989) The effect of white light on the ethylene biosynthesis of intact green seedlings. *Biochemical and Physiological Aspects of Ethylene Production in Lower and Higher Plants*. Kluwer, Dordrecht, pp.279-290
- Weimar M, Rothe GM (1986) Preparation of extracts from mature spruce needles for enzymatic analyses. *Phsiol Plant* 69:692-698
- Weiss C, Bevan M (1991) Ethylene and a wound signal modulate local and systemic transcription of *win2* genes in transgenic potato plants. *Plant Physiol* 96:943-951
- Wenzel AA, Schlautmann H, Jones CA, Koppers K, Mehlhorn H (1995) Aminoethoxyvinylglycine, cobalt and ascorbic acid all reduce ozone toxicity in mung beans by inhibition of ethylene biosynthesis. *Physiol Plant* 93:286-290
- White J (1979) The plant as a metapopulation. *Annu Rev Ecol Biosyst* 10:109-145
- Whitmore FW (1971) Lignin formation in wheat coleoptile cell walls. A possible limitation of cell growth. *Plant Physiol* 48:596-602
- Whitmore FW (1976) Binding of ferulic acid to cell walls by peroxidases of *Pinus eliottii*. *Phytochemistry* 15:375-378

- Whitmore FW (1978) Lignin-protein complex catalysed by peroxidase. *Plant Sci Lett* 13:241-245
- Wise RR, Naylor AW (1988) Stress ethylene does not originate directly from lipid peroxidation during chilling-enhanced photooxidation. *J Plant Physiol* 133:62-66
- Wolter KE, Gordon JC (1975) Peroxidases as indicators of growth and differentiation in aspen callus cultures. *Physiol Plant* 33:219-223
- Woltering E, de Vrije T (1995) Ethylene: a tiny molecule with great potential. *Bio Essays* 17:287-290
- Wood BW (1985) Effect of ethephon on IAA transport, IAA conjugation, and antidotal action of NAA in relation to leaf abscission of pecan. *J Amer Soc Hort Sci* 110:340-343
- Yamamoto M e.a. (1995) The synthesis of ethylene in melon fruit during the early stage of ripening. *Plant Cell Physiol* 36:591-596
- Yamauchi N, Minamide T (1985) Chlorophyll degradation by peroxidase in parsley leaves. *J Jap Soc Hort Sci* 54:265-271
- Yang C, Wilksch W, Wild A (1994) 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid, its malonyl conjugate and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase activity in needles of damaged and undamaged Norway spruce trees. *J Plant Physiol* 143:389-395
- Yang SF (1969) Further studies on ethylene formation from α -keto- γ -methylthiobutyric acid or α -methylthiopropionaldehyde by peroxidase in the presence of sulphite and oxygen. *J Biol Chem* 244:4360-4365
- Yang SF, Hoffman NE (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* 35:155-189
- Yu Y-B, Adams DO, Yang SF (1979) 1-aminocyclopropanecarboxylate synthase a key enzyme in ethylene biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* 198:280-286
- Yu Y-B, Yang SF (1979) Auxin-induced ethylene production and its inhibition by aminoethoxyvinylglycine and cobalt ion. *Plant Physiol* 64:1074-1077
- Zaprometov MN, Zagoskina NV, Strekova VY, Subotina GA (1982) Localization of peroxidase and lignin in tea plant tissues and callus cultures obtained from them. *Fiziol Rast* 29:230-238
- Zarembinski TI, Theologis A (1993) Anaerobiosis and plant growth hormones induce two genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Biol Cell* 4:363-373

- Zheng X, van Huystee RB (1992) Anionic peroxidase catalysed ascorbic acid and IAA oxidation in the presence of hydrogen peroxide: a defence system against peroxidative stress in peanut plant. *Phytochemistry* 31:1895-1898
- Zilinskas BA, Greenhalgh-Weidman B, Brennan E (1990) The relationship between EDU pre-treatment and C₂H₄ evolution in ozonated pea plants. *Environ Pollut* 65:241-249

