



MAGYAR AGRÁR- ÉS  
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

**Az erdei szamóca (*Fragaria vesca* L. cv. 'Rügen') arginin  
dekarboxiláz (*FvADC*) és spermidin szintáz (*FvSPDS*) gének  
funkcionális jellemzése dohányban (*Nicotiana tabacum* L.)**

**Doktori (PhD) értekezés**

**MENDEL ÁKOS**

**GÖDÖLLŐ**

**2022**

**A doktori iskola**

**Megnevezése:**

**Növénytudományi Doktori Iskola**

**Tudományága:**

**Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok**

**Vezetője:**

**Dr. Helyes Lajos**

Egyetemi tanár, az MTA doktora

Magyar Agrár és Élettudományi Egyetem

Kertészettudományi Intézet

**Témavezetők:**

**Dr. Kiss Erzsébet**

Professor emeritus

Magyar Agrár és Élettudományi Egyetem

Genetika és Biotechnológia Intézet

**Dr. Veres Anikó**

Egyetemi docens

Magyar Agrár és Élettudományi Egyetem

Genetika és Biotechnológia Intézet

.....  
**Dr. Helyes Lajos**

**Iskolavezető**

.....  
**Dr. Kiss Erzsébet**

**Témavezető**

.....  
**Dr. Veres Anikó**

**Témavezető**

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>1.</b>	<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b>	<b>5</b>
<b>2.</b>	<b>BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS</b>	<b>7</b>
<b>3.</b>	<b>IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b>	<b>10</b>
3.1.	A poliaminok biológiai szerepe a gyümölcserésben	10
3.2.	A poliaminok biológiai szerepe a stressztolerancia kialakításában	14
3.3.	A poliaminok bioszintézise	19
3.4.	Az arginin és az arginin dekarboxiláz dekarboxiláz	22
3.5.	A spermidin és a spermidin szintáz szintáz	24
3.6.	Táptalaj-kiegészítők és genetikai transzformáció alkalmazása a poliamin-bioszintézis megismerésében	26
3.7.	A kutatás előzményei és a <i>FvADC</i> , <i>FvSPDS</i> expressziós mintázata a szamóca gyümölcs érése során	29
<b>4.</b>	<b>ANYAG ÉS MÓDSZER</b>	<b>32</b>
4.1.	A felhasznált növényanyag és a génszekvenciák bioinformatikai elemzése	32
4.2.	Genomi DNS, plazmid DNS, RNS izolálása és cDNS szintézise	32
4.3.	Relatív expressziós szintek vizsgálata qPCR-rel	32
4.4.	A <i>FvADC</i> és a <i>FvSPDS</i> ORF-ek pENTR <sup>TM</sup> /SD/D-TOPO klónozó vektorba ligálása	33
4.5.	A <i>pGWB405::FvADC</i> és a <i>pGWB405::FvSPDS</i> bináris vektorkonstrukciók előállítása	34
4.6.	Az <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'GV3101' törzs transzformációja a <i>pGWB405::FvADC</i> és a <i>pGWB405::FvSPDS</i> vektorkonstrukciókkal	36
4.7.	A <i>Nicotiana tabacum</i> L. transzformációja	38
4.8.	A genetikai transzformáció sikerességének bizonyítása, a T <sub>1</sub> generáció előállítása	39
4.9.	A növénynevelési paraméterek a gének indukálhatóságának vizsgálatához	40
4.10.	A klorofill mennyiségének mérése	40
4.11.	A lignin tartalom mérése	40
4.12.	A poliaminok, valamint a prolin mennyiségének meghatározása HPLC-vel	41

4.13.	Mikroszkópos vizsgálat	41
4.14.	Statisztikai analízis	42
<b>5.</b>	<b>EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK</b>	<b>44</b>
5.1.	A <i>FvADC</i> , <i>FvSPDS</i> expressziós mintázata a <i>Fragaria x ananassa</i> Duch. gyümölcs érése során	44
5.2.	A <i>Nicotiana tabacum</i> modellnövény transzformációja <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -sel, valamint a T <sub>0</sub> vonalak előszelekciója	47
5.3.	A <i>FvADC</i> és <i>FvSPDS</i> enzimek sejten belüli lokalizációja	49
5.4.	Az arginin, a putrescin és a spermidin hosszútávú hatásának vizsgálata a <i>FvADC</i> -t, <i>FvSPDS</i> -t túltermelő és a vad típusú <i>Nicotiana tabacum</i> növények élettani paramétereire	53
5.4.1.	A klorofilltartalom	53
5.4.2.	A lignintartalom	55
5.4.3.	A prolintartalom	57
5.4.4.	A putrescin, spermidin és spermin, valamint az összpoliamin-tartalom	59
5.5.	A kezelések hatásának értékelése <i>FvADC</i> -t, <i>FvSPDS</i> -t túltermelő és a vad típusú <i>Nicotiana tabacum</i> növények esetében	67
5.5.1.	A vizsgált paraméterek értékelése a kezelések tükrében	67
5.5.2.	A vizsgált paraméterek közti összefüggések	74
5.5.3.	A kezelésekre adott reakciók összehasonlítása a <i>FvADC</i> és <i>FvSPDS</i> enzimet túltermelő, valamint a vad típusú növények vonatkozásában	76
5.6.	Új tudományos eredmények	81
<b>6.</b>	<b>KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK</b>	<b>83</b>
<b>7.</b>	<b>ÖSSZEFOGLALÁS</b>	<b>87</b>
<b>8.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>89</b>
<b>9.</b>	<b>IRODALOMJEGYZÉK</b>	<b>91</b>
<b>10.</b>	<b>MELLÉKLETEK</b>	<b>131</b>
<b>M2:</b>	<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b>	<b>143</b>

## 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

**ACC = 1-aminociklopropán-1-karboxilsav**

**ACL5 = acaulis5**

**ACO = 1-aminociklopropán-1-karboxilsav oxidáz**

**ACS = 1-aminociklopropán-1-karboxilsav szintáz**

**ADC = arginin dekarboxiláz**

**AFLP = Amplified fragment length polymorphism (amplifikált fragmentum-hossz polimorfizmus)**

**ATP = adenzin trifoszfát**

**dcSAM = dekarboxilált S-adenozil-L-metionin**

***FvADC::sGFP = Fragaria vesca L. cv. 'Rügen' S-adenozil-L-metionin dekarboxiláz::sGFP* fúziós konstrukció**

***FvSPDS::sGFP = Fragaria vesca L. cv. 'Rügen' Spermidin szintáz::sGFP* fúziós konstrukció**

**GABA =  $\gamma$ -aminovajsav**

**IAA = Indole acetic acid (indolecetsav)**

**NAA = Naphthaleneacetic acid (naftil ecetsav)**

**NADPH-oxidáz = Nicotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát oxidáz**

**NLS = Nuclear localization signal (sejtmagi lokalizációs szignál)**

**NOD = Nucleolar localization sequence detector (sejtmagvacska lokalizációs jel érzékelő)**

**OD = optikai denzitás**

**ODC = ornitin dekarboxiláz**

**ORF = Open reading frame (nyitott leolvasási keret)**

**PAO = poliamin oxidáz**

**PUT = putrescin**

**qPCR = Quantitative real-time polymerase chain reaction (kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció)**

**ROS = reactive oxygen species (reaktív oxigén fajták)**

**SAM = S-adenozil-L-metionin**

**SAMDC = S-adenozil-L-metionin dekarboxiláz**

**SAMS = S-adenozil-L-metionin szintáz**

**sGFP = synthetic green fluorescent protein (szintetikus zöld fluoreszcens fehérje)**

**SPD = spermidin**

**SPDS = spermidin szintáz**

**SPM = spermin**

**SPMS = spermin szintáz**

**VT = vad típus**



## 2. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Genetika és Biotechnológiai Intézetének jogelődjei korábbi kutatásai során *Fragaria x ananassa* Duch. cv. Elsanta receptákulum és az aszmag szövetek RNS-ujjlenyomatát tanulmányozták. cDNS-AFLP módszerrel expressziós változást mutató géneket azonosítottak a gyümölcserés zöld, fehér, rózsaszín és piros szakaszaiban izolált RNS-ekből kiindulva. 130 transzkriptum eredetű részleges cDNS-t izoláltak és szekvenáltattak. A szekvenált transzkriptumok között volt a poliaminok metabolizmusában résztvevő spermidin szintáz (DQ074728.1) is. A növényekben a poliaminok bioszintézisét az arginin dekarboxiláz (ADC), a SAM dekarboxiláz (SAMDC) és a spermidin szintáz (SPDS) szabályozza. Korábbi kísérleteink alapján kiderült, hogy bár az etilén és a poliaminok részt vesznek a gyümölcserésben, azonban más bioszintetikus útvonalakban is szerepet játszhatnak. A nem-klimaktérikus szamóca és a klimaktérikus gyümölcsök esetében eltérő módon vesznek részt a poliaminok a gyümölcserésben. Amíg a nem klimaktérikus szamócában a spermidin, és a spermin mennyisége nagymértékben emelkedik az érés előrehaladtával, addig a putrescin szint fokozatosan csökken. A poliaminok javítják a membránstabilitást az ozmotikus állapot szabályozásán keresztül, segítik a szabadgyökök negatív hatásainak kivédését, és hatással vannak a sztómák nyitottságára is. A kifejezetten két polipeptid összekötésére alkalmas  $\gamma$ -glutamil poliamin-származékokoknak fontos szerepük van a struktúr-, enzim-, és szignálfehérjék poszttranszlációs módosításában. Az arginin lebontását többek között az arginin dekarboxiláz enzim (ADC; EC 4.1.1.19) végzi, a reakció során agmatin és CO<sub>2</sub> keletkezik. Az agmatint az agmatináz enzim tovább alakíthatja putrescinné, így a poliamin bioszintézis felé terelve a szubsztrátot. A spermidin egy a növényekben is természetes módon előforduló poliamin forma, kémiaiilag 1,8-diamino-4-azaoktán. A spermidin egy dcSAM putrescinhez kapcsolásából jön létre, melyet a spermidin szintáz enzim katalizál.

A szamóca etiléntermelésében résztvevő *S-adenozil-L-metionin szintáz (FvSAMS)*, valamint az etilén és poliamin bioszintézis közös enzimét kódoló *S-adenozil-L-metionin dekarboxiláz (FvSAMDC)* gének jelentőségét az abiotikus stresszekkel szemben korábbi tanulmányainkóból már ismerjük. Ezekből a kísérletekből kiderül, hogy mindkét gén fokozott transzkripciója előnyösen befolyásolja a stressztoleranciát a vizsgált *Nicotiana benthamiana* D. növények esetében. A spermidin többletet termelő növények jobb gyümölcsminőséget és kedvezőbb beltartalmi mutatókat produkáltak, mint a kontroll társaik. A külsőleg alkalmazott spermidin kezelés hatása jól ismert paradicsom esetében, ám kevés a hasznosítható információ a gyümölcstermők vonatkozásában. Kísérletekkel bizonyították, hogy az utóérő őszibarack gyümölcsének puhulása lassítható spermidin permetezéssel. Hasonló kísérletekben a csökkenő

etilén mennyiség mellett a poliamin metabolizmus két kulcsenzimét (*ADC* és *SAMDC*) kódoló gének expressziója is csökkent.

A poliaminoknak az abiotikus stressztolerancia kialakításában játszott szerepéről egyre többet tudunk, a hatásmechanizmusuk azonban még számos kérdést vet fel. Ami azonban biztosnak látszik, az az, hogy a fokozott poliamin tartalmak segítenek a stresszekre reagálni a növényekben, így fenntartva a normális működésüket. A poliaminok növelik a sejtek külső és belső membránjainak stabilitását, csökkentik az oxidatív sérülések mértékét, puffereklik az ozmotikus állapotot. Ezenkívül az egyes poliaminformák elősegítik a szabadgyökök eliminálásáért felelős antioxidáns enzimek termelődését.

Az eddigi tanulmányokban már külön-külön vizsgálták az *ADC* és a *SPDS* enzimek túltermelésének hatását és bizonyították, hogy mind az *ADC*, mind a *SPDS* túltermelése fokozza a növények különféle abiotikus stresszekkel szembeni toleranciáját. Ennek ellenére egy kísérleti rendszerben még nem vizsgálták ezt a két enzimet. A kísérletben a vad típusú dohány növényeket *in vitro* 150 mg/l argininnel, 10 mg/l putrescinnel, és 10 mg/l spermidinnel kezeltük. A Fv*ADC* transzgenikus vonalakat 150 mg/l arginin és 10 mg/l putrescin, a Fv*SPDS* vonalakat 10 mg/l putrescin valamint 10 mg/l spermidin kezelésnek tettük ki. Meghatároztuk a klorofill *a* és *b*, a lignin és prolin tartalmat, a poliaminok mennyiségét, valamint a poliaminok egymáshoz viszonyított arányát.

Elsődleges célunk az említett arginin dekarboxiláz és spermidin szintáz enzimeket kódoló gének és azok hatásmechanizmusának mélyebb megértése volt, így közelebb juthatunk a poliaminok megismeréséhez.

További célkitűzésünk volt, hogy összehasonlító vizsgálatot végezzünk el a kontroll, illetve a hosszútávú arginin, putrescin és spermidin kezelésnek kitett a nem utóérő *Fragaria vesca* L. cv. Rügen szamócából izolált *Fragaria vesca* arginin dekarboxiláz (Fv*ADC*) és spermidin szintáz (Fv*SPDS*) enzimet túltermelő *Nicotiana tabacum* L. vonalak és annak vad típusa között.

Ez a kísérleti beállítás lehetővé teszi, hogy a vizsgált növényélettani paraméterek kvantitatív módon viszonyíthatóak legyenek egymáshoz, így tisztább képet alkothatunk a két enzim szerepéről.

Mivel a kísérletben alkalmazni kívánt pGWB405 bináris vektor a konstitutív CaMV35S promótert tartalmaz és a vizsgálni kívánt inszertek (Fv*ADC*, Fv*SPDS*) a *sGFP*-vel történő C-



terminális fúzionáltatásra alkalmas, további célként tűztük ki, hogy meghatározzuk a *FvADC::sGFP* és a *FvSPDS::sGFP* enzimek szubcelluláris lokalizációját.

Végül célul tűztük ki, hogy az eredmények értékelésével feltérképezzük a vizsgált paramétertek értékei közötti összefüggéseket, valamint a táptalaj-kiegészítők, illetve az átvitt gének hatását is kimutassuk.

### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 3.1. A poliaminok biológiai szerepe a növényekben

A poliaminok és a prolin a legfontosabb nitrogéntartalmú növényi ozmolitok (Bouchereau *et al.*, 1999; Kavi Kishore *et al.*, 1995; Tarezynski *et al.*, 1993). A poliaminok (PA) legalább két aminocsoporttal rendelkező kis molekulatömegű alifás nitrogéntartalmú vegyületek (Xu *et al.*, 2009). A spermidin (Spd), spermin (Spm) és a közvetlen prekursor molekulájuk, a diamin putrescin (Put) alapvető és létfontosságú poliaminok, melyek minden élő szervezetben jelen vannak. (Liu *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017; Tun *et al.*, 2006). A növények minden sejtjében megtalálhatók, még a sejtmagban és az embrióban is, ami az alapvető sejszintű folyamatokban betöltött fontos szerepük egyértelmű bizonyítéka (Bouchereau *et al.*, 1999; Galston *et al.*, 1997; Walden *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2015).

A poliamin szintek nagyban függenek a növény fajtától, egészségi állapotától, a szervtől, a szövet típusától, valamint a fejlődési stádiumtól (Kuznetsov és Shevyakova, 2007). A poliaminok nem tartoznak a fitohormonok közé, hatásuk azonban azokéhoz hasonló. Számos élettani folyamatban vesznek részt, úgymint a növekedés, a szenescencia, a stresszválasz reakciók (Mariani *et al.*, 1989; Nambeesan *et al.*, 2008). A sejszintű poliamin felvétel nagyon gyors folyamat, néhány perc alatt eléri a telítettséget. A feleslegben rendelkezésre álló poliaminokat a sejt a vakuólumban tárolja (Bagni és Pistocchi, 1991).

Ipari felhasználásuk során a poliaminok polimerképző- és kationos tulajdonságát használják ki. Főleg papírgyártásban, festékgyártásban vagy szennyvizek kezelésénél alkalmazzák. Koagulánsként a lebegő anyagok kicsapásával segítenek a víztisztításban vagy a szilárd fázis kinyerésében, de radioaktív urán eltávolítására is alkalmasak (http1; Joo *et al.*, 2003; Yue *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2022). Külsőleg adagolt poliaminok elősegítik a szőlő mikro dugványok *in vitro* gyökeresedését (Martin-Tanguy és Carré, 1993). A bioliztikus transzformációnál használt arany vagy wolfram részecskék felületén a DNS vagy RNS molekulákat a spermidin kationos tulajdonságát kihasználva kötik meg (Sanford *et al.*, 1993; Sivamani *et al.*, 2009). A tömegspektroszkópiában használt izoelektromos fókuszálás akrilamid géljéhez zwitterionos poliamin komplexet adva jobb elválasztást és hatékonyabb azonosíthatóságot lehet elérni (Esposito és Porta, 2003; McWhinney *et al.*, 1995). A poliaminok egyik további biotechnológiai felhasználási területe a sejt kultúrák felszaporításának elősegítése. Komplex poliamin tartalmú készítményekkel lerövidíthető a sejt kultúrák (élesztő, baktérium vagy

növényi származású) felszaporodásának ideje, valamint a nehezen tenyészthető sejtek kultúráiban is segít. Humán limfocita és zigotikus sejtek tenyésztésénél is használják (http2; Lenis *et al.*, 2017). A poliaminok központi szerepet töltenek be a tumorok kialakulásában, mivel szabályozzák a sejtosztódást, génexpressziót, a DNS- és fehérjeszintézist, az oxidatív stresszre adott reakciókat és az apoptózist. A poliamin bioszintézis gátlásával csökkenthető a tumor növekedése, fejlődése (Moinard *et al.*, 2005; Takigawa *et al.*, 1990). A magok poliamin oldatba mártása korábbi és egységesebb csírázást eredményez paprika, kukorica és búza esetében is. A csírázási idő akár 50%-kal is csökken, a magok nagyobb arányban csíráznak ilyen kezelés hatására. Nő a csíra és a gyökér hossza, a friss és száraztömeg, valamint a kihajtás erőssége is (Alharby *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2016).

A poliaminok fontos szerepet töltenek be az abiotikus és biotikus stressz tolerancia kialakításában, valamint a stresszre történő válaszreakciókban (Alcázar *et al.*, 2010a; Kasukabe *et al.*, 2004). A poliaminok javítják a membránstabilitást az ozmotikus állapot szabályozásán keresztül, segítik a szabadgyökök negatív hatásainak kivédését, és hatással vannak a sztómák nyitottságára is (Liu *et al.*, 2007; Roy *et al.*, 2005). A poliaminok jól szállítódnak a növény szövetei között, így az egész növényre kiterjedő szignálmolekulaként is el tudják látni funkciójukat (Pál *et al.*, 2015; Szalai *et al.*, 2017). A poliaminok bioszintézise több helyen kapcsolódik más vegyületek előállításával, így a szalicilsav képződéssel is. A poliaminokkal együtt a szalicilsav is segít az abiotikus stressz kivédésében, még a kényes akklimatizáció alatt is (Janda *et al.*, 2014; Pál *et al.*, 2006). Megfigyelhető volt a poliaminok és a szalicilsav szintek egyidejű emelkedése stresszhelyzetben (Pál *et al.*, 2013). Egyes vizsgálatok kimutatták a szalicilsav koncentrációjának közvetlen hatását a poliamin bioszintézisre is (Németh *et al.*, 2002; Szepesi *et al.*, 2011). A poliaminok kationos tulajdonságuk miatt könnyen alakítanak ki kötést anionos jellegű makromolekulákkal, mint a DNS, RNS, foszfolipid membránok, lignin és fehérjék (Gill és Tuteja, 2010; Igarashi és Kashiwagi, 2015). Ezek jellemzően reverzibilis kötődések, melyek által a kötött molekula kémiai és fizikai is stabilabb lesz (Bachrach 2005; Smita és Upendranath, 2008). A poliaminok számos formában kötődhetnek fehérjékhez, leggyakoribb eset a poliaminok primer amincsoportja, és egy fehérje endoglutaminja közötti kovalens kötés (Kuznetsov és Shevyakova, 2007). Kifejezetten két polipeptid összekötésére alkalmas  $\gamma$ -glutamil poliamin-származékok fontos szerepet játszanak a struktúr-, enzim-, és szignálfehérjék poszttranszlációs módosításában. A kötés specifikus, csak jól hozzáférhető glutamin esetében jöhet létre, a célfehérje aminosav szekvenciája nem befolyásolja. A molekulaméret miatt a putrescin képezi a legrövidebb hidat, a spermin a leghosszabbat, így nagyméretű fehérjeaggregátumok jöhetnek létre a poliaminok

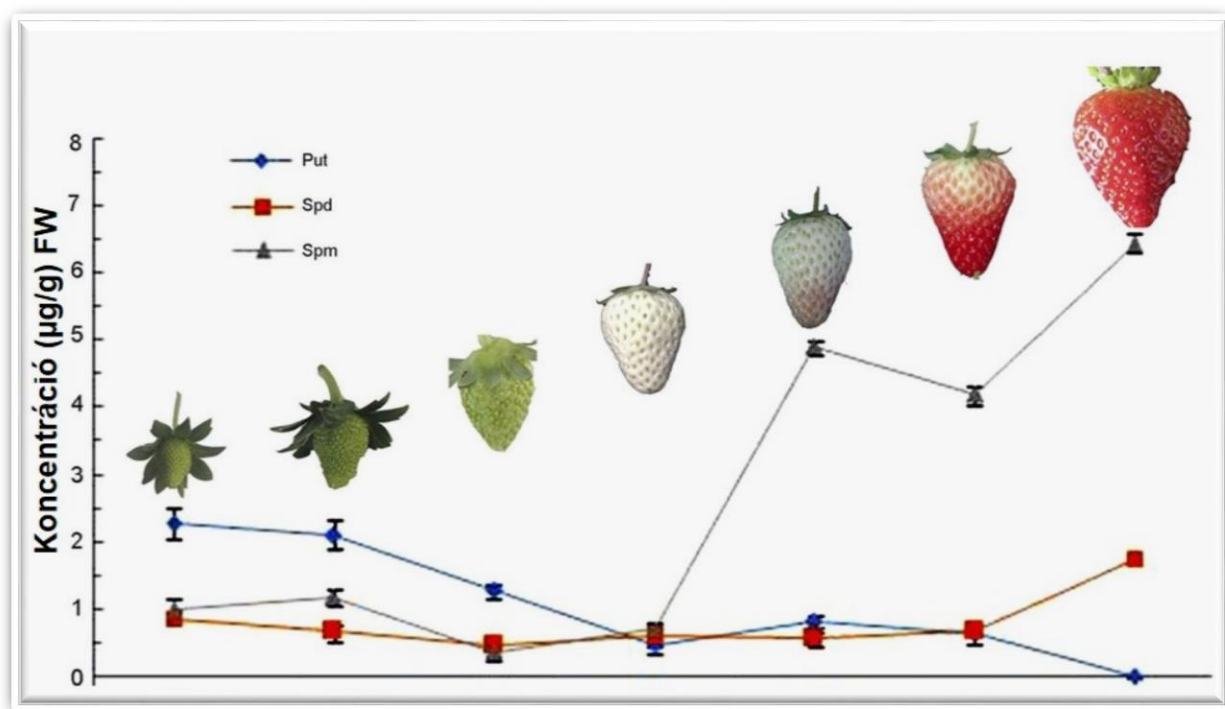
segítségével (Dondini *et al.*, 2003). A poliamin-konjugátumok szabályozzák a szabad poliaminszintet, valamint azok transzlokációjáért is felelősek (Havelange *et al.*, 1996; Martin-Tanguy, 2001). A szabad poliaminszintek szigorú homeosztatisz szabályozás alatt állnak, így koncentrációjuk nem éri el a toxikus szintet (Kuznetsov és Shevyakova, 2007).

### **3.2. A poliaminok biológiai szerepe a gyümölcserésben**

A gyümölcsök érése során a sejtek számában (és méretében), cukor- és savtartalmában, textúrájában, színében, ízében és aromájában bekövetkező változásokat a fitohormonok szabályozzák. A gyümölcserés lefolyását kétféle típusba sorolhatjuk: utóérő (klimaktérikus) és nem utóérő (nem-klimaktérikus). A klimaktérikus gyümölcserést klasszikusan a paradicsom (*Solanum lycopersicum* L.) példáján keresztül vizsgálják. Az etilén kulcsfontosságú az érés során (Alexander és Grierson, 2002). A paradicsomban az érés kezdetekor a narancssárga fázisban nagymértékben megnő az etiléntermelés, majd az érés előrehaladtával csökkenni kezd (Van de Poel *et al.*, 2012).

A nem-klimaktérikus gyümölcserés megismerésére alkalmas a szamóca (*Fragaria x ananassa* Duch.) növény. Ez a kis méretű modellnövény évelő, korán termőre fordul, generatíván és vegetatíván is szaporítható, valamint jól tűri az *in vitro* körülményeket (Jiu *et al.*, 2018). A szamócában az etilén mennyisége a zöld érési fázisban a legnagyobb, a fehér fázisra visszaesik, ezt követően a piros érési fázisig kismértékben megint emelkedik (Kovács *et al.*, 2020; Perkins-Veazie, 1995; Perkins-Veazie *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2013), a szamócagyümölcs érésekor nincs etiléncsúcs. A szamóca gyümölcs érését tehát nem csak az etilén, hanem számos növényi hormon együttesen szabályozza (Shen és Rose, 2014). A szamóca gyümölcs fejlődése során az abszcizinsav (ABA) szint emelkedése, az indolecetsav (IAA) mennyiségének csökkenése, arra enged következtetni, hogy ezen hormonok aránya szolgál szignálként a gyümölcserés következő fázisba történő lépéskor (Perkins-Veazie, 1995). Az indolecetsav önmagában indukálja a receptákulum sejtjeinek megnyúlását, ezzel egyidejűleg gátolja az érés előrehaladását (Given *et al.*, 1988) Az emelkedő ABA (abszcizinsav) koncentráció ezzel szemben segíti a gyümölcserést (Jia *et al.*, 2011). Az exogén etilén (vagy etilén-analóg) alkalmazása represszálja a gyümölcshús puhulásában szerepet játszó számos gén expresszióját, így lassítja az érést (Bustamante *et al.*, 2009; Castillejo *et al.*, 2004; Trainotti *et al.*, 2001). A szamócagyümölcs érését az etilén, az abszcizinsav a gibberelinsav, az auxin, a jázmonsav és a brassinoszteroidok együttesen szabályozzák (Chai *et al.*, 2013; Concha *et al.*, 2013; Csukasi *et al.*, 2011; Given *et al.*, 1988; Li *et al.*, 2011).

A poliaminok a szamóca gyümölcs fejlődésében és érésében is nélkülözhetetlenek (Guo *et al.*, 2018; Tilak és Raymond, 1996). A poliaminformák mennyiségének változását a szamóca gyümölcsének érése során a **1. ábra** szemlélteti.



**1. ábra:** A poliamin formák mennyiségének változása a szamóca érése során. A spermidin, és a spermin mennyisége nagymértékben emelkedik a szamóca érésének előrehaladtával, viszont a putrescin szint fokozatosan csökken (Guo *et al.*, 2018 nyomán).

A poliaminformák egymáshoz viszonyított arányának nagyobb a hatása, mint azok relatív mennyiségének. Ez az arány befolyásolja a sejtosztódást, a sejtmeagnyúlást, a szövettendifferenciálódást, a magvak csírázását, és az abiotikus stresszekkel szembeni tolerancia mértékét (Kakkar *et al.*, 2000; Minocha *et al.*, 1996; Paul *et al.*, 2017; Pieruzzi *et al.*, 2011). Amíg a szamócában a spermidin, és a spermin mennyisége nagymértékben emelkedik az érés előrehaladtával, addig a putrescin szint fokozatosan csökken (Guo *et al.*, 2018). A nem-klimaktérikus szamóca és a klimaktérikus gyümölcsök esetében eltérő módon vesznek részt a poliaminok a gyümölcserésben. A klimaktérikus érésű banán esetében mindhárom vizsgált poliaminforma koncentrációja emelkedik az érés során, majd az etilén-csúcs után egy visszaesés tapasztalható (Lokesh *et al.*, 2019).

A klimaktérikus, gyorsan puhuló kajszi és őszibarack érésmenete is befolyásolható exogén poliamin kezeléssel. A gyümölcsök bemártása putrescin vagy spermidin tartalmú oldatba

csökkenti a tömegvesztést, a légzésintenzitást, a fagyási sérülések előfordulását, a sejtfalak károsodását. A cukortartalom, oldható szárazanyagtartalom, titrálható savtartalom, színanyag tartalom, valamint húskeménység csökkenése időben elhúzódik, későbbre tolódik ilyen kezelések hatására (Bal, 2013; Koushesh *et al.*, 2012). A poliaminokkal történő pre- és posztharveszt kezelések az antioxidáns aktivitás növelésén és a sejtfaldegradáció csökkentésén keresztül növelik a pultontarthatóság idejét (Serrano *et al.*, 2016). Szabadföldi kísérletek alapján a putrescin és spermidin tartalmú szerekkel történő permetezés betakarítás előtt pozitívan befolyásolja a nektarin gyümölcsseinek pultontarthatóságát. A permetezés hatása hasonló a bemártásnál leírtakkal: elhúzódo minőségcsökkenés és hosszabb pultontarthatósági idő tapasztalható. A gyümölcshullás mértéke csökken, hosszabb ideig fán tartható a termés. A preharveszt poliaminkezelés csökkenti a gyümölcsök etilén termelését is (Torrighiani *et al.*, 2004). Érésspecifikus promóterhez kapcsolt SAMdc vagy ADC génnel megemelhető az érés kori poliamin tartalom. Ez az emelkedett szint magasabb C vitamin és likopintartalmat, a növény hosszabb életét eredményezi (Mattoo és Handa, 2008; Mehta *et al.*, 2002; Srivastava *et al.*, 2007; Torrighiani *et al.*, 2008). Az etiléntartalom és a légzés csökkentésével nő a pultontarthatóság ideje is (Gupta *et al.*, 2019). Spermidin és spermin túltermelő szamóca növények putrescintartalma alacsonyabb, mint a kontroll növényeké. Az indolecetsav, abszcizinsav, antocianin és oldható cukortartalom magasabb, mint a nem transzformáns növények gyümölcsseiben (Guo *et al.*, 2018). Az exogén poliamin kezelés gátolta az őszibarack (*Prunus persica* Batsch.) érését és a gyümölcshús puhulását, míg a poliaminok a sejtek megnyúlásának serkentésén túl az aroma vegyületek kialakulását is fokozzák a szőlő (*Vitis vinifera* L.) érése során, de a málna (*Rubus occidentalis* L.) és a datolya (*Phoenix dactylifera* L.) gyümölcserésben is fontos szerepet játszanak (Agudelo-Romero *et al.*, 2013; Bregoli *et al.*, 2002; Diboun *et al.*, 2015; Fortes *et al.*, 2015; Simpson *et al.*, 2016; Torrighiani *et al.*, 2012). Idegentermékenyülő japánkörte fajták putrescin permetezést követően nagyobb mértékben termékenyülnek. A kezelt virágok bibéje hosszabb ideig fogékony a pollenre, így a kézi beporzás is hatékonyabb (Franco-Mora *et al.*, 2005; Tamura *et al.*, 2006).

