



Cytokininy w mechanizmach obronnych roślin

Oliwia Pasternak, Michał M. Sikorski

Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

Cytokinins in Plant Defense Mechanisms

Summary

Cytokinins are plant hormones that control not only the proliferation and differentiation of plant, but they also play a role of signaling molecules in defense mechanisms activated at different stress conditions. The role of cytokinins in the regulation of plant pathogenesis-related proteins (PR) expression is discussed. The recent data on characterisation of cytokinin-specific binding proteins (CSBP) are presented.

Key words:

cytokinins, plant defense, binding proteins.

1. Wprowadzenie

Rośliny są niezdolne do zmiany lokalizacji, dlatego wytworzyły szereg mechanizmów umożliwiających im szybką reakcję na różne sygnały zewnętrzne, jak światło, składniki pokarmowe, ale także suszę, patogeny czy zranienie, a w rezultacie adaptację do nowych warunków. Pierwszą przeszkodą dla atakujących mikroorganizmów są wbudowane biologiczne lub fizyczne bariery, mianowicie kutikula i ściana komórkowa. W dalszych etapach infekcji następuje indukcja odpowiedzi obronnych w roślinie, które mogą być lokalne lub systemiczne. Najszybciej pojawia się tzw. reakcja nadwrażliwości (HR, *hypersensitive response*), która prowadzi do programowanej śmierci komórek gospodarza, co uniemożliwia dalsze rozprzestrzenianie się patogena (1,2). W obronie roślin bierze udział także szereg metabolitów wtórnych,

Adres do korespondencji

Oliwia Pasternak,
Instytut Chemii
Bioorganicznej,
Polska Akademia Nauk,
ul. Noskowskiego 12/14,
61-704 Poznań;
e-mail:
mmsik@ibch.poznan.pl

biotechnologia

3 (58) 153-164 2002

tw. fitoaleksyn, które mają toksyczne działanie wobec patogena. Ta odpowiedź nazywana jest systemiczną nabytą odpornością SAR (*systemic acquired resistance*). Na przykład, rośliny tytoniu zainfekowane na jednym liściu przez wirus mozaiki tytoniowej wytwarzają lokalne nekrozy, zapobiegając rozprzestrzenianiu się wirusa. Jednocześnie cała roślina staje się odporna nie tylko na kolejne ataki tego wirusa, ale także na inne patogeny (inne wirusy, grzyby, patogeniczne bakterie). Jest to możliwe dzięki istnieniu innego typu reakcji obronnej roślin, tzw. systemicznej nabytej odporności (SAR). Ten rodzaj odporności jest możliwy dzięki produkcji białek PR (*pathogenesis-related*). Zostało udowodnione, że sygnałem dla tej odpowiedzi jest kwas salicylowy. Obecnie wyróżnia się czternaście klas roślinnych białek obronnych PR (3). W większości są to białka o znanej funkcji, jak glukanazy (PR-2), chitynazy (PR-3), osmotyny (PR-5), inhibitory proteaz (PR-6), proteinazy (PR-7), lizozymy/chitynazy klasy III (PR-8), peroksydazy (PR-9). Funkcja białek PR-10, które są przedmiotem badań w naszej pracowni, nie została dotąd ostatecznie ustalona, dlatego określenie to zaczęto stosować dla grupy białek o istotnym podobieństwie sekwencji, włączając białka nie związane z patogenezą czy stresem. Porównanie sekwencji aminokwasowych białek tej klasy pozwala wyróżnić trzy grupy: 1) IPR (*intracellular pathogenesis-related*) „właściwe” białka PR-10, do których należą m.in. białka indukowane przez stres, alergeny pyłkowe drzew i krzewów oraz główne alergeny warzyw i owoców, 2) MLP (*major latex protein*) wykryte w lateksie maku (*Papaver somniferum*) oraz 3) CSBP (*cytokinin-specific binding protein*) – białka, dla których wykazano zdolność wiązania cytokinin.

