

STANISŁAW LEWAK

*Instytut Biologii Eksperymentalnej Roślin, Uniwersytet Warszawski,
Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa*

HORMONY ROŚLINNE — KIERUNKI BADAŃ OSTATNIEGO DZIESIĘCIOLECIA

WSTĘP

Kilkanaście lat temu upłynęła setna rocznica odkrycia w roślinach substancji, których obecność warunkuje wzrost, polarność i reakcje roślin na bodziec środowiskowy. W roku 1880 KAROL DARWIN, znany dziś głównie z powodu pionierskich prac nad teorią ewolucji, opublikował dzieło *The power of movement in plants*, w którym opisał doświadczenia wykazujące, że usunięcie wierzchołka wzrostu koleoptyla owsa powoduje zahamowanie wzrostu pozostałej części koleoptyla i utratę zdolności do wyginania się pod wpływem niesymetrycznego (bocznego) oświetlenia. Kontynuowanie tego rodzaju doświadczeń przez kilka pokoleń następców Darwina, połączone z ich wzbogaceniem o nowe techniki i podejścia eksperymentalne, doprowadziło w latach 30-tych naszego stulecia do wyodrębnienia i otrzymania w czystej postaci pierwszego hormonu roślinnego, auksyny, a następnie — do ustalenia jego struktury chemicznej jako kwasu indolilo-3-octowego.

Szybki rozwój nauk fizjologicznych i doskonalenie technik analitycznych doprowadziły w ciągu następnego półwiecza do poznania szeregu grup substancji pełniących podobną rolę w roślinach. Na szczególne podkreślenie zasługuje tutaj wprowadzenie metod chromatograficznych i instrumentalnej analizy strukturalnej. Wyniki tych badań pozwoliły również na wyróżnienie spośród substancji uczestniczących w regulacji procesów wzrostowych i rozwojowych roślin (zwanych ogólnie regulatorami wzrostu i rozwoju lub po prostu substancjami wzrostowymi roślin) klasy hormonów roślinnych. Substancje należące do tej klasy, zwane również fitohormonami, wyróżniają się (1) powszechnością występowania w organizmach roślin, (2) występowaniem i aktywnością biologiczną w niesłychanie niskich stężeniach oraz (3) często występującym rozdziałem między miejscem produkcji substancji czynnej w roślinie i miejscem jej działania.

W latach 80-tych stan wiedzy o hormonach roślinnych przedstawiał się następująco: poznano i uznano za hormony substancje należące do pięciu grup związków biologicznie czynnych, które wyliczamy w kolejności ich odkrywania i uznawania za hormony. Są to: auksyny (które głównie uczestniczą w regulacji wzrostu wydłużeniowego komórek, ruchów roślin, powstawaniu korzeni i doj-

rzewania owoców), gibereliny (regulacja wzrostu, spoczynku, kiełkowania nasion, kwitnienia i zawiązywania owoców), cytokininy (regulacja podziałów komórkowych, różnicowania komórek, spoczynku, transportu substancji organicznych w roślinie, starzenia), kwas abscysynowy (regulacja wzrostu, kiełkowania, morfogenezy, spoczynku, opadania liści i owoców, starzenia). Najpóźniej uznano za hormon etylen — prosty, gazowy związek organiczny, którego aktywność biologiczna (regulacja wzrostu objętościowego komórek, dojrzewania owoców, starzenia) i powszechne występowanie znane były od dawna. W każdej z tych grup (za wyjątkiem etylenu) występuje przynajmniej kilka, spokrewnionych strukturalnie, substancji czynnych. Rekordy bije pod tym względem grupa giberelin; znanych jest ponad 80 substancji należących do tej grupy. Wydaje się, że hormony biorą udział w regulacji wszystkich etapów rozwojowych rośliny od kiełkowania nasion, przez wzrost wegetatywny, różnicowanie i organogenezę, indukcję i powstawanie kwiatu, embriogenezę, owocowanie, dojrzewanie do starzenia i śmierci. Regulacyjną rolę hormonów wykazano nie tylko obserwując ich efekt na powstawanie i przebieg poszczególnych faz rozwojowych rośliny, ale stwierdzono również ich udział w powstawaniu i rozwoju (dojrzewaniu) organelli komórkowych, aktywacji enzymów, regulacji poziomu niektórych metabolitów, a także regulacji ekspresji szeregu genów. Toteż jest uzasadnioną opinią, że regulacja hormonalna zajmuje jedno z centralnych miejsc w całokształcie procesów determinujących rozwój rośliny i jej reakcje (często przystosowawcze) na bodźce pochodzące ze środowiska. Opinia ta jest źródłem wzmoczonego zainteresowania w ostatnich latach problematyką związaną z hormonami roślinnymi.

Do końca lat 70-tych poznano w wielu szczegółach drogi biosyntezy wszystkich hormonów, łącznie z większością enzymów uczestniczących w tych drogach, a także powiązania dróg syntezy hormonów z innymi szlakami metabolicznymi. Podobnie, poznano drogi degradacji i inaktywacji większości hormonów w komórce roślinnej.

W tym samym czasie wykazano zależność między stężeniem hormonu, a jego efektem biologicznym. W pewnym zakresie stężeń zależność ta jest linearna lub wykładnicza. Poza tym zakresem, ale ciągle przy stężeniach fizjologicznych, zależność staje się bardziej złożona. Efekt przestaje być proporcjonalny do stężenia, a często występuje jego odwrócenie (np. hamowanie wzrostu przez wysokie stężenia auksyny zamiast stymulacji obserwowanej przy niższych stężeniach). Ponadto, wielokrotnie wykazano, że ten sam proces lub zjawisko znajduje się pod kontrolą więcej niż jednego hormonu, przy czym poszczególne hormony mogą wywoływać efekty przeciwstawne, addytywne lub synergistyczne. Mówimy więc o równowadze hormonalnej uczestniczącej w regulacji poszczególnych procesów, lub o kompleksie hormonalnym. Z drugiej strony, ten sam hormon zazwyczaj uczestniczy w regulacji więcej niż jednego zjawiska lub procesu zachodzącego w roślinie (efekt pleiotropowy). Te obserwacje, jak również często występująca zbieżność miejsc produkcji i działania hormonów roślinnych stanowią o zasadniczej różnicy między nimi a hormonami zwierzęcymi.

Na tym tle oczywistymi powinny stać się pytania, które stawia sobie współczesna nauka o hormonach roślinnych. Zasadnicze pytania, do odpowiedzi na które zmiierzają badania prowadzone od kilkunastu lat, można sformułować następująco:

- Czy lista dotąd poznanych hormonów jest kompletna?
- Czy aktualne stężenie hormonu w tkance jest jedynym parametrem decydującym o jego efekcie regulacyjnym?
- Jak odbywa się regulacja stężenia hormonu w miejscu jego działania?
- Na czym polega działanie hormonu? Jaki jest mechanizm tego działania?

Wyniki badań ostatnich lat nie przyniosły ostatecznej odpowiedzi na żadne z tych pytań. Jednak w każdym przypadku znacznie ją przybliżyły. Toteż i my spróbujemy przybliżyć tę problematykę cierpliwemu Czytelnikowi w dalszej części tego opracowania.

Oczywiście, równoległe do prac zmierzających do odpowiedzi na powyższe pytania, są kontynuowane badania nad hormonalną regulacją wzrostu, rozwoju i różnicowania u roślin. Omawianie tych badań nie mieści się w ramach niniejszego opracowania. Wydaje się jednak, że na zasygnalizowanie zasługuje postęp w jednym z kierunków tych badań. Prace nad udziałem hormonów w morfogenezie roślin prowadzone w latach 70-tych (np. ZAJĄCZKOWSKI i współaut. 1984) uzyskały nowy wymiar z chwilą stwierdzenia hormonalnej regulacji orientacji mikrotubul kortykalnych, która określa sposób odkładania się mikrofibryl celulozowych w ścianie komórkowej. Z kolei orientacja mikrofibryl determinuje kierunek wzrostu komórek, a tym samym kształt rośliny. Stwierdzono w ostatnich latach udział nie tylko auksyn, ale także giberelin, cytokinin i etylenu, a ostatnio również kwasu jasmonowego, w określaniu pozycji mikrotubul, ich stabilności i asocjacji z plazmolemą (SHIBAOKA 1994), co inspirowało dalsze badania (np. na poziomie molekularnym) w tym kierunku.

POSZUKIWANIA NOWYCH HORMONÓW

Jak już wspomniano, rozwój technik analitycznych umożliwiających identyfikację, ustalenie struktury i oznaczanie ilościowe składników roślin występujących w stężeniach rzędu mikrograma na kilogram świeżej masy, decyduje o postępie badań nad hormonami roślinnymi. Nie w tym opracowaniu jest miejsce na omawianie współczesnych metod badawczych stosowanych w tych badaniach. Niemniej wymienić należy jako te, którym dzisiejsza nauka o hormonach najwięcej zawdzięcza, obok szeregu metod chromatograficznych (łącznie z HPLC — wysokorozdzielczą chromatografią cieczową), takie metody jak spektrografia masowa sprzężona z chromatografią gazową (GC-MS) i jej udoskonalenia (np. GC-MS/SIM — ilościowe monitorowanie wybranego jonu), a także metody immunologiczne (HEDDEN 1993). Techniki te w znacznym stopniu wyparły powszechnie stosowane poprzednio biologiczne metody identyfikacji i ilościowego oznaczania hormonów, które obecnie stanowią narzędzie pomocnicze i uzupełniające.