Publikācijas par disertācijas tēmu

- 1.* Курушина Н.В., Иевиньш Г.В., Романовская О.И. Влияние этилена на фракционный состав белков апикальной меристемы побега озимой ржи и ее листа. – Известия АН ЛатвССР, 1986, № 4, с.70–74.
- 2.* Иевиньш Г.В. Peroксидазы растений: строение, свойства, биохимический полифункционализм. – Известия АН ЛатвССР, 1987, № 7, с.90–97.
3. Иевиньш Г.В. Влияние 2–хлорэтилфосфоновой кислоты на активность фенилаланин–аммиак–лиазы и пероксидазы в проростках озимой ржи. – В сб. тезисов 7–й конф. молодых ученых–биологов. Рига, 1987. С.82–83.
4. Ильин В.В., Иевиньш Г.В. Ферментативная активность образования этилена из 1–аминоциклопропан–1–карбоновой кислоты в проростках озимой ржи. – В сб. тезисов 3–й Всес. конф. мол. уч. по физиол. раст. клетки. Петрозаводск, 1988. С.44.
5. Иевиньш Г.В., Ильин В.В. Изменение градиента активности ферментов в проростках озимой ржи под действием 2–хлорэтилфосфоновой кислоты. – В сб. тезисов 3–й Всес. конф. по физиол. раст. клетки. Петрозаводск, 1988. С.45.
- 6.* Иевиньш Г.В. Peroксидазы растений: проблемы изучения в связи с участием в регуляции роста и развития. – Известия АН ЛатвССР, 1988, № 6, с.65–74.
- 7.* Иевиньш Г.В., Романовская О.И., Ильин В.В. Активность оксидазы 1–аминоциклопропан–1–карбоновой кислоты в проростках озимой ржи. – Известия АН ЛатвССР, 1988, № 12, с.80–86.
8. Иевиньш Г.В. Выделение этилена под действием этефона и 1–аминоциклопропан–1–карбоновой кислоты в связи с ингибированием роста проростков ржи. – В сб. тезисов 8–й конф. мол. ученых–биологов. Рига, 1989. С.90–91.
9. Иевиньш Г.В. Распределение активности липоксигеназы в листьях проростков пшеницы и ржи в связи с активностью этилен–образующей системы. – В сб. тезисов 8–й конф. мол. ученых–биологов. Рига, 1989. С.92–93.
10. Иевиньш Г.В., Ильин В.В. Биосинтез стрессового этилена в проростках озимой ржи. – В сб. тезисов конф. мол. ученых–биологов. Казань, 1989. С.82–83.

- 11*. Иевиньш Г.В., Романовская О.И. Пероксидазная система проростков озимой ржи. I. Связь с образованием этилена. – Известия АН ЛатвССР, 1990, № 3, с.66–69.
- 12.* Иевиньш Г.В., Романовская О.И. Ингибирование роста проростков озимой ржи и выделение этилена под действием этефона и 1–аминоциклопропан–1–карбоновой кислоты. – Известия АН ЛатвССР, 1990, № 3, с.70–73.
- 13.* Вуцина И.А., Иевиньш Г.В., Романовская О.И. Динамика содержания полиаминов в апикальной меристеме и в листьях проростков озимой ржи. – Известия АН ЛатвССР, 1990, № 3, с.74–79.
14. Иевиньш Г.В., Вуцина И.А. Распределение активности пероксидазной системы в растущем листе проростков озимой ржи. – В сб. тезисов 4–й Всес. конф. мол. уч. по физиол. раст. клетки. Минск, 1990. С.57.
15. Иевиньш Г.В. Градиент активности оксидазы 1–аминоциклопропан–1–карбоновой кислоты в проростках ржи, пшеницы и гороха: связь с образованием этилена. – В сб. тезисов 4–й Всес. конф. мол. уч. по физиол. раст. клетки. Минск, 1990. С.76.
16. Иевиньш Г.В. Влияние 1–аминоциклопропан–1–карбоновой кислоты на градиент образования лигнина у проростков озимой ржи. – В сб. тезисов 4–й Всес. конф. мол. уч. по физиол. раст. клетки. Минск, 1990. С.77.
17. Ievinsh G. Gradient of ethylene-forming system activity in rye, wheat and pea seedlings: a possible relationship with lipoxygenase and peroxidase. - *Physiol. Plant.*, 1990, 79, p.A30.
18. Ievinsh G. Gradients of peroxidase, IAA-oxidase and lipoxygenase in rye, wheat and pea seedlings: relationship with ethylene formation. - In: *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases. Abstracts II International Symposium, 27-29 August, 1990, Lublin, Poland.* P.96.
- 19.* Ievinsh G., Iļjin V., Kreicbergs O., Romanovskaya O. Effect of ethephon on the activity of the ethylene-forming enzyme and the biosynthesis of ethylene in winter rye seedlings. - *Biochem Physiol Pflanzen*, 1990, 186, p.221-228.
20. Ieviņš Ģ. Etilēna veidošanās rudzu un kviešu dīgstos saistībā ar augšanu un attīstību. - *Vispasaules latviešu zinātņu kongress. Rīga, 1991, 3.sēj.*
21. Ievinsh G. Wound-induced ethylene production and evolution in winter rye seedlings. - *Abstracts 14th International Conference on Plant Growth Substances. Amsterdam, July 21-26, 1991.* P.16.