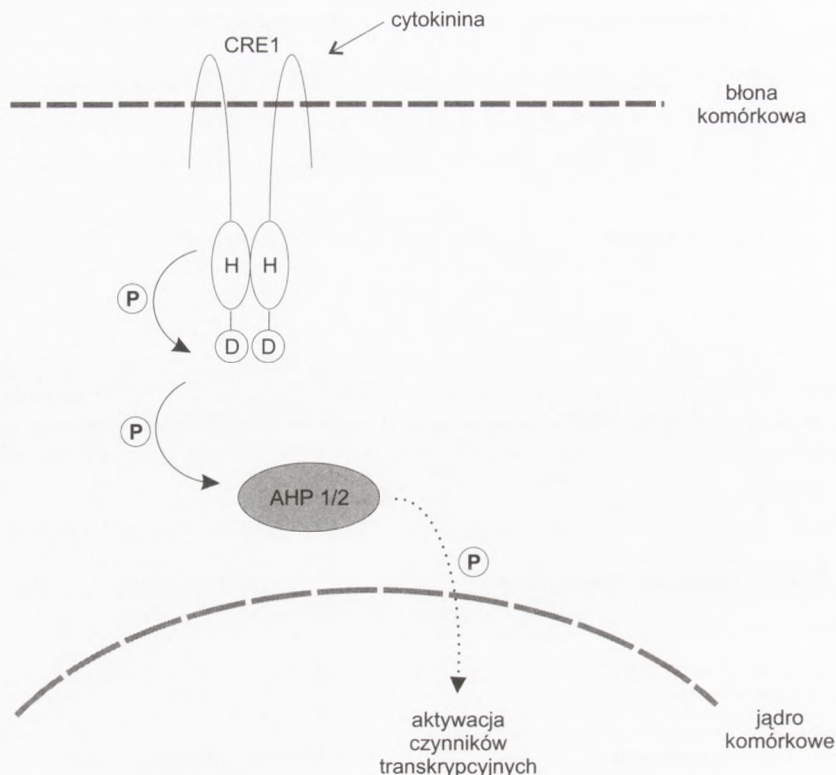
2. Cytokiny

Ze względu na budowę chemiczną cytokiny dzielimy na pochodne purynowe oraz pochodne mocznikowe, jednak wszystkie naturalnie występujące cytokiny są N6 pochodnymi adeniny. Pierwszą wyizolowaną i zidentyfikowaną cytokiną naturalną była zeatyna, która może występować jako wolna zasada, a także w połączeniu z rybozą (rybozyd) i resztą kwasu fosforowego (rybotyd). Znane są także połączenia zeatyny z glukozą i innymi cukrami, np. ksylozą (4).

Spośród związków przedstawionych na rysunku 1 tylko zeatyna i jej pochodna ZiP należą do cytokin naturalnych.

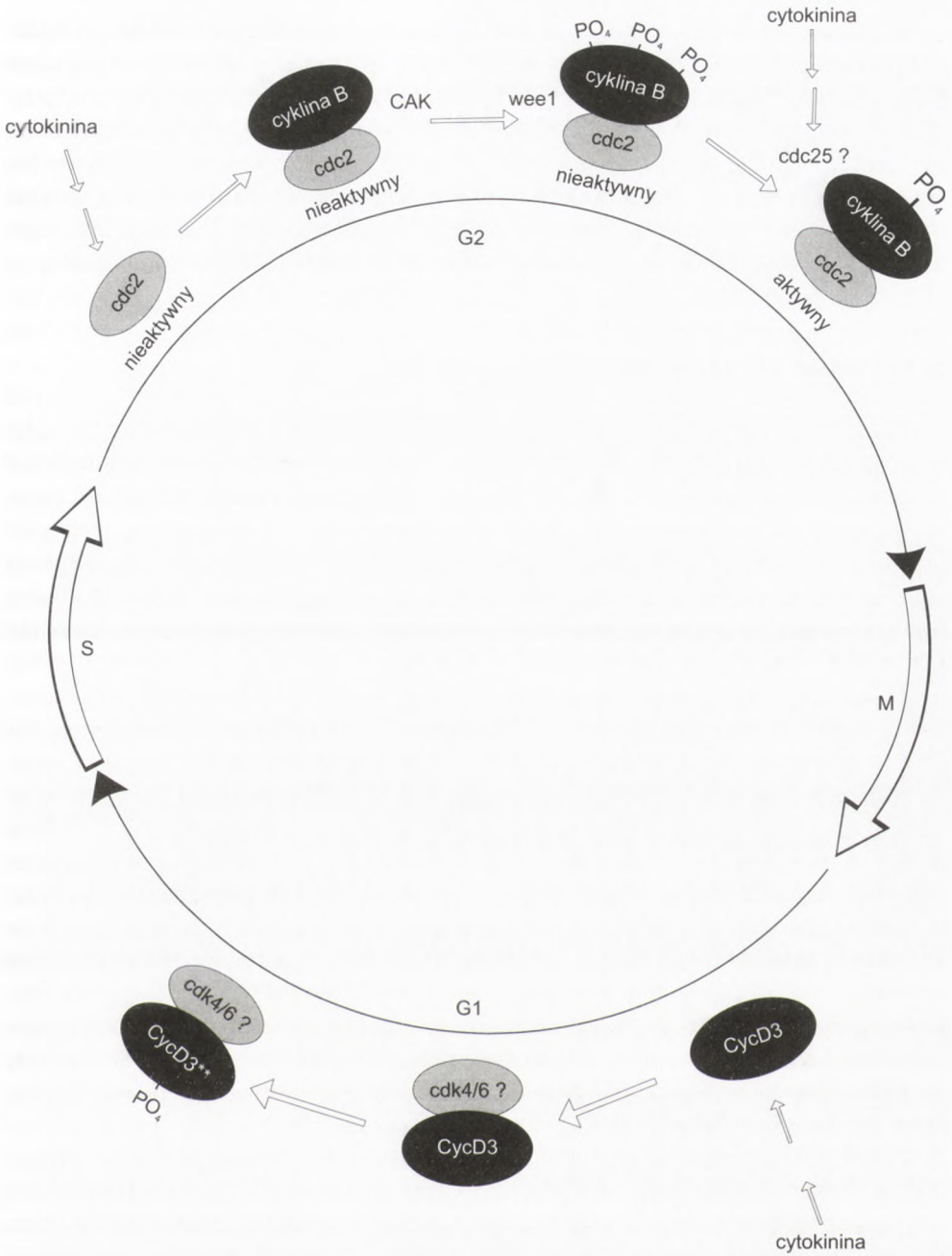
Cytokiny są hormonami roślinnymi, które zostały początkowo zidentyfikowane jako czynniki stymulujące podziały komórkowe. Następnie okazało się, że oddziałują one na wiele innych procesów związanych z rozwojem roślin. Ich charakterystycznym działaniem jest opóźnianie procesów starzenia oraz znoszenie dominacji wierzchołkowej w pędach, powodując wybijanie pąków bocznych. Wpływają także na inne procesy fizjologiczne, np. stymulują kiełkowanie nasion wymagające światła oraz skracają spoczynek pąków.