### **3.3. A poliaminok biológiai szerepe a stressztolerancia kialakításában**

Korábbi kísérleteink alapján kiderült, hogy bár az etilén és a poliaminok részt vesznek a gyümölcserésben, más bioszintetikus útvonalakban is szerepet játszhatnak a poliamin metabolizmus során aktív gének (Mendel *et al.*, 2018, Mendel *et al.*, 2021). Stressz minden olyan külső hatás, ami meggátol egy biológiai rendszert (ez esetben egy növényt) a normális működésben (Jones és Jones, 1989). A különböző abiotikus stressztípusok minden évben jelentős gazdasági károkat okoznak világszerte. Leggyakoribb a hideg-, szárazság-, meleg-, nehézfém és sóstressz

(Mahajan és Tuteja, 2005; Shi és Yin, 1993). Az etilén és a poliaminok fontos szerepet játszanak a növények biotikus és abiotikus stresszválaszainak kialakításában (Jang *et al.*, 2012; Müller és Munné-Bosch, 2015; Peng *et al.*, 2014; Romero *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2014), habár számos kutató egyetért abban, hogy az etilén és a poliamin metabolizmusa antagonisztikus (Li *et al.*, 2004; Nambeesan *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2016). Az etilén bioszintézise a SAM-ACC-etilén útvonalon történik (Yang és Hoffmann, 1984). Az etilén előállításában résztvevő ACC szintáz (ACS) és ACC oxidáz (ACO) enzimeket kódoló gének expressziója stressz hatására nő, így megemelkedik a szövetek etilén tartalma. Exogén ACC és etilén kezelések is növelik stressztűrést, míg az etilén koncentráció csökkentése érzékennyé teszi a vizsgált növényeket (Chen *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2004). A SAM dekarboxilációja során keletkezett dcSAM szolgáltat aminopropil-csoportot a spermidin- és spermin bioszintéziséhez (Hu *et al.*, 2006; Khan és Singh., 2010). Látható, hogy a SAM mindkét útvonal limitáló szubsztátja lehet, funkciója attól függ, hogy az ACS vagy a SAMDC enzim alakítja tovább. Ez a látszólagos ellentmondás mégsem akadályozza a sejt élettani folyamatait, mivel a sejten belüli SAM készlet mintegy 10%-át használja csak el a poliamin- valamint az etilén bioszintézisére (Bregoli *et al.*, 2002; Raveland *et al.*, 1998).

A sejtekben felhalmozódó reaktív oxigénradikálok mellett a prolin mennyisége is jól jellemzi a növények stresszeltségi állapotát. A prolin és a poliaminok a legfontosabb nitrogéntartalmú növényi ozmolitok (Bouchereau *et al.*, 1999; Tarezynski *et al.*, 1993). A prolin felhalmozódását számos növényfajban kimutatták környezeti stresszek hatására, így stresszeltségi állapotot jelző aminosavként tekintünk rá amellet, hogy nagymennyiségű gyorsan hasznosítható nitrogéntartalmú képvisel (Borgo *et al.*, 2015; Darko *et al.*, 2017; Kovács *et al.*, 2014). Hideg, meleg, alacsony vízpotenciál, nehézfém és só okozta stresszekre is következtethetünk a prolin mennyiségéből (Verslues *et al.*, 2010). Kavi Kishore *et al.*, (1995) kimutatták a prolin túltermelő transzgenikus *Arabidopsis* növények fokozott sótoleranciáját, valamint a prolin mennyiség növekedését különböző stresszek hatására.

A különböző poliaminformák a kloroplasztiszok, mitokondriumok és plazmamembránok megóvásában és stabilizálásában is szerepet játszanak (Jia *et al.*, 2010). A spermidin megőrzi a plazmamembrán integritását a stressz alatt, illetve megakadályozza a szuperoxid-generálódását a NADPH-oxidáz aktiválódásának gátlásával. (Roy *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2000). A magasabb rendű poliaminok (spermidin és spermin) növelik a tonoplaszt ion transzportereinek ( $H^+$ -ATPáz és  $H^+$ -PPáz) aktivitását, amelyek ezáltal a citoszolból a  $Na^+$ -t a vakuólumokba pumpálják, így ion- és pH egyensúlyt alakítanak ki a sejtben. (Liu *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2005). A poliaminok a

spermidin indukálta foszforiláció révén a só indukálta stressz jelzésben is szerepet játszanak (Gupta *et al.*, 2012a, b).

Gyakran reverzibilisen kapcsolódnak a kromatinszálakhoz is, így stabilizálva azokat (Alcázar *et al.*, 2020; Lutts *et al.*, 2013). A poliaminformák a poszttranszlációs folyamatok során módosíthatják a fehérjék aktivitását, funkcióját, de a transzkripció hatékonyságát is csökkenthetik (Mustafavi *et al.*, 2018). Ezek a beavatkozások hozzájárulnak a növényi szövetek fehérjetartalmának változásához (Du *et al.*, 2017; Sequera *et al.*, 2017; Yuan *et al.*, 2014). A fehérjék szenescencia okozta gyors degradálódását mind a spermidin, mind a spermin megakadályozza (Cai *et al.*, 2015; Serafini-Fracassini *et al.*, 2010; Wang és Shi, 2004). A spermidin növeli a nitrát reduktáz enzim aktivitását, ezzel pozitívan befolyásolja a nitrogén metabolizmust (Miura, 2013). A feleslegben felhalmozódott ammónia poliaminok hatására glutamáttá alakul, amely közvetlen prekursora a prolin és putrescin bioszintézisnek (Mattoo *et al.*, 2010).

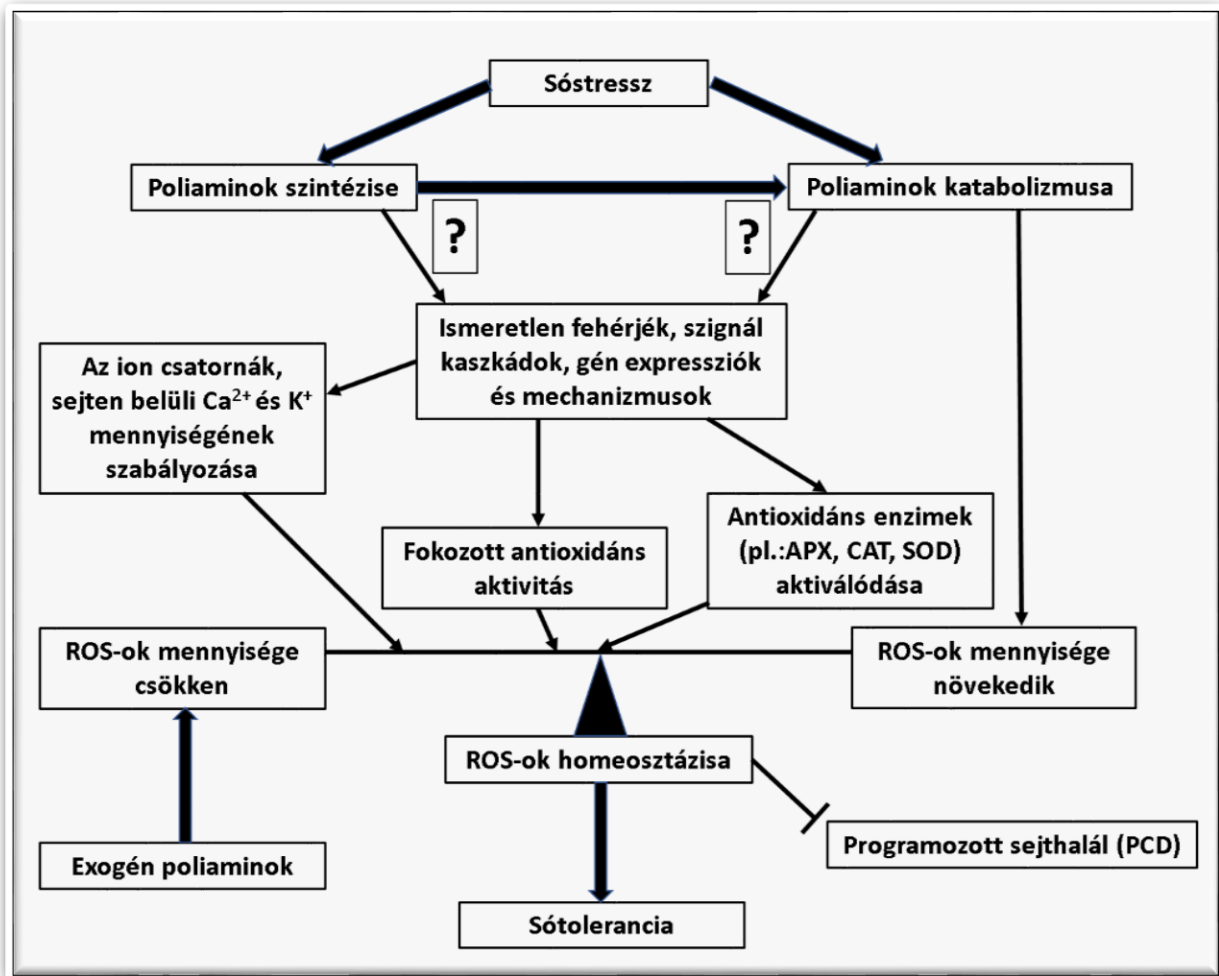
A minden növényi sejtben jelenlevő poliaminok fontos szerepet töltenek be a növények sótoleranciájának kialakításában is (Alcázar *et al.*, 2010a; Kasukabe *et al.*, 2004). A nitrogéntartalmú ozmolitok közül a prolin és a poliaminok a legfontosabbak (Bouchereau *et al.*, 1999; Kavi Kishore *et al.*, 1995; Tarezynski *et al.*, 1993). A poliaminok szerepet játszanak a szabad gyökök eltávolításában és a sztómák mozgásának szabályozásában, a membránstabilitásban, valamint az ozmotikus szabályozásban (Liu *et al.*, 2007). Eltérő eredmények születtek stresszelt növények poliamin tartalmának vizsgálata során, az endogén poliaminok mennyisége sóstressz hatására csökkent az almában, kukoricában és babban, ezzel ellentétben, szőlőben, búzában és kínai kelben emelkedett (Iqbal és Ashraf, 2012; Kim *et al.*, 2010; Legocka és Sobieszczuk-Nowicka, 2012; Liu *et al.*, 2008; Upreti és Murti, 2010). Az emelkedett toleranciát a fokozott mennyiségű spermidin és spermin hatásának tulajdonítják (Ahmad *et al.*, 2009; Alet *et al.*, 2012; Ben *et al.*, 2009; Yamamoto *et al.*, 2011;). Sóstressz esetén kínai kelben a putrescin mennyisége csökken, a spermidiné és a sperminé nő, míg a magoncoknál a spermidin szint csökken, a spermin szint növekszik (Kim *et al.*, 2010; Zapata *et al.*, 2003). Ezen vizsgálatok alapján a poliaminformák magasabb koncentrációja jellemző sóstressz hatására.

Exogén poliamin alkalmazásával sótoleranciát biztosíthatunk a növényekben. Az exogén putrescin sóstresszelt nadragulya (*Atropa bella-dona* L) különböző szerveiben csökkentette a Na<sup>+</sup> és a Cl<sup>-</sup> ionok felhalmozódását (Ali, 2000), sóstresszelt mustárban és csicseri borsóban fokozta az antioxidáns enzimek és a karotinoidok aktivitását (Sheokand *et al.*, 2008; Verma és Mishra, 2005).



A putrescin kezelés csökkentette a Na<sup>+</sup> felvételét és fokozta kálium felhalmozódását a gyökerekben, ezáltal pozitívan hatott a 100 mM NaCl stressznek kitett uborka (*Cucumis sativus* L.) magoncok gyökeresedésre is (Shi *et al.*, 2008). A foszfolipid membránok stabilizálásán, a szabad gyökök megkötésén és a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> egyensúly fenntartásán keresztül a putrescin mellett az exogén spermidin is fokozza a növények sótoleranciáját (Salethong *et al.*, 2011). Az exogén spermidin csökkenti a Na<sup>+</sup> felvételt a gyökerekben és gátolja a K<sup>+</sup> kiáramlását a sejtekből, és a Na<sup>+</sup> transzportot a gyökerekből a levelek felé (Zhao és Qin, 2004; Zhao *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2006). Az exogén spermin alkalmazása is növelte a szuperoxid-dizmutáz, a peroxidáz és az aszkorbát-peroxidáz aktivitását sóstresszelt uborkában, amely antioxidáns enzimek csökkentették a szuperoxid anion és malondialdehid mennyiségét (Shu *et al.*, 2013). Mindhárom fő poliaminforma (Put, Spd, Spm) exogén alkalmazása növeli a növények sótoleranciáját, de a kiemelkedő szerepe a korábbi kísérletek alapján a Spd-nek van (Hu *et al.*, 2012; Kasukabe *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2000).

A magas hőmérséklet okozta strukturális változások gyengítik a sejtmembránokat, különösképpen a kloroplasztiszok tilakoidmembránjait, így csökken a fotoszintetikus aktivitás (Seemann *et al.*, 1984; Starck *et al.*, 1993; Thebut és Santarius, 1982). A hősokk-fehérjék (HSP) mellett a poliaminok membránstabilizáló hatása is segít ebben az abiotikus stresszhelyzetben megtartani a növényi sejtek integritását (Kislyuk *et al.*, 1992; Porankiewicz és Gwózdź, 1993; Schuber 1989; Vierling, 1991). A hősokk okozta poliamin szint emelkedésének pozitív hatásait a membránintegritásra, a sztómák záródására, a víz- és ionveszteség csökkentésére, a szabadgyökök megkötésére már régóta ismerjük (Drolet *et al.*, 1986; Edreva *et al.*, 1998; Roy és Gosh, 1996). Hasonló eredményeket értek el búza növények ozmotikus stresszelése (PEG kezelés) esetében is (Kovács *et al.*, 2014). Számos zöldségféle esetében (káposzta, borsó, kukorica, saláta, répa, spenót, uborka, retek) bizonyították, hogy poliamin kezelést követően nagyságrendekkel nagyobb nehézfém koncentrációt is elviselnek. A fokozott tolerancia mellett a betakarított zöldségek Zn, Cd, Cr tartalma is alacsonyabb volt, mint a kezeletleneké (Choudhary *et al.*, 2012; Soudek *et al.*, 2016). Búza és egyéb fűfélék szárazságstressz okozta termés csökkenését szintén csökkenteni tudták poliamintartalmú permetezéssel (Ebeed *et al.*, 2017; Shukla *et al.*, 2015). A magasabb poliamin tartalom (a spermidinnek kiemelt szerepe van) segít a klorofill mennyiség csökkenés megakadályozásában, valamint a helyreállításban stresszhelyzetben (Besford *et al.*, 1993; Cohen *et al.*, 1979; Murkowski, 2001).



**2. ábra:** A poliaminok szerepe a sótolerancia kialakításában (Saha *et al.*, 2015 alapján).

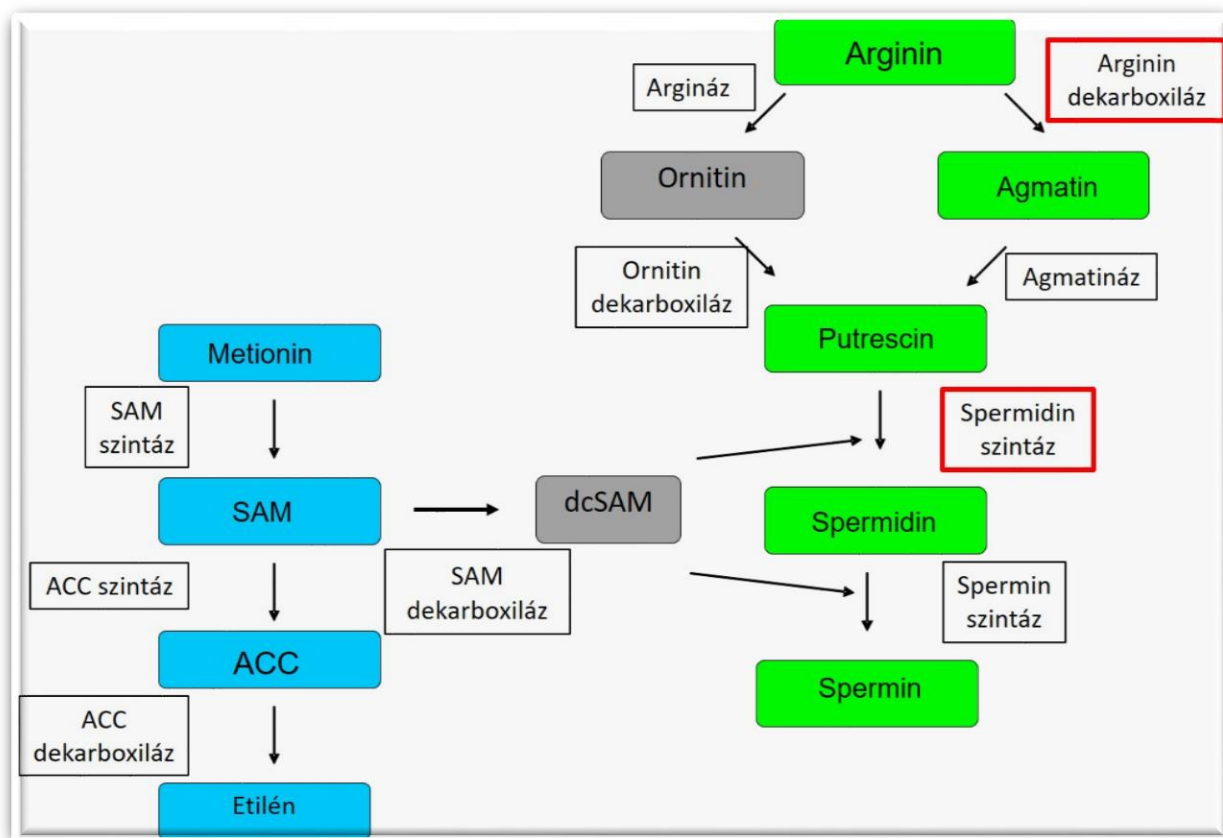
Az etilénhez hasonlóan, stressz esetén a poliaminok is fokozzák az antioxidáns rendszer enzimeinek aktivitását, valamint az ioncsatornák szabályozásával kialakítják a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  egyensúlyt, így szabályozva a ROS-ok és  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  homeosztázisát (**2. ábra**). A poliaminok diamin oxidáz (DAO) és poliamin oxidáz (PAO) általi stressz esetén bekövetkező katabolizmusa  $\text{H}_2\text{O}_2$ -t generál, ami kis koncentrációban szignálmolekula a stresszválaszban, nagyobb mennyiségben viszont programozott sejthalált (PCD) válthat ki (Moschou *et al.*, 2008a, b). A poliaminok lebomlásakor keletkező hidrogénperoxid csekély mennyiségű, önmagában nem okoz jelentős károkat. Ez a kis mennyiség azonban beindítja az oxidatív stresszek elleni védekezésben résztvevő gének (többek között a szuperoxid-dizmutáz, a peroxidáz és az aszkorbát-peroxidáz enzimeket kódoló) transzkripcióját, így a képződő  $\text{H}_2\text{O}_2$  jelzőmolekulaként funkcionál (Shu *et al.*, 2013). A poliaminoknak az abiotikus stressztolerancia kialakításában játszott szerepéről egyre többet tudunk, a hatásmechanizmusuk azonban még számos kérdést vet fel. Ami azonban biztosnak

látszik, az az, hogy a fokozott poliamin tartalmak segítenek a stresszekre reagálni a növényekben, így fenntartva a normális működésüket.

A poliaminoknak számos élettani funkcióján kívül rendkívül nagy szerepük van a másodlagos metabolitok kialakításában. Kiterjedt kutatások során bizonyították, hogy nemcsak a  $\gamma$ -amino-vajsav (GABA) bioszintézise indul ki a putrescintől, hanem különböző alkaloidok (atropin, kokain, effedrin, meszkalin, morfin, nikotin) kiindulási anyaga is ez a diamin (Docimo *et al.*, 2012; Fritz *et al.*, 2006; Kuznetsov és Shevyakova, 2007; Losak *et al.*, 2005; Zeller, 2012). A *SAMS1* mRNS felhalmozódása és a *Nicotiana suaveolens* L. virágillatának összetevői mennyisége között is összefüggést találtak (Roeder *et al.*, 2009).

### **3.4. A poliaminok metabolizmusa**

A poliaminok bioszintézisében résztvevő enzimek az ODC (ornitin-dekarboxiláz), az ADC (arginin-dekarboxiláz), az agmatin-iminohidroláz, a N-karbomilputrescin-amidohidroláz, a SAMDC (SAM dekarboxiláz), a SPDS (spermidin-szintáz), a SPMS (spermin-szintáz), valamint a LDC (lizin-dekarboxiláz). Ezt a bioszintetikus útvonalat növényekben az arginin dekarboxiláz (ADC), az ornitin dekarboxiláz (ODC), a SAM dekarboxiláz (SAMDC) és a spermidin szintáz (SPDS) szabályozza (Hasegawa *et al.*, 2000) (3. ábra). Az bioszintézisben eddig azonosított enzimek kódoló génjei *Arabidopsis thaliana* esetén: ADC1, ADC2, ODC, SPDS1, SPDS2, ACL5, SPMS (Imai *et al.*, 2004; Kuznetsov és Shevyakova, 2007; Panicot *et al.*, 2004; Soyka és Heyer 1999; Urano *et al.*, 2004;).



**3. ábra:** A poliaminok (zöld) és az etilén (kék) bioszintézise, valamint a bioszintézisben résztvevő kulcsenzimek (fehér). (Mendel *et al.*, 2013).

A S-adenozil-L-metionin (SAM) a közös prekursor molekulája az etilén és a poliamin metabolizmusnak (Martin-Tanguy, 2001; Minocha, 1988). A S-adenozil-L-metionin szintáz szintetizálja a S-adenozil-L-metionint (SAM) L-metioninből és ATP-ből, ami a második legtöbbet használt enzim-szubsztrát az ATP után (Cantoni, 1975). A SAM-ra mind a mitokondriumban, mind a kloroplasztisban szükség van a DNS, az RNS és a fehérjék metilálásához (Boerjan *et al.*, 1994; Block *et al.*, 2002; Fontecave *et al.*, 2004; Montasser-Kouhsari *et al.*, 1978; Shen *et al.*, 2002; Tabor és Tabor 1984). A lignin a legfőbb metabolikus fogyasztója a SAM-nak, ám csak bizonyos sejtekben és fejlődési fázisokban figyelhető meg lignin akkumuláció az elsődleges és a másodlagos sejtfa között (Hanson *et al.*, 1994). A SAM segítségével metilálódik a putrescin, a nikotin, a tropán és a nortropán alkaloidok (Blastoff *et al.*, 2009).

A SAM-ból 1-aminociklopropán-1-karboxilsav (ACC), majd etilén keletkezik (Yang és Hoffmann, 1984). Az etilén a növényi növekedés és fejlődés egyik fő szabályozója, valamint stresszhormonként viselkedik (Abeles *et al.*, 1992), és nagyban szerepet játszik a növény

természetes öregedésében, valamint a gyümölcsök érésében. Az etilén mennyisége abiotikus stresszek esetén is nő (Morgan és Drew, 1997).

Abban az esetben, amikor a SAM dekarboxiláz (SAMDC) dekarboxilálja a SAM-ot és dekarboxilált SAM (dcSAM) keletkezik, nem tud részt venni az etilén bioszintézisben. Ilyenkor a dcSAM a magasabb rendű poliaminok (spermidin és spermin) szintéziséhez szolgáltat aminopropil csoportot. A **3. ábrán** látható, hogy a spermidin (Spd) és a spermin (Spm) bioszintézis kulcsenzimeit a SAMDC mellett az arginin dekarboxiláz (ADC) és spermidin szintáz (SPDS) (de Dios *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2006; Mehta *et al.*, 2002; Khan és Singh, 2010). A SAM-ért folyó verseny az etilén és poliamin útvonal között nem alakul ki, mivel a SAM nagy feleslegben áll rendelkezésre. Az etilén és poliamin bioszintézis csupán 10%-át használja fel a SAM-nak (Bregoli *et al.*, 2002; Ravanel *et al.*, 1998). A poliaminok bioszintézisét növényekben alapvetően az arginin dekarboxiláz (ADC), a SAM dekarboxiláz (SAMDC), spermidin szintáz (SPDS) and spermin szintáz (SPMS) enzimek végzik (Hasegawa *et al.*, 2000; Lechowska *et al.*, 2021; Martin-Tanguy, 2001; Minocha, 1988).

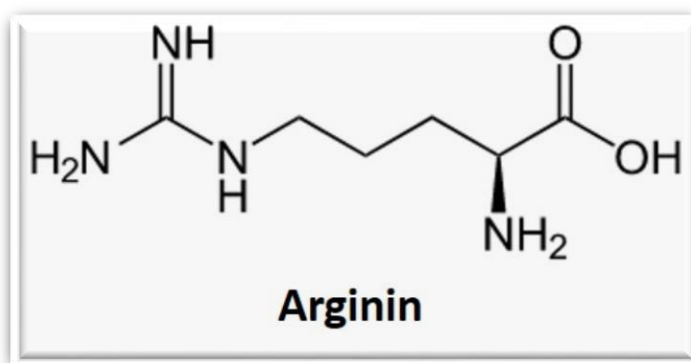
A legegyszerűbb poliamin a diamin putrescin, . Szintézise ornitinből vagy agmatinból indulhat ki. Az ornitint az ODC dekarboxilálással putrescinné alakítja (Shantz és Pegg, 1999). Az agmatin átalakítását putrescinné két enzim, az N-karbomilputrescin-aminohidroláz és az agmatin-aminohidroláz katalizálja (Docimo *et al.*, 2012; Genchi, 2017; Gill és Tuteja, 2010; Pegg, 2016). Magasabbrendű növényeknél mindkét útvonalon keletkezik putrescin, ám nem egyenlő mértékben. Normál állapotban az ADC útvonal, míg stresszelt állapotban az ODC útvonal fokozott működését mutatták ki (Lechowska *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2017). A *Brassicaceae* család számos tagjából (pl. *A. thaliana* L.) hiányzik az ODC útvonal, bizonyítva az ADC útvonal hatékonyságát (Hanfrey *et al.*, 2001). A putrescinhez a spermidin-szintáz enzim (SPDS) egy aminopropil csoportot kapcsol és így triamin spermidin jön létre. A továbbiakban a spermidinhez a spermin szintáz enzim (SPMS) újabb aminopropil csoportot kapcsolva tetraamin spermint hoz létre. Az aminopropil csoportokat az S-adenozil-metionin dekarboxilációja biztosítja, ezt a folyamatot az S-adenozil-metionin-dekarboxiláz (SAM DC) végzi (Kuznetsov és Shevyakova, 2007; Vuosku *et al.*, 2018). A putrescin a citoplazmában akkumulálódik, míg a spermidin a sejtfallban (Cai *et al.*, 2006).

A növényekben a poliaminok lebontását amin-oxidázok végzik. A réz-függő diaminoxidáz (DAO) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t, ammóniát és 4-aminobutanált állít elő a putrescinből. A legtöbb kétszikű növény nagy mennyiségben szintetizál DAO-t, ennek ellenére kevés ismert DAO gént írtak le

(Cona *et al.*, 2006). A flavoprotein-függő poliamin oxidáz (PAO) a magasabbrendű poliaminokat (Spd, Spm) bontja. A PAO enzim szintén generál  $H_2O_2$ -t (Hao *et al.*, 2018; Takahashi *et al.*, 2017). A növényekben megtalálható PAO géncsaládok kódolta enzimek számos módon kifejthetik hatásukat. A legtöbb poliamin oxidáz csak a tri- és tetraaminok lebontásáért felelős, de több esetben is kimutatták, hogy a poliaminformák közötti konverziót is katalizálhatják mind a lánchosszabbodás, mint a rövidülés irányában (Liu *et al.*, 2014; Moschou *et al.*, 2008c; Tassoni *et al.*, 2000). A PAO enzim az aminlánc hosszának csökkenéséért felelős (tehát sperminből spermidint hozhat létre), míg a DAO enzim terminális oxidációt eredményez (Walters, 2003a).

### 3.5. Az arginin és az arginin dekarboxiláz

Az L-arginin a növények számára feltételesen esszenciális aminosav, mivel a szervezet elő tudja ugyan állítani, de csak kis mennyiségben (Barbul, 1986; Beaumier, 1996; Visek, 1986). A fehérje felépítésben résztvevő 21 aminosav közül legnagyobb a nitrogén/szén aránya, így a fő nitrogénraktár az arginin (4. ábra) (Winter *et al.*, 2015).



4. ábra: Az L-arginin

A magban tárolt szerves nitrogén fajtól függően 40-50%-a argininként raktározódik, ugyanis ez a legkönnyebben mobilizálható nitrogénforrás (King és Gifford, 1997; VanEtten *et al.*, 1963). Az arginin a leggyakoribb nitrogénforma a föld alatti raktározó szervekben, legyen az gumó, rhizóma vagy gyökér (Bausenwein *et al.*, 2001; Nordin and Näsholm, 1997; Rennenberg *et al.*, 2010). Emiatt a növényekben az arginin metabolizmusa biztosítja a fő nitrogénelosztást és újrahasznosítást (Solum, 2005). Ez az egyik legszélesebb körben felhasznált aminosav, részt vesz az urea, ornithin, kreatin, agmatin, glutamát, prolin és poliamin bioszintézisében is, emiatt nagyon komplex szabályozás alatt áll (Morris, 2002; Wu és Morris, 1998). Az arginin közvetlen előállítása citrullinból történik. A citrullin előállítása elég energiaigényes folyamat, így alternatív útvonalak

is kialakultak: ornithinből (prolin vagy glutamin bontásából) takarékosabb a metabolizmus (Wu és Morris, 1998).

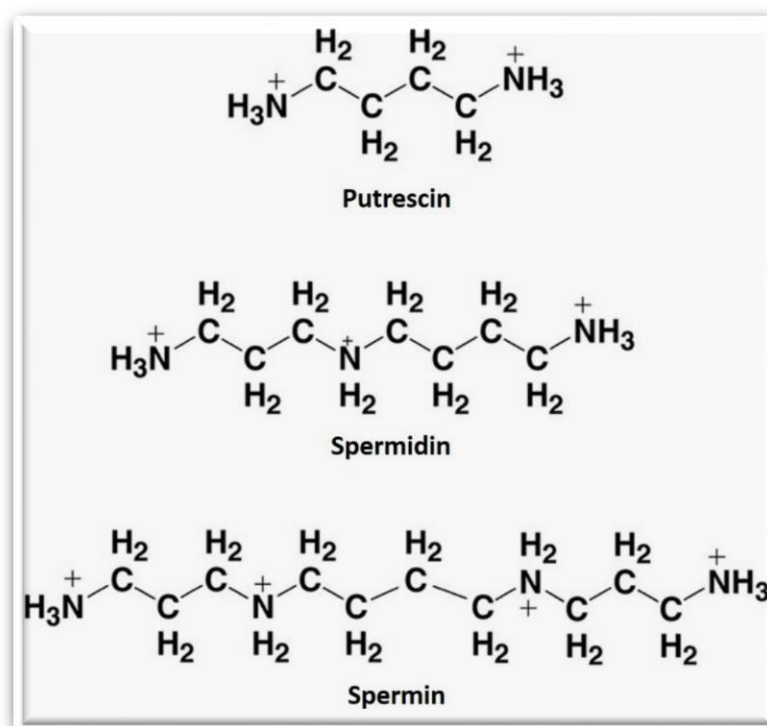
Az arginin lebontását többek között a piridoxál-foszfát függő arginin dekarboxiláz enzim (ADC; EC 4.1.1.19) végzi, a reakció során agmatin és CO<sub>2</sub> keletkezik (Mattoo *et al.*, 2015). Minden lebontó enzim az L-arginin guanidino csoportján keresztül hat (Morris, 2004). Az agmatint az agmatináz enzim tovább alakíthatja putrescinné, így a poliamin bioszintézis felé terelve a szubsztrátot (Iyer *et al.*, 2002; Mistry *et al.*, 2002).