Równoległe do kryteriów definiujących pojęcie hormonu roślinnego, wymienionych na początku tego opracowania, przyjęto trzy „kryteria metodyczne” precyzujące rodzaje prób doświadczalnych, którym musi zostać poddana substancja wykazująca aktywność biologiczną, występująca powszechnie i w „katalitycznych” stężeniach, aby mogła być uznana za hormon. Dopiero wykazanie, że: (1) występuje zależność (korelacja) między zmianami stężenia tej substancji

w roślinie i intensywnością badanego procesu fizjologicznego, (2) potraktowanie (egzogennie) rośliny (lub jej fragmentu) tą substancją inicjuje ten proces lub modyfikuje jego przebieg, (3) wywołanie zmiany endogennego stężenia (w roślinie) badanej substancji modyfikuje przebieg analizowanego procesu. Badanym procesem może być, na przykład, wzrost, liczba kiełkujących nasion lub pojawiających się pąków, ale także zmiana aktywności enzymu lub poziomu metabolitu. Modyfikacji endogennego stężenia kandydata do pozycji hormonu (kryterium metodyczne 3) można dokonać na przykład stosując inhibitory syntezy, transportu lub degradacji tej substancji. W ostatnich latach coraz szersze zastosowanie w tym celu znajdują rośliny, pozbawione zdolności syntezy badanego związku lub o zmodyfikowanej wrażliwości na tę substancję. Rośliny takie otrzymuje się bądź w wyniku mutacji i selekcji odpowiednich mutantów, bądź na drodze inżynierii genetycznej wprowadzając lub eliminując w roślinach transgenicznym geny odpowiedzialne za syntezę lub degradację kandydatów na hormony, syntezę białek wiążących potencjalne hormony lub białek uczestniczących w ich transporcie.

KWAS JASMONOWY

Wydaje się, że spośród licznych substancji czynnych biologicznie, opisywanych w ostatnich latach, w największym stopniu omawiane kryteria (zarówno te stanowiące definicję hormonu roślinnego, jak i kryteria metodyczne) spełnia kwas jasmonowy. Związek ten wyodrębnilo po raz pierwszy jako składnik olejku aromatycznego kwiatów jaśminu w początkach lat 60-tych (DEMOLE i współaut. 1962), zidentyfikowano następnie jako aktywną substancję wydzielaną do podłoża w kulturach grzyba *Lasiodiplodia theobromae*, odpowiedzialną za hamowanie wzrostu roślin (ALDRIDGE i współaut. 1971). W latach 80-tych stwierdzono występowanie kwasu jasmonowego praktycznie we wszystkich badanych roślinach, opracowano specyficzne metody analityczne oraz poznano większość funkcji fizjologicznych tej substancji (SEMBDNER i PARTHIER 1993, KODA 1992).

Kwas jasmonowy jest prostym, dwunastowęglowym związkiem, pochodną cyklopentanonu. Jego biosynteza jest związana z przemianami nienasyconych kwasów tłuszczowych i jej przebieg poznany został w wielu szczegółach (VICK i ZIMMERMAN 1984). Równolegle do kwasu jasmonowego w roślinach występuje jego ester metylowy — substancja lotna o podobnej do wolnego kwasu aktywności biologicznej. Do tej samej grupy hormonów, zwanej jasmonidami, należy kwas kukurbitowy, związek zbliżony strukturalnie i wykazujący podobną do kwasu jasmonowego aktywność, a także jego ester metylowy i szereg stereoizomerów obu kwasów o żadnej lub nieznacznej aktywności biologicznej.

Kwas jasmonowy i/lub jego ester metylowy wykazują efekt biologiczny podobny do kwasu abscysynowego. Tytułem przykładu wymienić można hamowanie wzrostu wydłużeniowego nadziemnych części roślin, hamowanie wzrostu kalusa, stymulację starzenia (hamowanie oddychania i stymulacja proteolizy), hamowanie fotosyntezy i aktywności niektórych enzymów chloroplastowych, a także stymulację opadania liści. Z drugiej strony, obserwowano specyficzne dla jasmonidów efekty, takie jak indukcję syntezy specyficznych białek (np.

WILEN i współaut. 1991), czy udział w regulacji tuberyzacji (KODA i KIKUTA 1991). Ponadto stwierdzono antagonistyczne w stosunku do kwasu abscysynowego działanie kwasu jasmonowego na kiełkowanie spoczynkowych nasion i na aktywność i biosyntezę niektórych enzymów (np. RANJAN i LEWAK 1995).

HORMON PRZYRANNY

Badania nad hormonem powstającym w wyniku mechanicznych uszkodzeń tkanki roślinnej nie są właściwie poszukiwaniem nowego hormonu, ale weryfikacją dawnych danych z użyciem nowoczesnych narzędzi badawczych. Już w 1921 roku HABERLANDT opisał hormon przyranny (traumatyna, kwas traumatynowy), a następnie struktura traumatyny została ustalona jako kwas trans-2-dodecenedionowy (ENGLISH i współaut. 1939). Kwas traumatynowy nie spełniał wszystkich kryteriów stawianych hormonom roślinnym; nie wykrywano go we wszystkich zranionych tkankach i nie we wszystkich badanych roślinach podanie traumatyny wywoływało charakterystyczną reakcję (wzmożenie podziałów komórkowych, stymulacja opadania liści). Reakcja ta była znacznie wyraźniejsza po podaniu nieoczyszczonego ekstraktu ze zranionych owoców.

Wyniki badań prowadzonych przez ZIMMERMANA (np. ZIMMERMAN i COUDRON 1979) wykazały, że traumatyna Haberlanda jest produktem nieenzymatycznego utlenienia właściwego hormonu przyrannego — kwasu 12-okso-trans-10-dodecenedionowego. Stwierdzono, że związek ten powstaje z kwasu linolenowego (produktu hydrolizy lipidów roślinnych), że w starszych tkankach występuje w nieaktywnej postaci zestryfikowanej oraz, że występuje i jest aktywny we wszystkich badanych roślinach. Pomimo niewielu, jak dotąd, prac nad „nowym” hormonem przyrannym wydaje się, że jest on poważnym kandydatem do rodziny hormonów roślinnych. Pozostaje pytanie, czy przejmie on nazwę „kwas traumatynowy”, czy też nazwa ta pozostanie przy „starym” związku Haberlanda.

TRIAKONTANOL

Ten jednowodorotlenowy alkohol alifatyczny, o długim (trzydziestowęglowym), nierozkrzewionym łańcuchu występuje powszechnie w niewielkich ilościach jako składnik wosków roślinnych. Triakontanol wykryto i zidentyfikowano po raz pierwszy w liściach lucerny w roku 1933 (CHIBNAL i współaut. 1933), a badania nad jego aktywnością jako regulatora wzrostu rozpoczęto w końcu lat 70-tych (RIES i współaut. 1977). Najlepiej poznanym efektem działania triakontanolu, który wykazuje aktywność w stężeniach rzędu 10^{-8} M, jest stymulacja wzrostu i zwiększanie suchej masy roślin (np. RIES i WERT 1977). Stąd też znalazł on szerokie zastosowanie w przypadku niektórych upraw w USA a także w Chinach (RIES 1984). Tym niemniej, jest znane jego działanie regulacyjne w takich procesach, jak synteza chlorofilu, fotosynteza i fotooddychanie (HAUGSTAD i współaut. 1983) i kiełkowanie nasion (np. LEWAK i SKOWROŃSKA 1982).

Z pewnością jest zbyt wcześnie, aby uznać triakontanol za hormon roślinny. Autor niniejszego opracowania nie spotkał się z doniesieniami dotyczącymi poziomu endogennego triakontanolu (wewnątrzkomórkowego a nie zawartego w woskach kutykuli), a tym bardziej dotyczącymi korelacji zmian tego poziomu ze zmianami badanych procesów fizjologicznych. Brak takich danych nie pozwa-

la na wykluczenie możliwości, że obserwowane efekty są skutkiem нефизjologicznego działania triakontanolu. Z drugiej strony, dane dotyczące mechanizmów działania tej substancji, jak na przykład doniesienia o aktywacji przez triakontanol błonowej ATP-azy (LESNIAK i współaut. 1989), lub o powstawaniu po podaniu triakontanolu specyficznego elicitora (RIES i współaut. 1990, RIES 1991), przemawiają za udziałem endogennego triakontanolu w regulacji wzrostu roślin.

CYJANOWODÓR

Występowanie w roślinach wolnego cyjanowodoru, gazowego, niskocząsteczkowego związku nieorganicznego, a także substancji rozkładających się w roślinie z wydzielaniem wolnego cyjanowodoru (związki cyjanogenne), jest znane od niemal 200 lat (pierwsze doniesienie na ten temat — SCHRADER 1803). Zainteresowanie tymi substancjami było związane głównie z silnie toksycznym działaniem cyjanowodoru na organizmy zwierzęce; HCN jest inhibitorem wielu metaloenzymów, w tym kluczowego enzymu oddechowego — oksydazy cytochromowej. Odkrycie tak zwanej niewrażliwej na cyjanki drogi oddechowej (oddychanie alternatywne), funkcjonującej u roślin w wielu sytuacjach fizjologicznych, oraz stwierdzenie stymulacji przez cyjanowodór takich procesów, jak kiełkowanie nasion czy redukcja azotanów (DZIEWANOWSKA 1983 a, b) zwróciło uwagę na cyjanowodór jako substancję regulującą procesy fizjologiczne u roślin. Powszechność występowania tej substancji w roślinach (aczkolwiek często w stężeniach na granicy wykrywalności) oraz fakt, że HCN jest aktywny w stężeniach rzędu 10^{-6} M stwarzają podstawy, aby uważać go za kandydata na nowy hormon roślinny.

Cyjanowodór powstaje w roślinach nie tylko w wyniku hydrolizy cyjanogenów. Powstaje on na przykład z glioksalanu i hydroksyloaminy, metabolitów odpowiednio fotooddychania i szlaku redukcji azotanów. Ponadto, powstanie cząsteczki HCN towarzyszy ostatnim etapom syntezy etylenu, uznanego hormonu roślinnego. Poznano enzymy katalizujące te reakcje, jak również poznano w szczegółach drogi asymilacji cyjanowodoru, to znaczy drogi inaktywacji substancji czynnej jako trucizna albo jako endogenne regulator. Ciekawym jest, że enzymy szlaku asymilacji cyjanowodoru wykryto we wszystkich badanych organizmach z organizmem człowieka włącznie. Niestety, ich efektywność w większości organizmów jest niewystarczająca aby uchronić nas przed toksycznym działaniem HCN. Natomiast u roślin, zwłaszcza cyjanogennych (zawierających natywne cyjanogeny) zdolność do asymilacji cyjanowodoru jest wystarczająca, aby utrzymać jego stężenie na nietoksycznym, regulacyjnym poziomie.