Mimo że działanie fizjologiczne cytokin zostało dobrze scharakteryzowane, mechanizmy molekularne leżące u podstaw działania tych hormonów pozostają nie-



Rys. 2. Schemat działania receptora błonowego CRE1 w *Arabidopsis thaliana* aktywowanego przez cytokininę; wg (18), zmodyfikowany. CRE1 – receptor cytokininy, H – kinaza histydynowa (sensor) z resztą kwasu asparaginowego (D).

powiedzi, a następnie na cytozolowe białko AHP. Zaktywowane białko AHP przenosi sygnał do jądra, gdzie poprzez aktywację czynników transkrypcyjnych wpływa na ekspresję genów (rys. 2). Molekularne powiązanie pomiędzy opisanym mechanizmem a cyklem komórkowym pozostaje nadal nie wyjaśnione. W badaniach wykazano wpływ cytokinin na długość różnych faz cyklu komórkowego. Zaobserwowano, że potraktowanie kinetyną zalążków korzeniowych nasion *Vicia faba* powoduje skrócenie faz G1 i S, natomiast faza G2 ulegała wydłużeniu. Podstawą molekularną tych procesów jest aktywacja kinaz zależnych od cyklin, biorących udział w cyklu komórkowym, z których dwa rodzaje są przedstawione na rysunku 3. Aktywacja kinaz zależnych od cyklin (cdk2, cdk4 i cdk6) zostaje osiągnięta przez asocjację ze specyficzną cykliną i jej fosforylację. W przypadku cdk4 i cdk6 kinaza aktywująca cyklinę (CAK, *cyclin activating kinase*) katalizuje tę reakcję, natomiast cdk2 wymaga dodatkowej fosforylacji przez kinazę białkową wee1. Dodanie egzogennych cytokinin podnosi poziom transkryptów cdc2 i CycD3, a nadekspresja CycD3 w kulturach tkankowych *Arabidopsis* powoduje, że podziały komórkowe zachodzą bez cytokinin (8).



Rys. 3. Udział cytokinin w regulacji cyklu komórkowego; wg (21), zmodyfikowany. Opis w tekście.