A növények ADC génjeinek száma eltérő, van, ahol 2 (*Arabidopsis*) vagy 3 (*Brassica juncea*) is megtalálható (Galloway *et al.*, 1998; Mo és Pua, 2002). Az *Arabidopsis thaliana* *AtADC1* génje a sziklevelekben, valamint a levelek alapi részében, míg az *AtADC2* génje a sziklevelekben, a valódi levelekben, a gyökerek szállítószöveiben és a virágszervekben aktív (Urano *et al.*, 2003). Ez a kettősség igaz a kifejlett és a csíranövényekre is (Hummel *et al.*, 2004). Az *AtADC1* gén expressziója alig mutatható ki a mag kialakulásakor, ám az *AtADC2* expressziója virágzás után 12 nappal megerősödik, és az embriófejlődés minden szakaszában magas marad (Urano *et al.*, 2005). Mindkét ADC gén fokozott aktivitást mutat a hajtáscsúcs és a gyökércsúcs tenyészkúpjában. Stressz hatására csak az *AtADC2* aktívabb a szállítószövetekben (Urano *et al.*, 2004). *Nicotiana tabacum*, *N. benthamiana*, *Oryza sativa*, ADC génjein végzett vizsgálatok hasonló eredményeket hoztak (Akiyama *et al.*, 2007; Bortolotti *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2000a; 2000b). Számos növényfajban csak egy ADC gén van (Nam *et al.* 1997; Pérez-Amador *et al.* 2002; Primikiriós és Roubelakis-Angelakis, 1999; Rastogi *et al.* 1993;), ilyenek például az *Avea fatua* és a *Fragaria vesca* is (Mattoo *et al.*, 2015). Az ADC paralógok 80%-os szekvencia egyezést mutatnak a *Brassicaceae* családban (Hanfrey *et al.*, 2001). Az arginin dekarboxiláz gén (ADC) expresszióját növeli az exogén spermidin (Lazzarato *et al.*, 2009). A zab ADC génje egy 66 kDa-os fehérjét kódol, melyből egy 24 kDa méretű enzimatikusan aktív ADC enzim érik (Bell és Malmberg, 1990; Malmberg és Cellino, 1994). Paradicsomnál ugyanez az enzim 55 kDa méretű (502 aminosav) fehérjéből indul ki (Rastogi *et al.*, 1993). A *N. tabacum* 77 kDa-os polipeptidjéből (721 aminosav) 54 kDa funkcióképes, mely a sejtmagban és a kloroplasztisban kimutatható (Bortolotti *et al.*, 2004). A *FvADC* fő ORF-je (NC\_020497.1) 708 aminosavat kódol, intront nem tartalmaz. Genomi szinten a *Rosaceae* család *Prunus* nemzetségének arginin dekarboxiláz enzimét kódoló génjeihez áll a legközelebb: a *Prunus persica* (XM\_007200245.2) 88%, a *Prunus avium* (XM\_021950639.1) 81%, a *Prunus dulcis* (XM\_034370861.1) 81% hasonlóságot mutat. További magasfokú egyezés található a *Malus* és *Pyrus* fajok azonos génjeivel. A *Nicotiana tabacum* ADC-t kódoló génjével (NM\_001325190.1) 74%-os szekvencia egyezést mutat. Aminosav szinten a

*Fragaria vesca* ADC enzime a *Prunus persica*-ével (XP\_007200307.1) 85%, a *Prunus avium*-ével (XP\_021806331.1) 84%, *Prunus armeniaca*-ével (CAB4320369.1) 84%, de még a *Nicotiana tabacum*-ével (AAF42972.1) is 74% egyezést mutat.

### 3.6. A spermidin és a spermidin szintáz

A spermidin egy a növényekben is természetes módon előforduló poliamin forma, mely az eukarióták sejt növekedéséért és -fejlődéséért felelős (Fan *et al.*, 2020). Kémiaiailag 1,8-diamino-4-azaoktán (**5. ábra**) (Tassoni *et al.*, 2000). Egy dcSAM putrescinhez kapcsolásából jön létre, melyet a spermidin szintáz enzim (SPDS; E.C. 2.5.1.16) katalizál (Junker *et al.*, 2013; Korolev *et al.*, 2002).



**5. ábra:** A fő poliaminok (Kabir és Kumar, 2013 nyomán).

A poliaminok közül kiemelkedő szerepe van a spermidinnek, melyet számos kutatás támaszt alá. Többek között részt vesz a sejtosztódásban, sejt differenciálódásban, sejtmegegyezésben, a homeosztázis, a génexpresszió szabályozásában, makromolekulák előállításában, az apoptózisban, az oxidatív stressz okozta károk helyreállításában, az embriogenezisben (zigotikus és szomatikus), gyökérfejlődésben, virágzásindukcióban, a gyümölcsök kialakulásában és érésében, a pollentömlő kialakulásában és megegyezésében, a szenescenciában, valamint a biotikus és abiotikus stresszekre adott válaszreakciókban



(Agostinelli *et al.*, 2006; Bachrach és Wang 2002; Cassol és Mattoo, 2003; Cohen 1998; Fluhr és Mattoo, 1996; Jänne *et al.*, 2004; Kusano *et al.*, 2007; Mattoo és Handa, 2008; Mengoli *et al.*, 1992; Minocha *et al.*, 2004; Mohapatra *et al.*, 2009a; Paschalidis és Roubelakis-Angelakis, 2005; Pignatti *et al.*, 2004; Tome és Gerner 1997). Ezenkívül a spermidin szubsztrátként szolgál egy translációs iniciációért felelős faktor (eIF5A) módosításához is, így részt vesz a poszttranszkripciós szabályozásban is (Chou *et al.*, 2004; Mehta *et al.*, 1991; Park *et al.*, 1981; Park *et al.*, 2006; Wolff *et al.*, 2007).

A spermidin azon kívül, hogy a magas nitrogén/szén arányával önmagában is nitrogénraktárként működik a növényi sejtekben, szignálmolekulaként a szerves nitrogén körforgását is elősegíti a fák gyökereiben és leveleiben (Bauer *et al.*, 2004; Foyer és Noctor, 2002; Rennenberg *et al.*, 1998). A paradicsom termésének sejtjei szerves nitrogénforrásként használják a spermidint, (Mattoo *et al.*, 2006). A spermidin túltermelő transzgenikus vonalak jobb termésminőséget és kedvezőbb beltartalmi értékekkel rendelkeztek, mint a kontroll (Mattoo és Handa, 2008; Mehta *et al.*, 2002).

A külsőleg alkalmazott spermidin kezelés hatása jól ismert már paradicsom esetében, ám kevés a hasznosítható információ a gyümölcstermők vonatkozásában (Cheng *et al.*, 2012). Kísérletekkel bizonyították, hogy az utóérő őszibarack gyümölcsének puhulása lassítható spermidin permetezéssel (Torrighiani *et al.*, 2012). Ez a hatás a poligarakuronáz- és a pektinmetilészteráz inhibitor enzimek transzkripciós aktivitásának csökkenésével összefüggő lassuló sejtfa degradációnak köszönhető (Brummel *et al.*, 2004; Ghiani *et al.*, 2011; Trainotti *et al.*, 2003). Hasonló kísérletekben a csökkenő etilén mennyiség mellett a poliamin metabolizmus két kulcsenzimét (*ADC* és *SAMDC*) kódoló gének expressziója is csökkent (Ziosi *et al.*, 2006). A nem klimaktérikus szamóca esetében a spermidin növeli a virágok számát, a termésmennyiséget, a levélméretet, a növény tömegét és a klorofill tartalmat (Movahed *et al.*, 2010). A gyümölcs átmérője és tömege is növelhető exogén kezeléssel (Eshghi és Jamali, 2012). A tárolás során bekövetkező puhulás, súlyvesztés, sav-, C-vitamin és antocianin tartalom, valamint az antioxidáns kapacitás csökkenés kisebb mértékű spermidin kezelés hatására, de még az alacsony tárolási hőmérséklet okozta károsodás mértéke is (Mortazavi *et al.*, 2012; Raeisi *et al.*, 2013). Megnövekedett pultontarthatóságról számoltak be más spermidinnel kezelt növényekről származó terméseknél is, többek között paprika, kajszi, szilva, csemegegyümölcs, kivi, mangó és gránátalma esetében (Champa *et al.*, 2014; Malik és Zora, 2005; Mirdehghan *et al.*, 2015; Patel *et al.*, 2019; Pérez-Vicente *et al.*, 2002; Ramezanián és Rahemi, 2009; Wang *et al.*, 2019). Az *Arabidopsis thaliana* spermidin szintáz enzime 36 kDa tömegű. A gyökerekben az *AtSPDS1* és *AtSPDS2*

erősen expresszál, míg az *AtSPDS3* a hajtások internódiumaiban és a virágrügyekben (Hanzawa *et al.*, 2002). A borsó *PsSPDS1* génje az osztódó növényi szövetekben aktív (hajtáscsúcs, gyökércsúcs, fejlődő termés), míg a *PsSPDS2* a termésfejlődés későbbi szakaszában, és a hajtások elongációjakor expresszálódik erősebben (Alabadí *et al.*, 1999). Hasonló expressziós mintázatot írtak le *Nicotiana tabacum*, *Medicago falcata*, *Zea mays* esetében is (Guo *et al.*, 2014; Rodríguez-Kessler *et al.*, 2006; Zhuo *et al.*, 2018). Egy *SPDS* gént tartalmaz az *Olea europaea*, a *Prunus pseudocerasus*, a *Prunus avium*, a *Prunus persica*, a *Fragaria x ananassa*, és a *Fragaria vesca* is (Gomez-Jimenez *et al.*, 2010; Kovács *et al.*, 2020; Mendel *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2020).

A *FvSPDS* fő ORF-je (XM\_004297595.2) 336 aminosavat kódol. Nukleotid sorrendjében a legnagyobb egyezést az *Ipomopsis aggregata* (GT313702.1, 96%), a *Prunus armeniaca* (CV046039.1, 88%) és a *Quercus robur* (FP026861.1, 86%) mutatja a vizsgált szekvenciával. A *Nicotiana tabacum* *SPDS* génjének szekvenciája 80%-ban azonos a *FvSPDS* génjével. Aminosav sorrendet tekintve szintén a *Prunus* nemzetséggel a legnagyobb a hasonlóság: *Prunus armeniaca* (KAH0991643.1) 87%, *Prunus dulcis* (XP\_034218472.1) 87%, *Prunus persica* (XP\_007222503.1) 87%. A *Nicotiana tabacum* *SPDS* aminosav sorrendje 84%-os egyezést mutat a *FvSPDS* enzimmel.

### **3.7. Táptalaj-kiegészítők és genetikai transzformáció alkalmazása a poliamin-bioszintézis megismerésében**

A XVIII. században Duhamel du Monceau észrevette, hogy a sebzett fák felületén kallusz képződik (Bonga *et al.*, 1992). Később a XIX. század első felében Schleiden és Schwann is kimutatta, hogy a növények egy-egy sejtjéből is lehet intakt növényt felnevelni, és megalkották a totipotencia elméletét (Schleiden, 1838; Schwann, 1839). Az elméletet Haberlandt 1902-ben igazolta is (Haberlandt, 1902). 1904-ben Hännig éretlen embriókat izolált mesterséges körülmények között és sikerült több keresztesvirágú faj esetében ép növényeket felnevelnie (Hännig, 1904). Azóta az embriókultúrán kívül számos más módszert is kifejlesztettek, és útjára indult az *in vitro* módszerek használata különböző kutatási célok eléréséért (Pierik, 1997).

A poliaminok megismerése több, mint 300 éve tart. Leeuwenhoek 1678-ban izolált egy kristályos anyagot, melyet (6. ábra) 150 évvel később sperminként azonosítottak (Ladenburg, 1888; Leeuwenhoek, 1978; Schreiner, 1879;). A felfedezése után 250 évvel Rosenheim írta le először a spermin struktúráját, majd a spermidinét és putrescinét is (Rosenheim, 1924).



**6. ábra:** Spermin-foszfát kristályok Lewenhoeck mikroszkópja alatt (1678)  
(Leeuwenhoek, 1978).

Ezután a megismerés folyamata kissé felgyorsult, hamar megtalálták a diamin-oxidáz (DAO) enzimet, ami a putrescint bontja (Zeller, 1938). 1941-ben már számos szövetből ki tudták mutatni a poliaminok jelenlétét (Hämäläinen, 1941). A humán gyógyászatban a rákos elváltozások kimutatásának is egyik fő célmolekulái lettek a poliaminok (Russel, 1971). 1978-ban a poliamin bioszintézist gátló  $\alpha$ -difluorometil-ornithine (DFMO) szintetizálásával indult a hatásmechanizmus molekuláris vizsgálata (Bachrach, 2010; Metcalf, 1978).

Petúnia esetében találtak olyan mutánsokat, melyek magasabb ADC aktivitásuknak köszönhetően putrescint többletet termeltek. Ezek az egyedek abnormalis virágmorfológiával rendelkeztek (Gerats *et al.*, 1988).

Gyakoribbak azok a mutánsok, melyek valamilyen poliamin bioszintézishez kapcsolódó enzim deficiensek, így ADC és SPDS hiánymutáns *Arabidopsis* növényeket is azonosítottak már (Hanzawa *et al.* 1997; 2000, Soyka és Heyer 1999; Watson *et al.*, 1997; 1998). Kutatócsoportok egyetértenek abban, hogy túltermelő mutánsokat nehéz kimutatni, mivel a sejtszintű poliamin homeosztázis szigorúan szabályozott. Egy-egy gén kikapcsolása vagy épp fokozott transzkripció aktivitása számos élettani folyamatot érint, ami gátolhatja a sejtek normális működését (Kakkar *et al.*, 2002).

Genetikai transzformáció segítségével új metabolikus útvonalak alakíthatók ki olyan növényekben, melyekben addig nem volt jellemző az adott végtermék (Tarczynski *et al.*, 1992). Az elmúlt évtizedekben a genetikai módosítás (és kiváltképp az abiotikus stressztoleranciával kapcsolatos metabolikus útvonalak módosítása) fejlődött a legtöbbet, ez lett a legígéretesebb megoldás a stressz okozta károk mérséklésére (Bartels és Nelson, 1994; Bohnert *et al.*, 1995; Bohnert és Jenson, 1996; Bray 1997; Dixon és Amtzen, 1997; McCue és Hanson, 1990). Mivel

kimutatták, hogy a stresszhelyzetben megemelkedett poliamin koncentráció főleg az arginin dekarboxiláz enzim fokozott aktivitásának köszönhető, az ADC enzim és az azt kódoló *ADC* gén lett a genetikai vizsgálatok fő tárgya (Rajam, 1997). A poliamin bioszintézisben részt vevő enzimeket izolálták, leírták és számos faj esetében az azokat kódoló géneket is azonosították, így minden készen állt, hogy a bioszintézis különböző lépésein keresztül módosítsák a poliamin tartalmat (Smith, 1985). 1990-ben használtak először CaMV35S promótert a poliamin termelés génjeinek vizsgálatához, nem sokkal később *SAMDC* génnel transzformált dohánynövényeknél emelkedett spermidin és összpoliamin szintet tudtak kimutatni (DeScenzo és Minocha, 1993; Hamill *et al.*, 1990; Noh és Minocha, 1994).

Számos kísérleti eredményt publikáltak, miszerint az ADC enzim aktivitásával elért poliamin termelés csökkentése meggátolja a szomatikus embriogenezist, míg növelése javítja a hatékonyságot (Feier *et al.*, 1984; Fienberg *et al.*, 1984; Montague *et al.*, 1978; Robie és Minocha, 1989; Roustan *et al.*, 1994). Legnagyobb hatékonyságot a répa esetében sperminnel értek el (Takeda *et al.*, 2002).

Gyökérsejtek vizsgálata során megállapították, hogy 25°C-os hőmérsékleten a külsőleg adagolt putrescin növelte a növekedés ütemét, míg a spermidin és spermin hátráltatta a sejtmegnyúlást (Lee, 1997). A hidegstressznek kitett rizs növények szintén pozitívan reagáltak putrescin exogén adagolására. Mikroszaporított mogyoró hajtásszáma és hajtáshossza is nagymértékben emelkedik poliaminok külső adagolásakor (Nas, 2004). Nehezen gyökeresedő gyümölcsfajok *in vitro* tenyésztésében is nagy segítséget jelent a poliaminok (különösen a putrescin) használata, de a gumófejlődést, gumóméretet és termés mennyiséget több faj esetében is növeli (Mader, 1997; Pedros *et al.*, 1999; Rugini, 1993; Ondo Ovono *et al.*, 2010). A rhizómatömeg is növelhető *in vitro* poliaminokkal (Viu *et al.*, 2009). Mivel tulipán fajták hagymahozamára is jótékonyan hatottak mind a poliaminok, mind az arginin, élesen körvonalazódni látszik az exogén poliaminkezelés gyökeresedésre és a gyökér eredetű szervek kialakulására kifejtett pozitív hatása (Podwyszyńska *et al.*, 2015).

Gyökérsejtek GABA kezelése növeli a metionin, arginin, putrescin, spermidin és spermin szinteket, valamint az ADC és SAMDC enzimek aktivitását és csökkenti a DAO és PAO enzimek aktivitását (Wang *et al.*, 2014). Jázmonsav kezelés elsősorban a putrescin szintre hat pozitívan, míg a glutation az ADC és SAMDC enzimek aktivitásán keresztül csökkenti a poliaminok mennyiségét (Németh *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2019). Arginin, metionin és GABA hozzáadása is növelte a poliaminok mennyiségét, valamint az ADC aktivitását kukorica kalluszsejtekben (Santos

*et al.*, 1993). NaCl okozta fitotoxicitást csökkenti a külsőleg adagolt prolin, mivel növeli a poliamin bioszintézisben résztvevő gének expresszióját (Shahid *et al.*, 2014). Melatonin kezelés hatására nő az antioxidáns enzimek (szuperoxid dizmutáz, peroxidáz, kataláz) koncentrációja, a *SAMDC* és *SPDS* gének transzkripció aktivitása, a poliamin tartalom, csökken a ROS-ok mennyisége (Gong *et al.*, 2017). Virginiai fenyő molekuláris vizsgálatakor az antioxidáns enzimek (aszorbát peroxidáz, glutation reduktáz, szuperoxid dizmutáz) magasabb aktivitása volt megfigyelhető poliaminok táptalajhoz történő adagolásakor, kiemelkedő hatása a putrescinnek volt. Nagyobb mennyiséggel kezelt növények esetében a DAO és PAO enzimek aktivitása is emelkedett, ez jól mutatja a poliamin metabolizmus szigorú, kétirányú szabályozottságát (Tang és Newton, 2005).

### **3.8. A kutatás előzményei és a *FvADC*, *FvSPDS* expressziós mintázata a szamóca gyümölcs érése során**

A Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Genetika és Biotechnológiai Intézetben korábban folytatott kutatásai során Balogh *et al.* (2005) *Fragaria x ananassa* Duch. cv. Elsanta receptákulum és az aszmag szövetek RNS-ujjlenyomatát tanulmányozták. cDNS-AFLP módszerrel expressziós változást mutató géneket azonosítottak a gyümölcserés zöld, fehér, rózsaszín és piros szakaszaiban izolált RNS-ekből kiindulva. 130 transzkriptum eredetű részleges cDNS-t izoláltak és szekvenáltattak. A szekvenált transzkriptumok között volt a poliaminok metabolizmusában résztvevő spermidin szintáz (DQ074728.1) is.

A kutatás korai szakaszában a poliamin metabolizmusban résztvevő gének, és promótereik vizsgálatára koncentráltunk. Nagyfokú hasonlóságot találtunk a különböző fajok azonos funkciót betöltő génjeiben, de a promóterrégiók is közel azonos kötőhelyeket tartalmaznak. A promóterrégiók hasonlósága nemcsak az azonos gének, hanem a teljes bioszintetikus útvonal génjeire is kiterjed (Mendel *et al.*, 2013). A kutatás egyik első lépéseként bioinformatikai módszerekkel meghatároztuk 12 gyümölcsfaj lehetséges *SPDS* génjének szekvenciáját (Kovács *et al.*, 2015). Az elméletet degenerált primerekkel indított PCR segítségével igazoltuk is, valamint a málna (*Rubus idaeus* cv. Bliss) *RiSPSD* génjének szekvenciáját (KP980552.1) fel is töltöttük az NCBI nemzetközi adatbázisba.

A szamóca etiléntermelésében résztvevő *S-adenozil-L-metionin szintáz (FvSAMS)*, valamint az etilén és poliamin bioszintézis közös enzimét kódoló *S-adenozil-L-metionin dekarboxiláz (FvSAMDC)* gének jelentőségét az abiotikus stresszekkel szemben korábbi tanulmányainkban már ismertettük (Kovács, 2018; Kovács *et al.*, 2020). Ezekből a kísérletekből

kiderül, hogy mindkét gén fokozott transzkripciója előnyösen befolyásolja a stressztoleranciát a vizsgált *Nicotiana benthamiana* D. növények esetében.

A SAM tekintetében a poliamin-bioszintézis legfőbb metabolikus kompetitora a lignin.. A lignin hidroxycinnamil-alkohol tartalmú monolignol molekulák komplex heteropolimere, mely jelen van minden magasabb rendű növényben és a szárazföldi biomassza 25%-át teszi ki. (Whetten, 1998). A cellulóz mellett a lignin is szerepet játszik a sejtfa szilárdításában, nemcsak a fässzárúaknál, hanem a lágyszárúaknál is. Merevvé, keménnyé, és víz által áthatolhatatlanná teszi a sejtek poliszaharid-fehérje mátrixát, így a kártevők, kórokozók bejutását is gátolja (Smita és Upendranath, 2008; Vance *et al.*, 1980). A lignin a növényi sejtek elsődleges és a másodlagos sejtfa között halmozódik fel, így növelve annak szilárdságát. Ezt megelőző vizsgálataink során kimutattuk, hogy a FvSAMS-t és FvSAMDC-t túltermelő kezeletlen *N. benthamiana* D. növények szignifikánsan magasabb lignintartalommal rendelkeztek, mint a vad típusúak. Sóstressz hatására a SAM dekarboxilációja csökkentette a lignintartalmat a poliamin metabolizmus és ezáltal az abiotikus stresszel szembeni tolerancia javára (Kovács *et al.*, 2020).



## 4. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 4.1. A felhasznált növényanyag és a génszekvenciák bioinformatikai elemzése

A *Fragaria vesca* L. teljes genomszekvenciája elérhető a National Center for Biotechnology Information (NCBI) adatbázisban (Shulaev *et al.*, 2011), ezért fel tudtuk használni a *Fragaria vesca* L. 'Rügen' fajtája levélszövetét a vizsgálni kívánt gének izolálásához. Basic Local Alignment and Search Tool (BLAST) analízissel azonosítottuk a *FvADC* és a *FvSPDS* ORF-eket. A *FvADC* ORF 2856 bp (jelölt *FvADC* - XM\_004306397.2), míg a *FvSPDS* ORF 1378 bp hosszú (jelölt *FvSPDS* - XM\_004297595.2).

Mivel egy régóta köztermesztésben lévő fajtát akartunk vizsgálni, a qPCR analízishez *Fragaria x ananassa* Duch. cv. 'Asia' különböző érési stádiumban lévő gyümölcseit használtuk fel. Az itt használt primereket eredetileg a *Fragaria vesca* cv. 'Rügen' genomra terveztük, majd PCR-rel ellenőriztük, hogy *Fragaria x ananassa* Duch. cv. 'Asia' fajta esetében is a megfelelő méretű fragmentumok amplifikálódnak-e. A szekvenciák bioinformatikai elemzéséhez a TargetP 1.1 (Emanuelsson *et al.*, 2007), a GPS-SNO 1.0 (Xue *et al.*, 2010), a cNLS Mapper (Kosugi *et al.*, 2009), a NetNES 1.1 (La Cour *et al.*, 2004), a Nucleolar localization sequence Detector (NoD) (Scott *et al.*, 2011), és a PHOSIDA (Gnad *et al.*, 2011) alkalmazásokat használtuk.

### 4.2. Genomi DNS, plazmid DNS, RNS izolálása és cDNS szintézise

A gyártó által előírt protokoll alapján izoláltuk a genomi DNS-t (DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany) (Melléklet 10.1), a plazmid DNS-t (PureYield<sup>™</sup> Plasmid Miniprep System Kit, Promega, Madison, USA) (Melléklet 10.2), az összes RNS-t (Total RNA Mini Kit Plant, Geneaid<sup>®</sup>, New Taipei City, Taiwan) (Melléklet 10.3). Az összes RNS-ből Oligo(dT)<sub>18</sub> primer felhasználásával cDNS-t szintetizáltunk a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) segítségével (Melléklet 10.4), így az mRNS populációt képviselő cDNS populációt kaptunk a további vizsgálatokhoz. A kapott ribonukleinsavak tisztaságát, koncentrációját spektrofotométerrel (NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer) ellenőriztük.

### 4.3. Relatív expressziós szintek vizsgálata qPCR-rel

A kapott cDNS populáció felhasználásával ki tudjuk mutatni az egyes éppen működésben lévő gének egymáshoz (jelen esetben egy folyamatosan azonos szinten expresszálódó háztartási génhez) viszonyított expressziós aktivitását. A relatív expressziós szintek vizsgálatához primereket terveztünk a kérdéses gének szekvenciáira, ezek főbb paramétereit az **1. táblázat**



foglalja össze. A reakcióelegy végtérfogata mintánként 20 µl volt, és a következő összetevőkből állt: 10 µl 2xABsolute qPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientific, Waltham, USA), 1,75 µl/primer (70 nM koncentrációjú), 1 µl cDNS (200 nM koncentrációjú). Mintánként 3 biológiai és 4 technikai ismétlést alkalmaztunk, így egy-egy eredmény 12 mérésből származik. A reakciókat Corbett RG-6000 készülékkel végeztük el. Az expressziós szintek relatív meghatározásához Rotor-Gene Q Series 2.3.1. szoftver 'Comparative Quantification' módszerét használtuk (Warton *et al.*, 2004, McCurdy *et al.*, 2008). A *Nicotiana tabacum* L. esetében a GAPDH (gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz), míg a *Fragaria x ananassa* Duch. cv. 'Asia' szamóca gyümölcsnél az *actin* volt a referencia háztartási gén, amely a viszonyítás alapjául szolgált.

**1. táblázat:** A qPCR-hez használt primerek főbb paraméterei

A primer neve	Szekvencia	T <sub>m</sub> (°C)
FvSAMS1_RT_F	CAACAAACGATTCTTGAAGACAGCTG	56.4
FvSAMS1_RT_R	AGACTGAGGCTTCTCCACTT	54.4
FvSAMS2_RT_F	GTTTTGAAGACTGCTGCTTATGGG	56
FvSAMS2_RT_R	AGCTTGAACCTTATCCCACTTGA	53.5
FvSAMS3_RT_F	CTCCTGAGCTTATGCCTCTCAGC	58.8
FvSAMS3_RT_R	ATGGTCATTGTAGTACTCCACAGTGACTT	58.7
FvSAMDC1_RT_F	TGTTTCATTGGATTTGAAGGGATACTGT	55.2
FvSAMDC1_RT_R	AGAGGATTCGTAGTCCTCATCTTC	55.7
FvSAMDC2_RT_F	GATCAACAAGCTATGAAGAGCTGG	55.7
FvSAMDC2_RT_R	GTTCTTCATGCTCAAACCTCTTCAACTTC	58.9
FvSAMDC3_RT_F	GTAGCCAATCACTACTTCGACGCCT	59.3
FvSAMDC3_RT_R	TGAGAGTGAGGCCGAGAAGCGA	58.6
FvADC_RT_F	CTTCCACAACATGCCGTATCTG	54.8
FvADC_RT_R	TCAACCACTGCAGTATGACCACT	55.3
FvSPDS_RT_F	CAGAGAGTATATGGCTTCACATGCACAT	58.5
FvSPDS_RT_R	GGTCCCTCAGTAGAACAGAGCAT	57.1

#### 4.4. A *FvADC* és a *FvSPDS* ORF-ek pENTR<sup>TM</sup>/SD/D-TOPO klónozó vektorba ligálása

*Fragaria vesca* L. cv. 'Rügen' levélszövetéből RNS-t izoláltunk (Melléklet 10.3). A totál RNS-ből a mRNS-eket célozva oligo (dT)18 primer felhasználásával cDNS-t szintetizáltunk (Melléklet 10.4). A cDNS könyvtárból a *FvADC* és *FvSPDS* géneket a Fv\_ADC\_SFT – FvADC\_SRT és a Fv\_SPDS\_SFT – FvSPDS\_SRT primerpárok alkalmazásával (1. táblázat) amplifikáltuk (Melléklet 10.5). A felszaporított szekvenciákon ellenőrzés céljából gélelektroforézist végeztünk (TAE puffer, 1,2% agaróz).

A megfelelő méretű fragmentumokat visszaizoláltuk az agaróz gélből (Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Kit, Promega, Madison, USA) (Melléklet 10.6). A

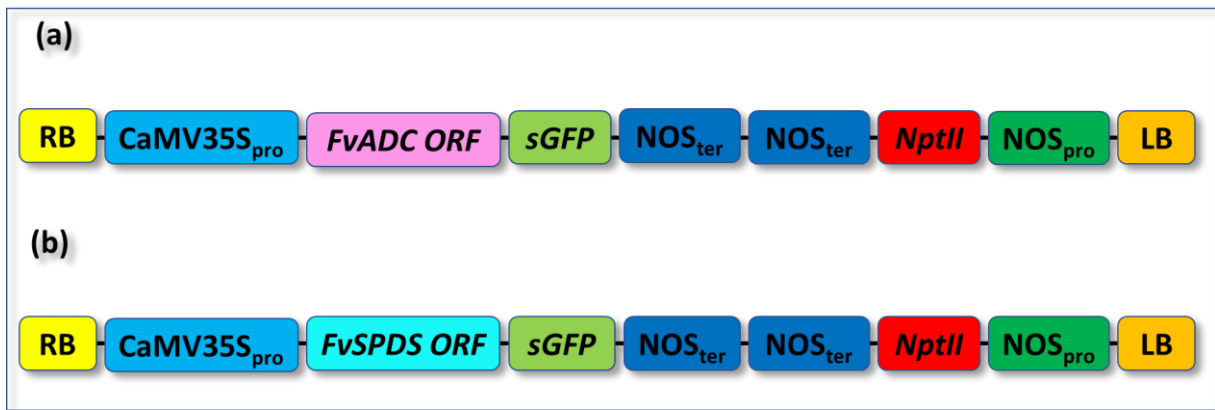
vektorkonstrukciók összeállításához Gateway® rendszert használtunk. A gyártó által előírt protokollt követve a *FvADC* és a *FvSPDS* szekvenciákat pENTR™/SD/D-TOPO klónozó vektorba ligáltuk. A forward primerek a szükséges CACC szekvenciát is tartalmazták, míg a reverz primerrel elimináltuk a kódoló régiók végén található stop kodont. Ezekkel a változtatásokkal a cDNS ORF-eket C terminálisan fuzionáltatni tudtuk a pGWB405 bináris vektorban lévő *sGFP* riportergénnel.

Az elkészített vektorkonstrukciókkal *E. coli* 'JM109' törzset transzformáltunk, majd szelekciós LB táptalajon (50 µg/ml spektinomycin) tenyészeteket indítottunk. A felnövő kolóniákra kolónia PCR-t indítottunk M13\_F – FvADC\_SRT és M13\_F – FvSPDS\_SRT primerpárok felhasználásával. A *pENTR::FvSAMS* esetében pozitív eredményt adó kolóniák közül a az első kettő, míg a *pENTR::FvSAMDC* esetében az ötödik és hatodik kolóniákból izoláltunk plazmidot). Az izolált plazmidok felhasználásával a M13\_F – FvSAMS\_SRT, FvSAMS\_SFT-M13\_R és a M13\_F – FvSAMDC\_SRT, FvSAMDC\_SFT – M13\_R primerpárokkal PCR-t indítottunk, amellyel a fragmentumok orientációját is ellenőriztük.