22. levinsh G. The role of coleoptile in formation and evolution of rapidly induced ethylene in light-grown winter rye seedlings. - *Physiol. Plant.* 1991, 82, p.B8.
- 23.* Иевиньш Г.В., Ильин В.В., Вуцина И.А., Романовская О.И. Градиент образования этилена в растущем листе проростков озимой ржи: влияние этефона. – *Физиол. раст.*, 1991, 38(4), с.736–741.
- 24.* levinsh G., Romanovskaya O. Accelerated lignification as a possible mechanism of growth inhibition in winter rye seedlings caused by ethephon and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. - *Plant Physiol. Biochem.* 1991, 29, p.327-331.
- 25.* levinsh G. Gradients of peroxidase, IAA-oxidase and lipoxygenase in rye, wheat and pea seedlings: relationship with ethylene formation. - In: *Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases.* J.Lobarzewski, H.Greppin, C.Penel, T.Gaspar (eds.), 1991, University of Geneva, p.333-341. ISBN 2-88164-003-6.
- 26.* levinsh G., Ijlin V., Vucina I., Romanovskaya O. Gradient of ethylene formation in the growing leaf of winter rye seedlings: effect of ethephon. - *Soviet Plant Physiol.*, 1991, 38, p.539-543.
- 27.* levinsh G. Soluble lipoxygenase activity in rye seedlings as related to endogenous and exogenous ethylene and wounding. - *Plant Sci.*, 1992, 82, p.155-159.
- 28.* levinsh G. Characterization of the peroxidase system in winter rye seedlings: compartmentation and dependence on leaf development and hydrogen donors used. - *J. Plant Physiol.*, 1992, 140, p.257-263.
29. levinsh G. Endogenous rhythmicity of ethylene production during growth of intact cereal seedlings. - *Physiol. Plant.*, 1992, 85, p.A28.
30. Arente G., Kreicbergs O., levinsh G. Effect of Camposan M on the hormonal balance and linear growth of etiolated pea seedlings. - In: *Ethylene, Physiology, Biochemistry and Practical applications. Abstracts International Conference, 1992, Moscow-Puschino-St.Petersburg.* P.6-7.
- 31.* levinsh G., Kreicbergs O. Endogenous rhythmicity of ethylene production in growing intact cereal seedlings. - *Plant Physiol.*, 1992, 100, p.1389-1391.
- 32.* levinsh G., Ijlin V., Kreicbergs O. Coleoptile removal-induced ethylene production in winter rye seedlings. - *Biol. Plant.*, 1993, 35, p.229-236.

33. levinsh G., Kreicbergs O. Alkaline hydrolysis-related ethylene-releasing substances: a substrate for peroxidases? - In: Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology. Abstracts III International Symposium, July 10-14, 1993, Elsinore, Denmark. P.88.
34. levinsh G., Kreicbergs O. Developmental and stress control of alkaline hydrolysis-related ethylene releasing substances (AHRERS). - Biol. Plant., 1994, 36, p.S26.
35. Arente G., levinsh G., Gertnere D. *In vitro* modulation of *Solanum tuberosum* L. morphogenesis in a hormone-free medium: a putative role for ethylene. - Biol. Plant., 1994, 36, p.S77.
36. levinsh G., Arente G., Selga M., Selga T., Kreicbergs O. Biochemical and ultrastructural aspects of environmental stress defense in *Pinus sylvestris* L. needles. - Physiol. Plant., 1994, 91, p.A4.
37. levinsh G., Tillberg E. Does inhibitor studies can be used to distinguish between the different pathways of ethylene biosynthesis? - Plant Physiol., 1994, 105, p.S143
- 38.* levinsh G., Tillberg E. Stress-induced ethylene biosynthesis in pine needles: a search for the putative 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid-independent pathway. - J. Plant Physiol. 1995, 145, p. 308-314.
39. levinsh G., Valcina A., Ozola D. Ethylene and the control of ascorbate peroxidase activity in pine. Abstr. 15th Intl. Conf. Plant Growth Substances, Minneapolis, 1995, # 358.
- 40.* levinsh G., Valcina A., Ozola D. Induction of ascorbate peroxidase activity in stressed pine (*Pinus sylvestris* L.) needles: a putative role for ethylene. - Plant Sci. 1995, 112, p.167-173.
- 41.* levinsh G., Kreicbergs O., Tillberg E. Regulation of alkaline hydrolysis-related ethylene releasing substances in needles of *Pinus sylvestris*: a possible relationship with stress ethylene formation.
- 42.* Arente G., Gertnere D., levinsh G. Modulation of *Solanum tuberosum* L. morphogenesis in a stem explant culture by ethylene. Physiol. Plant. /Submitted/
- 43.* levinsh G., Gertnere D., Valcina A., Ozola D. The control of ascorbate peroxidase activity during modulation of morphogenesis in *Solanum tuberosum* L. stem explant culture by ethylene. Physiol. Plant. /Submitted/
- 44.* levinsh G., Ozola D. Spatial distribution of ethylene production by individual needles along a shoot of *Pinus sylvestris* L. Ann Bot. /Submitted/.