Wykazano również wpływ cytokinin na poziom specyficznych mRNA. Przykładem mogą być badania prowadzone nad białkiem tworzącym z chlorofilem a/b kompleks zbierający światło (LHC II, *ligh harvesting complex*). Wykazano dziesięciokrotny wzrost ilości mRNA tego białka w kulturach zawieszinowych tytoniu po potraktowaniu kinetyną. Stwierdzono również negatywną regulację ekspresji niektórych genów przez cytokiny, m.in. w liściach ogórka poziom mRNA dla fitochromu obniżał się po podaniu cytokinin (9). Wśród genów wielu białek, których ekspresja jest regulowana przez cytokiny są też białka związane z odpowiedzią obronną roślin.

3. Regulacja ekspresji genów przez cytokiny

Cytokiny regulują rozwój, wzrost i metabolizm roślin. Fitohormony te wpływają na ekspresję różnych mRNA i białek w komórkach roślin, jednak odpowiedzi na cytokiny są bardzo złożone. Po pierwsze, cytokiny regulują aktywność enzymów i ilość mRNA zarówno pozytywnie jak i negatywnie. Po drugie, regulacja ekspresji genów odbywa się na etapie transkrypcji oraz potranskrypcyjnie, np. poprzez stabilizację transkryptów. Wreszcie ekspresja genów regulowana przez cytokiny jest także regulowana przez inne fizykochemiczne czynniki, jak auksyny, kwas abscysynowy, azotany czy światło (10).

Charakterystyka genów indukowanych przez stres i regulowanych rozwojowo jest istotna dla zrozumienia wpływu środowiska na rozwój roślin. Koncepcja, że geny indukowane stresem mogą odgrywać rolę w rozwoju roślin nie jest nowa. Stres osmotyczny indukuje ekspresję genów RAB21 w liściach ryżu i Em w kulturze zarodków pszenicy. RAB22 i Em są również indukowane podczas ostatnich stadiów dojrzewania zarodków, kiedy zostają one poddane programowanemu wysuszeniu. Geny te odgrywają zatem bardzo ważną rolę w rozwoju roślin umożliwiając im przetrwanie w czasie suszy, które ma miejsce zarówno podczas dojrzewania zarodków jak i stresu osmotycznego. Innym przykładem jest ekspresja genów biorących udział w syntezie flawonoidów (np. syntetazy chalkonowej), co prowadzi do syntezy fitoaleksyn, związków biorących udział w obronie przed atakiem mikroorganizmów. Geny biosyntezy flawonoidów indukowane przez zranienie pełnią także ważną rolę podczas rozwoju korzenia, zapobiegając infekcjom spowodowanym penetracją korzeni bocznych w glebie (11).

Jedno z najwcześniejszych doniesień na temat regulacji ekspresji genów związanych z obroną u roślin przez cytokiny dotyczy genów kodujących glukazę (β GLU I) i chitynazę (CHN I). Wiadomo, że oba enzymy biorą udział w odpowiedzi na stres, zranienie i infekcję patogena, szczególnie infekcję grzybową, ponieważ enzymy te hydrolizują β -1,3-glukany i chitynę, które są głównymi komponentami ścian komórkowych grzybów. Ponadto enzym β GLU może być zaangażowany w wiele różnych procesów fizjologicznych i rozwojowych, w tym podziały komórkowe, mikrosporoogenezę, kiełkowanie pyłku i in. Istnieją także doniesienia, że CHN może odgrywać

rolę w embriogenezie. Dodatkowo ekspresja obu tych genów jest regulowana przez etylen (indukcja) i kwas abscysynowy (represja) (12).