A szelekciós táptalajon felnövő kolóniákból izolált plazmidokat restriktív enzimekkel emésztettük. A *pENTR::FvADC* és a *pENTR::FvSPDS* plazmidok emésztését *AflIII* és *AscI* enzimekkel végeztük. A 10.12, 10.14, 10.15 mellékletekben szereplő restriktív térképek alapján várt méretű fragmentumok amplifikálódása és azok megfelelő méretű fragmentumokra történő hasítását figyeltük meg.

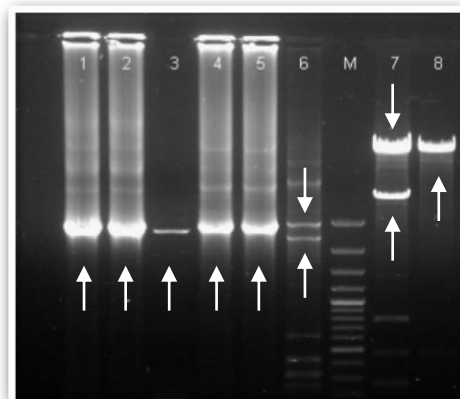
#### **4.5. A pGWB405::FvADC és a pGWB405::FvSPDS bináris vektorkonstrukciók előállítás**

Az emésztéssel is pozitív eredményt adó *pENTR::FvADC* és *pENTR::FvSPDS* vektorkonstrukciókat ezután LR klonáz enzim alkalmazásával (Gateway™ LR Clonase™, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) a gyártó által előírt protokoll alapján pGWB405 bináris vektorba ligáltuk a szekvenciákat (Melléklet 10.8). A pGWB405 bináris vektor konstitutív CaMV35S promótert és sGFP riportergént tartalmaz, amely alkalmas a szekvenciák C terminális fuzionáltatására. A szelekciós marker-gén baktériumok esetében spektinomycin rezisztenciát, a növények esetében a kanamicin rezisztenciát kódol (7. ábra).



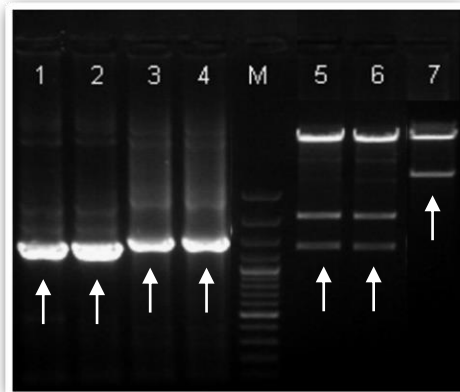
**7. ábra:** A *pGWB405::FvADC* (a) és a *pGWB405::FvSPDS* (b) bináris vektorkonstrukciók. RB- right border (jobb oldali határrégió); CaMV35S<sub>pro</sub> – karfiol mozaik vírus 35S konstitutív promótere; *sGFP* – szintetikus zöld fluoreszcens fehérjét kódoló gén; NOS<sub>ter</sub> – nopalín szintáz terminátorrégiója; *NptII* – neomicin foszfortranszferáz II (kanamicin rezisztenciát kialakító gén); NOS<sub>pro</sub> – nopalín szintáz promótere; LB – left border (bal oldali határrégió).

Az így kapott *pGWB405::FvADC* és *pGWB405::FvSPDS* bináris vektorkonstrukciókkal *Escherichia coli* ‘JM109’ törzset transzformáltunk. A transzformált törzsek szelekción LB táptalajon (50 µg/ml spektinomycin kiegészítéssel) felnövő kolóniáira az **1. táblázatban szereplő primerek** felhasználásával kolónia PCR-t indítottunk. pBI121\_35S\_F – FvADC\_SRT és pBI121\_35S\_F – FvSPDS\_SRT valamint FvADC\_SFT – sGFP\_RT\_R és FvSPDS\_SFT – sGFP\_RT\_R primerpárok felhasználásával ellenőriztük a megfelelő orientációban történő beépülést. Ezzel párhuzamosan a restrikciós térképek alapján (Melléklet 10.13, 10.14, 10.15) az *pGWB405::FvADC* konstrukcióhoz az *AscI* – *SacI* enzimeket, a *pGWB405::FvSPDS* konstrukcióhoz a *HindIII* – *AscI* enzimeket választottuk ki, hogy elvégeztük restrikciós emésztést is (**8-9. ábra**).



**8. ábra:** A *pGWB405::FvADC* kolóniákkal indított kolónia PCR eredménye. A kívánt méretű fragmentumokat fehér nyilakkal jelöltük. 1-2: *pGWB405::FvADC* plazmid pBI121\_35S\_F – FvADC\_SRT primerekkel; 3: üres *pGWB405* plazmid pBI121\_35S\_F – FvADC\_SRT

primerekkel (negatív kontroll); 4-5: *pGWB405::FvADC* plazmid *FvADC\_SFT* – *sGFP\_RT\_R* primerekkel; 6: üres *pGWB405* plazmid *FvADC\_SFT* – *sGFP\_RT\_R* primerekkel (negatív kontroll); 7: *pGWB405::FvADC* plazmid emésztése *AscI* – *SacI* restriktív enzimekkel; 8: üres *pGWB405* plazmid emésztése *AscI* – *SacI* restriktív enzimekkel; M: Molekulatömeg marker, ThermoFisher Scientific 100 bp Plus, a fragmentumok nagysága: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp;



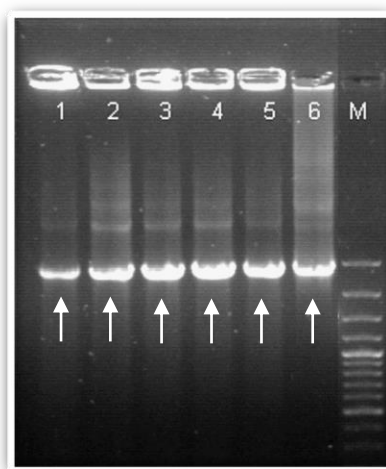
**9. ábra:** A *pGWB405::FvSPDS* kolóniákkal indított kolónia PCR eredménye. A kívánt méretű fragmentumokat fehér nyilakkal jelöltük. 1-2: *pGWB405::FvSPDS* plazmid *pBI121\_35S\_F* – *FvSPDS\_SRT* primerekkel; 3-4: *pGWB405::FvSPDS* plazmid *FvSPDS\_SFT* – *sGFP\_RT\_R* primerekkel; 5-6: *pGWB405::FvSPDS* plazmid emésztése *HindIII* – *AscI* restriktív enzimekkel; 7: üres *pGWB405* plazmid emésztése *HindIII* – *AscI* restriktív enzimekkel; M: Molekulatömeg marker, ThermoFisher Scientific 100 bp Plus, a fragmentumok nagysága: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp;

A gélfotókon látszik, hogy mindkét konstrukció esetében (*pGWB405::FvADC* és *pGWB405::FvSPDS*) a megfelelő méretű fragmentum amplifikálódott mind az 5' irányban, mind a 3' irányban átfedő szekvenciákhoz kapcsolódó primereket (*pBI121\_35S\_F*, *sGFP\_RT\_R*) alkalmazva. A *pGWB405::FvADC* plazmid emésztése során az *AscI* – *SacI* restriktív enzimek kivágtak egy megfelelő méretű fragmentumot a konstrukcióból, ami a natív *pGWB405* plazmidből nem hasítódott ki. A *pGWB405::FvSPDS* plazmid *HindIII* – *AscI* restriktív enzimekkel történő emésztése után a két kisebb méretű fragmentum jelenléte a kontrollként használt natív *pGWB405*-ben megtalálható egy nagyobb szakasszal szemben bizonyítja a megfelelő beépülést. Mindkét *pGWB405* konstrukció esetében a pozitívnak bizonyuló kolóniák közül a másodikat választottuk ki. Az ezekből a kolóniákból izolált plazmidokat használtuk a későbbiekben.

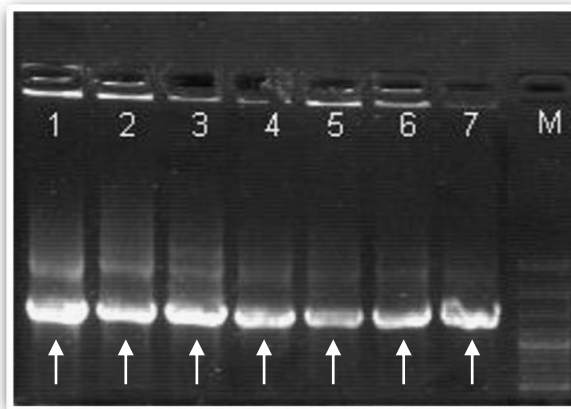
#### 4.6. Az *Agrobacterium tumefaciens* 'GV3101' törzs transzformációja a *pGWB405::FvADC* és a *pGWB405::FvSPDS* vektorkonstrukciókkal

A *pGWB405::FvADC* és *pGWB405::FvSPDS* bináris vektorkonstrukciókkal *Agrobacterium tumefaciens* 'GV3101' törzset transzformáltunk. A transzformált törzsek 50 µg/ml spektinomycin tartalmazó szelekciós LB táptalajon felnövő kolóniáira az **1. táblázat**-ban leírt

pBI121\_35S\_F – FvADC\_SRT és pBI121\_35S\_F – FvSPDS\_SRT primerpárok felhasználásával kolónia PCR-t indítottunk (**10-11. ábra**).



**10. ábra:** A *pGWB405::FvADC* plazmiddal transzformált *Agrobacterium tumefaciens* ‘GV3101’ törzs kolóniáira indított kolónia PCR eredménye. A kívánt méretű fragmentumokat fehér nyilakkal jelöltük. 1-5: *pGWB405::FvADC* plazmid, *Agrobacterium tumefaciens* ‘GV3101’ 1-5. kolóniák; 6: *pGWB405::FvADC* plazmid, pozitív kontroll; M: Molekulatömeg marker, ThermoFisher Scientific 100 bp Plus, a fragmentumok nagysága: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp;



**11. ábra:** A *pGWB405::FvSPDS* plazmiddal transzformált *Agrobacterium tumefaciens* ‘GV3101’ törzs kolóniáira indított kolónia PCR eredménye. A kívánt méretű fragmentumokat fehér nyilakkal jelöltük. 1-5: *pGWB405::FvSPDS* plazmid, *Agrobacterium tumefaciens* ‘GV3101’ 1-6. kolóniák; 6: *pGWB405::FvSPDS* plazmid, pozitív kontroll; M: Molekulatömeg marker, ThermoFischer Scientific DNA Ladder 100 bp Plus, a fragmentumok nagysága: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp;

A *pGWB405::FvADC* konstrukciót tartalmazó *A. tumefaciens* törzs 4. vizsgált kolóniájából és a *pGWB405::FvSPDS* plazmiddal transzformált *A. tumefaciens* törzs 1. kolóniájából glicerines

törzset indítottunk, melyeket ezután -80°C-on tartottunk a további felhasználásig. A későbbiekben ezekből a törzsekből indított tenyészetekkel transzformáltuk a dohánynövényeket.

#### 4.7. A *Nicotiana tabacum* L. transzformációja

A pozitívnak értékelt *pGWB405::FvADC* és *pGWB405::FvSPDS* vektorkonstrukciókkal elvégeztük az *Agrobacterium tumefaciens* ‘GV3101’ törzs transzformációját (Melléklet 10.10). Ennek sikerességét a már ismertett kolónia PCR-rel ellenőriztük. A vektorépítéshez használt primereket, valamint azok főbb paramétereit a **2. táblázat** tartalmazza. A pozitív eredményt adó kolóniákból az *E. coli* ‘JM109’, valamint az *Agrobacterium tumefaciens* ‘GV3101’ baktériumtörzsek esetében a hosszútávú tároláshoz folyékony glicerines baktérium törzstenyészet készítettünk (750 µl steril 87%-os glicerinnel, 250 µl törzstenyészet), melyeket -80°C-on tároltunk.

**2. táblázat:** A vektorépítéshez használt primerek főbb paramétereit

Primer neve	Szekvencia	T <sub>m</sub> (°C)	Fragmentum hossz (bp)	Génbanki azonosító
Fv_ADC_SFT	CACC GTAGTCGCGGAAGAGATGC	66,3	1266	XM_004306397.2
Fv_ADC_SRT	TCAACCACTGCAGTATGACCACT	62,1		
Fv_SPDS_SFT	CACC TCTTGTGTTGGGTTTCATGGCC	65,7	1027	XM_004297595.2
Fv_SPDS_SRT	CTGTGCTTTCGATTCAATCACCTTCT	61,7		
M13_F	CACGACGTTGTAAAACGACGG	55,6	Az inszert méretétől függ	GU931384.1
M13_R	TGCCAGGAAACAGCTATGACC	55,2		
pBI121_35S_F	GGTAATATCCGGAAACCTCCTC	52,5	Az inszert méretétől függ	AB294429
sGFP_RT_R	CTGTAGTTGCCGTCGTCCT	55,1		

A transzformáns kolóniákból folyékony YEP táptalajon (Melléklet 10.11) tenyészetet indítottunk (50 µg/ml spektinomycin és 100 µg/ml rifampicin hozzáadásával), amit 12 óráig inkubáltuk 28°C-on. A kifejlődött folyékony tenyészetekből 2 ml-t 50 ml friss folyékony YEP tápoldatba oltottunk (50 µg/ml spektinomycin és 100 µg/ml rifampicin hozzáadásával). Ismét inkubáltuk 28°C-on, amíg a baktériumtenyészet OD<sub>600</sub> értéke 0,5-1 közé nem esett. Ezután a tenyészetet centrifugáltuk (15 percig 4300 g fordulatszámon), a felülúszót leöntöttük. [Az üledéket (baktériumokat) 1 ml folyékony MS tápoldatban (Melléklet 10.11) felfuszpendáltuk (1 mg/l benzil-adenin és 0,2 mg/l naftil-ecetsav hozzáadásával).] A kapott tenyészetből 400 µl-t oltottunk az előbb leírt 20 ml folyékony YEP tápoldatba. A dohányleveleket 1 cm<sup>2</sup> felületű téglalap alakú darabokra vágtuk, melyeket folyékony tenyészetben rázattunk 60 percig. Szilárd MS táptalajra helyeztük az explantumokat és 4 napig sötétben együtt tenyésztettük a növényi szöveteket a baktériummal. A kokultiváció végén a levéldarabokat háromszor átmostuk 200 µg/ml timentint, 300 µg/ml karbenicilint és 300 µg/ml cefotaximot tartalmazó steril desztillált vízzel, majd

háromszor antibiotikum mentes desztillált vízzel. Ezután szilárd szelektív hajtásregeneráló MS táptalajra helyeztük (0,2 mg/l NAA, 1mg/l BA, 200 µg/ml timentin 80 µg/ml kanamicin és 250 µg/ml cefotaxim hozzáadásával) a növényi szöveteket. 2 hetente friss táptalajra helyeztük a kalluszosodó explantumokat szer-rotációt alkalmazva a felhasznált antibiotikumok tekintetében (timentin, karbenicilin, cefotaxim). Ezzel a módszerrel csökkenthetjük az antibiotikum rezisztens törzsek kialakulásának kockázatát.

#### **4.8. A genetikai transzformáció sikerességének bizonyítása, a T<sub>1</sub> generáció előállítása**

A szelektív (80 µg/ml kanamicinnel kiegészített) MS táptalajon a nem transzformáns növények a kloroplasztiszok életképtelensége miatt gyenge növekedésűek, torzak és fehér színűek lettek. A normálisan fejlődő növényeket a petri-csészékből egyesével passzáltuk az ugyanolyan táptalajt tartalmazó tenyészedényekbe. Ezek leveleiből DNS-izolálás után PCR-rel ellenőriztük a transzgén integrációját a növényi genomba. A tervezett primerpárokkal elvégeztük a *FvADC* és a *FvSPDS* szekvenciák klónozását PCR-rel (Melléklet 10.5). A felszaporított szekvenciákon ellenőrzés céljából gélelektroforézist végeztünk (TAE puffer, 1,2% agar). A pozitív eredményt adó növényekből a gyártó leírása alapján izoláltuk az összes RNS-t (Total RNA Mini Kit Plant, Geneaid<sup>®</sup>, New Taipei City, Taiwan) (Melléklet 10.3). Az összes RNS-ből oligo(dT)<sub>18</sub> primer felhasználásával cDNS-t szintetizáltunk a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) segítségével (Melléklet 10.4). A transzgénről történő transzkripciót PCR-rel az előbb említett módszerrel vizsgáltuk a cDNS-ek felhasználásával. Az inszertek C-terminálisan fúzionáltak az sGFP riportergénnel, így a termelődő fehérje vizuálisan is nyomon követhető, ezért az RNS szinten is pozitív eredményt adó vonalakat lézerletpogatósu konfokális mikroszkóppal is vizsgáltuk a 4.11 fejezet szerint (Leica TCS SP8). Ezzel a módszerrel a transzgén transzlációs aktivitása is kimutatható. Azokból a vonalakból, melyek fehérje szinten is mutatták az inszert integrációját és funkcióképességét, *in vivo* akklimatizáltuk autoklávban sterilizált virágföld keverékben (16 órás nappalhossz, 23°C). A két konstrukciót tartalmazó vonalak virágait öntermékenyítettük, ezekről magot fogtunk. Az ezekből a magokból kikelő növények alkotják a T<sub>1</sub> nemzedéket. A T<sub>0</sub> nemzedék azon vonalai tartalmazzák a bevitt génkonstrukciót egy funkcióképes kópiában, melyek utódpopulációja (T<sub>1</sub> nemzedék) 3:1-es hasadást mutat szelektív táptalajon. A T<sub>1</sub> vonalak szegregációs arányát *in vitro* vizsgáltuk a 80 µg/ml kanamicint tartalmazó MS táptalajon. A *FvADC* és *FvSPDS* vonalak esetében több független transzformációs eseményből származó vonalnál kaptunk a kívánatos 3:1-es hasadási arányt. Ezek közül a következő három-három vonalat választottuk ki további vizsgálatok céljából: *FvADC*-5, *FvADC*-7, *FvADC*-37 *FvSPDS*-2, *FvSPDS*-9, *FvSPDS*-82.

#### 4.9. Növénynevelési paraméterek a gének indukálhatóságának vizsgálatához

A kiemelt 3-3 megfelelő szegregációs arányt mutató transzgenikus vonal előszelekcióját 80 µg/ml kanamicinnel kiegészített MS táptalajon végeztük, míg a vad típusú (kontrollnak használt) *Nicotiana tabacum* L. magokat antibiotikum-mentes MS táptalajon csíráztattuk. A 21. napon a növényeket indukciós táptalajra helyeztük, mely minden esetben MS táptalaj volt egy-egy a poliamin metabolizmusban résztvevő szerves molekula kiegészítéssel. Az arginin dekarboxiláz enzim génjének egy új, jelölt kópiáját hordozó vonalakat (FvADC-5, FvADC-7, FvADC-37) 150 mg/l arginint vagy 10 mg/l putrescint tartalmazó táptalajra helyeztük. A spermidin szintáz génnel transzformált FvSPDS-2, FvSPDS-9, FvSPDS-82 vonalakat 10 mg/l putrescint vagy 10 mg/l spermidint tartalmazó táptalajon neveltük tovább (Bhatnagar *et al.*, 2004; Veerasamy és Chinnagounder 2013). A vad típusú növényeket mindhárom kezelésnek (arginin, putrescin és spermidin) alávetettük. A vad típusú, valamint a 3-3 transzformált növényvonalat kiegészítés nélküli MS táptalajon is tenyésztettük. A növényeket 16 óra megvilágítás mellett 23°C-on neveltük, a mintákat a vetést követő 90. napon gyűjtöttük.

#### 4.10. A klorofill mennyiségének mérése

Az összklorofill-tartalom, valamint a klorofill *a* és *b* mennyiségének meghatározását Porra *et al.* (1989) módszere alapján végeztük. A gyűjtött levélmintákból 200 mg-ot porítottunk el folyékony nitrogénben. Ezután 2 ml 80%-os (v/v) jéghideg acetonban szuszpendáltuk a mintákat. Az acetonban felvett mintákat 12000 g fordulatszámon 4°C-on 20 percig centrifugáltuk. A felülúszót újra centrifugáltuk 12000 g fordulatszámon 5 percig, szintén 4°C-on. 1 ml felülúszóhoz 1 ml 1 M Tris-HCl-ot (pH 8) adtunk, majd NanoDrop ND-1000 UV/Vis spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies, USA) a 645 nm-en (Abs.645) és a 663 nm-en (Abs.663) mértük az abszorbanciát. Növényi minta nélkül elkészített oldattal kalibráltuk a műszert. A klorofill *a* (Ca) és a klorofill *b* (Cb), valamint az összklorofill (Ct) tartalmat az alábbi képletek felhasználásával határoztuk meg:

$$Ca=0,0127*(Abs.663)-0,00269*(Abs.645);$$

$$Cb=0,0229*(Abs.645)-0,00468*(Abs.663);$$

$$Ct=Ca+Cb.$$

#### 4.11. A lignin tartalom mérése

A hajtások lignin mennyiségének meghatározásához első lépéseként fehérjementes sejtfal-kivonatot készítettünk. 200 mg liofilizált hajtást (szárat és levelet vegyesen) homogenizáltunk 5 ml 50 mM kálium-foszfát pufferben (pH 7), majd 1400 g fordulatszámon centrifugáltuk 5 percig.



A felülúszót leöntöttük, és kétszer megismételtük a centrifugálást. Az alsó fázishoz 5 ml 1%-os Triton-X-100-t adtunk (pH 7), és 1400 g fordulatszámon centrifugáltuk 5 percig. A felülúszót leöntöttük, és kétszer megismételtük a centrifugálást. Ezután 5 ml 1 M NaCl-t (pH 7) mértünk a mintákra, majd 1400 g fordulatszámon centrifugáltuk 5 percig. A felülúszót leöntöttük, és kétszer megismételtük a lépést. A csapadékra 5 ml desztillált vizet mértünk, és 1400 g fordulatszámon centrifugáltuk 5 percig. A felülúszót leöntöttük és kétszer megismételtük a mosást. Ezután 5 ml acetont adtunk a mintákhoz, 5 percig centrifugáltuk 1400 g fordulatszámon, a felülúszót leöntöttük. Még két alkalommal centrifugáltuk, majd 60°C-on 12 órán át beszárítottuk a mintákat.

A lignin mennyiségének meghatározásához Moreria-Vilar *et al.*, (2014) módszerét alkalmaztuk. 20 mg fehérjementes sejtfal-kivonatra ráértünk 0,5 ml 25% (v/v) jégecetben oldott acetil-bromidot, majd 70°C-on 30 percig inkubáltuk. A mintákat ezt követően jégen hirtelen hűtöttük le. Ezután hozzáadtunk 0,9 ml 2 M nátrium hidroxidot (NaOH), 0,1 ml 5 M hidroxilamin-hidrogén kloridot (NH<sub>2</sub>OH·HCl) és 4 ml jégecetet. Az így kapott oldatokat 1400 g fordulatszámon 5 percig centrifugáltuk. A minták abszorbanciáját WPA Biotech Photometer 1101 (Cambridge, UK) készülékkel mértük 280 nm-en. A standard görbe készítéséhez a fent leírt módon előkészített alkáli lignin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) 10, 100 és 500 mg-os oldatát használtunk.

#### **4.12. A poliaminok, valamint a prolin mennyiségének meghatározása HPLC-vel**

A szabad poliaminok, valamint a prolin mennyiségének meghatározását HPLC módszerrel, Németh *et al.* (2002) alapján végeztük. A mintaelőkészítés során 200 mg növényi mintát folyékony nitrogénben homogenizáltunk, 2 ml 0,2 M-os jéghideg perklórsavval (HClO<sub>4</sub>) extraháltuk. Az így előkészített mintákat 20 percre jégre helyeztük, majd 10000 g fordulatszámon 20 percig centrifugáltuk 4°C-on.

Smith és Davies (1985) a módszere szerint a poliamin frakcióból danzil-kloriddal származékot képeztünk. 100 µl felülúszóhoz 200 µl telített nátrium-karbonátot, valamint 400 µl acetonban frissen oldott danzil-kloridot (5 mg/ml) adtunk 2 ml-es Eppendorf csőben. A mintákat homogenizáltuk, majd 60 percig inkubáltuk sötétben 60°C-on. Ezután 100 µl prolin oldatot adtunk hozzá (100 mg/ml), és további 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten sötétben. Ezután a danzil-származékokat 500 µl toluollal extraháltuk 30 másodpercig, majd a felső, szerves fázist átszívtuk 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe Pasteur-pipetta segítségével. A mintákat vákuum alatt bepároltuk. A danzilált poliaminokat és prolint 1 ml 100%-os metanolban oldottuk fel, majd 0,2 µm pórusméretű teflon membránszűrőn átszűrtük. A mintákat acetonitril vivőközeg használatával WATERS W 2690 (Milford, USA) HPLC készülékkel vizsgáltuk.

#### **4.13. Mikroszkópos vizsgálat**

A fúziós zöld fluorescens fehérjék (FvADC::sGFP, FvSPDS::sGFP) vizuális detektálását Leica TCS SP8 lézerletapogató konfokális mikroszkóppal valamint Leica/Leitz fluoreszcens sztereó mikroszkóppal (DMRB 301-371.010, Leica, Wetzlar, Germany) végeztük. A vizsgált levéllemezek apikális részén 5\*5 mm-es metszeteket készítettünk. A metszeteket natív formában, fixálás nélkül vizsgáltuk az adaxiális oldaláról. A metszetek fedéshez glicerin és desztillált víz 1:1 arányú elegyét alkalmaztunk. A képek feldolgozásához a Leica LAS AF Lite 3.3.10134.0 szoftvert használtuk.

#### **4.14. Statisztikai analízis**

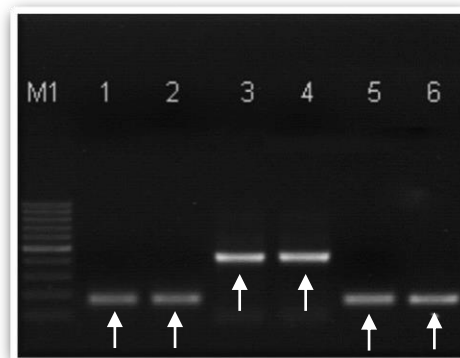
A vizsgálatokhoz szükséges növényi mintát 3-3 növényegyed egyenlő arányban gyűjtött levelei képezték. Az eredmények 9 mérésből származnak. Az adatok kiértékeléséhez egytényezős varianciaanalízist (ANOVA) végeztünk. A szórás-homogenitás megfelelőségét a Levene's teszt, és a varianciarány-próba alapján ellenőriztük. Amikor a szórás-homogenitás szignifikáns ( $p > 0,05$ ) Tukey féle *post hoc* teszttel, amikor a szórás-homogenitás sérül ( $p < 0,05$ ) Games-Howell teszttel határoztuk meg a szignifikánsan eltérő csoportokat. Az adatok összefüggésének vizsgálatához korrelációanalízist végeztünk. A kapott értékek kezeléseket és vonalak szerinti elemzését interakcióvizsgálattal végeztük. Az adatok kiértékeléséhez IBM SPSS v.27 programot használtuk.



## 5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

### 5.1. A *FvADC*, *FvSPDS* expressziós mintázata a *Fragaria x ananassa* Duch. gyümölcs érése során

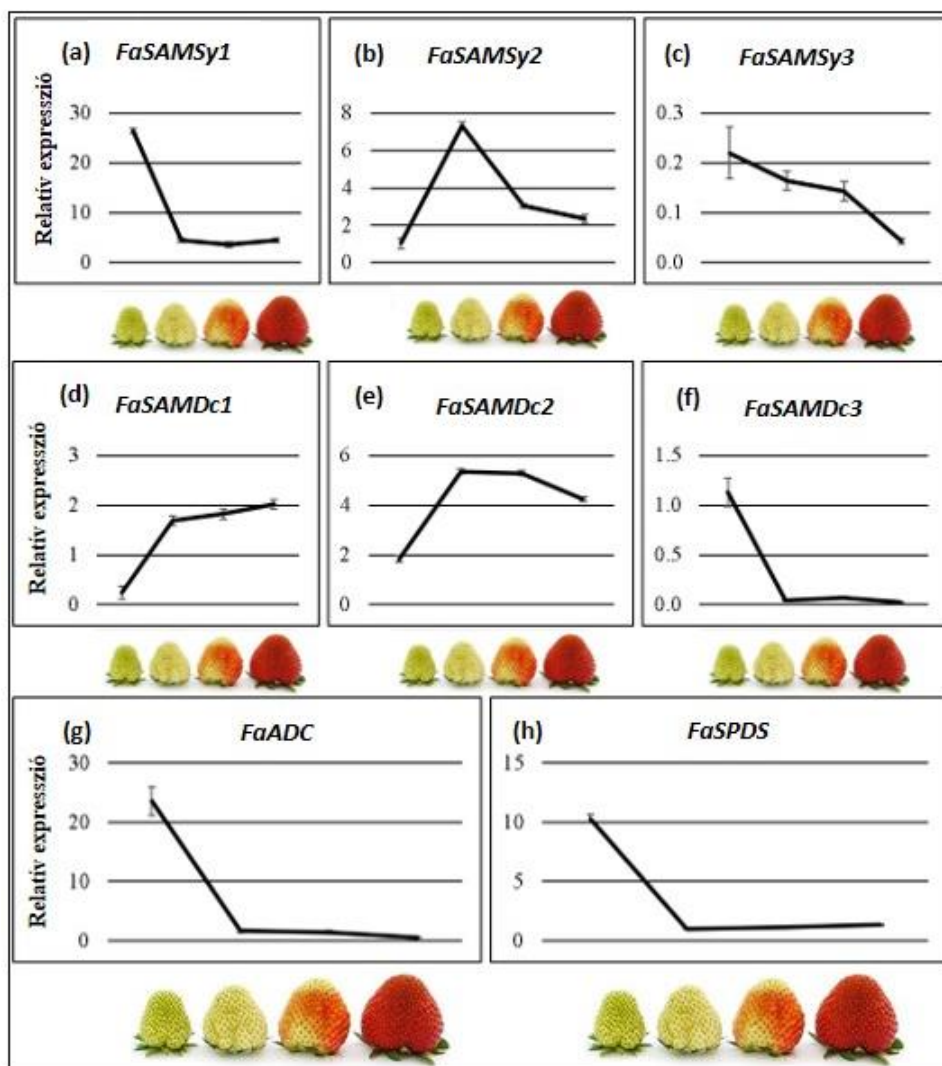
Az etilén mellett a poliaminok is fontos szerepet játszanak a gyümölcsérésében, ezért a mi vizsgálataink is kiterjedtek az endogén *FaADC* és a *FaSPDS* gének relatív expressziójára qPCR módszerrel. A *Fragaria vesca* genomra tervezett primerek (1. táblázat) a PCR-rel történő ellenőrzés során 100%-osan működtek a *Fragaria x ananassa* Duch. cv. 'Asia' fajta genomi DNS-ével is (12. ábra), ezért a zöld, fehér, rózsaszín és piros érési stádiumú gyümölcsök receptákulum és aszmag szöveteiből együttesen izolált RNS-ről visszaírt cDNS-en qPCR-t indítottunk. (13. ábra).