Dlaczego więc cyjanowodór nie został dotąd uznany za hormon roślinny? Podstawową przyczyną jest ograniczona liczba danych dotyczących jego funkcji fizjologicznej. Poza regulacją oddychania i asymilacji (redukcji) azotanów wszystkie doniesienia dotyczą regulacji kiełkowania nasion i procesów z tym związanych. Wykazano obecność cyjanowodoru we wszystkich badanych nasionach, jak również stymulujący wpływ HCN na kiełkowanie (np. ESASHI i współaut. 1991). Stwierdzono również korelacje między poziomem endogennego HCN a zdolnością nasion do kiełkowania (DZIEWANOWSKA i współaut. 1983, BOGATEK i współaut. 1991) oraz udział cyjanowodoru w regulacji aktywności enzymów

katabolizmu cukrowców w kielkujących nasionach (np. BOGATEK i LEWAK 1991). Natomiast brak jest podobnych danych dotyczących, na przykład, regulacji wzrostu, kwitnienia, dojrzewania.

Inną prawdopodobną przyczyną nieuznawania cyjanowodoru za hormon roślinny jest bariera psychologiczna, podobna do tej, jaka przez wiele lat nie pozwalała uznać za hormon etyleny. W odróżnieniu od wszystkich innych hormonów (za wyjątkiem etyleny) cyjanowodor nie jest substancją stałą i nie jest związkiem o wystarczająco złożonej budowie, aby wykazywać specyficzność strukturalną. Ponadto jest on znaną, groźną trucizną. Nie jest łatwo zaakceptować obcego w dobranym gronie.

FENOLOAMIDY

Jak już wspomniano wcześniej, hormony roślinne stanowią grupę substancji wzrostowych, spełniających pewne umowne kryteria. Do roślinnych regulatorów, które są aktywne (i występują) w znacznie wyższych stężeniach niż to przyjęto dla hormonów, należą poliaminy (aminy biogenne). Najpowszechniej występującymi przedstawicielami tej grupy są putrescyna (diamina), spermidyna (triamina) i spermina (tetraamina). Ich stężenie w roślinie dochodzi do 1 mM. Spektrum aktywności fizjologicznej poliamin w roślinach w znacznym stopniu pokrywa się z zakresem działania hormonów. Obserwacje wskazujące, że ich poziom znacznie się zmienia pod wpływem takich czynników środowiskowych, jak światło, temperatura i czynniki stresowe wywołały znaczne zainteresowanie tymi substancjami w latach 80-tych. Niemniej, pomimo tendencji aby traktować je podobnie jak „klasyczne” hormony roślinne (GALSTON i SAWHNEY 1990) wydaje się, że nie ma do tego wystarczających podstaw.

Do podobnej grupy regulatorów należą fenole roślinne. Substancje te charakteryzują się olbrzymim zróżnicowaniem strukturalnym i pełnią bardzo różne role w roślinach (od roli regulacyjnej do strukturalnej). Ich stężenia znacznie przekraczają zakres przyjęty dla hormonów co, łącznie z ograniczonym (niekiedy do jednego gatunku) rozpowszechnieniem w roślinach fenoli wykazujących działanie regulacyjne, zdecydowanie nie pozwala ich traktować jako hormonów roślinnych (np. KEFELI i DASHEK 1984).

Na tym tle na specjalną uwagę zasługują fenoloamidy, substancje zawierające elementy strukturalne zarówno amin biogennych, jak i fenoli i powstające z tych związków. Fenoloamidy występują powszechnie w roślinach w stężeniach nanomolarnych (podobnie jak hormony) i zmiany ich zawartości są skorelowane z takimi zjawiskami, jak odpowiedź na infekcje wirusowe, powstawanie i rozwój kwiatów, określanie płci i tuberyzacja (np. MARTIN-TANGUY 1985). Zróżnicowanie strukturalne poznanych dotąd fenoloamidów jest bardzo duże. Jest ono wynikiem zróżnicowania struktury fenoli oraz faktu, że obok „typowych” poliamin mogą wchodzić w ich skład aminy — produkty dekarboksylacji aminokwasów, jak na przykład tyramina (NEGREL i MARTIN 1984). To zróżnicowanie strukturalne odróżnia fenoloamidy od hormonów roślinnych; nawet w najliczniejszej grupie giberelin wszyscy przedstawiciele charakteryzują się tym samym szkieletem węglowym. Przeciwno uznaniu już teraz fenoloamidów za hormony przemawia jednak przede wszystkim brak danych dotyczących efektów biologicznych feno-

loamidów egzogennych oraz brak doświadczeń polegających na modyfikacji ich endogennego poziomu.

SUBSTANCJE UCZESTNICZĄCE W REAKCJACH ODPORNOŚCIOWYCH ROŚLIN

Infekcja roślin przez patogeny aktywuje mechanizmy obronne prowadzące do powstania różnego typu odporności. W powstawaniu odporności biorą udział mniej, lub bardziej specyficzne substancje chemiczne (elicytory). Wydaje się, że przynajmniej niektóre fenoloamidy mogą pełnić tę rolę. W ostatnich latach stwierdzano wielokrotnie wzrost poziomu kwasu salicylowego (związek fenolowy) i polipeptydu systeminy skorelowany z powstawaniem tak zwanej odporności systemicznej roślin. Traktowanie kwasem salicylowym roślin nie porażonych patogenem powodowało indukcję syntezy specyficznych białek powstających w wyniku infekcji i zwiększało odporność tych roślin. Pomimo niskich stężeń aktywnych tych substancji i powszechnego ich występowania w zainfekowanych roślinach, nie wydaje się, aby można je było traktować jako kandydatów na hormony roślinne. Co prawda wykazano wpływ egzogenego kwasu salicylowego na indukcję kwitnienia i opóźnianie starzenia niektórych kwiatów (róże), hamowanie kiełkowania nasion niektórych gatunków, indukcję alternatywnej (cyjanoodpornej) drogi oddechowej i ograniczanie transpiracji. Niemniej, oznaczenia zmian poziomu endogenego kwasu salicylowego nie wydają się potwierdzać udziału tego związku w regulacji tych procesów. Przekonywająco udowodnione spektrum działania kwasu salicylowego jest ograniczone do jednego rodzaju reakcji rośliny — indukcji systemicznej odporności na patogeny (RASKIN 1992). Wyniki doświadczeń z roślinami transgenicznymi pozbawionymi zdolności gromadzenia tego związku (VERNOOIJ i współaut. 1994) przemawiają przeciw uznaniu kwasu salicylowego za hormon roślinny i zdają się wskazywać na jego rolę w łańcuchu transdukcji sygnału na terenie komórki.

HORMONY ZWIERZĘCE I ICH ANALOGI

Pomimo stwierdzania wielu istotnych różnic między naturą, budową chemiczną i sposobem działania hormonów roślinnych i zwierzęcych, nauka o hormonach roślinnych od lat idzie tropem szybciej rozwijającej się (znacznie lepiej finansowanej) nauki o hormonach zwierzęcych (endokrynologii). Jednym z przejawów tej tendencji są poszukiwania w roślinach substancji o budowie podobnej lub identycznej do znanych hormonów zwierzęcych i badanie funkcji tych związków w organizmie roślinnym. Wykryto w roślinach hormony steroidowe, prostaglandyny (SANIEWSKI 1989) i acetylocholinę (TRETYN i współaut. 1988) oraz stwierdzono zdolność tych substancji do udziału w regulacji niektórych procesów fizjologicznych, takich jak na przykład wzrost i rozwój generatywny, a także w odpowiedzi roślin na bodźce środowiskowe. Stosunkowo wiele uwagi poświęca się steroidom występującym u krzyżowych — brassinosterolom, wśród których występują związki aktywne w nanomolarnych stężeniach uczestniczące w regulacji wzrostu i reakcjach tropicznych roślin (np. SASSE 1985). W świetle dotychczasowych danych nie wydaje się, aby substancje te spełniały podstawowe kryterium przyjęte dla hormonów roślinnych, to znaczy powszechność występowania. Obszerny artykuł przeglądowy na ten temat ukazał się niedawno na

łamach *Kosmosu* (CZERPAK 1993) i tam zainteresowany Czytelnik może znaleźć wiele informacji szczegółowych.

CO DECYDUJE O STĘŻENIU HORMONU W KOMÓRCE ROŚLINNEJ?

Jak już wspomniano, wielokrotnie stwierdzano zależność między stężeniem hormonu, którym traktowano roślinę, a wielkością odpowiedzi fizjologicznej. Podobnie, wielokrotnie wykazywano korelacje między stężeniem hormonu w tkance i intensywnością procesu regulowanego przez ten hormon. Niemniej, zarówno możliwości techniczne traktowania hormonami pojedynczych komórek w tkance, jak i określenia stężenia hormonu w konkretnych komórkach, czy grupach komórek, są ograniczone. Stąd niewielka znajomość tego, jak wygląda regulacja hormonalna na poziomie komórki. Badania prowadzone na kulturach komórkowych (np. BOUZAYEN i współaut. 1990) lub na protoplastach izolowanych z tkanek wykazujących charakterystyczną odpowiedź na konkretny hormon (np. komórki warstwy aleuronowej zbóż odpowiadające na giberelinę indukacją syntezy α -amylazy, JACOBSEN i KNOX 1973) dostarczają danych wycinkowych. Podobnie, stosowanie przeciwciał do oznaczania dystrybucji hormonu w tkance (a nawet na terenie komórki) dostarcza danych obarczonych błędem metodycznym; przeciwciała najczęściej nie rozróżniają wolnych hormonów od związanych, nieaktywnych ich form. Utrudnia to, jeśli nie uniemożliwia, interpretację takich danych. Stąd też nieliczne dane dotyczące poziomu hormonów w komórkach roślinnych należy traktować jako dane wstępne lub przybliżone.

Jest rzeczą oczywistą, że o aktualnym poziomie hormonu w tkance (a także w komórce) decyduje w znacznym stopniu równowaga między intensywnością jego syntezy i degradacji. Innym, równoległym działającym mechanizmem jest odwracalna inaktywacja hormonów; powstawanie nieczynnych połączeń hormonów z cukrami, aminokwasami i peptydami oraz z innymi związkami niskocząsteczkowymi. Powstające połączenia, tak zwane koniugaty hormonów, stanowią rezerwową pulę nieaktywnego związku, z którego czynny hormon może być uwolniony niewielkim kosztem metabolicznym. Równowaga między powstawaniem koniugatów i ich rozpadem (najczęściej hydrolitycznym) jest drugim ze sposobów ustalania poziomu hormonu w komórce. Wreszcie trzecim sposobem — jest równowaga między intensywnością dopływu hormonu do komórki (tkanki) z innych tkanek i szybkością jego odpływu do innych obszarów rośliny (równowaga transportu).