Shinshi i wsp. (13) wykazali inhibicję ekspresji genu chitynazy w kulturach komórkowych tytoniu (*Nicotiana tabacum*) po dodaniu cytokiny i auksyny. Hormony te hamują również ekspresję genu 1,3- β -glukanazy w kulturach *Nicotiana plumbaginifolia* (14). Odmienne schematy ekspresji tych genów wykazano w doświadczeniach *in vivo* dla tytoniu (15) i ryżu (16). Z pędów tytoniu poddanych działaniu podwyższonego poziomu endogennych lub egzogennych cytokin wyizolowano cDNA odpowiadające pięciu różnym mRNA, których stężenie w pędach rośnie wraz ze wzrostem poziomu cytokin. Cztery z tych cDNA odpowiadają białkom związanym z obroną u roślin – ekstensynie, chitynaze, białku PR-1 i białku podobnemu do PR-1 (17). Ekspresja genów kodujących te białka (akumulacja specyficznych mRNA) jest indukowana przez infekcję patogena lub/i zranienie, co wskazuje na ich zaangażowanie w mechanizmach obronnych roślin. W roślinach tytoniu mRNA kodujące PR-1 występuje na niskim poziomie we wszystkich organach. Pozostałe mRNA występują na niskim poziomie w pędach, szczególnie w liściach, ale są bardzo powszechne w korzeniach. Wcześniej (13) zaobserwowano negatywną regulację poziomu mRNA chitynazy przez cytokinę, natomiast w badaniach *in vivo* wykazano jej stymulujące działanie. Potwierdza to fakt, że mechanizm działania cytokin jest bardzo złożony, a otrzymane wyniki mogą być rezultatem współdziałania wielu czynników i z tego względu są trudne do zinterpretowania. W przypadku genu chitynazy brak jest dowodów na jego bezpośrednią regulację przez cytokiny, natomiast istnieją silne przesłanki na indukcję mRNA chitynazy przez etylen. Przypuszcza się zatem, że w regulacji genów związanych z patogenezą (np. chitynazy) przez cytokiny może pośredniczyć etylen (16). W ryżu synteza 1,3- β -glukanazy jest konstytutywna w korzeniach, ale indukowana przez cytokinę, etylen, zranienie, elicytory grzybowe i kwas salicylowy w łodygach (15).

Poziom mRNA kodującego białko SAM22 (*starvation-associated message 22*) soi (*Glycine max*) wrasta 10-krotnie, kiedy kultury zawieszynowe soi wchodzi w fazę stacjonarną. Akumulacja tego mRNA w fazie stacjonarnej może być wywołana stresem z powodu braku fitohormonów. W dalszych badaniach wykazano, że ilość SAM22 wzrasta także w odpowiedzi na różne stresy środowiskowe (kwas salicylowy, elicytor grzybowy – chitosan, H₂O₂, zranienie) oraz tkankospecyficznie w całym roślinie (w korzeniach, siewkach i starzejących się organach). Na podstawie analizy sekwencji aminokwasowej białko SAM22 zaliczono do grupy białek PR-10. Akumulacja mRNA SAM22 w korzeniach i starzejących się tkankach potwierdza rolę tego białka w fizjologii stresu, ponieważ korzenie ulegają zranieniu podczas penetracji korzeni bocznych przez korę i epidermę korzenia głównego, a starzejące się tkanki podlegają programowanej śmierci komórki (11).

Potraktowanie kultury kalusowej barwinka (*Catharantus roseus*) cytokiną zwiększało stężenie białka nazwanego T1. Sekwencja aminokwasowa otrzymana na podstawie wyizolowanego mRNA posiadała 40% identyczności z innymi białkami PR-10,

należącymi do podgrupy IPR (*intracellular pathogenesis-related*). Funkcja T1, podobnie jak innych białek PR-10, nie jest dotąd poznana, jednak znacząca homologia sekwencji aminokwasowej z białkami IPR (silnie indukowanymi w roślinach przez atak patogena lub zranienie) wskazuje, że T1 odgrywa rolę w odpowiedzi rośliny na stres środowiskowy. Ekspresja wcześniej zidentyfikowanego genu kodującego białko SAM 22, również z podgrupy IPR, była także regulowana przez cytokininy, jednak w przeciwieństwie do białka T1 zidentyfikowanego w komórkach barwinka, traktowanie komórek soi cytokinina prowadziło do znacznego obniżenia akumulacji transkryptów SAM22 (10). Można zatem przypuszczać, że geny kodujące białka T1 i SAM22 nie są bezpośrednio regulowane przez cytokininy, lecz proces ten jest bardziej złożony i wymaga zaangażowania pośrednich czynników sygnałowych.

Synteza mRNA białka należącego do klasy PR-1, indukowanego w odpowiedzi na zranienie jest całkowicie zablokowana poprzez egzogenne dodanie antagonisty cytokinin, 2-chloro-4-cykloheksylamido-6-etylamino-*s*-triazyny. Jednak w roślinach tytoniu inokulowanych wirusem TMV, egzogenne podanie cytokinin nie zatrzymywało replikacji wirusa. Te rezultaty wskazują, że cytokininy są niezbędne, ale nie wystarczające do ekspresji białka PR-1, a tym samym indukcji odpowiedzi obronnej (18).