**12. ábra:** A *Fragaria vesca* L. genomra tervezett primerek tesztelése PCR-rel a *Fragaria x ananassa* Duch. cv. 'Asia' fajta genomi DNS-ével. A kívánt méretű fragmentumokat fehér nyilakkal jelöltük. 1: FvADC\_RT\_F – FvADC\_RT\_R primerpárral kapott fragmentum a *Fragaria x ananassa* Duch. cv. 'Asia' fajta genomi DNS-ével; 2: FvADC\_RT\_F – FvADC\_RT\_R primerpárral kapott fragmentum a *Fragaria vesca* cv. 'Rügen' genomi DNS-ével; 3: FvSPDS\_RT\_F – FvSPDS\_RT\_R primerpárral kapott fragmentum a *Fragaria x ananassa* Duch. cv. 'Asia' fajta genomi DNS-ével; 4: FvSPDS\_RT\_F – FvSPDS\_RT\_R primerpárral kapott fragmentum a *Fragaria vesca* cv. 'Rügen' genomi DNS-ével; 5: Fv\_ACTIN\_RT\_F – Fv\_ACTIN\_RT\_R primerpárral kapott fragmentum a *Fragaria x ananassa* Duch. cv. 'Asia' fajta genomi DNS-ével; 6: Fv\_ACTIN\_RT\_F – Fv\_ACTIN\_RT\_R primerpárral kapott fragmentum a *Fragaria vesca* cv. 'Rügen' genomi DNS-ével; M: Molekulatömeg marker, ThermoFisher Scientific 100 bp Plus, a fragmentumok nagysága: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp.

A *FaADC* gén esetében 14-szer nagyobb relatív expressziót mértünk a zöld érési stádiumban lévő gyümölcsben, mint a fehérben és közel 40-szer nagyobbat, mint a rózsaszínben és pirosban. A *FaADC*-hez hasonló expressziós mintázatot kaptunk a *FaSPDS* gén esetében is, a zöld gyümölcsben több mint 10-szer nagyobb relatív expressziót detektáltunk, mint a fehér és a rózsaszín érési stádiumokban. Még a piros érési stádiumhoz képest is közel 8-szoros volt az

expresszió mértéke. Mindkét gén relatív expressziója kizárólag a zöld érési stádiumban volt kimagasló, míg a fehér és rózsaszín stádium között egyáltalán nem volt különbség. A *FaADC* gén relatív expressziója a piros stádiumban a rózsaszínhez képest felére esett vissza, míg a *FaSPDS* gén-é kismértékben (30%-kal) erősödött (Mendel *et al.*, 2018). Egy korábbi tanulmányban a *Vitis vinifera* L. különböző érési stádiumaiban lévő bogyóinak vizsgálata során a *VvSPDS* gén relatív expressziója hasonló mintázatot mutatott (Agudelo-Romero *et al.*, 2014). Guo *et al.* (2018) szamóca különböző érési stádiumaiban poliamin szinteket mértek. Méréseikből kiderül, hogy a zöld érési fázisban a legmagasabb a putrescín szintje, melyért a magasabb arginin-dekarboxiláz aktivitás felelős. Az érés előrehaladásával ez a szint lecsökkent. Ezzel szemben a spermidin mennyiségének növekedését csak a piros gyümölcsöknél tudták kimutatni. Klimaktérikus, és nem klimaktérikus fajok (őszibarack, sárgadinnye, paradicsom, szamóca, paprika és tojásgyümölcs) gyümölcsfejlődését vizsgálva is hasonló mintázatot kapott Nambeesan *et al.* (2008). Korábbi kutatások kimutatták, hogy az ADC gének főleg a sejtmegnyúlást segítik elő a növényi fejlődés (különösen a gyümölcsök fejlődése) során, így az ezzel járó fejlődési stádiumokban erősebb a relatív expressziójuk (Walden *et al.*, 1997). A paradicsom ADC mRNS szintje a színváltáskor a legmagasabb (Rastogi *et al.*, 1993), míg a borsó növekedési szakaszában is magasabb, mint a későbbi érési stádiumokban (Pérez-Amador *et al.*, 1995). Kutatásaikban azt is kimutatták, hogy a borsó ADC mRNS mennyisége nincs szoros összefüggésben az ADC enzimaktivitással, tehát poszttranszlációs szabályozás alatt áll.



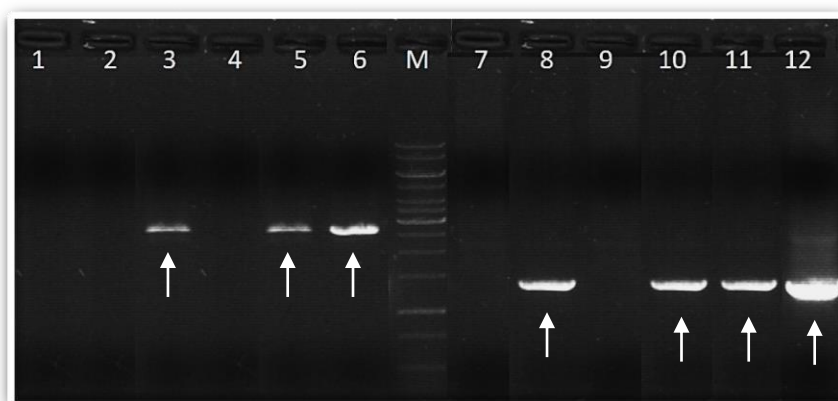
**13. ábra:** A *FaSAMSy1* (a), *FaSAMSy2* (b), *FaSAMSy3* (c), *FaSAMDC1* (d), *FaSAMDC2* (e), *FaSAMDC3* (f), *FaADC* (g) és *FaSPDS* (h) gének relatív expressziója a szamóca gyümölcs négy különböző érési stádiumában. SD±, n=4 (P<0,001).

Számos kutatás eredménye egybehangzó abban a tekintetben, hogy a poliaminok nagy mennyiségben vannak jelen a gyors sejtosztódásban, erős növekedési fázisban lévő szövetekben, valamint ott, ahol aktív metabolizmusra van szükség (Feirer *et al.*, 1984; Fienberg *et al.*, 1984; Heimer és Mizrahi, 1982; Khan és Minocha, 1991; Minocha *et al.*, 1991; Minocha *et al.*, 1995; Montague *et al.*, 1978; Montague *et al.*, 1979; Robie és Minocha, 1989; Tabor és Tabor, 1984; Walker *et al.*, 1985). Hatanaka *et al.* (1999) szerint megemelkedett spermidin koncentráció szükséges a *Coffea arabica* embriogeneziséhez. Magasabb *CaSPDS* cDNS szinteket találtak a nyolc leveles kávé növények gyökereiben, zöld hajtásaiban, valamint a fiatalabb levelekben, tehát a fejlődésben lévő szövetekben. *In vitro* tenyésztés során ki tudták mutatni a *CaSPDS* nagyobb aktivitását az intenzíven osztódó kallusz sejtekben. A kiemelt szerepet tulajdonítanak

poliaminoknak az *in vitro* sejtosztódásban és növényregenerációban is (Minocha és Minocha, 1995; Vondráková *et al.*, 2015; Yadav és Rajam, 1997).

## 5.2. A *Nicotiana tabacum* L. modellnövény transzformációja *Agrobacterium tumefaciens*-sel és a T<sub>0</sub> vonalak előszelekciója

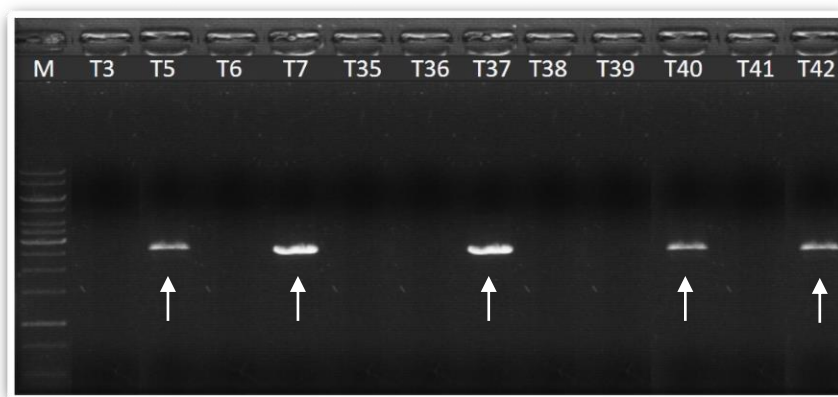
A glicerines *Agrobacterium tumefaciens* ‘GV3101’ törzsekből folyékony tenyészeteket hoztunk létre, melyeket előkészítettünk a *Nicotiana tabacum* L. *in vitro* transzformációjára. A sebzett levélexplantumokat a tenyészetekbe mártottuk, majd 4-5 napos kokultivációt alkalmaztunk. Háromszori steril desztillált vizes átmosás után az explantumokat 80 µg/ml kanamicint is tartalmazó szelekciós MS táptalajra helyeztük. A szelekciós táptalajon regenerálódó növényeket egyesével friss táptalajra helyeztük, ezzel egyidejűleg DNS-t izoláltunk belőlük, hogy kiderítsük, mely egyedek DNS-ébe integrálódott a T-DNS, PCR-t indítottunk az izolált DNS-ekből a pBI121\_35S\_F–FvADC\_SRT és pBI121\_35S\_F–FvSPDS\_SRT primerpárok felhasználásával (14. ábra). A DNS szinten pozitívnak bizonyuló vonalakat (T<sub>0</sub>) *in vitro* klónoztuk. Ezen klónok akklimatizált, nevelőkonténerbe kiültetett (*in vivo*) egyedeiről fogtunk magot a későbbi felhasználásra (T<sub>1</sub>).



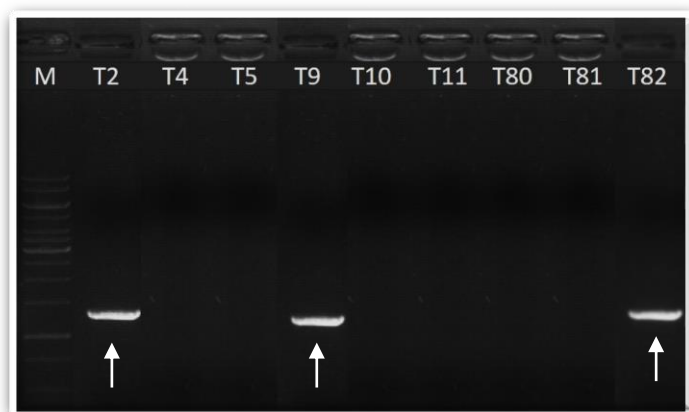
**14. ábra:** A *pGWB405::FvADC* és a *pGWB405::FvSPDS* vektorkonstrukciókat tartalmazó T<sub>0</sub> vonalak DNS szintű tesztelése. A kívánt méretű fragmentumokat fehér nyilakkal jelöltük. 1-5: *pGWB405::FvADC* vektorkonstrukcióval transzformált T<sub>0</sub> 1-5 vonalak; 6: *pGWB405::FvADC* vektorkonstrukció (pozitív kontroll); 7-11: *pGWB405::FvSPDS* vektorkonstrukcióval transzformált T<sub>0</sub> 1-5 vonalak; 12: *pGWB405::FvSPDS* vektorkonstrukció (pozitív kontroll); M: Molekulatömeg marker, ThermoFischer Scientific DNA Ladder 100 bp Plus, a fragmentumok nagysága: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp.

A 14. ábrán látható, hogy mely T<sub>0</sub> vonalnál amplifikálódott a várt méretű szekvencia (ADC3, ADC5, SPDS2 SPDS4 és SPDS5). Ezekből a DNS szinten pozitívnak bizonyuló egyedekből (ADC: 3, 5, 6, 7, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 vonalak; SPDS: 2, 4, 5, 9, 10, 11, 80,

81, 82 vonalak) RNS-t izoláltunk, melyekről Oligo (dT)18 primerrel reverz transzkripciót indítottunk. A kapott cDNS-ekre a már említett módon PCR-t indítottunk (FvADC\_SFT – sGFP\_RT\_R és FvSPDS\_SFT – sGFP\_RT\_R primerpárok felhasználásával), hogy meghatározzuk, mely vonalakban aktív a transzkripció a transzgenről. Az RNS szintű ellenőrzés során vizsgált 12 FvADC vonalak közül 5, az FvSPDS vonalak közül 3 esetében volt bizonyítható a transzkripció aktivitás. A pozitív minták amplifikálódott fragmentumait láthatjuk a **15-16. ábrákon**.



**15. ábra:** A *pGWB405::FvADC* vektorkonstrukciókat tartalmazó T<sub>0</sub> vonalak RNS szintű tesztelése. A kívánt méretű fragmentumokat fehér nyilakkal jelöltük. *pGWB405::FvADC* konstrukciót tartalmazó 3, 5, 6, 7, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 T<sub>0</sub> vonalak RNS-éből szintetizált cDNS; M: Molekulatömeg marker, ThermoFischer Scientific DNA Ladder 100 bp Plus, a fragmentumok nagysága: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp.



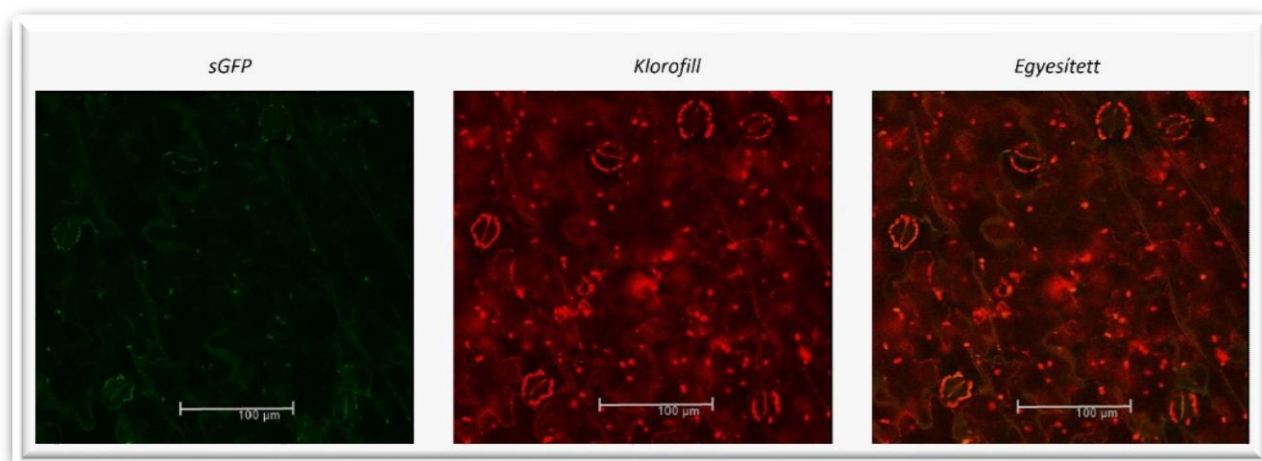
**16. ábra:** A *pGWB405::FvSPDS* vektorkonstrukciókat tartalmazó T<sub>0</sub> vonalak RNS szintű tesztelése. A kívánt méretű fragmentumokat fehér nyilakkal jelöltük. *pGWB405::FvSPDS* konstrukciót tartalmazó 2, 4, 5, 9, 10, 11, 80, 81, 82 T<sub>0</sub> vonalak RNS-éből szintetizált cDNS; M: Molekulatömeg marker, ThermoFischer Scientific DNA Ladder 100 bp Plus, a fragmentumok nagysága: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp.



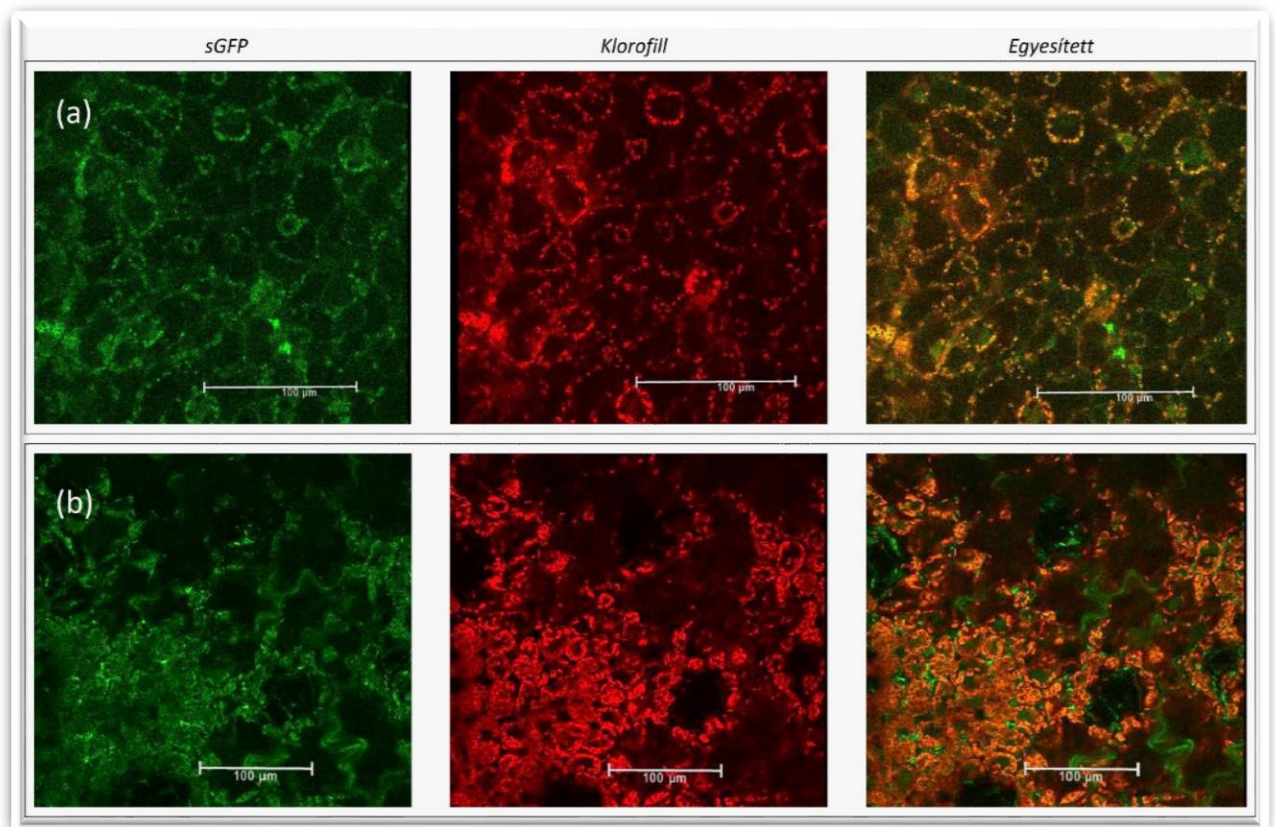
Azoknak a vonalaknak akklimatizált *in vivo* T<sub>0</sub> klónjaiból, melyeknél DNS és RNS szinten is bizonyítottuk az expressziós kazetta integrálódását a genomba, magot fogtunk. A T<sub>1</sub> vonalak szegregációs arányát *in vitro* vizsgáltuk a 80 µg/ml kanamicint tartalmazó MS táptalajon. A T<sub>0</sub> nemzedék azon vonalai tartalmazzák a bevitt génkonstrukciót egy funkcióképes kópiában, melyek utódpopulációja (T<sub>1</sub> nemzedék) 3:1-es hasadást mutat az adott szelektív táptalajon. A FvADC és FvSPDS vonalak esetében több független transzformációs eseményből származó vonalnál kaptunk a kívánatos 3:1-es hasadási arányt. Ezek közül a következő három-három vonalat választottuk ki további vizsgálatok céljából: FvADC-5, FvADC-7, FvADC-37 FvSPDS-2, FvSPDS-9, FvSPDS-82.

### 5.3. A FvADC és FvSPDS enzimek sejten belüli lokalizációja

Első lépésben stabil transzformánsokban vizsgáltuk a FvADC::sGFP és a FvSPDS::sGFP fúziós fehérjék sejten belüli lokalizációját. A klorofill autofluoreszcenciáján kívül nem mutatható ki sGFP aktivitás a vad típusú növények esetében (**17. ábra**).



**17. ábra:** A vad típusú (Vt) *Nicotiana tabacum* növények expressziós mintázata az oszlopos parenchima sejtekben. A vonal 100 µm-t jelöl.



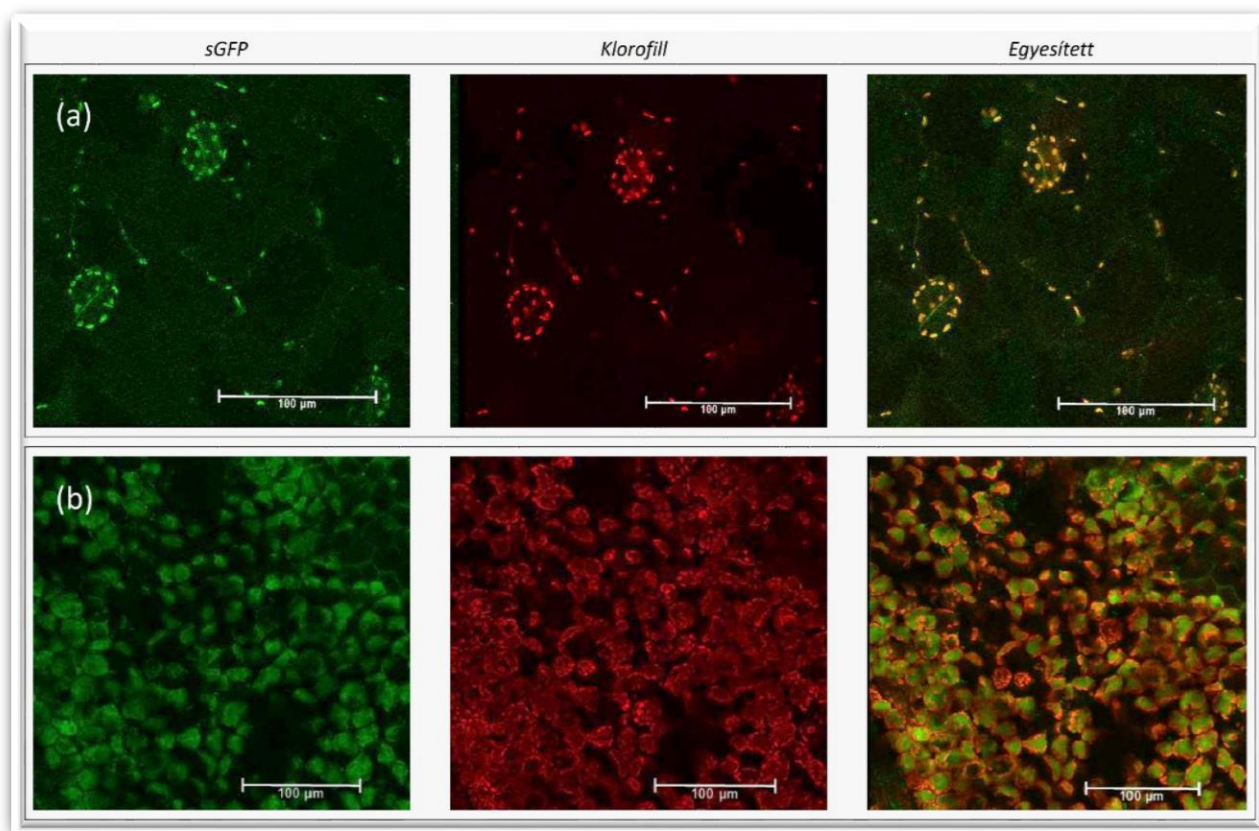
**18. ábra:** A *FvADC::sGFP* konstrukció expressziós mintázata a stabil transzformánsok epidermális (a) és oszlopos parenchima (b) sejtjeiben. A vonal 100 µm-t jelöl.

Stabil transzformánsokban vizsgáltuk a *FvADC::sGFP* fúziós fehérjék lokalizációját. Az epidermális sejtekben az *sGFP* a klorofillal azonos mintázatú helyeken detektálható, így kloroplasztisz lokalizációt állapítottunk meg (**18./a ábra**). Az *sGFP* riportergén konstitutív promóterhez kapcsolva önmagában citoplazmás expressziót mutat, így nem módosíthatja a vele fuzionáltatott szekvencia szubcelluláris lokalizációját (Chiu *et al.*, 1996). A *N. tabacum* endogén arginin dekarboxiláz enzime minden növényi szervben mutat aktivitást, ám az aktivitás helye a szövet funkciójától függ (Bortolotti *et al.*, 2004). Korábbi kutatások kimutatták, hogy az ADC enzim alapvetően a sejtben és kloroplasztiszban működik (Nandy *et al.*, 2022; Slocum, 1991). A fotoszintetikusán aktív szövetekben a kloroplasztiszi jelenlét, a nem aktívokban a sejtbeni jelenlét a domináns. Az *A. thaliana* esetében citoplazmás és kloroplasztiszi lokalizációt figyeltek meg szintén *sGFP* fehérjék segítségével (Maruri-López és Jiménez-Bremont, 2017). A sejtbeni és citoplazmás lokalizáción kívül minden szerző egyetért abban, hogy a kloroplasztiszban is rendkívül aktív a poliaminok bioszintézise és így az abban résztvevő enzimek is (Borrell *et al.*, 1995; Gemperlová *et al.*, 2006; Torrigiani *et al.*, 1986). Korábbi kutatások kloroplasztisz specifikus tranzitfehérjék kodonjait adonosították *Arabidopsis*, dohány, rizs, zab, rozs, mustár és

alma ADC génjei vizsgálatakor (Burtin és Michael, 1997; Peremarti *et al.*, 2010; Urano *et al.*, 2003). A poliaminok a klorofill fehérjekomplexek antennafehérjéihez kapcsolódva módosítják a fotoszintetikus apparátus hatásfokát és fokozzák az ellenállást az oxidatív stresszek ellen (Sobieszczyk-Nowicka és Legocka, 2013). Emiatt fontos a poliaminok folyamatos utánpótlása, ami magyarázza a fokozott ADC aktivitást a kloroplasztiszokban. Rizs, alma, őszibarack, szegfű és mustár ADC génjei is hordoznak N-terminális kloroplasztisz specifikus tranzitpeptid kodont (Liu *et al.*, 2009; Peremarti *et al.*, 2009). Az arginin dekarboxiláz enzim a citoplazmában szintetizálódik, majd onnan szállítódik a kloroplasztiszokba.

Mikroszkópos vizsgálataink során nem tudtuk a *FvADC::sGFP* konstrukció sejtmagi vagy citoplazmás aktivitását kimutatni, ám az oszlopos parenchima sejtek esetében a sejtközi térben detektálható volt az sGFP jele (**18./b ábra**). Dohánynövények esetében a poliamintartalom jelentős megemelkedését tapasztalták az intercelluláris térben stressz (pl. vírusfertőzés) hatására (Yamakawa *et al.*, 1998). A spermidin és a spermin növeli a védekezésben résztvevő számos gén transzkripció aktivitását, főleg a szerzett szisztémikus rezisztenciáért felelős génekét. Védelmet nyújtanak többek között a *Botrytis cinerea*, a dohány mozaik vírus, az uborka mozaik vírus, valamint a *Pseudomonas syringae* baktérium ellen is (Marco *et al.*, 2014; Mitsuya *et al.*, 2009; Seifi *et al.*, 2019; Takahashi *et al.*, 2003, 2004). Patogének által fertőzött szöveteknél gyakran megfigyeltek emelkedett poliaminszinteket, így *Pseudomonas syringae*, *P. cichorii*, *P. viridiflava*, *Magnaporthe grisea* vagy *Sclerotinia sclerotiorum* esetében is (Angelini *et al.*, 2010). Rozslisztharmat fertőzését követően megemelkedik a Put, Spd és Spm mennyisége, az ODC, ADC és SAMDC aktivitása is (Walters *et al.*, 1985; 1986). Petrezselyem sárga mozaik vírus és dohánymozaik vírus fertőzés megnövelte a növények endogén poliamintartalmát (Uehara *et al.*, 2005). Számos vizsgálat alapján úgy tűnik, hogy a poliaminok, valamint a DAO és a PAO enzimek részt vesznek a védekezésben a növény-patogén kölcsönhatás során. Emelkedett poliaminszintek, valamint a bioszintézisükben résztvevő enzimek fokozott aktivitását figyelték meg a növények szisztémikus védekezésében (Walters, 2003a). A legtöbb esetben a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> szint kismértékben megemelkedik, amit egy hiperszenzitív reakció követ. A poliaminok másodlagos metabolitok kiindulási anyagai, valamint fenolos vegyületekkel is komplexeket képeznek, így tudnak részt venni a patogénnel szembeni védekezésben (Walters, 2003b). A Spm szignálmolekulaként részt vesz a hiperszenzitív reakcióban uborka mozaik vírus fertőzés esetében, így gátolva a vírus szaporodását dohányban és *Arabidopsis*-ban is. Exogén Spd és Spm kezeléssel közepes mértékű TMV rezisztenciát is ki tudtak alakítani (Mitsuya *et al.*, 2009; Sagor *et al.*, 2009). A fokozott poliamin termelés a bioszintézisben résztvevő enzimek fokozott aktivitását is jelenti, ám jelenlegi

ismereteink szerint eddig egy szerző sem számolt be a sejtközötti járatokban arginin dekarboxiláz aktivitásról.



**19. ábra:** A *FvSPDS::sGFP* konstrukció expressziós mintázata a stabil transzformánsok epidermális (a) és oszlopos parenchima (b) sejtjeiben. A vonal 100 µm-t jelöl.

A *FvSPDS::sGFP* expressziós mintázatát is vizsgáltuk *N. tabacum* epidermális sejtjeiben. Az sGFP kloroplasztiszokkal megegyező helyeken is adott fluorescens jelet, így kloroplasztisz lokalizációt állapítottunk meg (**19./a ábra**). A *N. tabacum* endogén spermidin szintáz enzime minden növényi szervben mutat aktivitást (Gomez-Jimenez *et al.*, 2010; Paschalidis *et al.*, 2005). Ez összhangban van számos kutatás eredményével, melyekben kimutatták, hogy a SPDS enzim alapvetően a sejtmagban és kloroplasztiszban működik (Belda-Palazón *et al.*, 2012; Kaur-Sawhney *et al.*, 2003; Slocum, 1991). A SPDS enzim kloroplasztiszokban betöltött szerepét is többen is bizonyították (Borrell *et al.*, 1995; Gemperlová *et al.*, 2006; Torrigiani *et al.*, 1986). Ahogy korábban már említettük, a poliamin bioszintézis enzimeit nagyban hozzájárulnak a fotoszintézis hatékonyságának növeléséhez, valamint a biotikus-, és abiotikus stresszekkel szembeni ellenállás fokozásához (Marco *et al.*, 2014; Mitsuya *et al.* 2009; Seifi *et al.*, 2019; Sobieszczyk-Nowicka és Legocka, 2013; Takahashi *et al.* 2003, 2004; Yamakawa *et al.*, 1998). A

poliaminok folyamatos jelenlétéhez legnagyobb mértékben a sejtmagban és a kloroplasztiszban van szükség, valamint a veszélyeknek leginkább kitett helyeken (sebek, sztóma zárósejtek, epidermális réteg, etc.) (Jiménez-Bremont *et al.*, 2014). *Morus spp.* SPDS génjeiben nem találtak szignál peptidet, lokalizációját a funkciója határozta meg (Liu *et al.*, 2021). A növényi SPDS gének nem tartalmaznak tranzit peptid specifikus szekvenciákat és a *sGFP* sem módosítja az expressziós mintázatot. A spermidin szintáz enzim a citoplazmában szintetizálódik, majd onnan szállítódik a kloroplasztiszokba és a sejtmagba (Chiu *et al.*, 1996; Hashimoto *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2021).