Aczkolwiek procesy syntezy i degradacji hormonów poznano w znacznym stopniu w ubiegłych latach, ich regulacja pozostaje ciągle przedmiotem licznych dociekań. W znacznie mniejszym stopniu poznano dotąd enzymy uczestniczące w powstawaniu koniugatów, a na przykład próby wykrycia specyficznych glikozydaz hydrolizujących glikozydy i/lub estry glikozydowe giberelin nie zostały uwieńczone powodzeniem (np. SCHLIEMANN 1986). Wydaje się, że dominującymi trendami badań nad regulacją poziomu hormonów w roślinie, prowadzonych w ostatnich latach, są: (1) śledzenie mechanizmów powodujących zmiany poziomu hormonów w wyniku działania czynników środowiska takich jak światło, stosunki wodne, zmiany temperatury, infekcje patogenów i inne warunki stre-

sowe, oraz (2) badanie regulacji biosyntezy i degradacji hormonów przez inne hormony. Udział hormonów w reakcji roślin na stresowe czynniki środowiska jest przedmiotem innego, interesującego opracowania w tym zeszycie *Kosmosu* (KACPERSKA 1995). Regulacja biosyntezy etylenu przez auksynę należy do najlepiej poznanych przykładów oddziaływania jednego hormonu na powstawanie innego (np. KENDE 1993), niemniej mechanizm wielu z obserwowanych (i wcześniej wspomnianych) nieaddytywnych (synergistycznych) efektów kilku hormonów podanych łącznie jest interpretowany jako wynik regulacji poziomu jednego hormonu przez inny (np. DERMASTIA i współaut. 1994).

Hormony przemieszczają się w roślinie zarówno w ksylemie, jak i we floemie. Z dróg tych korzystają zapewne w znacznie mniejszym stopniu etylen i ester metylowy kwasu jasmonowego (oraz cyjanowodór), które jako substancje gazowe i niepolarne przemieszczają się na drodze dyfuzji przez błony komórkowe. Jedną z osobliwości przemieszczania się hormonów w roślinie jest tak zwany transport polarny, który wykazano w sposób nie budzący wątpliwości jedynie w przypadku auksyn. Transport ten zachodzi w sposób ukierunkowany bazypetalnie (w kierunku fizjologicznej podstawy rośliny), jest niezależny od przemieszczania się hormonu w naczyniach i wymaga nakładu energii metabolicznej. Transport polarny odgrywa zasadniczą rolę w determinacji polarności organizmu i jego skoordynowanego, harmonijnego rozwoju. Jego mechanizm polega na niesymetrycznym występowaniu na błonie komórkowej białek nośnikowych, umożliwiających przenoszenie zjonizowanej auksyny z cytoplazmy do apoplastu (HERTEL 1983). Wyizolowano białka wiążące auksynę, wykazano, że ich zdolność do wiązania hormonu jest blokowana przez specyficzne inhibitory polarnego transportu auksyny, poznano strukturę tych białek, a także zlokalizowano je (stosując przeciwciała monoklonalne) w bazalnej części komórek (JACOBS i SHORT 1986). Ta ostatnia obserwacja stanowi potwierdzenie udziału tych białek w polarnym transporcie auksyny.

O kierunku translokacji decyduje miejsce produkcji hormonu, a w jeszcze większym stopniu lokalizacja i właściwości komórek (tkanek) docelowych, w których hormony wykonują swoje zadanie. Gdy intensywność degradacji, koniugacji i eksportu hormonu z komórki jest niewielka następuje wzrost jego stężenia (gromadzenie się hormonu). Mówimy wtedy o „sekwestracji” hormonu w komórce. Gdy komórka taka jest zdolna do fizjologicznej odpowiedzi na zwiększone stężenie hormonu — mówimy o komórce „kompetentnej”. Wspomniano już wcześniej, że ten sam hormon może wywoływać różne odpowiedzi zależnie od tkanki, w której działa i zależnie od sytuacji fizjologicznej. Stan fizjologiczny komórki wyrażający się zdolnością do konkretnej odpowiedzi na dany hormon nazywamy „kompetencją” tej komórki. Zdolność do sekwestracji hormonu w komórkach o wysokiej kompetencji w stosunku do tego hormonu jest warunkiem pełnienia przez tę komórkę roli „komórki docelowej” (ang. target cell), to znaczy komórki odpowiadającej w sposób specyficzny na sygnał hormonalny. Jak dotąd poznano i scharakteryzowano niewiele takich komórek docelowych w roślinach. Do zbadanych najbardziej szczegółowo należą: komórki warstwy aleuronowej ziarniaków zbóż syntetyzujące α -amylazę w odpowiedzi na giberelinę (np. JACOBSEN i KNOX 1973), komórki strefy odcinającej liści, produkujące celulazę pod wpływem etylenu (DEL CAMPILLO i współaut. 1990) i komórki szparkowe reagu-

jące na kwas abscysynowy (MACROBIE 1991). Wykazanie obecności kompetentnych komórek docelowych stanowi odpowiedź na jedno z pytań postawionych we wstępie do niniejszego opracowania; aktualne stężenie hormonu nie jest jedynym parametrem decydującym o jego efekcie. Innym, równie ważnym parametrem, jest kompetencja komórek. Problemy zarówno teoretyczne, jak i metodyczne, związane z mechanizmami powstawania kompetencji komórek ze zmianami kompetencji w trakcie rozwoju rośliny i ich znaczeniem biologicznym zajmują ciągle ważne miejsce we współczesnych badaniach nad hormonami (np. TREWAVAS 1991, BRADFORD i TREWAVAS 1994).

RECEPTORY HORMONÓW

Kompetentne, docelowe komórki roślinne muszą być zdolne do odróżniania cząsteczki hormonu od setek tysięcy docierających do nich innych związków chemicznych. Rozpoznawanie naturalnych hormonów musi być na tyle precyzyjne, aby odróżnić je od syntetycznych analogów o nieznacznie zmodyfikowanej strukturze, a także od nieaktywnych, związanych form hormonów (koniugatów). Do tak precyzyjnego molekularnego rozpoznawania substancji niskocząsteczkowych są zdolne białka i stąd koncepcja białkowych receptorów hormonów roślinnych. Zgodnie z tą koncepcją, hormon docierający do kompetentnej komórki natrafia na jej powierzchni na specyficzne białko, z którym wiąże się w kompleks za pomocą odwracalnego wiązania niekowalencyjnego. Białko receptorowe nabywa aktywność biologiczną w wyniku związania się z hormonem, to znaczy inicjuje ciąg zdarzeń prowadzący do odpowiedzi fizjologicznej.

Koncepcja receptorów hormonów w sposób oczywisty wyjaśnia różnice we wrażliwości różnych tkanek na hormon i zmiany wrażliwości tej tkanki w czasie ontogenezy; komórki tych tkanek zawierają różne ilości białka receptorowego. Koncepcja ta tłumaczy także kompetencję komórek; zależy ona od zdolności do sekwestracji hormonu i od ilości specyficznego receptora. Zakładając, że ten sam hormon może tworzyć aktywne kompleksy z różnymi receptorami i w ten sposób inicjować ciąg zdarzeń prowadzących do różnych odpowiedzi, wyjaśnia pleiotropizm działania hormonów roślinnych. Wreszcie można przyjąć, że jedna cząsteczka białka receptorowego posiada dwa (lub więcej) miejsca aktywne, zdolne do wiązania różnych hormonów, podobnie jak ma to miejsce w przypadku enzymów allosterycznych. Tłumaczyłoby to często obserwowane współdziałanie różnych hormonów w regulacji tego samego procesu.

Omawianą koncepcję potwierdzono w ostatnich latach w wyniku szeregu doświadczeń opartych głównie na badaniu zdolności wiązania hormonów (znakowanych radioizotopami) przez tkanki roślinne, izolowane komórki, frakcje komórkowe i indywidualne białka. Wiązanie takie powinno spełniać następujące warunki, aby mogło być przypisane receptorowi w sensie omawianej koncepcji: musi ono być: (1) odwracalne, (2) o wysokim powinowactwie do hormonu występującego w bardzo niskim stężeniu, (3) wysycane przy podobnym stężeniu hormonu jak odpowiedź fizjologiczna, (4) specyficzne w stosunku do hormonów tej samej grupy i ich aktywnych analogów, (5) ograniczone do tkanek kompetentnych w stosunku do badanego hormonu i (6) związane ze specyficzną odpowie-

dział rośliny na hormon. W wyniku tych badań wyizolowano i scharakteryzowano szereg białek spełniających większość powyższych kryteriów. Najtrudniej jest spełnić kluczowe, ostatnie z wymienionych kryteriów, które jest właściwie wykazaniem aktywności biologicznej kompleksu hormon — receptor.

RECEPTORY AUKSYN

Najlepiej poznanymi receptorami hormonów roślinnych są białka wiążące auksynę (JONES 1994). Z pędów kukurydzy wyodrębniono szereg takich białek (zwanych ABP — auxin binding proteins), które spełniały pierwszych pięć wymienionych wyżej kryteriów. Jednym z tych białek okazał się nośnik auksyny uczestniczący w jej polarnym transporcie, omówiony poprzednio. Natomiast dwa następne, dobrze scharakteryzowane ABP wydają się pełnić rolę receptorów odpowiedzialnych za odpowiedzi wzrostowe rośliny. Oba te białka wykazują znaczne podobieństwo chemiczne i immunologiczne, różniąc się nieco specyficznością wiązania auksyn. Na terenie komórki są one związane z retikulum endoplazmatycznym oraz plazmolemą i, być może, z tonoplastem. Pewne wątpliwości budzi rola biologiczna ABP związanego z błonami retikulum endoplazmatycznego; od receptora hormonu oczekuje się bowiem lokalizacji na zewnętrznej stronie błony komórkowej. Wydaje się, że właściwą rolę receptora auksyny pełni ABP plazmolemy, podczas gdy ABP związany z retikulum jest jego prekursorem nieaktywnym *in situ*. Występowanie podobnych ABP wykazano u innych roślin (np. u tytoniu — LIBBENGA i MENNES 1987), aczkolwiek ich badania są zaawansowane w mniejszym stopniu.