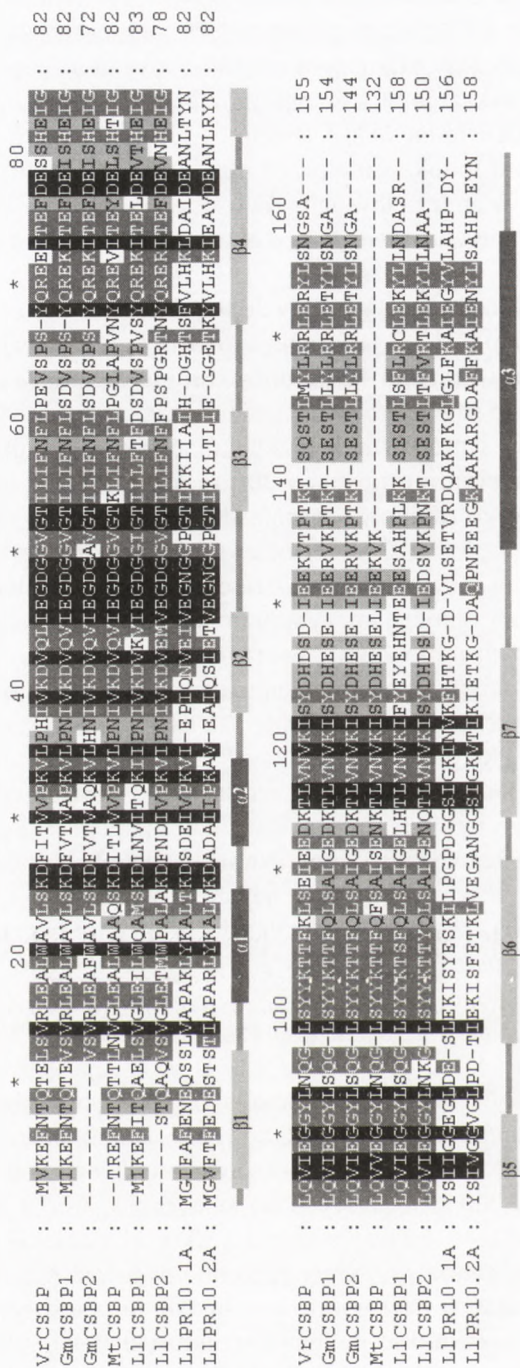
Zakażenie wrażliwego (podatnego na infekcję) jęczmienia (*Hordeum vulgare*) grzybem *Pyrenophora teres* i kukurydzy (*Zea mays*) grzybem *Drechslera maydis* powoduje formowanie tzw. „zielonych wysp” (zgrupowanie nie zainfekowanych zielonych komórek liścia, otoczonych przez żółte komórki zainfekowane wirusem), zwiększony poziom cytokinin oraz akumulację metabolitów w miejscach zainfekowanych, stymulując rozmnażanie patogena. Cytokininy są znane z ich możliwości skierowywania pożywienia w miejsce, w którym występują w wyższym stężeniu. Istnienie tych miejsc zostało potwierdzone za pomocą badań autoradiograficznych; akumulacja znakowanych metabolitów była widoczna w miejscu infekcji we wrażliwych roślinach. W dalszych badaniach wykazano, że oba patogeny wydzielają cytokininy, których poziom zmierzono za pomocą chromatografii HPLC. W odróżnieniu od roślin wrażliwych na infekcję, w liściach roślin odpornych zanotowano niższą koncentrację cytokinin i dodatkowo obniżenie ich poziomu po infekcji. Wzrost stężenia cytokinin we wrażliwych roślinach może pomagać we wzroście patogena, natomiast obniżenie poziomu cytokinin w roślinach odpornych może być sygnałem, dla uruchomienia mechanizmów obronnych we wczesnych stadiach infekcji (19).

4. Białka wiążące cytokininy

Dwa białka wiążące cytokininy CSB1 (*cytokinin binding protein*) i CSB2 wyizolowano z frakcji rozpuszczalnej kalusa tytoniu za pomocą chromatografii powinowactwa na kolumnie z Sepharozą związaną z benzyloaminopuryną (BA). Masa cząsteczkowa białek CBP1 i CBP2 wynosi odpowiednio 34 i 26 kDa, a każde z nich posiada dwa

miejsca wiązania cytokinin. Stała wiązania BA dla białka CSB1 wynosi $8,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, natomiast dla CSB2 $1,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, a wiązanie to jest kompetencyjne względem zetyliny i kinetyliny, ale nie adeniny, adenozyliny czy IAA. W wyniku kolejnych badań wykazano, że białko CSB1 wykazuje 90% homologii z endochitynazą, natomiast CSB2 jest białkiem stresu – OLP (*osmotin-like protein*). Ekspresja genów tytoniu kodujących osmotynę i OLP jest indukowana przez ABA, NaCl, etylen, a także zranienie i infekcję wirusową. Porównanie sekwencji wykazało, że osmotyna i OLP są wysoce homologiczne do białka antywirusowego (gp22) wyizolowanego z kultur komórkowych tytoniu (20).