Korábbi kutatások is felhívták a figyelmet arra, hogy a poliamin bioszintézis enzimeit a citoplazmában a legaktívabbak, majd onnan szállítódnak a további felhasználás helyére (Gonzalez *et al.*, 2021; Hashimoto *et al.*, 1998; Takács *et al.*, 2016). Az oszlopos parenchima sejtek esetében a mi kísérletünkben is detektálható volt az *sGFP* jele a citoplazmában (**19./b ábra**).

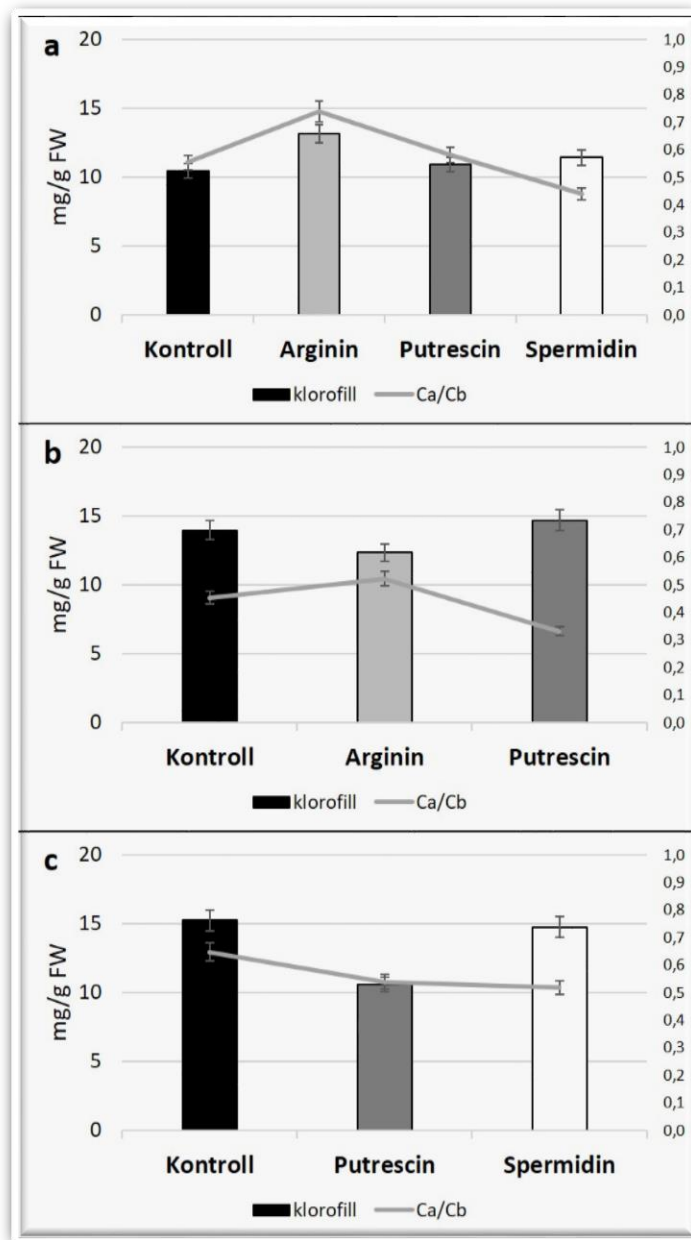
A poliaminok részt vesznek az oxidatív stressz eliminálásában, a húzófonalak kialakításában, a kromatinszálak stabilizálásában, valamint a génexpresszió szabályozásában (Childs *et al.*, 2003; Goyal *et al.*, 2019; Matthews, 1993; Phengchat *et al.*, 2016;). Ennek megfelelően több korábbi tanulmányban is megemlíti a SPDS enzimek sejtmagi lokalizációját (Amarasinghe és Carlson, 1994; Liang és Lur, 2002; Wu *et al.*, 2020), mikroszkópos vizsgálataink során azonban nem tudtuk a *FvSPDS::sGFP* konstrukció sejtmagi aktivitását kimutatni.

#### **5.4. Az arginin, a putrescin és a spermidin hosszútávú hatásának vizsgálata a FvADC-t, FvSPDS-t túltermelő és a vad típusú *Nicotiana tabacum* növények élettani paramétereire**

##### **5.4.1. A klorofilltartalom**

Az arginin dekarboxiláz enzim génjének egy új, jelölt kópiáját hordozó vonalakat (FvADC-5, FvADC-7, FvADC-37) 150 mg/l arginint vagy 10mg/l putrescint tartalmazó táptalajra helyeztük. A spermidin szintáz génnel transzformált FvSPDS-2, FvSPDS-9, FvSPDS-82 vonalakat 10 mg/l putrescint vagy 10 mg/l spermidint tartalmazó táptalajon neveltük tovább. A vad típusú növényeket mindhárom kezelésnek (arginin, putrescin és spermidin) alávetettük. A vad típusú, valamint a 3-3 transzformált növényvonalat kiegészítés nélküli MS táptalajon is tenyésztettük.

A klorofilltartalom információt ad a növények fiziológiai állapotáról, fitnesséről is (Kovács *et al.*, 2020). Az összklorofill-tartalom, valamint a klorofill *a* és *b* mennyiségének meghatározását Porra *et al.* (1989) módszere alapján végeztük.



**20. ábra:** A vad típusú (a), FvADC (b) és FvSPDS (c) *Nicotiana tabacum* növények klorofill *a* és *b* tartalma (mg/g) friss tömegre megadva, valamint azok egymáshoz viszonyított aránya kontroll körülmények között, valamint 150 mg/l arginin, 10 mg/l putrescin, és 10 mg/l spermidin hatására (SD±, n=3).

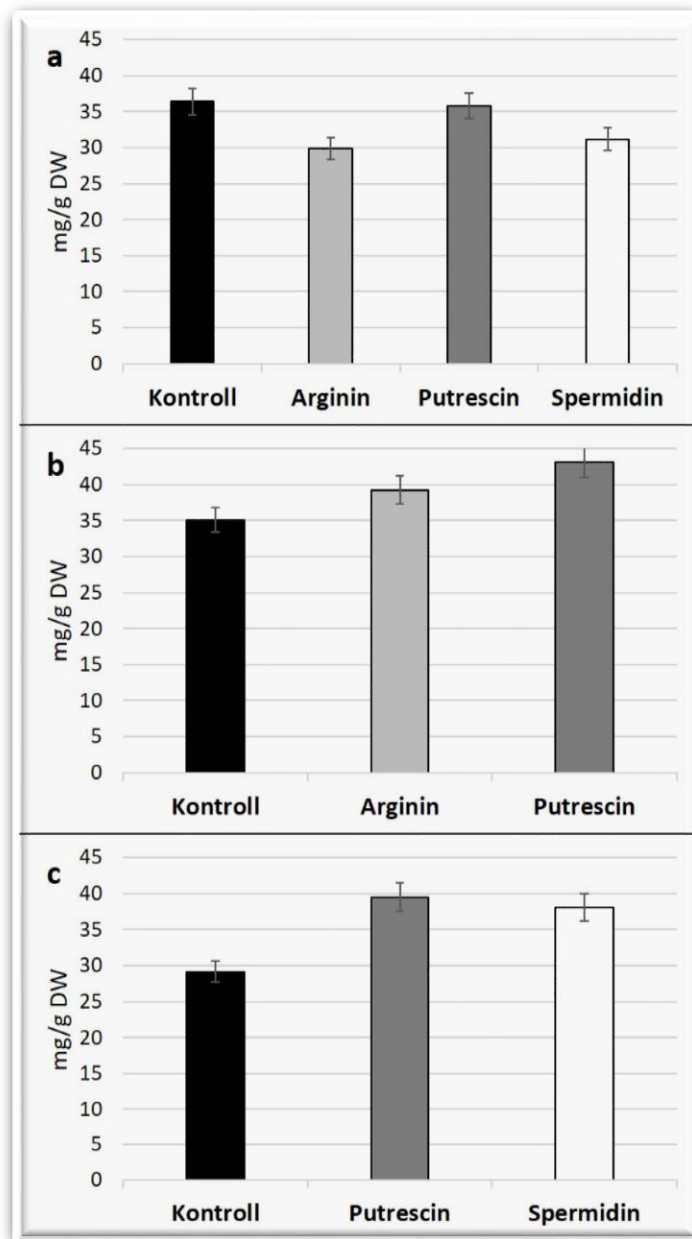
A vad típusú *Nicotiana tabacum* növények klorofill *a* és *b* tartalma (mg/g) friss tömegre megadva, valamint azok egymáshoz viszonyított aránya a **20/a ábrán** látható. A kezeletlen kontroll értéke 10,5 mg/g volt. A kontrollhoz képest mind a három kezelés növelte az összklorofill szintjét, legkevésbé a putrescin kezelés (4,2%), legnagyobb mértékben az arginin hozzáadása (25,6%). A kontroll növényekhez képest az arginin kezelés 35,1%-kal, a putrescin kezelés 4,9%-kal növelte a klorofill *a* arányát a klorofill *b*-hez képest. Ezzel szemben spermidin hozzáadásakor 20,0%-kal csökkent ugyanez az érték az összklorofill-tartalom emelkedése mellett.

Akontroll FvADC vonal klorofill tartalma 14,0 mg/g volt a friss tömegre vetítve, ami 33,3%-kal nagyobb a kezeletlen vad típusú növényeknél mérténél (**20/b ábra**). Ugyanez az eltérés mutatható ki a putrescin hatására is. Minden vizsgált mintánál elmondható, hogy a putrescin kezelés után magasabb klorofilltartalmat mértünk, mint arginin hatására. Az arginin hozzáadása 11,6%-kal csökkentette, a putrescin hozzáadása 5,2%-kal növelte az összklorofill-tartalmát. A két klorofill típus aránya ebben az esetben informatívabb azok mennyiségénél. Azt tapasztaltuk, hogy az argininnal kezelt növények *Ca/Cb* aránya átlagosan 15,5%-kal emelkedett, míg putrescin hatására átlagosan 27,0%-kal csökkent a kontrollhoz képest..

A három FvSPDS *Nicotiana tabacum* vonal kontroll növényeinek átlaga 15,2 mg/g volt a friss tömegre vetítve, ami 45,5%-kal nagyobb a kezeletlen vad típusú növényeknél mérténél (**20./c ábra**). Az összklorofill-tartalom alakulása nem mutat egységes képet a különböző kezelésekre hatására a FvSPDS vonalak esetében. A putrescin kezelés hatására mindhárom FvSPDS vonal esetében csökkent a koncentráció, átlagosan 30,5%-kal. Spermidin hozzáadásakor egy vonal klorofilltartalma csökkent, kettő emelkedett a kezeletlen kontrollhoz képest, ám mindhárom esetben emelkedett a putrescinnel kezeltékhez képest (átlagosan 39,5%-kal). A putrescin kezelés után minden vizsgált mintánál magasabb klorofilltartalmat kaptunk, mint arginin hatására. A putrescin hozzáadása a három FvSPDS vonal átlagában 32,1%-kal, a spermidin hozzáadása 3,1%-kal csökkentette a minták összklorofill-tartalmát. A két klorofill típus aránya ebben az esetben is informatív. Minden putrescint vagy spermidint tartalmazó táptalajon nevelt FvSPDS *Nicotiana tabacum* növény *Ca/Cb* aránya csökkent, átlagosan 18,3%-kal. A putrescin 17,2%-kal, a spermidin 20,1%-kal alacsonyabb értékeket eredményezett a kontroll FvSPDS növényekhez képest.

#### **5.4.2. A lignintartalom**

Korábbi vizsgálataink során kimutattuk, hogy a FvSAMS-t és FvSAMDC-t túltermelő kezeletlen *N. benthamiana* D. növények szignifikánsan magasabb lignintartalommal rendelkeztek, mint a vad típusúak. Sóstressz hatására a SAM dekarboxilációja csökkentette a lignintartalmat a poliamin metabolizmus, és ezáltal az abiotikus stresszel szembeni tolerancia javára (Kovács *et al.*, 2020). Ezért vizsgáltuk, hogy a kísérletbe vont táptalaj-kiegészítők hogyan befolyásolják a vad típusú, valamint a FvADC-t és FvSPDS-t konstitutívan túltermelő növények lignin tartalmát.



**21. ábra:** A vad típusú (a), FvADC (b) és FvSPDS (c) *Nicotiana tabacum* növények lignintartalma (mg/g) liofilizált száraz tömegre megadva kontroll körülmények között, valamint 150 mg/l arginin, 10 mg/l putrescin, és 10 mg/l spermidin hatására (SD±, n=3).

A **21./a ábra** a vad típusú *Nicotiana tabacum* növények liofilizált száraz tömegre vonatkozó lignintartalmát mutatja be (mg/g). A kontroll növények 36,4 mg/g lignint tartalmaztak száraz tömegre vetítve. Mind a három alkalmazott táptalaj-kiegészítés csökkentette a vizsgált növények lignintartalmát. Arginin kezelés hatására a lignintartalom 18,1%-kal csökkent (29,8 mg/g), míg spermidin hatására 14,4%-kal (31,2 mg/g). Putrescin hozzáadására 1,6%-os, nem szignifikáns csökkenést tapasztaltunk.

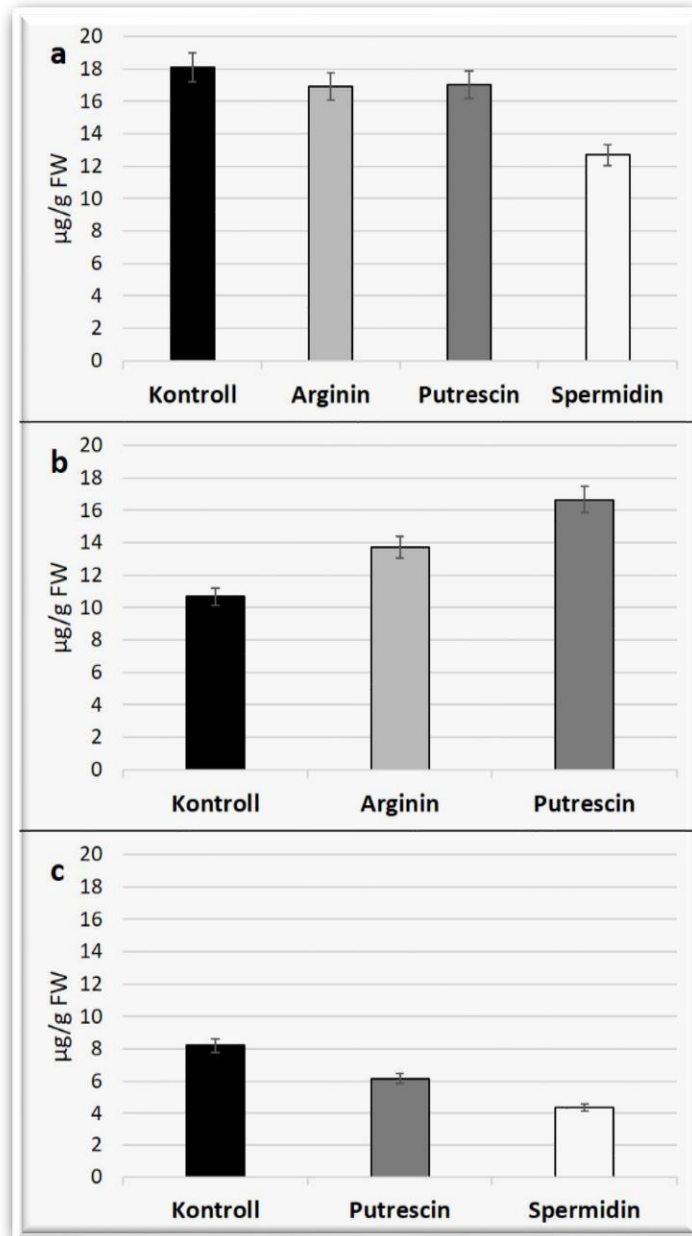


A három FvADC vonal kontroll növényeinek átlaga 35,1 mg/g volt a száraz tömegre vetítve, ami 3,6%-kal alacsonyabb a kezeletlen vad típusú növényeknél mérténél (**21./b ábra**). Mindhárom vonalnál ugyanazt a tendenciát figyelhetjük meg a lignintartalom alakulásában: a legkisebb értékek a kontroll FvADC növényeknél jelentkeznek, míg a legnagyobbban a putrescinnel kezeltéknél. A három vonal átlagában az arginin hozzáadása 11,8%-kal, a putrescin hozzáadása 23,0%-kal növelte a mérhető lignintartalmat.

A három FvSPDS *Nicotiana tabacum* vonal kontroll növényeinek átlagos lignintartalma 29,2 mg/g volt a száraz tömegre vetítve, ami 19,9%-kal alacsonyabb a kezeletlen vad típusú növényeknél mérténél (**21./c ábra**). A három vonal esetében egyértelműen a kontroll FvSPDS növényeknél jelentkeznek a legkisebb lignintartalmak, a két táptalaj-kiegészítő emelte ezt az értéket. A három vonal átlagában a putrescin hozzáadása 35,4%-kal, a spermidin hozzáadása 30,6%-kal növelte a FvSPDS *Nicotiana tabacum* növények lignin tartalmát.

### **5.4.3. A prolintartalom**

Kavi Kishore *et al.*, (1995) kimutatták a transzgénikusan több prolint termelő *Arabidopsis* növények fokozott sótoleranciáját, valamint a prolin mennyiség növekedését különböző stresszek hatására, ezért vizsgáltuk, hogy a különböző, poliamin metabolizmushoz kapcsolódó táptalaj-kiegészítők miként befolyásolják a FvADC, FvSPDS vonalak, valamint a vad típusú dohány növények prolintartalmát.



**22. ábra:** A vad típusú (a), FvADC (b) és FvSPDS (c) *Nicotiana tabacum* növények prolintartalma ( $\mu\text{g/g}$ ) friss tömegre megadva kontroll körülmények között, valamint 150 mg/l arginin, 10 mg/l putrescin, és 10 mg/l spermidin hatására ( $\text{SD}\pm$ ,  $n=3$ ).

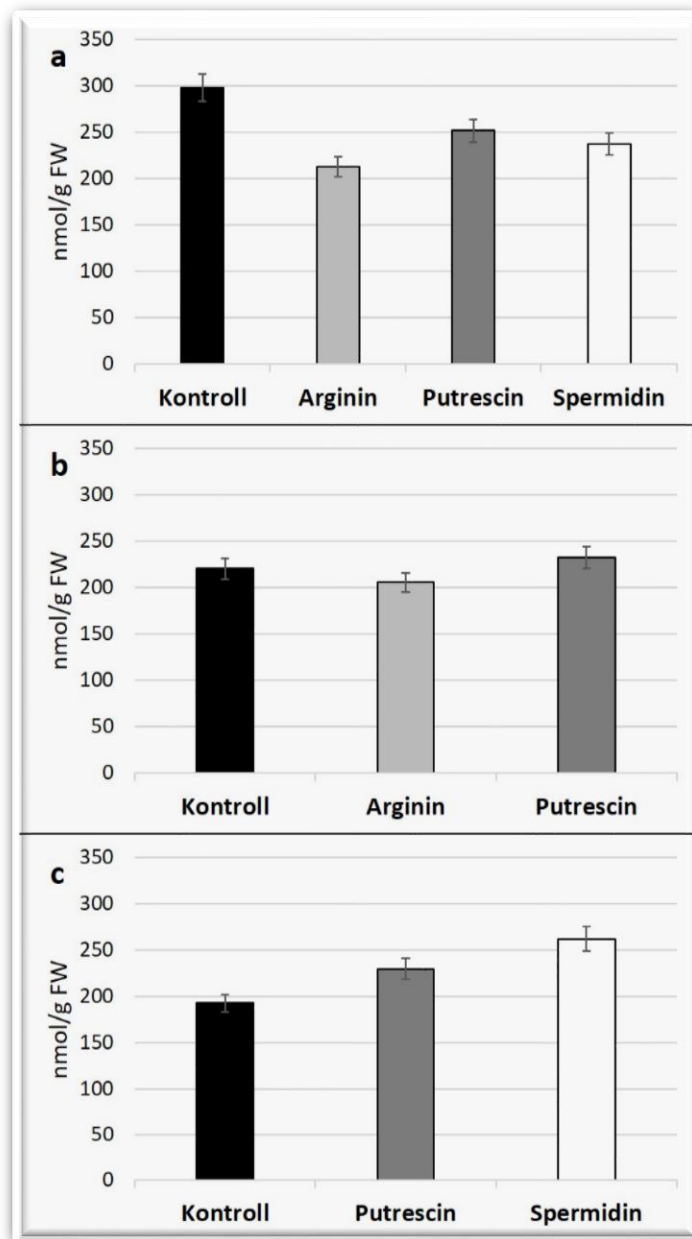
A **22./a ábra** a vad típusú *Nicotiana tabacum* növények friss tömegre vonatkozó prolintartalmát mutatja be ( $\mu\text{g/g}$ ). A kezeletlen kontroll értéke 18,1  $\mu\text{g/g}$  volt. Összességében elmondható, hogy mind a három alkalmazott táptalaj-kiegészítés csökkentette a vizsgált növények prolintartalmát. Arginin kezelés hatására a prolintartalom 6,4%-kal csökkent (16,9  $\mu\text{g/g}$ ), míg putrescin hatására 6,0%-kal (17,0  $\mu\text{g/g}$ ). Spermidin hozzáadására 33,3%-os, erőteljesebb csökkenést tapasztaltunk.

A három FvADC vonal kontroll növényeinek átlaga 10,7 µg/g volt a friss tömegre vetítve, ami 41,0%-kal alacsonyabb a kezeletlen vad típusú növényeknél mértnél. Mindhárom vonalnál ugyanazt a tendenciát figyelhetjük meg a prolintartalom alakulásában: a legkisebb értékek a kontroll FvADC növényeknél jelentkeznek, míg a legnagyobbban a putrescinnel kezeltknél (**22./b ábra**). A három vonal átlagában az arginin hozzáadása 28,6%-kal, a putrescin hozzáadása 56,1%-kal növelte a mérhető prolintartalmat.

A FvSPDS *Nicotiana tabacum* vonalak kontroll növényeinek átlaga 8,2 µg/g volt a friss tömeg arányában, ez 54,7%-kal alacsonyabb a kezeletlen vad típusú növényeknél mértnél (**22/c. ábra**). A prolintartalom alakulásában ugyanaz a tendencia mindhárom vizsgálatba vont vonal esetében, a legnagyobb értékek a kontroll FvSPDS növényeknél voltak mérhetőek. Putrescin hozzáadása átlagosan 24,9%-kal, míg spermidin hozzáadása 47,0%-kal csökkentette a prolintartalmat.

#### **5.4.4. A putrescin, spermidin és spermin, valamint az összpoliamin-tartalom**

A poliaminok az abiotikus stresszekkel szembeni védekezés részeként szerepet játszanak a membránstabilitás megerősítésében, a szabad gyökök eltávolításában, az ozmotikus szabályozásban, és a sztómák nyitottságának szabályozásában (Liu *et al.*, 2007). Ezért vizsgáltuk a különböző poliaminformák mennyiségének változását a poliamin-metabolizmusban résztvevő arginin, putrescin és spermidin hatására a FvADC, FvSPDS vonalak, valamint a vad típusú dohány növényekben (**23. ábra**).

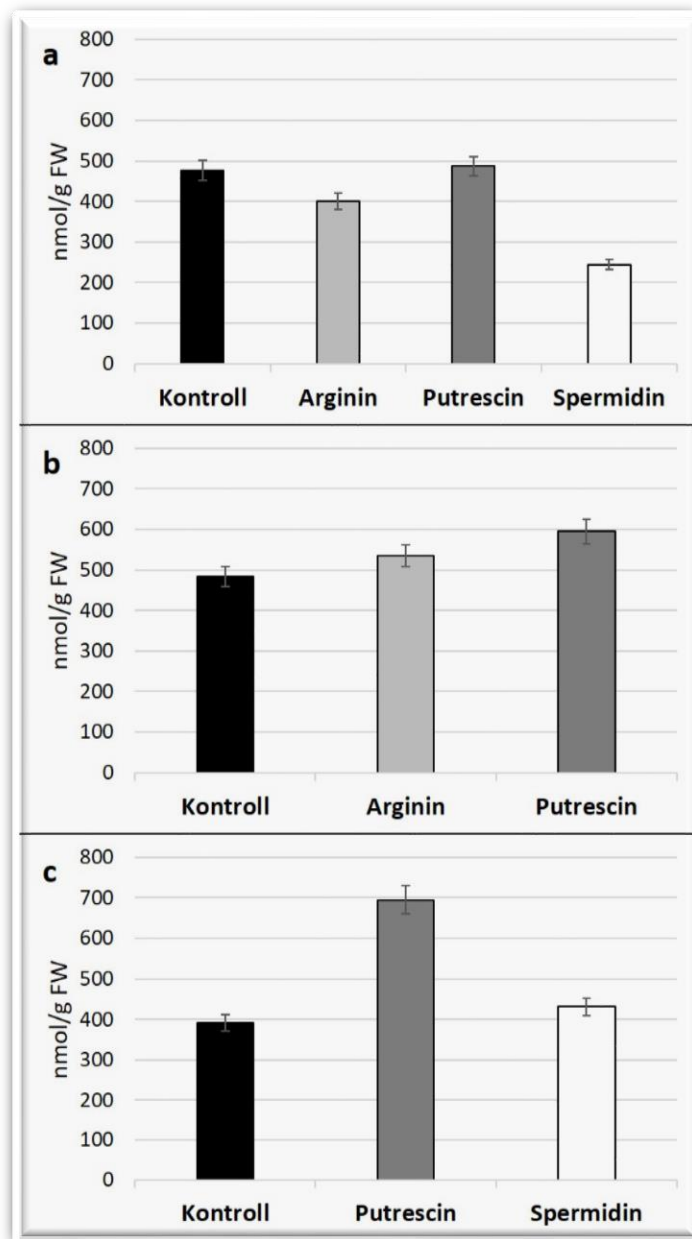


**23. ábra:** A vad típusú (a), FvADC (b) és FvSPDS (c) *Nicotiana tabacum* növények putrescintartalma (nmol/g) friss tömegre megadva kontroll körülmények között, valamint 150 mg/l arginin, 10 mg/l putrescin, és 10 mg/l spermidin hatására (SD±, n=3).

A **23./a ábra** a vad típusú *Nicotiana tabacum* növények friss tömegre vonatkozó putrescintartalmát mutatja be (nmol/g). A kezeletlen kontroll értéke 298,3 nmol/g volt, tehát mind a három alkalmazott táptalaj-kiegészítés csökkentette a vizsgált növények putrescintartalmát. Arginin kezelés hatására a putrescintartalom 28,8%-os (212,4 nmol/g), putrescin hatására 15,7%-os (255,5 nmol/g), míg spermidin hozzáadására 20,6%-os (237,0 nmol/g) csökkenést tapasztaltunk.

A **23./b ábra** a FvADC *Nicotiana tabacum* növények putrescintartalmát mutatja be (nmol/g) friss tömegre vetítve. A három vonal kontroll növényeinek átlaga 220,2 nmol/g volt a friss tömegre vetítve, ami 26,1%-kal alacsonyabb a kezeletlen vad típusú növényeknél mértnél. A putrescintartalom alakulása mindhárom vonal esetében hasonlóan alakul. Az arginin hozzáadása 8,1%-kal csökkentette, a putrescin hozzáadása 5,3%-kal növelte a szabad putrescintartalmat a három vonal átlagában.

A FvSPDS *Nicotiana tabacum* vonalak kontroll növényeinek átlaga 192,7 nmol/g volt a friss tömeg arányában, ez 35,4%-kal alacsonyabb a kezeletlen vad típusú növényeknél mértnél (**23./c ábra**). A putrescintartalom alakulásában ugyanazt a tendenciát figyelhetjük meg mindhárom vizsgálatba vont vonal esetében. A legalacsonyabb értékek a kontroll FvSPDS növényeknél voltak mérhetőek. Putrescin hozzáadása átlagosan 19,1%-kal, míg spermidin hozzáadása 35,9%-kal növelte a mérhető putrescintartalmat.



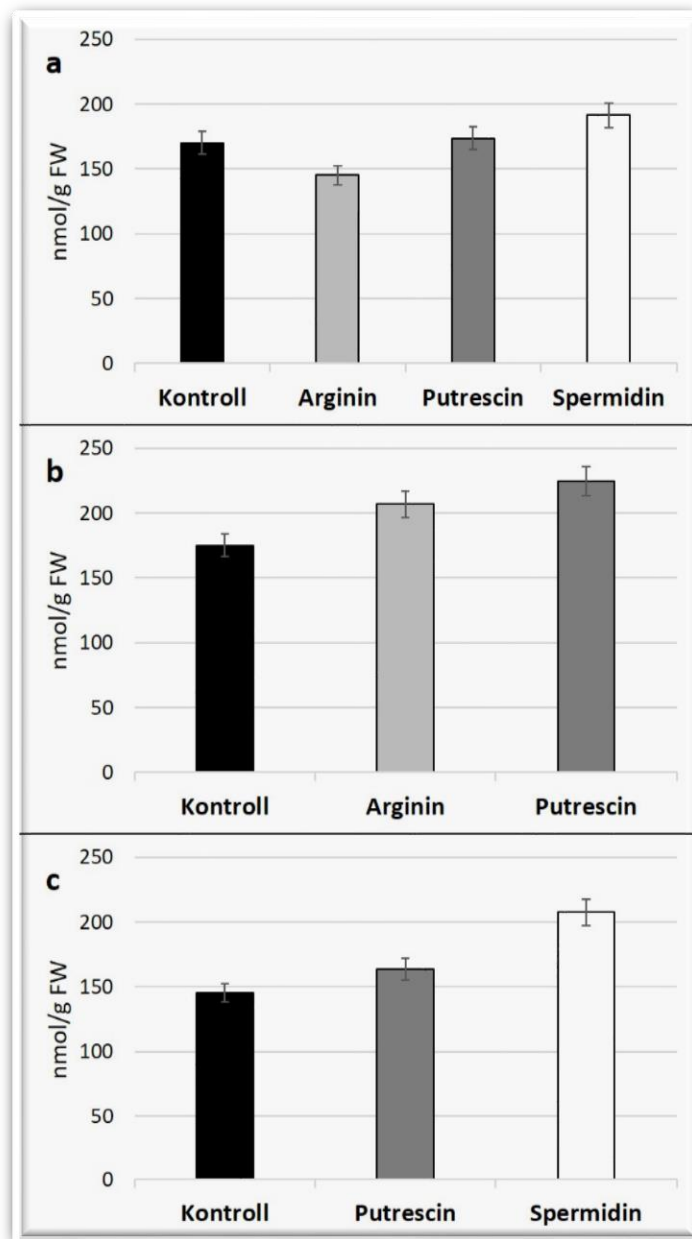
**24. ábra:** A vad típusú (a), FvADC (b) és FvSPDS (c) *Nicotiana tabacum* növények spermidintartalma (nmol/g) friss tömegre megadva kontroll körülmények között, valamint 150 mg/l arginin, 10 mg/l putrescin, és 10 mg/l spermidin hatására (SD±, n=3).

A **24./a ábra** a vad típusú *Nicotiana tabacum* növények friss tömegre vonatkozó spermidintartalmát mutatja be (nmol/g). A kontroll növények átlagosan 476,5 nmol/g spermidint tartalmaztak. Az arginin kezelés hatására a spermidintartalom 16,0%-os csökkenést (400,1 nmol/g), putrescin hatására 2,2%-os nem szignifikáns emelkedést (487,0 nmol/g), míg spermidin hozzáadására 48,7%-os erőteljes csökkenést (237,0 nmol/g) mutatott.

A három FvADC *Nicotiana tabacum* vonal kontroll növényeinek átlaga 483,8 nmol/g volt a friss tömegre vetítve, ami 1,5%-kal magasabb a kezeletlen vad típusú növényeknél mérténél (**24./b**

**ábra).** A spermidintartalom alakulása mindhárom vonal esetében hasonlóan alakul, a legkisebb mennyiséget a kezeletlen kontrollnál, a legnagyobbat a putrescinnel kezelésnél mértük. Az arginin hozzáadása 10,8%-kal, a putrescin hozzáadása 22,9%-kal növelte a szabad spermidintartalmat a három vonal átlagában.