Receptor auksyny wyizolowany z kukurydzy jest dimerem o masie 40–45 KD, zbudowanym z dwóch identycznych 20–22 KD podjednostek. Otrzymano monoklonalne przeciwciała w stosunku do tych podjednostek i posługując się nimi wyselekcjonowano z biblioteki cDNA siewek kukurydzy cDNA dla ABP, który następnie sklonowano i zsekwencjonowano. Homologiczne sekwencje DNA znaleziono w genomie tytoniu, *Arabidopsis thaliana* i truskawki, co pozwoliło następnie na zlokalizowanie genów kodujących ABP na poszczególnych chromosomach tych roślin. Ustalono również w szczegółach strukturę polipeptydu ABP, która wykazuje znaczne podobieństwo u wszystkich badanych roślin jedno- i dwuliściennych (JONES 1994).

Wykazano znaczną zgodność rozmieszczenia receptora auksyny w tkankach z ich wrażliwością na ten hormon. Stwierdzono na przykład, że wzrost apikalnych segmentów koleoptyli owsa jest silniej stymulowany przez auksynę niż wzrost części bazalnych wykazując jednocześnie, że części wierzchołkowe zawierają znacznie więcej ABP (oznaczonego immunologicznie) niż części bazalne. Wydaje się, że najbardziej przekonującą wskazówką, że ABP jest rzeczywiście funkcjonalnym receptorem auksyny, jest obserwacja, że zablokowanie ABP w koleoptylach kukurydzy przez podanie specyficznych przeciwciał hamuje wzrost indukowany przez auksynę (ROBERTS i HOOLEY 1988). Również pośrednich dowodów dostarczają wyniki szeroko zakrojonych badań nad udziałem ABP w powstawaniu indukowanej przez auksynę polaryzacji błon (np. BARBIER-BORYGOO i współaut. 1991). Pomimo intensywnych badań ostatnich lat, prowadzonych również z użyciem mutantów (REID 1993), brakuje bezpośrednich dowodów

na pełnienie przez kompleks ABP-auksyna roli biologicznej (kryterium 6 z wymienionych na początku tej części artykułu).

RECEPTORY GIBERELIN

Receptory innych hormonów roślinnych poznano w niewielkim stopniu. Wykazano obecność miejsc receptorowych giberelin w kilku tkankach wyróżniających się jednoznacznie odpowiedzią na ten hormon (np. hypokotyle ogórka, międzywęzła grochu, komórki aleuronowe jęczmienia, STODDART 1986). Wobec antagonistycznego działania giberelin i kwasu abscysynowego na indukcję syntezy szeregu enzymów hydrolitycznych w tkance aleuronowej ziarniaków zbóż na uwagę zasługuje obserwacja, że wiązanie gibereliny przez potencjalne receptory zlokalizowane w plazmolemie ulega hamowaniu przez kwas abscysynowy (NOLAN i HO 1988, a także SKRIVER i współaut. 1991). Otrzymanie mutantów niewrażliwych na giberelinę dostarczyło w ostatnich latach dodatkowych, aczkolwiek pośrednich, dowodów na występowanie specyficznych receptorów tego hormonu. Mutanty takie otrzymano dla szeregu roślin, w tym pszenicy, kukurydzy, grochu i *Arabidopsis* (SRIVASTAWA i SECHLEY 1991). Są one zdolne do syntezy gibereliny, ale nie zachodzą w nich typowe procesy regulowane przez ten hormon, takie jak wzrost (rośliny karłowate) i synteza α -amylazy, nawet po podaniu egzogennej gibereliny. W przypadkach, gdy mutacja dotyczy jednego genu (np. mutant D8 kukurydzy lub mutant Rht3 pszenicy) sugeruje się, że dotyczy ona genu kodującego białko receptorowe, nie wykluczając jednak na razie innych możliwości (np. gen kodujący syntezę antagonisty giberelin, blokującego właściwy receptor).

RECEPTORY CYTOKININ

Również badania nad receptorami cytokinin znajdują się w fazie początkowej. Na początku lat 80-tych wyizolowano z zarodków pszenicy białko o wysokim powinowactwie do cytokinin, dla którego określono strukturę i zidentyfikowano kodujący je gen (ERION i FOX 1981). Okazało się jednak, że występowanie tego białka jest ograniczone do tkanek zapasowych, a ponadto, że jest ono niesłychanie podobne do białek zapasowych nasion, co oczywiście uniemożliwiło traktowanie go jako potencjalnego, funkcjonalnego receptora cytokinin. Spośród późniejszych badań zmierzających do identyfikacji receptorów cytokinin wymienić można izolację z liści tytoniu białka specyficznie wiążącego substancje o aktywności cytokinin (MAMOTANI i TSUJI 1992). Kinetyka wiązania cytokinin przez to białko, dla którego określono masę cząsteczkową na 31 kDa, jest podobna do kinetyki wiązania hormonów przez receptory, niemniej brak jest innych dowodów świadczących o jego roli fizjologicznej jako receptora cytokinin. Nie uzyskano dotąd mutantów niewrażliwych na cytokiny, u których można by się spodziewać zablokowania syntezy receptora.

RECEPTORY KWASU ABCYSYNOWEGO

Podobnie jak w przypadku giberelin, badania nad mutantami dostarczyły argumentów za występowaniem receptorów kwasu abscysynowego. Niewrażliwe na ten hormon mutanty *Arabidopsis thaliana* są zdolne do wzrostu w obecności

kwasu abscysynowego w stężeniach hamujących wzrost szczepu dzikiego, wykazują zaburzenia gospodarki wodnej, spoczynku nasion i innych typowych odpowiedzi na ten hormon. Jest wysoce prawdopodobne, że mutacja dotyczy genu specyficznego receptora kwasu abscysynowego (REID 1993). Innych dowodów, wskazujących pośrednio na obecność specyficznych receptorów kwasu abscysynowego dostarczyły wcześniejsze doświadczenia nad wiązaniem hormonu przez protoplasty komórek szparkowych, które są dla niego komórkami docelowymi (HORNBERG i WEILER 1984).

RECEPTORY ETYLENU

Również w przypadku etylenu dotychczasowe dane wskazują jedynie w sposób pośredni na obecność specyficznych receptorów tego hormonu. Pomimo, że w wielu tkankach roślinnych wykazano zdolność do wiązania etylenu, to tylko z liścieni *Phaseolus vulgaris* i *P. aureus* wyodrębniono i zidentyfikowano białko o wysokim powinowactwie do tego hormonu (HALL 1986). Białko to, o masie 50–60 KD, wiązało etylen ze stosunkowo niewielką szybkością i kinetyka wiązania odbiegała od typowej kinetyki oddziaływania hormonu z receptorem, co może być wynikiem lotności etylenu. Ponadto wykazano, że na terenie komórki białko to jest związane z retikulum endoplazmatycznym i ciałkami białkowymi. Nie powinno to jednak utrudniać pełnienia przez nie roli receptora, gdyż etylen dyfunduje swobodnie przez błony. Badania nad niewrażliwymi na etylen mutantami *Arabidopsis* doprowadziły do identyfikacji mutantu ETR1, który najprawdopodobniej utracił zdolność do syntezy receptora tego hormonu (BOWLER i CHUA 1994). Zmutowane rośliny mają znacznie niższą zdolność do wiązania etylenu niż szczep dziki i wykazują zaburzenia we wzroście i morfologii hypocotyli. Zidentyfikowano, zsekwencjonowano i scharakteryzowano gen *etr1*, a w wydedukowanej strukturze białka receptora wyróżniono domeny funkcjonalne, odpowiedzialne za wiązanie etylenu (domena N-terminalna) i za przekazywanie sygnału na system wtórnych przekaźników (domena C-terminalna). Podobne badania nad niewrażliwymi na etylen mutantami są prowadzone także na innych roślinach (np. na pomidorze, LANAHAN i współaut. 1994).

Intensywność i zakres prac zmierzających do poznania funkcjonalnych receptorów hormonów roślinnych, prowadzonych w ostatnich latach, pozwalają sądzić, że niedługo przyjdzie czekać na ich jednoznaczne wyniki. Wydaje się, że zastosowanie technik inżynierii genetycznej (uzyskanie roślin transgenicznych zawierających poznane receptory lub ich pozbawione) pozwoli na precyzyjne określenie ich funkcji fizjologicznych.

MECHANIZM DZIAŁANIA HORMONÓW ROŚLINNYCH

Powstanie kompleksu hormonu z jego specyficznym receptorem jest pierwszym zdarzeniem warunkującym odpowiedź na ten hormon. Badanie kinetyki tej odpowiedzi pozwoliło na wyróżnienie tak zwanych odpowiedzi szybkich, rozpoczynających się po kilku lub kilkunastu minutach od podania hormonu i odpowiedzi powolnych, których realizacja następuje po wyraźnie dłuższym czasie, mierzonym w dziesiątkach minut lub w godzinach. W odpowiedziach

szybkich kompleks hormon-receptor uczestniczy bezpośrednio, lub niemal bezpośrednio, w realizacji regulowanego procesu. Natomiast w odpowiedziach powolnych (długoterminowych) powstanie tego kompleksu inicjuje funkcjonowanie łańcucha transdukcji sygnału, który prowadzi do modyfikacji selektywnej ekspresji genów kodujących białka uczestniczące w realizacji procesu fizjologicznego.

HORMONALNA REGULACJA TRANSPORTU JONÓW

Szybkie odpowiedzi rozpoczynają się natychmiast, gdy hormon dotrze do komórki docelowej i zwiąże się z receptorem. Ten tak krótki okres między podaniem hormonu, a początkiem odpowiedzi wyklucza udział szeregu przemian metabolicznych i skomplikowanego łańcucha transdukcji. Szybkie odpowiedzi są wynikiem zmian konformacyjnych receptora, wywołanych przez hormon, lub zmian w bezpośrednim otoczeniu cząsteczki receptora (najczęściej w plazmolemie). Do najlepiej poznanych odpowiedzi tego typu należy hormonalna regulacja przemieszczania się jonów przez błony, niemniej na przykład aktywacja (lub dezaktywacja) białek enzymatycznych przez hormony również mieści się w tej kategorii.