Poszukiwania białek wiążących cytokiny doprowadziły do wyizolowania białka z fasoli mung (*Vigna radiata*) (21). Do izolacji użyto 100 kg etiolowanych siewek fasoli, które ostatecznie oczyszczono za pomocą chromatografii powinowactwa na kolumnie z Sepharozą, do której kowalencyjnie związane ligand – 4PU [N-fenyl-N'-(4-pirydylo)mocznik], syntetyczną pochodną mocznika wykazującą wysoką aktywność cytokiny. Ostatecznie otrzymano 20 μg białka VrCSBP (*cytokinin-specific binding protein*), wykazującego zdolność wiązania 4PU30 (N-(2-chloro-4-pirydylo)-N'-fenylmocznik) ze stałą $K_a = 5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$. Dodatkowo stwierdzono kompetencyjne względem 4PU30 wiązanie z cytokinami – pochodnymi purynowymi, m. in. zetyliną, ale nie z adeniną czy rybozydami cytokinin. Masę białka ustalono na 17 kDa, a na podstawie analizy hydrofobowości stwierdzono, że białko to nie zawiera sekwencji sygnałowej ani domeny transbłonowej, co prowadzi do wniosku, że VrCSBP jest białkiem cytoplazmatycznym. Przeszukanie baz danych i porównanie sekwencji aminokwasowych białek PR-10 i białek CSBP wskazuje na identyczność sekwencji wynoszącą poniżej 20%. Jednak porównując struktury drugorzędowe metodą PHD (22) wykazano, że obie grupy białek posiadają podobny układ arkuszy β i helis α (rys. 4). Ponadto w sekwencji CSBP występują motywy charakterystyczne dla białek PR-10, szczególnie pętla glicynowa, będąca najbardziej zachowawczym motywem w białkach PR-10 (EGNGGPG) występuje w białkach CSBP w bardzo zbliżonej formie (EGDGGI/VG). Na tej podstawie białka CSBP włączono do klasy PR-10. Sekwencje kodujące białka CSBP znaleziono także u innych motylkowatych – soi (*Glycine max*) i lucerny (*Medicago truncatula*). Sekwencje aminokwasowe białek CSBP (uzyskane przez translację sekwencji kodujących cDNA i EST) wykazują identyczność rzędu 70%, dlatego cDNA białka VrCSBP wykorzystano jako sondę do przeszukania biblioteki ekspresyjnej, uzyskanej z korzeni łubinu żółtego (*Lupinus luteus*) infekowanych *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*). Rezultatem było znalezienie dwóch kolejnych homologów CSBP – LICSBP1 i LICSBP2, różniących się sekwencją i liczbą aminokwasów: LICSBP1 – 158 aa, LICSBP2 – 155 aa (Pasternak i Sikorski, dane nie publikowane). Otrzymano również homogenne preparaty rekombinowanych białek VrCSBP oraz LICSBP1. Przedmiotem badań w naszej pracowni będzie organospecyficzna ekspresja białek CSBP w łubinie żółtym oraz poznanie struktury białek CSBP. Próby krystalizacji białka VrCSBP doprowadziły do uzyskania kryształów zdolnych do dyfrakcji promieni X z rozdzielczością 1,6 Å (Bujacz i in., dane nie publikowane). Krystalizacja



Rys. 4. Porównanie sekwencji aminokwasowych znanych białek CSBP z wybranyimi białkami IPR lubinu żółtego (LlPR-10.1A, LlPR-10.2A) z zaznaczeniem przewidywanej struktury drugorzędowej (7 arkuszy β i 3 helisy α). Porównanie sekwencji wykonano za pomocą programu CLUSTAL. Sekwencje aminokwasowe białek CSBP uzyskano na podstawie translacji sekwencji kodujących cDNA i EST dostępnych w EMBL GenBank.

została przeprowadzona w obecności zeatyny i CPPU, co pozwala przypuszczać, że po określeniu struktury krystalograficznej możliwe będzie wskazanie miejsca wiązania liganda. Sądzymy, że zlokalizowanie miejsca wiązania cytokiny w strukturze białka CSBP będzie pomocne w badaniach nad funkcją białek IPR, które mimo że posiadają wspólny konserwatywny motyw glicynobogaty, nie wiążą żadnej nukleotydowej pochodnej oraz analogów cytokin. Poznanie struktury kompleksu CSBP-cytokiny wskaże czy pętla glicynobogata istotnie stanowi ważny element struktury badanych białek i centrum wiązania liganda.