A **24./c ábra** a FvSPDS *Nicotiana tabacum* növények spermidintartalmát mutatja be (nmol/g) friss tömegre megadva. A kontroll növényeinek átlaga 391,8 nmol/g volt a friss tömeg arányában, ez 17,8%-kal alacsonyabb a kezeletlen vad típusú növényeknél mérténél. A spermidintartalom alakulásában ugyanazt a tendenciát figyelhetjük meg mindhárom vizsgálatba vont vonal esetében. A legalacsonyabb értékek a kontroll FvSPDS növényeknél voltak mérhetőek. Putrescin hozzáadása átlagosan 17,3%-kal, míg spermidin hozzáadása 10,1%-kal növelte a mérhető spermidintartalmat.



**25. ábra:** A vad típusú (a), FvADC (b) és FvSPDS (c) *Nicotiana tabacum* növények spermintartalma (nmol/g) friss tömegre megadva kontroll körülmények között, valamint 150 mg/l arginin, 10 mg/l putrescin, és 10 mg/l spermidin hatására (SD±, n=3).

A **25./a ábra** a vad típusú *Nicotiana tabacum* növények friss tömegre vonatkozó spermintartalmát mutatja be (nmol/g). A vad típusú növények kezeletlen kontrolljainál spermin tartalma 170,28 nmol/g volt. Az arginin kezelés hatására a spermintartalom 14,8%-os csökkenést (146,2 nmol/g), putrescin hatására 2,0%-os nem szignifikáns emelkedést (173,6 nmol/g), míg spermidin hozzáadására 12,4%-os emelkedést (191,4 nmol/g) mutatott.

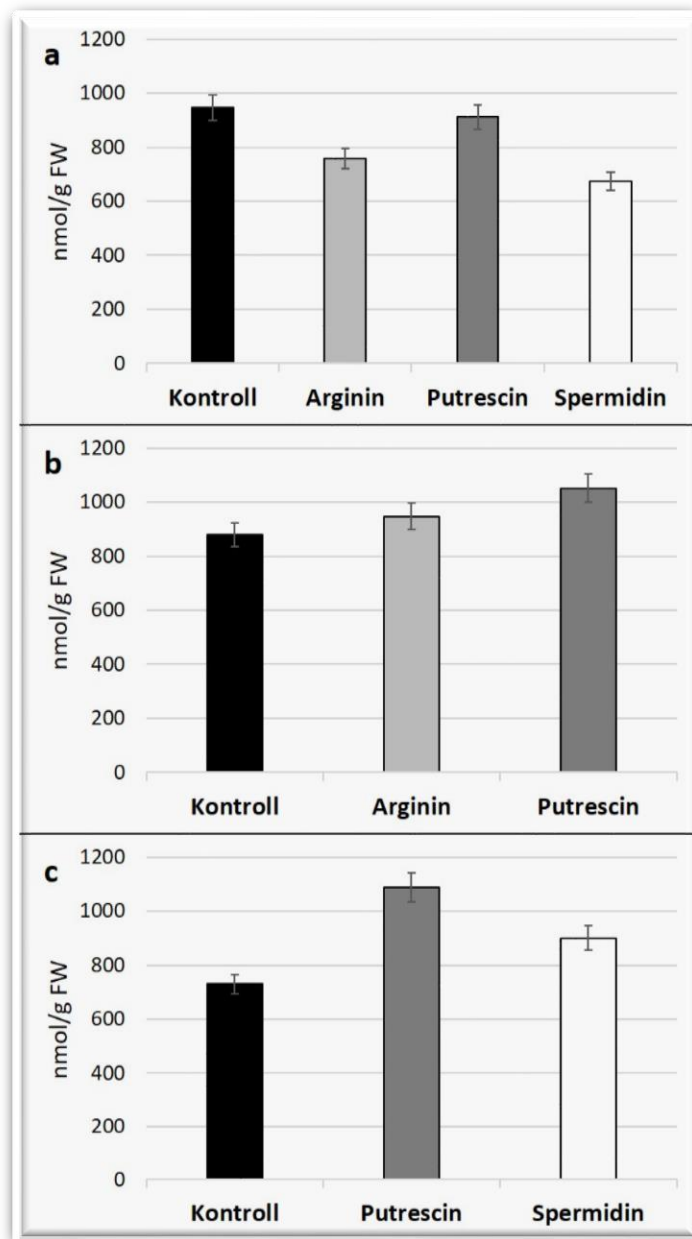
A három FvADC vonal kontroll növényeinek átlaga 174,9 nmol/g volt a friss tömegre vetítve, ami 2,7%-kal magasabb a kezeletlen vad típusú növényeknél mértnél. A spermintartalom



alakulásánál mindhárom vonal esetében ugyanazt a tendenciát láthatjuk, a legkisebb mennyiséget a kontroll, a legnagyobbat pedig a putrescin kezelésnél mértük (**25./b ábra**). Az arginin hozzáadása átlagosan 18,3%-kal, a putrescin hozzáadása 28,6%-kal növelte a szabad spermintartalmat.

A FvSPDS *Nicotiana tabacum* vonalak kontroll növényeinek átlaga 145,5 nmol/g volt a friss tömeg arányában, ez 14,6%-kal alacsonyabb a kezeletlen vad típusú növényeknél mérténél (**25./c**). A spermintartalom alakulásában ugyanazt a tendenciát figyelhetjük meg mindhárom vizsgálatba vont vonal esetében, a legalacsonyabb értékek a kontroll FvSPDS növényeknél voltak mérhetőek. Putrescin hozzáadása átlagosan 12,5%-kal, míg spermidin hozzáadása 42,7%-kal növelte a mérhető spermintartalmat.

Az összpoliamin-tartalom a három főbb poliaminforma, a putrescin, spermidin és spermin mennyiségének összessége, mely külön mutatóként is jellemzi a vizsgált vonalak állapotát, a **26. ábrán** látható.



**26. ábra:** A vad típusú (a), FvADC (b) és FvSPDS (c) *Nicotiana tabacum* növények összpoliamin-tartalma (nmol/g) friss tömegre megadva kontroll körülmények között, valamint 150 mg/l arginin, 10 mg/l putrescin, és 10 mg/l spermidin hatására (SD±, n=3).

A **26./a ábra** a vad típusú *Nicotiana tabacum* növények friss tömegre vonatkozó összpoliamin-tartalmát mutatja be (nmol/g). A vad típusú növények kezeletlen kontroll értéke 945,12 nmol/g volt. Az arginin kezelés hatására az összpoliamin-tartalom 19,8%-os (757,7 nmol/g), putrescin hatására 3,5%-os (912,2 nmol/g), míg spermidin hozzáadására 28,8%-os (672,7 nmol/g) csökkenést mutatott, vagyis az összpoliamin-tartalmat mindhárom táptalaj-kiegészítő negatívan befolyásolta.

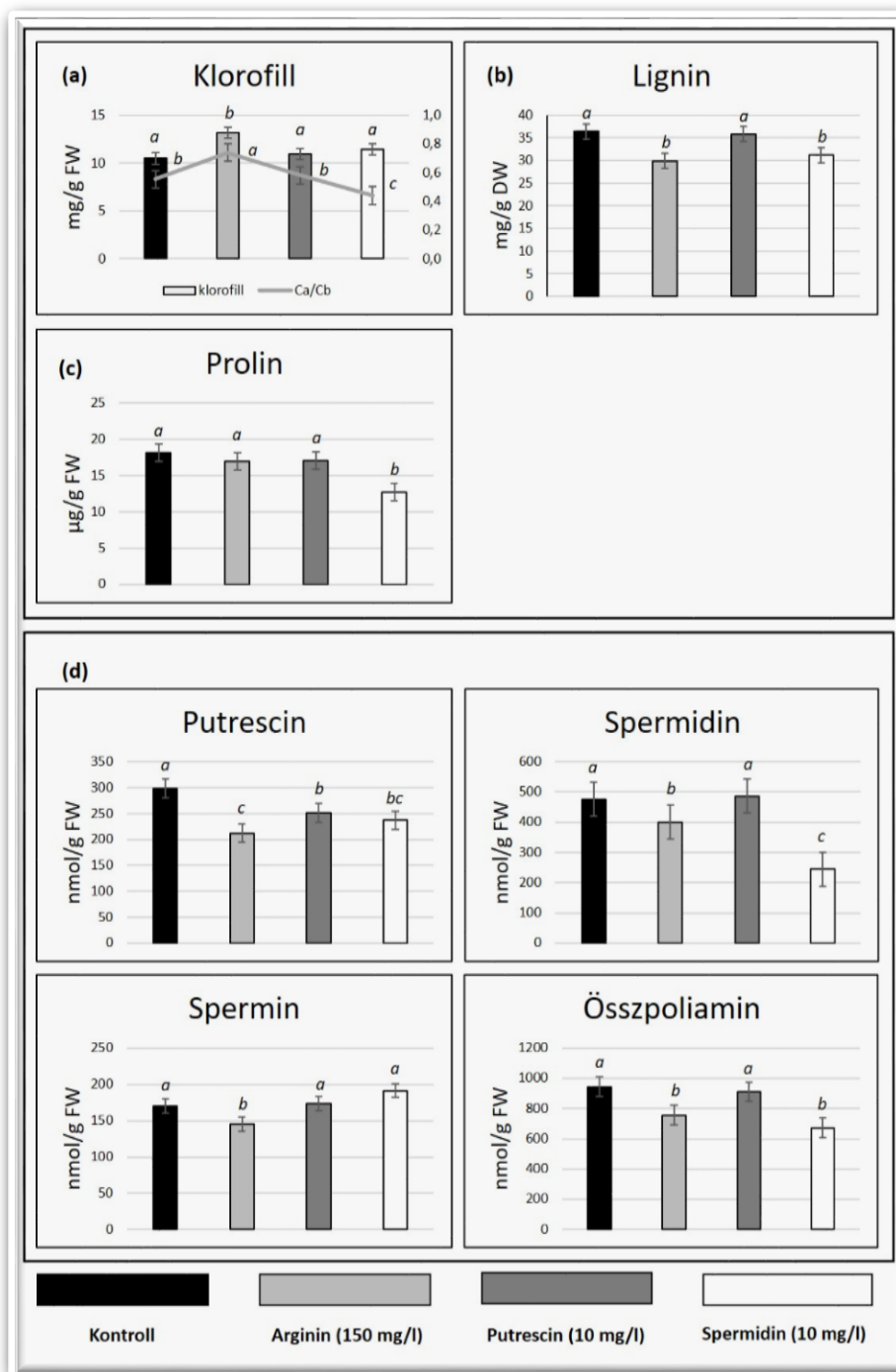
A három FvADC *Nicotiana tabacum* vonal kontroll növényeinek átlaga friss tömegre vetítve 878,9 nmol/g volt, ami 7,0%-kal magasabb a kezeletlen vad típusú növényeknél mértnél (**26./b ábra**). Az összpoliamin-tartalom alakulásánál mindhárom vonal esetében ugyanazt a tendenciát láthatjuk, a legkisebb mennyiséget a kezeletlen kontrollnál, a legnagyobbat a putrescinnel kezelésnél mértük. Az arginin hozzáadása átlagosan 7,9%-kal, a putrescin hozzáadása 19,6%-kal növelte a szabad összpoliamin-tartalmat.

A kontroll FvSPDS növényeinek átlaga 730,0 nmol/g volt a friss tömeg arányában, ez 11,2%-kal alacsonyabb a kezeletlen vad típusú növényeknél mértnél. A spermintartalom alakulásában ugyanazt a tendenciát figyelhetjük meg mindhárom vizsgálatba vont vonal esetében, a legalacsonyabb értékek a kontroll FvSPDS növényeknél voltak mérhetőek (**26./c ábra**). Putrescin hozzáadása átlagosan 49,1%-kal, míg spermidin hozzáadása 23,4%-kal növelte a mérhető spermintartalmat.

## **5.5. A kezelések hatásának értékelése FvADC-t, FvSPDS-t túltermelő és a vad típusú *Nicotiana tabacum* növények esetében**

### **5.5.1. A vizsgált paraméterek értékelése a kezelések tükrében**

A vizsgált paraméterek (klorofil, lignin, prolin, putrescin, spermidin, spermin, és összpoliamin tartalmak) értékeit a 49-51. ábrában foglaltuk össze. A Vt növények esetében a már ismertetett kilenc vonal átlagát reprezentáló adatokat jelenítettük meg, míg a FvADC és FvSPDS növények esetében a három-három egymástól független transzformáns vonal három biológiai ismétlésének átlagai szerepelnek az összesítésben. Az oszlopok tetején az SD értékek szerepelnek, felettük a dőlt betűk a szignifikánsan eltérő csoportokba tartozó értékeket jelölik. A *post hoc* tesztet Tukey's Honest Significant Difference teszttel végeztük, ahol a feltételek megengedték (a FvADC prolintartalmát, valamint a FvSPDS lignin, prolin, és spermidin tartalmát Games-Howell teszttel értékeltük).

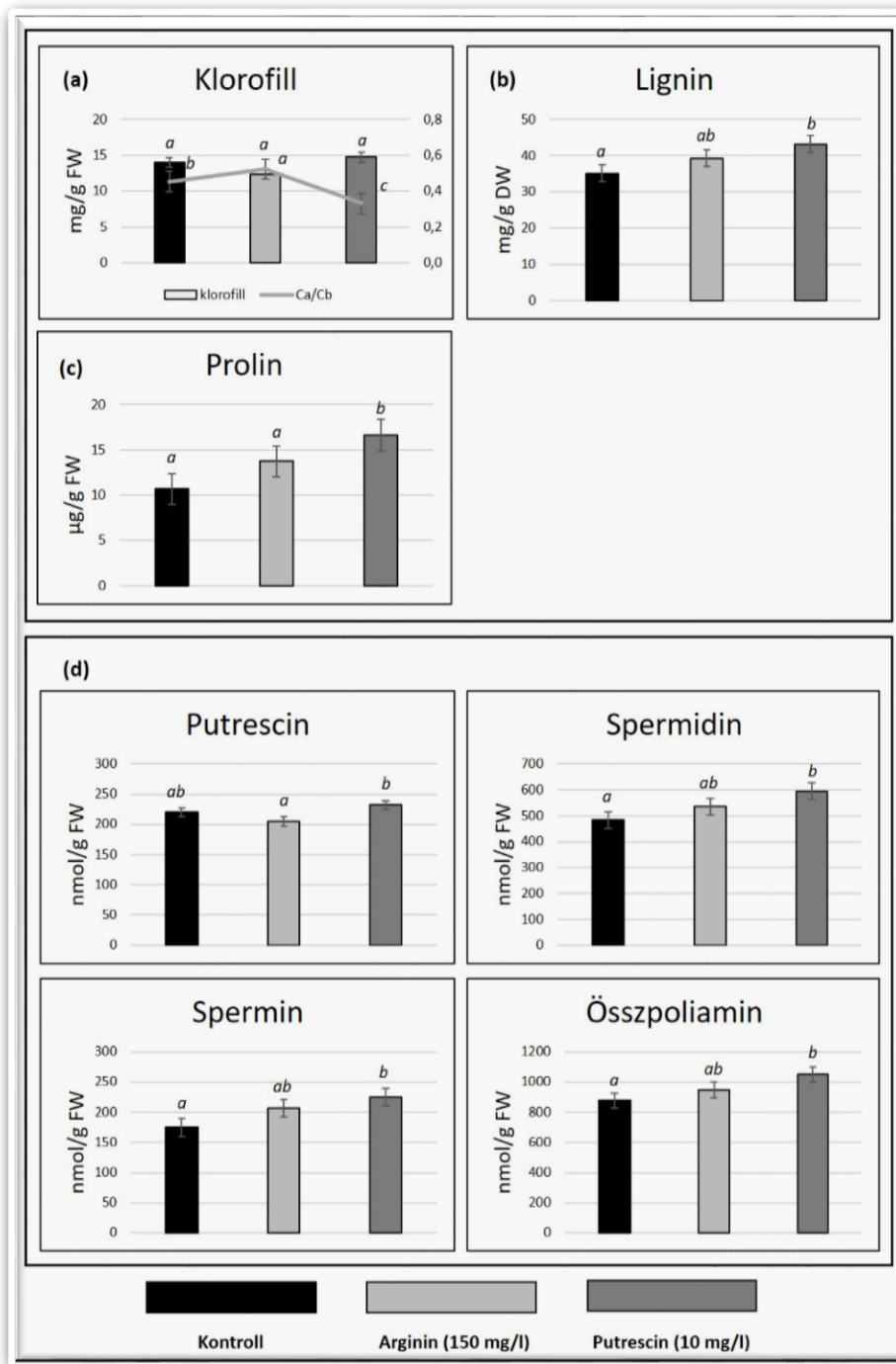


**27. ábra:** A vad típusú (Vt) *Nicotiana tabacum* növények klorofilltartalmának, Ca/Cb arányának (a), lignintartalmának (b), prolintartalmának (c), valamint poliamintartalmának (d) meghatározása, SD±, n=9, valamint a szignifikánsan azonos csoportok jelölése (dőlt betű) (P<0,05).

A vad típusú, FvADC és FvSPDS dohánynövények eredményeinek értékelésével a három, poliamin bioszintézisben is résztvevő nitrogéntartalmú vegyület hosszútávú hatását mutathatjuk ki. A klorofill esetében csak az arginin kezelés eredményezett szignifikánsan magasabb értéket a vad típusúaknál (**27. ábra**), valamint a putrescin hozzáadása okozott szignifikáns csökkenést a

FvSPDS növényeknél (**29. ábra**). A többi esetben nem tudtunk kimutatni változást. Az exogén poliaminok alkalmazása növeli az antioxidáns enzimek aktivitását, stabilizálja a kloroplasztisz külső membránját, és növeli a fotoszintetikus apparátus fotokémiai hatékonyságát (Shu *et al.*, 2012; Shu *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2018). A külsőleg alkalmazott putrescin hatása nemcsak az antioxidáns enzimek megemelkedett aktivitásában, és az érintett gének transzkripciójában érhető tetten, hanem a megnövekedett klorofilltartalomban is. A különböző eredetű klorofilltartalom csökkenés is megakadályozható külsőleg alkalmazott poliaminokkal (Cai, 2009; Duan, 2000; Wang *et al.*, 2003). A putrescin mellett az arginin is csökkenti a membránok károsodását, így óvja a kloroplasztiszok épségét (Sun *et al.*, 2018). Méréseink alapján a *Ca/Cb* arány szintén csak az arginin kezelésnél emelkedett meg a vad típusnál és a FvADC-nél (**28. ábra**). Putrescin hatására mindkét transzformáns csoportnál, míg a spermidin hatására a vad típusnál és a Fv SPDS-nél csökkent ez az érték. A klorofill *b* önmagában csak a fotonok energiájának begyűjtéséért felelős, az így előállított energiát egy klorofill *a* molekulának adja át. A klorofill *b* mennyisége tehát összességében javítja a fotoszintetikus rendszer kihasználtságát. Kísérletekben kimutatták, hogy a stresszelt növényeik klorofilltartalma (klorofill *a* és klorofill *b* is) putrescin kezelés hatására emelkedett, de azok aránya érdemben (*Ca/Cb*) nem változott (Islam *et al.*, 2022).

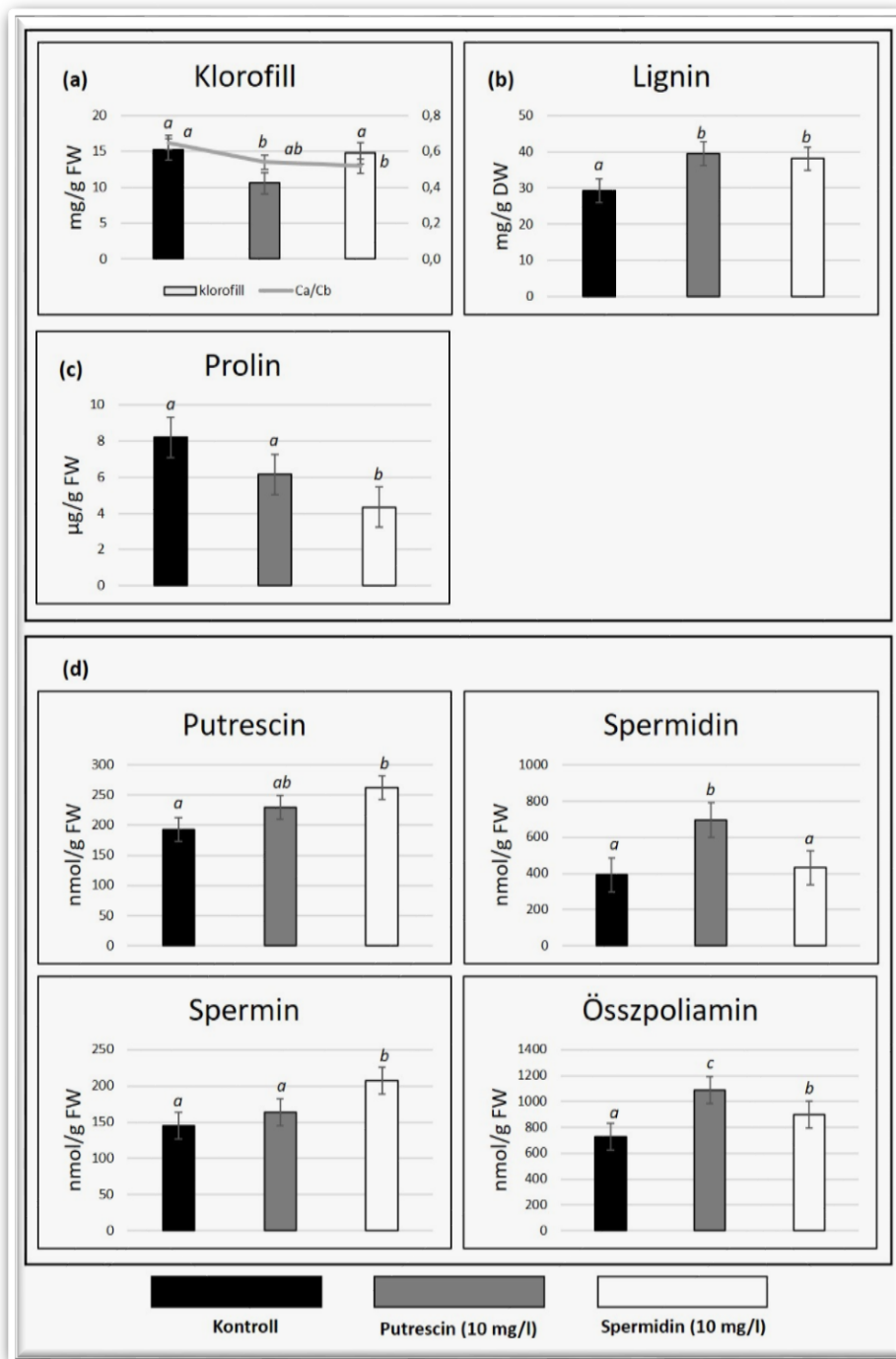
Kísérletünkben a putrescin hozzáadása nem befolyásolta, az arginin és a spermidin csökkentette a mérhető lignintartalmat a Vt növényeknél. A FvADC és FvSPDS vonalaknál az arginin, a putrescin és a spermidin hatására is növekedett a lignintartalom. Korábbi tanulmányokban fokozott SAM aktivitást, és ezzel összefüggésben emelkedett lignifikációt figyeltek meg a vízhiányos cirok, valamint sóstresszelt kukorica, szója és paradicsom növényekben. A lignin metabolizmusa használja fel a legnagyobb mennyiségben a SAM-ot, ami aminopropil csoportot szolgáltat a spermidin és spermin bioszintéziséhez is. (Azaizeh and Steudle, 1991; Cruz *et al.*, 1992; Neves *et al.*, 2010; Sánchez-Aguayo *et al.*, 2004;). Korábbi vizsgálataink során kimutattuk, hogy a FvSAMS-t és FvSAMDC-t túltermelő *N. benthamiana* D. növények szignifikánsan magasabb lignintartalommal rendelkeztek, mint a vad típusúak (Kovács *et al.*, 2020). A táptalajhoz adagolt arginin csökkenti a lignin mennyiségét, míg a spermidin növeli a lignifikációt *in vitro* nevelt *Arabidopsis* növények esetében (Xu *et al.*, 2014).



**28. ábra:** A FvADC *Nicotiana tabacum* növények klorofilltartalmának, Ca/Cb arányának (a), lignintartalmának (b), prolintartalmának (c), valamint poliamintartalmának (d) meghatározása, SD±, n=9, valamint a szignifikánsan azonos csoportok jelölése (dőlt betű) (P<0,05).

Méréseink alapján a spermidinnel kezelt vad típusú és a FvSPDS növényeknél tudtunk kimutatni szignifikáns prolintartalom csökkenést, de a FvADC vonalak prolintartalma nőtt putrescin kezelés hatására. A többi kezelésnek nem volt mérhető hatása. Számos növényfajban figyeltek meg abiotikus stressz hatására megnövekedő prolin koncentrációt (Szabados és Saviouré, 2010), ezért állapotot jelző aminosavként tekintenek a prolinra. Vad típusú *Nicotiana tabacum*

növények vizsgálatánál megfigyelték, hogy a kisebb hőstressz nagyobb mértékben a prolintartalmat növelte, míg nagyobb hőstressz inkább a poliaminok mennyiségét emelte. A két érték mindig együtt mozgott, ám ellentétes irányban (Cvikrová *et al.*, 2012). Az abszcizinsav-függő prolinfelhalmozódást nem befolyásolja a nitrogénoxid mennyisége, stressz hatására az antioxidáns rendszertől függetlenül nő az aminosav koncentrációja (Planchet *et al.*, 2014). A növényi sejtekben az arginin az urea cikluson keresztül közvetlenül tudja növelni a prolin mennyiségét (Del Duca *et al.*, 2014), ami beindítja a putrescin termelődését (Mohapatra *et al.*, 2009b). Islam kísérleteiben poliamin kezelés hatására megnövekedett a prolintartalom stresszelt növények esetében (Islam *et al.*, 2022). Putrescinnel történő permetezés több esetben is növelte a prolin mennyiségét (Mohammadi *et al.*, 2018; Sánchezrodríguez *et al.*, 2016; Zeid *et al.*, 2007), de a spermidin és spermin is pozitív hatással volt rá (Chen *et al.*, 2019). A putrescin mellett az arginin is növeli a prolin koncentrációt az antioxidáns enzimaktivitás növelésén keresztül (Peynevandi *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2018). Ugyanúgy, mint a prolin, az arginin dekarboxiláz útvonalon keresztül a putrescin (és ezáltal a többi poliaminforma) bioszintézise is verseng a glutamátért, mégsem lehet egyértelmű antagonisztikus összefüggést találni a két útvonal között. A prolinszintézis független poszttranszlációs szabályozás alatt áll (Majumdar *et al.*, 2016).



**29. ábra:** A FvSPDS *Nicotiana tabacum* növények klorofilltartalmának, Ca/Cb arányának (a), lignintartalmának (b), prolintartalmának (c), valamint poliamintartalmának (d) meghatározása, SD±, n=9, valamint a szignifikánsan azonos csoportok jelölése (dőlt betű) (P<0,05).

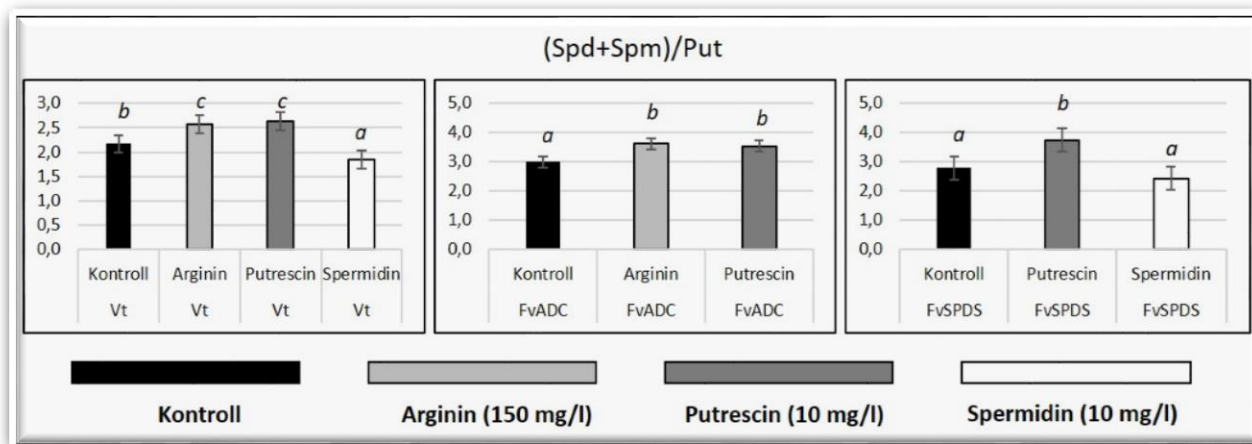
Méréseinkből kitűnik, hogy az arginin, putrescin és spermidin táptalajhoz történő adagolása hatással volt a különböző poliaminformák koncentrációjára. A kontrollként használt vad típusú növények putrescin szintjét mindhárom kezelés csökkentette. A két transzformált vonal egyedénél a putrescin és (az FvADC esetében) a spermidin hozzáadása is növelte a mérhető putrescin mennyiséget. A Vt növények endogén spermidin mennyiségét az arginin és a spermidin



kezelés is csökkentette, a putrescin hatástalan volt. A FvADC vonalak spermidin koncentrációja mindkét kezelés hatására nőtt, a FvSPDS növényeké csak a putrescin kezelésre reagált pozitívan. A spermin mennyiségét a vad típusban az arginin kismértékben csökkentette. A FvADC vonalak spermin mennyisége szintén mindkét kezelés hatására emelkedett, a FvSPDS növényekére viszont csak a spermidin volt hatással. Az összpoliamin-tartalom teljes mértékben leképezi a spermidin tartalmat mindhárom vizsgált növényvonal esetében. A három fő poliaminforma (putrescin, spermidin és spermin) a növény minden sejtjében megtalálható, és számos élettani folyamatban részt vesznek, mint a növekedés, a szenescencia, stresszválasz reakciók (Bouchereau *et al.*, 1999; Galston *et al.*, 1997; Mariani *et al.*, 1989; Nambeesan *et al.*, 2008; Walden *et al.*, 1997). A spermidin és spermin mennyiségét nagymértékben növelte a külsőleg alkalmazott putrescin kezelés mind a kezeletlen, mind az ozmotikus stressznek kitett lucerna növényekben (Zeid *et al.*, 2007), míg a putrescintartalom kismértékben nőtt (Pál *et al.*, 2018). ADC enzimet túltermelő *Arabidopsis* növényeknél emelkedett putrescin szintet mértek a spermidin- és sperminszintek emelkedése nélkül (Alcázar *et al.*, 2010b). Ez azt bizonyítja, hogy az ADC enzimaktivitás hiába magas, az arginin dekarboxiláz enzim (és az azt kódoló ADC gén transzkripció aktivitása) nem limitálja a poliamin bioszintézist. Kasukabe *et al.* (2004) kísérletében SPDS enzimet túltermelő *Arabidopsis* növények fokozott arginindekarboxilációt és emelkedett spermidin szintet mutattak stressz hatására. Az SPDS gén túltermeltetése dohánynövényekben emelkedett SPDS és SAMDC aktivitást okozott, míg az ADC enzimaktivitás nem változott (Franceschetti *et al.*, 2004).