W ostatnim dwudziestolecu ukazało się kilkadziesiąt prac, często kontrowersyjnych (np. KUTSCHERA 1994), na temat tak zwanego wzrostu kwasowego. Nowe dane doświadczalne potwierdziły jednoznacznie, że indukowany przez auksynę wzrost objętościowy komórki polega na aktywowaniu przez ten hormon pompy zlokalizowanej w plazmolemie, która wykorzystuje energię metaboliczną (ATP) do przemieszczania jonów wodorowych (protonów) z komórki do apoplastu, powodując zakwaszenie ściany komórkowej (np. RAYLE i CLELAND 1992). Mechanizm ten jest wspomagany przez indukowaną (również przy udziale auksyny) egzocytozę pęcherzyków o kwaśnej zawartości (HAGER i współaut. 1991). Zakwaszenie ściany komórkowej powoduje rozluźnienie jej struktury (m.in. rozerwanie wiązań wodorowych), zmniejszenie ciśnienia turgorowego i wzrost komórki.

Innym, intensywnie badanym w ostatnich latach, rodzajem szybkich odpowiedzi na hormony jest indukowany przez kwas abscysynowy wpływ jonów potasowych z komórek szparkowych w warunkach suszy. Proces ten stanowi element mechanizmu ruchu szparek i został bardziej szczegółowo omówiony w równoległym opracowaniu w tym samym zeszycie *Kosmosu* (KACPERSKA 1995).

HORMONALNA REGULACJA SELEKTYWNEJ EKSPRESJI GENÓW

Podstawową drogą, na której przebiegają powolne odpowiedzi na hormon, jest modyfikacja poziomu specyficznych białek komórkowych. Może ona być wynikiem indukcji lub zablokowania syntezy tych białek (na etapie transkrypcji, translacji lub posttranslacyjnego przekształcania cząsteczki), lub też zmian intensywności ich degradacji (całkowita lub ograniczona proteoliza). W ostatnich latach najwięcej uwagi poświęcono mechanizmom regulacji hormonalnej procesu transkrypcji. Jest to, bez wątpienia, wynikiem zarówno roli, jaką pełnią specyficzne białka komórkowe we wzroście i różnicowaniu, jak i burzliwego rozwoju w tym czasie metod biologii molekularnej. Skoncentrowanie badań

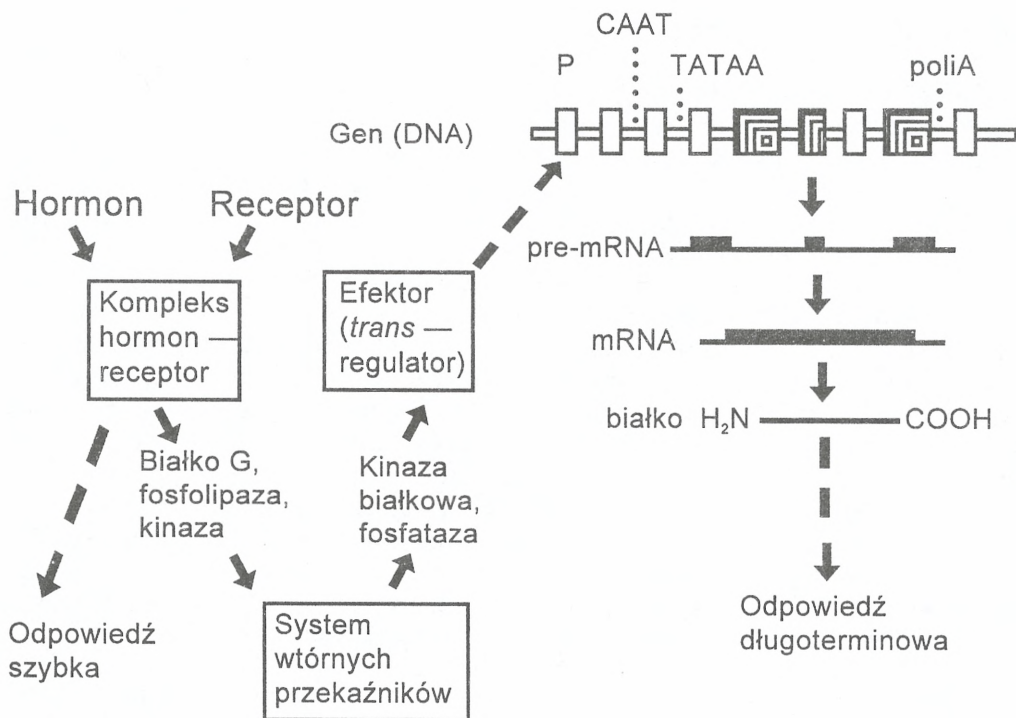
w tym kierunku odsunęło w cień dawniejsze koncepcje tłumaczące mechanizm działania hormonów jako aktywność enzymatyczną kompleksu hormon-receptor, lub jako modyfikację przez hormony struktury i właściwości błon i białek enzymatycznych (np. aktywności zależnej od DNA polimerazy RNA). Niemniej, wyniki tych badań nie zdeaktualizowały całkowicie tych dawniejszych koncepcji.

Porównanie składu białek roślin traktowanych hormonem i roślin kontrolnych, a zwłaszcza porównanie włączania ^{14}C aminokwasów do białek takich roślin wskazuje, że regulacja hormonalna dotyczy ułamka procentu wszystkich białek. Na przykład wśród około 40 000 rozróżnionych elektroforetycznie białek, występujących w hypocotylach soi, tylko kilkanaście pojawia się, lub zanika w roślinach traktowanych auksyną (ZURFLUH i GUILFOYLE 1980). Podobne wyniki uzyskano rozdzielając elektroforetycznie zdolny do translacji mRNA z roślin traktowanych (lub nie) auksyną lub etylenem (ZURFLUH i GUILFOYLE 1982). Świadczy to o bardzo precyzyjnym sposobie tej regulacji. Przypisanie poszczególnym indukowanym lub reprimowanym przez hormon białkom konkretnych funkcji fizjologicznych natrafia na poważne trudności. Stosunkowo łatwo jest wnioskować o tej funkcji, jeśli uda się wykazać aktywność enzymatyczną białka, jak ma to miejsce, na przykład, w przypadku indukowanej przez auksynę syntezy celulazy w epikotylach grochu lub indukowanej przez giberelinę syntezy α -amylazy w ziarniakach zbóż (np. HUANG i współaut. 1993). Natomiast w innych sytuacjach wnioskowanie jest oparte na korelacjach między lokalizacją białka w tkance i jej wrażliwością na hormon: na przykład indukowane przez auksynę białka występują głównie w intensywnie rosnących częściach hypocotyła soi, co pozwala postulować ich udział w mechanizmach wzrostu. Innym rodzajem korelacji jest stwierdzenie, że zmiany w ekspresji konkretnych genów, zachodzące pod wpływem bodźca środowiskowego, są identyczne ze zmianami powodowanymi przez hormon. Na przykład indukowane przez suszę niektóre białka siewek są identyczne z białkami indukowanymi w nasionach przez kwas abscysynowy podczas późnej embriogenezy, co sugeruje ich udział w powstawaniu tolerancji na dehydratację (np. FINCHSAVAGE i współaut. 1994). W przypadku zidentyfikowania i zsekwencjonowania genu, którego ekspresja jest regulowana przez hormon, informacji o roli biologicznej produktu tego genu może dostarczyć porównanie jego sekwencji ze znanymi sekwencjami funkcjonalnych genów innych organizmów i stwierdzenie homologii (szereg przykładów znajdzie Czytelnik w pracy przeglądowej CHANDLER i ROBERTSON 1994). Potwierdzeniem tak zdobytych informacji będzie jednak dopiero sklonowanie genu, otrzymanie jego produktu w systemie *in vitro* i wykazanie funkcji fizjologicznej syntetycznego białka.

Skutkiem powstania kompleksu hormonu z receptorem jest uruchomienie łańcucha transdukcji sygnału, to znaczy przekazanie informacji z plazmolemy (lokalizacja receptora) do jądra komórkowego (lokalizacja genu). Funkcjonowanie łańcucha transdukcji umożliwia równocześnie amplifikację (wzmocnienie) tej informacji. Roślinne łańcuchy transdukcji sygnału (kaskady informacyjne) są podobne do tych, jakie funkcjonują w organizmach zwierzęcych. Uczestniczą w nich tak zwane białka G, jony wapniowe, fosforany inozytolu, diacyloglicerole i szereg innych tak zwanych wtórnych przekaźników sygnału. Są one uruchamiane nie tylko przez hormony ale także w wyniku działania innych nośników

informacji (światło, infekcja patogenu, inne czynniki stresowe). Łańcuchy transdukcji sygnału przedstawiano wielokrotnie w ostatnich latach w artykułach przeglądowych, również na łamach *Kosmosu* (np. BARAŃSKA 1993, BUSH 1993, COTE i CRAIN 1993, DROBAK 1993, NOWAK 1988, VERHEY i LOMAX 1993), toteż pominiemy ich szczegółowe omawianie w tym opracowaniu.

Pierwszym ogniwem łańcucha transdukcji sygnału jest powstanie kompleksu hormon-receptor białkowy. Ostatnim elementem łańcucha, bezpośrednio uczestniczącym w aktywacji (lub dezaktywacji) genu, jest białkowy czynnik regulujący proces transkrypcji konkretnego odcinka DNA (działający w sposób *trans*). Aktywacja tego czynnika jest wynikiem fosforylacji, lub defosforylacji już istniejących białek, na skutek aktywacji odpowiednich kinaz białkowych lub/i fosfataz przez końcowe ogniwa łańcucha transdukcji sygnału, co przedstawiono schematycznie na rysunku 1. Pojawienie się aktywnego czynnika transkrypcyjnego może także być wynikiem bardziej złożonych procesów, jak na przykład



Rys. 1. Podstawowe drogi działania hormonów. Utworzenie kompleksu hormon-receptor jest warunkiem uruchomienia różnych mechanizmów. Regulacja transkrypcji jest najczęściej badanym mechanizmem kontroli selektywnej ekspresji genu. P — promotor, w regionie którego znajduje się sekwencja nukleotydów, warunkująca odpowiedź na efektor (czynnik transkrypcyjny), powstający w wyniku uruchomienia przez hormon łańcucha transdukcji sygnału.

agregacja już istniejących, nieczynnych białek, lub indukcja syntezy białka — czynnika transkrypcyjnego.