5. Podsumowanie

Niektóre fitohormony, szczególnie cytokiny, auksyny, etylen i kwas abscysynowy, są zaangażowane w reakcje odpowiedzi na infekcje lub zranienie. Podwyższony poziom endogennych lub egzogennych cytokin wpływa na ekspresję genów związanych z obroną roślin, w tym białek PR (PR-1, glukanazy – PR-2, chitynazy – PR-3, PR-10) i ekstensyny, jednak regulacja ich ekspresji może być zarówno pozytywna jak i negatywna. Nawet w przypadku tego samego genu, u tej samej rośliny w zależności od warunków hodowli (*in vivo* lub *in vitro*). Spowodowane jest to złożonością mechanizmów działania cytokin i ich współdziałania z innymi regulatorami. Ważnych informacji dostarczyłoby porównanie promotorów różnych genów regulowanych przez cytokiny. Znane są także białka związane z odpowiedzią obronną roślin, które mają zdolność wiązania cytokin. Stąd wniosek, że istnieje silna zależność pomiędzy białkami stresu i morfogenezą, a białka te mogą być białkiem stresu, które odgrywa ważną rolę w transdukcji sygnału hormonalnego w odniesieniu do morfogenezy.

Publikacja w ramach projektu badawczego KBN nr 6 P04B 004 21.

Literatura

1. Ryan C. A., Jagendorf A., (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 4075.
2. Stobiecki M., (2000), w: *Na pograniczu chemii i biologii*, t. IV, red. Koroniak H., Barciszewski J., Wyd. Nauk. UAM, 439-460.
3. van Loon L. C., van Strien E. A., (1999), Phys. Mol. Plant Pathol., 38, 85-97.
4. Borowska B., (1997), w: *Regulatory wzrostu i rozwoju roślin*, red. Jankiewicz L. S., PWN, Warszawa, 60-71.
5. Hwang I., Sheen J., (2001), Nature, 413, 383-389.
6. Inoue T., Higuchi M., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K., Kikimoto T., (2001), Nature, 409, 1060-1063.
7. Schmillig T., (2001), Trends in Plant Sci., 6, 281-284.
8. D'Agostino I. B., Kieber J. J., (1999), Curr. Opin. Plant Biol., 2, 359-364.
9. Legocka J., (1997), w: *Regulatory wzrostu i rozwoju roślin*, red. Jankiewicz L. S., PWN, Warszawa, 199-225.

10. Carpin S., Laffer S., Schoentgen F., Valenta R., Chénieux J-C., Rideau M., Hamdi S., (1998), *Plant Mol. Biol.*, 36, 791-798.
11. Crowell D. N., John M. E., Russell D., Amasino R. M., (1992), *Plant Mol. Biol.*, 18, 459-466.
12. Rezzonico E., Flury N., Meins F. Jr., Beffa R., (1998), *Plant Physiol.*, 117, 585-592.
13. Shinshi H., Mohnen D., Meins F., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 89-93.
14. de Loose M., Alliotte T., Gheysen G., Genetello C., Gielen J., Soetaert P., van Montagu M., Inzé D., (1988), *Gene*, 70, 13-23.
15. Simmons C. R., Litts J. C., Huang N., Rodriguez R. L., (1992), *Plant Mol. Biol.*, 18, 33-45.
16. Memelink J., Hoge J. H. C., Schilperoort R. A., (1987), *EMBO J.*, 6, 3579-3583.
17. Watillon B., Kettmann R., Boxus P., Burny A., (1991), *Plant Physiol.*, 96, 479-484.
18. Sano H., Ohashi Y., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 4138-4144.
19. Angra-Sharma R., Sharma D. K., (1999), *Mycopathologia*, 148, 87-95.
20. Kobayashi K., Fukuda M., Igarashi D., Sunaoshi M., (2000), *Plant Cell Physiol.*, 41, 148-157.
21. Fujimoto Y., Nagata R., Fukasawa H., Yano K., Azuma M., Iida A., Sugimoto S., Shudo K., Hashimoto Y., (1998), *Eur. J. Biochem.*, 258, 794-802.
22. Rost B., Sander C., (1994), *Proteins*, 19, 55-72.