Badanie czynników *trans*-działających na transkrypcję genów, uczestniczących w fizjologicznej odpowiedzi na hormon roślinny, stało się możliwe dzięki poznaniu w strukturze tych genów sekwencji nukleotydów odbierających informację docierającą w postaci zależnych od hormonów czynników transkrypcyjnych. Sekwencje te, (elementy działające *cis*) najczęściej sąsiadują z regionem promotorowym genu (rys. 1), lecz mogą także znajdować się w pobliżu krańca 3' kodującego odcinka DNA. Ich aktywacja prowadzi do indukcji, wzmocnienia (enhancer), lub wygaszenia (silencer) transkrypcji genu.

Sekwencje nukleotydów uczestniczące w hormonalnej regulacji ekspresji szeregu genów (elementy działające *cis*) poznano między innymi u zbóż, tytoniu, *Brassica* i *Arabidopsis thaliana*. Element warunkujący odpowiedź na kwas abscysynowy (ABRE — abscisic acid response element) zawiera minimum 11 nukleotydów i towarzyszy promotorom kilku poznanych genów kodujących białka indukowane przez ten hormon (GUILTINAN i współaut. 1990, SKRIVER i współaut. 1991, BAKER i współaut. 1994). Podobnie, sekwencja odpowiedzialna za reakcję na etylen (ERE — ethylene-responsive element) w genach β -1,3-glukanazy i chitynazy tytoniu składa się z 11 par zasad (OHME-TAKAGI i SHINSHI 1995), różni się ona jednak od ERE genów innych białek w innych roślinach. Natomiast element warunkujący odpowiedź na giberelinę (GARE — gibberellic acid response element) w jednym z genów α -amylazy (Amy32b) zawiera zaledwie 6 nukleotydów (SUTLIFF i współaut. 1993, ROGERS i współaut. 1994). Wydaje się zaskakująca ta stosunkowo prosta struktura *cis*-elementów odpowiedzialnych za hormonalną regulację ekspresji genów.

Obecność zależnych od hormonów czynników transkrypcyjnych można wykazać poddając elektroforezie fragmenty DNA zawierające elementy *cis*-działające, omówione powyżej, w obecności rozfrakcjonowanych ekstraktów białkowych z jąder roślin traktowanych hormonem (lub roślin nietraktowanych). Wiązanie się białka z elementem *cis* powoduje spowolnienie przemieszczania się DNA podczas elektroforezy. Wykryto szereg takich *trans*-działających czynników transkrypcyjnych, powstających w odpowiedzi na giberelinę (SUTLIFF i współaut. 1993), etylen (OHME-TAKAGI i SHINSHI 1995) i kwas abscysynowy (GUILTINAN i współaut. 1990). Niektóre z nich sklonowano i zsekwencjonowano, a wydedukowaną sekwencję aminokwasów polipeptydu porównano z sekwencją znanych czynników transkrypcyjnych. Tylko w przypadku jednego z peptydów powstających w wyniku działania kwasu abscysynowego udało się znaleźć podobieństwo strukturalne do tych czynników (KATAGIN i CHUA 1992).

Wyniki prowadzonych w ostatnich latach badań nad mechanizmami działania hormonów roślinnych pozwalają na wniosek, że równolegle funkcjonuje więcej niż jeden mechanizm. Wyniki te upoważniają do przedstawienia dróg działania hormonów w sposób jak na rysunku 1. Wydaje się, że dalsze badania doprowadzą do pełniejszego potwierdzenia zależności przedstawionych w tym schemacie i do jego uszczegółowienia, ale nie zmieniają jego zasadniczych założeń. Poza pytaniami, postawionymi już w tym opracowaniu, jest jeszcze jedno, na które odpowiedź powinny przynieść badania najbliższych lat. Pytanie to dotyczy utrzymania specyficzności działania hormonów w trakcie przekazywania infor-

macji do jądra komórkowego. Specyficzność ta jest zdefiniowana „na wejściu” przez obecność specyficznego receptora. Odnajduje się ona „na wyjściu” w postaci specyficznego białka. Natomiast poznane dotąd łańcuchy transdukcji sygnału są w zasadzie takie same dla wszystkich hormonów i dla wszystkich poznanych odpowiedzi. Być może o specyficzności odpowiedzi decyduje równowaga między operującymi równolegle, nie do końca jeszcze poznanymi, szlakami transdukcji sygnału.

PLANT HORMONES — TRENDS OF THE LAST DECADE RESEARCH

Summary

Plant hormones are a distinct group of substances that control growth, cell divisions and cell differentiation. According to the criteria used for definition of a plant hormone, jasmonides should be added to the phytohormone list. Wound hormone (traumatol), triacontanol, hydrogen cyanide and phenolamides are regarded as possible candidates for the plant hormone group. Arguments are given that polyamines, phenolics, salicylic acid and animal hormones, despite their physiological activity and frequent occurrence in plants, certainly can not be considered plant hormones.

Mechanisms responsible for the establishment of a plant hormone level in a cell are reviewed. The competence of a cell towards a defined hormone, as well as the ideas of target cells and tissues are discussed.

The concept of specific receptors for plant hormones in the competent cells is developed, and the results of search for such receptors for the main plant hormones are reviewed. The basic modes of hormone action are described. Special attention is paid to the mechanisms of hormonal control of specific protein synthesis. Several examples of the recently studied hormone- responsive elements in plant genes and of hormone-induced transcriptional factors are presented.

LITERATURA

- ALDRIDGE D. C., GALT S., GILES D., TURNER W. B., 1971. *Metabolites of Lasiodiplodia theobromae*. J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1623-1627.
- BAKER S. S., WILHELM K. S., THOMAS M. F., 1994. *The 5' region of Arabidopsis thaliana cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression*. Plant Mol. Biol. 24, 701-713.
- BARAŃSKA J., 1993. *Ca²⁺ jako wtórny przekaźnik informacji*. Kosmos 42, 557-564.
- BARBIER-BORYGOO H., EPHRIKIHINE G., KRAMB D., MAUREL C., PALME K., GUERN C., 1991. *Perception of the auxin signal at the plasma membrane of tobacco mesophyll protoplasts*. Plant J., 1, 83-93.
- BOGATEK R., LEWAK St., 1991. *Cyanide controls enzymes involved in lipid and sugar catabolism in apple embryos during culture*. Physiol. Plant. 83, 422-426.
- BOGATEK R., DZIEWANOWSKA K., LEWAK St., 1991. *Hydrogen cyanide and embryonal dormancy in apple seeds*. Physiol. Plant. 83, 417-421.
- BOUZAYEN M., LACHE A., PECH J.-C., 1990. *Subcellular localization of the sites of conversion of 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid into ethylene in plant cells*. Planta 180, 175-180.
- BOWLER C., CHUA N. -H., 1994. *Emerging themes of plant signal transduction*. Plant Cell 6, 1529-1541.
- BRADFORD K. J., TREWAVAS A. J., 1994. *Sensitivity thresholds and variable time scales on plant hormone action*. Plant Physiol. 105, 1029-1036.
- BUSH D. S., 1993. *Regulation of cytosolic calcium in Plants*. Plant Physiol., 103, 7-13.
- CHANDLER P. M., ROBERTSON M., 1994. *Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol. 45, 113-141.
- CHIBNALL A. C., WILLIAMS E. F., LATNER A. L., PIPER S. H., 1933. *The isolation of n-triacontanol from lucerne wax*. Biochem. J. 27, 1885-1888.
- COTE G. G., CRAIN R. C., 1993. *Biochemistry of phosphoinositides*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 44, 333-356.
- CZERPAK R., 1993. *Występowanie i aktywność biologiczna hormonów zwierzęcych i związków pokrewnych u roślin*. Kosmos 42, 613- 636.

- DARWIN C., 1880. *The Power of Movements in Plants*. Murray, London.
- DEL CAMPILLO E., REID P. D., SEXTON R., LEWIS L. N., 1990. Occurrence and localization of 9.5 cellulase in abscising and nonabscising tissues. *Plant Cell* 2, 245-254.
- DEMOLE E., LEDERER E., MERCIER D., 1962. *Isollement et détermination de la structure du jasmonate du méthyl, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin*. *Helv. Chim. Acta* 46, 675-685.
- DERMASTIA M., RAVNIKAR M., VILHAR B., KOVAC M., 1994. Increased level of cytokinin ribosides in jasmonic acid-treated potato (*Solanum tuberosum*) stem node cultures. *Physiol. Plant.* 92, 241-246.
- DROBAK B. K., 1993. Plant phosphoinositides and intracellular signaling. *Plant Physiol.*, 102, 705-709.
- DZIEWANOWSKA K., 1983 a. Naturalne związki cyjanogenne. *Post. Biochem.* 29, 191-225.
- DZIEWANOWSKA K., 1983 b. Rola logiczna związków cyjanogennych i cyjanowodoru. *Post. Biochem.* 29, 227-238.
- DZIEWANOWSKA K., NIEDŹWIEDZ I., LEWAK St., 1983. Hydrogen cyanide and cyanogenic compounds in seeds. II. Changes in free HCN level in apple seeds during stratification. *Physiol. Veg.* 17, 681-686.
- ENGLISH J. Jr., BONNER J., HAAGEN-SMIT A. J., 1939. Structure and synthesis of a plant wound hormone. *Science* 90, 329.
- ERION J. L., FOX J. E., 1981. Purification and properties of a protein which binds cytokinin-active 6-substituted purines. *Plant Physiol.* 67, 156-162.
- ESASHI Y., ISUZUGAWA K., MATSUYAMA S., ASHINO H., HASEGAWA R., 1991. Endogenous evolution of HCN during pre-germination periods in many seed species. *Physiol. Plant.* 83, 27-33.
- FINCHSAVAGE W. F., PRAMANIK S. K., BEWLEY J. D., 1994. The expression of dehydrin proteins in desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds of temperate trees. *Planta* 193, 478-485.
- GALSTON A. W., SAWHNEY R. K., 1990. Polyamines in plant physiology. *Plant Physiol.* 94, 406-410.
- GUILTINAN M. J., MARCONE W. R., QUATRANO R. S., 1990. A plant leucine zipper protein that recognizes abscisic acid response element. *Science* 250, 267-271.
- HABERLANDT G., 1921. Wundhormone als Erreger von Zellteilungen. *Beitr. Allgem. Botan.* 2, 1-53.
- HALL M. A., 1986. Ethylene receptors. [W:] *Hormones, Receptors and Cellular Interactions in Plants*. CHADWICK C. M., GARROD D. R. (red.). Cambridge University Press, Cambridge. Str. 69-89.
- HAGER A., DEBUS G., EDEL H. -G., STRANSKY H., SERRANO R., 1991. Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high turnover pool of plasma-membrane H⁺ATPase. *Planta* 185, 527-537.
- HAUGSTAD M., ULSAKER L. K., RUPPEL A., NILSEN S., 1983. The effect of triacontanol on growth, photosynthesis and photorespiration in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Anacystis nidulans*. *Physiol. Plant* 58, 451-456.
- HEDDEN P., 1993. Modern methods for the quantitative analysis of plant hormones. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 107-129.
- HERTEL R., 1983. The mechanism of auxin transport as a model for auxin action. *Z. Pflanzenphysiol.* 122, 53-67.
- HORNBERG C., WEILER E. W., 1984. High-affinity binding sites for abscisic acid on the plasmalemma of *Vicia faba* guard cells. *Nature* 310, 321-324.
- HUANG N., CHANDLER J., THOMAS B. R., KOIZUMI N., RODRIGUEZ R. L., 1993. Metabolic regulation of α -amylase gene expression in transgenic cell cultures of rice (*Oryza sativa*). *Plant Mol. Biol.* 23, 7237-747.
- JACOBS M., SHORT T. W., 1986. Further characterization of the presumptive auxin transport carrier using monoclonal antibodies. [W:] *Plant Growth Substances 1985*. Bopp M. (red.) Springer. Berlin 219-226.
- JACOBSEN J. V., KNOX R. B., 1973. Cytochemical localization and antigenicity of α -amylase in barley aleurone tissue. *Planta* 112, 213-224.
- JONES A. M., 1994. Auxin-binding proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 393-420.
- KACPERSKA A., 1995. Udział hormonów w odpowiedzi roślin na stresowe czynniki środowiska. *Kosmos* 44, 623-637.
- KATAGIN F., CHUA N., 1992. Plant transcription factors, present knowledge and future challenges. *Trends Genet.* 8, 22-27.
- KEFELI V. I., DASHEK W. V., 1984. Non-hormonal stimulators and inhibitors of plant growth and development. *Biol. Rev.*, 11, 273-288.
- KENDE H., 1993. Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 283-307.
- KODA Y., 1992. The role of jasmonic acid and related compounds in the regulation of plant development. *Intern. Rev. Cytology* 135, 155-199.
- KODA Y., KIKUTA Y., 1991. Possible involvement of jasmonic acid in tuberization of yam plants. *Plant Cell Physiol.* 32, 629-633.

- KUTSCHERA U., 1994. *The current status of the acid-growth hypothesis*. New Phytol., 126, 549–569.
- LANAHAN M. B., YEN H.-C., GIOVANNONI J. J., KLEE H. J., 1994. *The Never Ripe mutation blocks ethylene perception in tomato*. Plant Cell 6, 521–530.
- LESNIAK A. P., HAUG A., RIES S. K., 1989. *Stimulation of ATP-ase activity in barley (Hordeum vulgare) root plasma membranes after treatment with triacontanol and calmodulin*. Physiol. Plant. 75, 75–80.
- LEWAK St., SKOWROŃSKA E., 1982. *Interaction of triacontanol with gibberellin in control of lettuce seed germination*. Physiol. Plant. 55, 183–186.
- LIBBENGA K. R., MENNES A. M., 1987. *Hormone binding and its role in hormone action*. [W:] *Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development*. DAVIES P. J. (red.). M. Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster, str., 194–221.
- MACROBIE E. A. C., 1991. *Effect of ABA on ion transport and stomatal regulation*. [W:] *Abscisic Acid, Physiology and Biochemistry*. DAVIES W. J., JONES H. G. (red.). Bios Scientific Publishers, Oxford, Str., 153–168.
- MARTIN-TANGUY J., 1985. *The occurrence and possible function of hydroxycinnamoyl amides in plants*. Plant Growth Regul. 3, 381–399.
- MAMOTANI E., TSUJI H., 1992. *Isolation and characterization of a cytokinin-binding protein from the water soluble-fraction of tobacco leaves*. Plant Cell Physiol. 33, 407–412.
- NEGREL J., MARTIN C., 1984. *The biosynthesis of feruloyltyramine in Nicotiana tabacum*. Phytochemistry 23, 2797–2801.
- NOLAN R. C., HO T. D., 1988. *Hormonal regulation of α -amylase expression in barley aleurone layers*. Plant Physiol. 88, 588–593.
- NOWAK J. Z., 1988. *Receptory błonowe a przemiany fosfoinozotydydów, trifosforan inozytoli i diacyloglicerol jako drugie przekazywniki informacji*. Kosmos 37, 339–378.
- OHME-TAKAGI M., SHINSHI H., 1995. *Ethylene inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element*. Plant Cell 7, 173–182.
- RANJAN R., LEWAK St., 1995. *Interaction of jasmonic and abscisic acid in the control of lipases and proteases in germinating apple embryos*. Physiol. Plant 93, 421–426.
- RASKIN I., 1992. *Role of salicylic acid in plants*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43, 439–463.
- RAYLE D. L., CLELAND R. E., 1992. *The acid growth theory of auxin induced cell elongation is alive and well*. Plant Physiol. 99, 1271–1274.
- REID J. B., 1993. *Plant hormone mutants*. J. Plant Growth Regul. 12, 207–226.
- RIES S. K., 1984. *Regulation of plant growth with triacontanol*. CRC Critical Rev. Plant Sci. 2, 239–285.
- RIES S., 1991. *Triacontanol and its second messenger 9- β -L(+) adenosine as plant growth substances*. Plant Physiol. 95, 986–989.
- RIES S. K., WERT V., 1977. *Growth responses of rice seedlings to triacontanol in light and dark*. Planta 135, 77–82.
- RIES S. K., WERT V. F., SWEETLEY C. C., LEAVITT R. A., 1977. *Triacontanol, a new naturally occurring plant growth regulator*. Science 195, 1339–1341.
- RIES S. K., WERT V., O'LEARY N. F. D., NAIR M., 1990. *9- β -L(+) adenosine, a new naturally occurring plant growth substance elicited by triacontanol in rice*. Plant Growth Regul. 9, 263–273.
- ROGERS J. C., LANAHAN M. B., ROGERS S. W., 1994. *The cis-acting gibberellin response complex in high-pl α -amylase gene promoters — Requirement of a coupling element for high-level transcription*. Plant Physiol. 105, 151–158.
- ROBERTS J. A., HOOLEY R., 1988. *Plant Growth Regulators*. Blackie, Glasgow, London, str., 139–144.
- SANIEWSKI M., 1989. *Występowanie i aktywność fizjologiczna prostaglandyn w roślinach*. Kosmos 38, 211–223.
- SASSE J., 1985. *The place of brassinolide in the sequential response to plant growth regulators in elongating tissue*. Physiol. Plant. 63, 303–308.
- SCHLIEHMANN W., 1986. *Enzymic hydrolysis of gibberellin conjugates*. [W:] *Conjugated Plant Hormones — Structure, Metabolism and Function*. SCHREIBER K., SCHÜTTE H. R., SEMBDNER G. (red.). Deutcher Verlag der Wissenschaften, Berlin. 191–204.
- SEMBDNER G., PARTIER B., 1993. *The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates*. Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. 44, 569–589.
- SHIBAOKA H., 1994. *Plant hormone-induced changes in the orientation of cortical microtubules, alterations in the cross-linking between microtubules and the plasma membrane*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45, 527–544.
- SKRIVER K., OLSEN F. L., ROGERS J. C., MUNDY J., 1991. *Cis-acting DNA elements responsive to gibberellin and its antagonist abscisic acid*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7266–7270.

- SRIVASTAWA L. M., SECHLEY K. A., 1991. *In search of a gibberellin response*. Jour. Iowa Acad. Sci. 98, 51-62.
- STODDART J. L., 1986. *Gibberellin receptors* [W:] *Hormones, Receptors and Cellular Interactions in Plants*. CHADWICK C. M., GARROD D. R. (red.). Cambridge University Press, Cambridge, 91-114.
- SUTLIFF T. D., LANAHAN M. B., HO T. H. D., 1993. *Gibberellin treatment stimulates nuclear factor binding to the gibberellin response complex in a barley alpha-amylase promoter*. Plant Cell 5, 1681-1692.
- TRETYN A., KOPCEWICZ J., ŚLESKE E., 1988. *Interaction of light and the cholinergic system in the regulation of seed germination*. Biol. Plant. 30, 338-342.
- TREWAVAS A., 1991. *How do plant growth substances work? II*. Plant Cell Environ. 14, 1-12.
- VERHEY S. D., LOMAX T. L., 1993. *Signal transduction in vascular plants*. J. Plant Growth. Regul. 12, 179-195.
- VERNOOL B., FRIEDRICH L., MORSE A., REIST R., KOLDITZJAWHAR R., WARD E., KESSMANN H., RYALS J., (1994) *Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction*. Plant Cell 6, 959-965.
- VICK B. A., ZIMMERMAN D. C., 1984. *Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species*. Plant Physiol. 75, 458-461.
- WILEN R. W., VAN ROOIJEN G. J. H., PEARCE D. W., PHARIS R. P., HOLBROOK L. A., MOLONEY M. M., 1991. *Effects of jasmonic acid on embryo-specific processes in Brassica and Linum oilseeds*. Plant Physiol. 95, 399-405.
- ZAJĄCZKOWSKI S., WODZICKI T. J., ROMBERGER J. A., 1984. *Auxin waves and plant morphogenesis*. [W:] *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, tom 10. Pirson A., ZIMMERMAN M. H. (red.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 234-262.
- ZIMMERMAN D. C., COUDRON C. A., 1979. *Identification of traumatin, a wound hormone, as 12-oxo-trans-10-dodecenoic acid*. Plant Physiol. 63, 536-541.
- ZURFLUH L. L., GUILFOYLE T. J., 1980. *Auxin induced changes in the patterns of protein synthesis in soybean hypocotyl*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 357-361.
- ZURFLUH L. L., GUILFOYLE T. J., 1982. *Auxin- and ethylene- induced changes in the population of translatable messenger RNA in elongating sections of soybean hypocotyl*. Plant Physiol. 69, 332-337.