Méréseink alapján a Vt növények élettani paramétereit nemhogy javultak volna, de romlottak több esetben is a különböző táptalaj-kiegészítők hatására. A FvADC növények értékei putrescin hatására nagyobb mértékben nőttek, mint arginin hatására. A FvSPDS dohányvonalak esetében csak a poliamin szintek tükrözik a putrescin, valamint a spermidin intenzívebb feldolgozását.

Látható, hogy a putrescin hatása a növényekre teljesen eltérő a spermidinétől és a sperminétől. Kutatások szerint a poliaminok összes mennyiségén túl a különböző poliaminformák egymáshoz viszonyított arányának is fontos szerepe van azok élettani folyamatokban betöltött szerepében. Rézionok okozta lipidperoxidáció vizsgálatánál kimutatták az exogén spermidin és spermin pozitív hatását, ami szoros összefüggésben volt a spermidin és spermin putrescinhez viszonyított arányával (Handa és Mattoo, 2010; Wang *et al.*, 2007).



**30. ábra:** A vad típusú , FvADC és FvSPDS *Nicotiana tabacum* növények poliaminformáinak arányai, SD±, n=9, valamint a szignifikánsan azonos csoportok jelölése (dőlt betű) (P<0,05).

A **30. ábrán** a méréseinkből számított (Spd+Spm)/Put arányokat tüntettük fel. A vad típusú növények esetében kimutatható, hogy az arginin és a putrescinin táptalajhoz történő adagolása szignifikánsan növelte a spermidin és a spermin arányát a putrescinhez viszonyítva. Az exogén putrescintöbbletet az SPDS enzim spermidinné alakítja, így igazolja a méréseinket. Az arginin hozzáadásától viszont azt várnánk, hogy emelkedjen a putrescin tartalom (az ADC útvonalon keresztül), ám ennek ellentétét figyeltük meg. A spermidin hozzáadása csökkentette a komplexebb poliaminok arányát a putrescin javára, ez sincs teljesen összhangban a várható hatással. Az Fv ADC és FvSPDS vonalak ugyanúgy reagáltak a kezelésekre, mint a Vt növények. Kimutatták, hogy (Sper+Spm)/Put arány szoros összefüggésben van a különböző stressztolerancia mértékével. A magasabb arány nagyobb fokú ellenállást biztosít (Wang *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2008). A kezeletlen kontrollhoz viszonyított magasabb (Sper+Spm)/Put arányt figyeltek meg sóstresszelt növények esetében. Spermidin hatására ez az érték, és ezzel összefüggésben a sótolerancia mértéke még jobban emelkedett, ami azt jelenti, hogy a spermidin és spermin együttes mennyisége döntő fontosságú a tolerancia kialakításában (Li *et al.*, 2016; Zapata *et al.*, 2004). Putrescin többletet termelő *Arabidopsis* és *Populus* növények esetében nem mérhető jelentős változás a spermidin és a spermin koncentrációjában (Shao *et al.*, 2014). A putrescin csak kismértékben tudja növelni a spermidin és a spermin mennyiségét, nincs szoros összefüggés a kettő között. Ezzel szemben a spermidin és a spermin mennyisége szoros regressziót mutat, amiből arra következtethetünk, hogy kölcsönösen pozitív hatással vannak egymásra a SPDS és SPMS enzimek (és az azokat kódoló gének) (Mattoo *et al.*, 2010).

### 5.5.2. A vizsgált paraméterek közti összefüggések

A három vonal kezeléseinek paraméterei alapján korrelációanalízist végeztünk, így ki tudjuk mutatni, hogy az egyes tulajdonságok értékeit mely másik tulajdonságok értékei magyarázzák (**3. táblázat**).

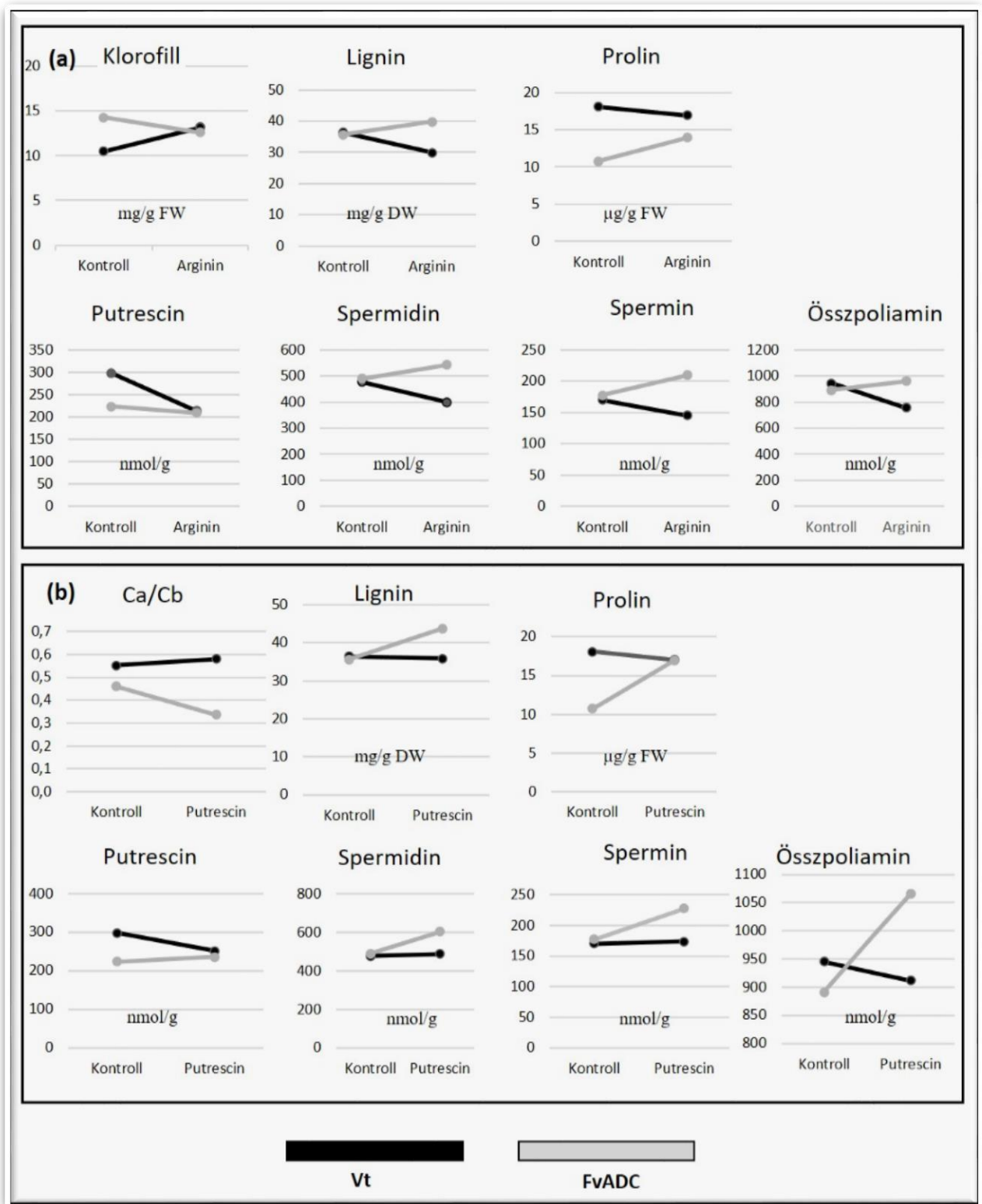
**3. táblázat:** A vizsgált paraméterek közötti korreláció (n=66, p<0.01).

	<i>Ca/Cb</i>	Lignin	Putrescin	Spermidin	Spermin	Összpoliamin
Lignin	-0,395					
Putrescin		0,492				
Spermidin	-0,343	0,712				
Spermin	-0,344	0,847	0,524	0,247		
Összpoliamin	-0,357	0,920	0,373	0,917	0,569	
(Spd+Spm)/Put	-0,410	0,491	-0,413	0,874		0,679

A klorofill és prolin tartalom, valamint a *Ca/Cb* arány esetében nem tudunk szignifikáns korrelációt kimutatni. Ezek az értékek nem mutatnak összefüggést egyik mért paraméter értékeivel sem. A lignin tartalom közepes, negatív összefüggést (-0,395, és -0,386) mutat a *Ca/Cb* aránnyal, tehát magasabb lignin tartalmat alacsonyabb *Ca/Cb* arány esetében mérhetünk. A putrescin közepes pozitív összefüggésben áll a lignintartalommal (0,492). A spermidin, spermin, összpoliamin, és (Spd+Spm)/Put arány negatív közepes erősségű összefüggésben áll a *Ca/Cb* aránnyal. Az összes kezelés és vonal átlagában a magasabb poliamin tartalmak és arányok növelték a *Cb* arányát a *Ca*-val szemben, ami fokozott fotoszintetikus hatékonyságot jelent. A spermidin szint közepes, pozitív korrelációt mutat a lignin mennyiségével. A spermin erős összefüggésben van a lignin tartalommal (0,847), közepesen erősen korrelál a putrescinnel, és gyengén a spermidinnel. Az összpoliamin tartalom nagyon erős összefüggésben áll a lignintartalommal (0,920) és a spermidin tartalommal (0,917), és közepesen erős korrelációban áll a putrescin, valamint a spermin tartalommal. Az összpoliamin tartalom legnagyobb mértékben a spermidin tartalomtól függ, legkevésbé a putrescin mennyiségétől. (Spd+Spm)/Put arány erős pozitív összefüggést mutat a spermidin tartalommal (0,874), közepesen erőset a lignin és az összpoliamin tartalommal. Negatív közepesen erős korreláció áll fenn a (Spd+Spm)/Put arány és a putrescin mennyisége között, viszont a spermin mennyisége nem magyarázza ezt az értéket. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy az összpoliamin mennyiséget és a (Spd+Spm)/Put arányt legnagyobb mértékben a spermidin mennyisége befolyásolja. A klorofill és prolin tartalom függetlensége a többi paramétertől azt bizonyítja, hogy a mért eltérések nem a poliamin metabolizmus változásaiból származnak.

### **5.5.3. A kezelésekre adott reakciók összehasonlítása a FvADC és FvSPDS enzimet túltermelő, valamint a vad típusú növények vonatkozásában**

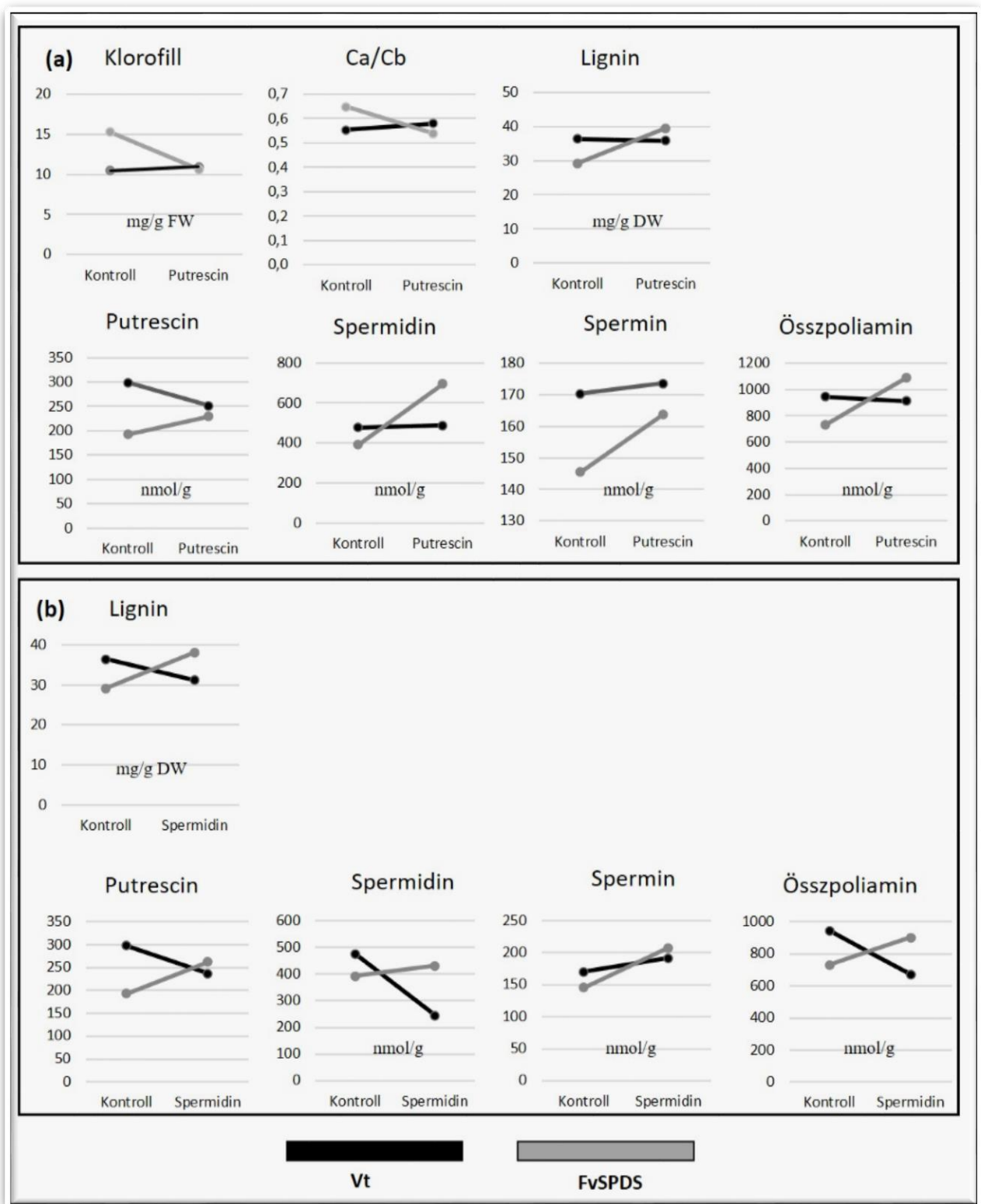
A vizsgált paraméterek kezelésekre történő változásai jól nyomon követhetők a **20-30. ábrákon**. Ki tudtuk mutatni, hogy az arginin, a putrescin és a spermidin kezelés is szignifikáns változást okozott az értékelt tulajdonságokban. A kapott értékek kezeléseket és vonalak szerinti elemzésével számos esetben szignifikáns interakció figyelhető meg. Ezzel a vizsgálati módszerrel kimutatható, hogy az adott kezelésre mennyire eltérően reagáltak a különböző növényvonalaink. Az **31. ábra** összesíti azokat a vizsgált paraméterekben végbement változásokat, melyekért a *FvADC* gén okozta fokozott ADC aktivitás felelős.



**31. ábra:** A vad típusú (Vt) és a FvADC *Nicotiana tabacum* növények paramétereinek változásainak összehasonlítása, 150 mg/l arginin (a) és 10 mg/l putrescín (b) kezelés hatására n=9.

Az arginin dekarboxiláz enzimet túltermelő dohánynövények klorofilltartalma arginin hozzáadására csökkent, miközben a vad típusúé nőtt. Az arginin többlet dekarboxilálódott a fokozott ADC aktivitás hatására és csökkentette klorofilltartalmát. Ezzel ellentétben a vad típusúhoz

képezt nőtt a lignin és a prolintartalom. A növény egészségi és stresszeltségi állapotát jelző paraméterek (a klorofill mennyiségén kívül) javultak. A FvADC növények putrescin, spermidin és spermin mennyisége az elvárásoknak megfelelő emelkedő tendenciát mutat arginin kezelés hatására, így azok összessége is nőtt. Az arginin dekarboxiláz enzimet túltermelő növények teljes mértékben azonosan reagáltak a putrescin kezelésre, mint az argininra. A poliaminok mennyiségének emelkedése ebben az esetben fokozottabb volt, nagyobb mértékben nőtt, mint az előző kezelésnél. A fokozott poliamin tartalom fokozott stressztűrést eredményez. A putrescin hozzáadása nem csökkentette az endogén putrescin mennyiséget a transzformáns növények esetében. Burtin és Michael (1997) kísérleteiben ADC enzimet túltermelő dohánynövényeknél nem tudtak kimutatni fokozott poliamin mennyiséget annak ellenére, hogy a putrescin közvetlen prekursorának, az agmatinnak több, mint tízszeresére nőtt a koncentrációja. A SAM-dekarboxiláz, diamin oxidáz és poliamin oxidáz enzimek aktivitása változatlan maradt, tehát az arginin dekarboxiláz enzim fokozott termelésének hatása nem jelent meg a poliaminok szintjén.



**32. ábra:** A vad típusú (Vt) és a FvSPDS *Nicotiana tabacum* növények paraméterei változásainak összehasonlítása, 10 mg/l putrescine (a) és 10 mg/l spermidine kezelés hatására n=9.

Az **32. ábra** összesíti azokat a vizsgált paraméterekben végbement változásokat, melyekért a FvSPDS gén okozta fokozott SPDS aktivitás felelős. A szamóca spermidine szintáz enzimét

túltermelő dohánynövények klorofill tartalma és a klorofillformák aránya is nagyobb mértékben csökkent putrescin kezelés hatására, mint a vad típusú növényeké. Az intenzívebb poliamintermelés nem járult hozzá a fotoszintetikus határfok javításához. A putrescin a SPDS enzim szubsztrátjaként a poliaminfomák mennyiségével párhuzamosan a lignin tartalmat is növelte. Az várt spermidin és spermin szintézis emelkedése mellett a putrescin mennyisége is nőtt. Spermidin kezelés hatására a FvSPDS növények lignin és poliamintartalma a vad típusú növények azonos paramétereikhez képest nagyobb mértékben emelkedett. Ez azt jelenti, hogy a spermidin szintáz enzim fokozott termelése pozitívhatással van a növény egészségi állapotára, stressztűrésére. A spermidin hozzáadása nem csökkentette az endogén spermidin mennyiséget a transzformáns növények esetében. A FvSPDS növények stresszeltségi állapotot jelző prolin tartalma nem tér el a vad típusúakétól.

A **31-32. ábrából** az is kiderül, hogy a Vt dohánynövények miként reagálnak az egyes kezelésekre. Az arginin határozottan növeli a klorofill tartalmat, a putrescin és spermidin a spermin tartalmat. A három kezelés (arginin, putrescin, spermidin) csökkenteti az összes többi vizsgált paraméter értékeit. Vizsgálataink során a (Spd+Spm)/Put arány egyik esetben sem mutatott szignifikáns interakciót a vonalak tekintetében. Ennek az értéknek az alakulása teljes mértékben független az erősebb *ADC* vagy *SPDS* gén transzkripció aktivitásától.



## 5.6. Új tudományos eredmények

1. Bizonyítottuk, hogy a *FaADC* és a *FaSPDS* változó expressziót mutat a *Fragaria x annanassa* Duch. cv. 'Asia' szamóca gyümölcs érése során.
2. Bizonyítottuk, hogy a *FvADC* és a *FvSPDS* gének expressziósan aktívak a transzgénikus *Nicotiana tabacum* növényekben.
3. GFP fúziós fehérjék segítségével megállapítottuk a FvADC intracelluláris lokalizációját.
4. Kimutattuk, hogy a FvADC enzimet túltermelő *N. tabacum* növények több vizsgált élettani paraméterét módosította a putrescin, mint az arginin táptalajhoz történő adagolása.
5. A Vt, FvADC és FvSPDS vonalakban mért adatok alapján megállapítottuk, hogy a klorofill mennyisége minden vizsgált paramétertől független, a lignin, spermidin, spermin, összpoliamin, és (Spd+Spm)/Put arány negatív összefüggést mutat a *Ca/Cb* aránnyal. A poliaminok mennyisége, valamint a (Spd+Spm)/Put arány pozitív összefüggésben áll a lignintartalommal.
6. Bizonyítottuk, hogy a poliaminok egymáshoz viszonyított arányára nincs hatással a FvADC vagy FvSPDS enzimek túltermelése, viszont az arginin vagy putrescin táptalajhoz történő adagolása növeli ezt az értéket.



## 6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Bizonyítottuk, hogy a *FaADC* és a *FaSPDS* változó expressziót mutatott a szamóca gyümölcsének korai érése során, ami a gyümölcsök kialakulásakor a sejtsztódásban és sejt differenciálódásban betöltött szerepüket támasztja alá. Korábbi kísérleteink alapján már leírtuk, hogy a poliamin bioszintézisért felelős számos gén részt vesz a gyümölcserésben is, tehát a poliaminok fontos szerepet töltenek be a minőségi változások során. Szakirodalmi és saját adatok alapján a poliaminok fokozzák az antioxidáns rendszer enzimeinek aktivitását, csökkentik a  $\text{Na}^+$  toxicitását a  $\text{H}_2\text{O}_2$  és  $\text{O}_2^-$  mennyiségét, valamint fokozzák a membránok stabilitását, így segíthetnek a gyümölcsök kialakulásakor és érésakor fellépő sejt szintű belső stressz hatásait csökkenteni, ellensúlyozni.

A *Fragaria vesca* L. cv. 'Rügen' *FvADC* és *FvSPDS* génjeit sikeresen transzformáltuk *Nicotiana tabacum* L. növények szöveteibe, melyek utódaiban a vizsgált gének transzkripció aktivitása is bizonyítható volt. Az így kapott növényvonalakat vetettük alá további vizsgálatoknak. Stabil transzformánsok epidermális sejtjeiben a *FvADC::sGFP* fúziós fehérjék esetében kloroplasztisz lokalizációt, a *FvSPDS::sGFP* fúziós fehérjék esetében kloroplasztisz és citoplazmás lokalizációt állapítottunk meg. A *N. tabacum* endogén poliamin bioszintézisben részt vevő arginin dekarboxiláz és spermidin szintáz enzime minden növényi szervben mutat aktivitást, ám az aktivitás helye a szövet funkciójától függ. A fotoszintetikusan aktív szövetekben a kloroplasztiszi jelenlét, a nem aktívokban a sejtmagi és citoplazmás jelenlét a domináns. A poliaminok a klorofill fehérjekomplexek antennafehérjéihez kapcsolódva módosítják a fotoszintetikus apparátus határfokát, és fokozzák az ellenállást az oxidatív stresszek ellen. A poliaminok folyamatos jelenlétéhez legnagyobb mértékben a sejtmagban és a kloroplasztiszban van szükség, valamint a veszélyeknek leginkább kitett helyeken. Korábbi kutatások is felhívták a figyelmet arra, hogy a poliamin bioszintézis enzime a citoplazmában a legaktívabbak, majd onnan szállítódnak a további felhasználás helyére. Oszlopos parenchima sejtek esetében a sejtközi térben detektálható volt a *FvADC::sGFP* konstrukció aktivitása. Dohány növények intercelluláris terében a poliamin tartalom jelentős megemelkedését tapasztalták biotikus stresszek (*Botrytis cinerea*, dohány mozaik vírus, Uborka dohány mozaik vírus, *Pseudomonas syringae*, etc.) hatására. Kimutatták, hogy a poliaminok növelik számos a védekezésben résztvevő gén transzkripció aktivitását, főleg a szerzett szisztémikus rezisztenciáért felelős génekét. Az intercelluláris térben aktív ADC enzim a védekezésre történő felkészülésre utalhat.

A lignin tartalom növekedése, valamint az emelkedett poliamin szintek alapján elmondható, hogy az arginin dekarboxiláz enzimet túltermelő dohánynövények fitnessét leíró paraméterek javultak mind az arginin, mind a putrescin kezelés hatására. Ez a javulás putrescin hozzáadásakor nagyobb mértékű volt. A lignin tartalom növekedése, valamint az emelkedett poliamin szintek jól mutatják a putrescin és a spermidin exogén alkalmazásának pozitív hatását a spermidin szintáz enzimet túltermelő dohánynövények egészségi állapotára. A vizsgálatokból úgy tűnik, hogy mindegyik alkalmazott táptalajkiegészítő pozitívan hatott mind a vad típusú, mind a FvADC és FvSPDS növények élettani paramétereire, vitalitására. Annak ellenére, hogy a klorofill mennyisége minden vizsgált paramétertől függetlenül alakult a vad típusú, FvADC és FvSPDS vonalakban is, a klorofillformák arányában tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni. Vizsgálatainkban a lignin, spermidin, spermin, összpoliamin tartalom és (Spd+Spm)/Put arány is negatív korrelációban áll a *Ca/Cb* aránnyal. A magasabb értékek ebben az esetben alacsonyabb *Ca/Cb* arányt eredményeznek, ami a fotoszintetikus apparátus magasabb hatásfokáról tanúskodik. A lignintartalom összefüggését a poliaminokéval szintén ki tudtuk mutatni. Az összefüggés erősségének sorrendjében a (Spd+Spm)/Put arány, a putrescin, a spermidin, spermin és összpoliamin tartalom pozitív korrelációt mutat a lignin tartalommal. Ez egyirányú összefüggés, tehát a lignintartalom nincs hatással a poliaminokra, csak fordítva. A poliaminokról korábbi kutatásainkban már megállapítottuk, hogy csökkentik a reaktív oxigéngyökök és a hidrogénperoxid mennyiségét, a sérült szövetek ionvesztését, fokozzák a sótoleranciát, de most a sejtfal szilárdságának növekedése is bizonyítottnak látszik.

Minden vizsgálatot, minden mérést elvégeztünk vad típusú *N. tabacum* növényeken, valamint FvADC és FvSPDS entimeket túltermelő transzformáns vonalak mintáin is. Az élettani paraméterek és poliamin szintek alapján megállapítható, hogy a Vt növényekhez képest a FvADC gén konstitutív túltermeltetése nagyobb mértékben van hatással a vitalításra, mint a FvSPDS gén overexpressziója. Ezzel ellentétben az arginin táptalajhoz történő adagolása kisebb mértékű hatást indukált, mint a putrescin és spermidin kezelés. A poliaminformák közvetlen hozzáadásának nagymértékű jótékony hatása az szakirodalom alapján várható volt, az arginin közvetlen hatása azonban kevésbé ismert. Úgy tűnik, az arginin egyéb bioszintetikus útvonalakban betöltött szerepe miatt (aminosav-, prolin-, GABA bioszintézis, citrát kör, urea ciklus, etc.) nem tud akkor hatást kifejteni a vizsgált paraméterekre, mint a poliaminok. Az arginint más is fogyasztja, ezért kisebb mértékben erősíti a poliamin bioszintézist. Abban az esetben, amikor a poliaminok előállítására tereltük az arginint (ADC gén overexpressziója által), annak hatása jobban megjelent a vizsgált paraméterekben észlelt változásokban. A FvADC gén konstitutív túltermeltetése nemcsak a

poliaminok jótékony hatásán keresztül fejt ki hatását, hanem az urea cikluson keresztül a klorofilltartalmat is megnöveli a sejtekben. Így a megemelkedett klorofill tartalom a jobb fotoszintetikus hatékonysággal kiegészülve segít jobban hasznosítani a beérkező sugárzást. A *FvSPDS* gén hatása inkább a poliaminformák konverziójában jelenik meg. A hozzáadott putrescint és spermidint segít közvetlenül tovább alakítani, de a putrescin szintre is jótékony hatással bír. Úgy tűnik, a különböző poliaminformák mennyisége önmagában nem jelent jobb fiziológiai állapotot, inkább a diamin putrescin és a hosszabb láncú spermidin és spermin egymáshoz viszonyított aránya döntő. Vizsgálataink során a (Spd+Spm)/Put arány egyik esetben sem mutatott szignifikáns interakciót a vonalak tekintetében. Ennek az értéknek az alakulására nincs hatással a *FvADC* vagy *FvSPDS* gének túltermelése, viszont az arginin vagy putrescin táptalajhoz történő adagolása növeli ezt az értéket. Ez az arány szigorú szabályozás alatt áll, egyes szerzők szerint a szövet- és szerv differenciálódás irányításában is meghatározó szerepet tölt be.

Annak kimutatása, hogy mely egyéb bioszintetikus útvonalakban bekövetkezett változásokon keresztül érvényesülnek a *FvADC* és *FvSPDS* gének túltermelése okozta molekuláris változások, qPCR vizsgálatokkal a legcélszerűbb a vad típusú és transzformáns vonalak kezelt mintáiból izolált RNS minták reverz transzkripcióját követően. Az alkalmazott kutatás felé történő elmozdulás lenne az *in vivo* kísérleti rendszer adaptálása üvegházi és szabadföldi körülményekre egynyári, vagy akár évelő kertészeti kultúrák esetében. Már kereskedelmi forgalomban kaphatóak poliamintartalmú növénykondicionáló szerek. Ezek tápoldatozással, vagy permetezéssel történő kijuttatása fokozza a gyökér- és hajtásfejlődést, valamint a különböző stresszekkel (gyomirtószer, vízhiány, hideg, hősokk) szembeni ellenállóképességet, és lerövidíti a regenerálódás idejét, ezek alkalmazhatósága azonban kevésbé kutatott.



## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a *FaADC* és a *FaSPDS* változó expressziót mutatott a *Fragaria x ananassa* Duch. cv. 'Asia' gyümölcsének érése során, ami az érésben betöltött szerepüket támasztja alá. Szakirodalmi és saját adatok alapján a poliaminok segíthetnek a gyümölcsök kialakulásakor és érésekor fellépő sejtszintű belső stressz hatásait csökkenteni. A *Fragaria vesca* L. cv. 'Rügen' *FvADC* és *FvSPDS* génjeit sikeresen transzformáltuk *Nicotiana tabacum* L. növények szöveteibe, melyek utódaiban a vizsgált gének transzkripciós aktivitását is bizonyítottuk.

A stabil transzformánsok epidermális sejtjeiben *FvSPDS::sGFP* fúziós fehérjék esetében kloroplasztisz és citoplazmás lokalizációt állapítottunk meg. A poliamin bioszintézis enzimei a citoplazmában a legaktívabbak, majd onnan szállítódnak a további felhasználás helyére, folyamatos jelenlétükhöz legnagyobb mértékben a sejtmagban és a kloroplasztiszban van szükség. A *FvADC::sGFP* fúziós fehérjék esetében kloroplasztisz lokalizációt állapítottunk meg. Oszlopos parenchima sejtek esetében a sejtközötti térben is detektálható volt a *FvADC::sGFP* konstrukció aktivitása. Kimutatták, hogy a poliaminok növelik számos, a szerzett szisztémikus rezisztenciáért felelős gének transzkripciós aktivitását. Az intercelluláris térben aktív ADC enzim a védekezésre történő felkészülésre utalhat.

Mindegyik alkalmazott táptalajkiegészítő pozitívan hatott a vizsgált növények élettani paramétereire. A lignin tartalom növekedése, valamint az emelkedett poliamin szintek alapján megállapítottuk, hogy az arginin dekarboxiláz enzimet túltermelő dohánynövények (*FvADC*) fitnessét leíró paraméterek javultak mind az arginin, mind a putrescin kezelés hatására, mely a javulás putrescin hozzáadásakor nagyobb mértékű volt. Az emelkedett poliamin szintek, valamint a lignin tartalom növekedése jól mutatják a putrescin és a spermidin exogén alkalmazásának pozitív hatását a spermidin szintáz enzimet túltermelő dohánynövények (*FvSPDS*) egészségi állapotára.

A klorofill mennyisége minden vizsgált paramétertől függetlenül alakult a vad típusú, *FvADC* és *FvSPDS* vonalakban is, a klorofillformák arányában mégis lehetett szignifikáns különbséget kimutatni. Vizsgálatainkban a lignin, spermidin, spermin, összpoliamin tartalom és (Spd+Spm)/Put arány is negatív korrelációban áll a *Ca/Cb* aránnyal, ami a fotoszintetikus apparátus magasabb hatásfokáról tanúskodik. Az összefüggés erősségének sorrendjében a (Spd+Spm)/Put arány, a putrescin, a spermidin, spermin és összpoliamin tartalom pozitív

korrelációt mutat a lignin tartalommal, így a sejtfal szilárdságának növekedése is lehet a poliaminok hatása.

A Vt növényekhez képest a *FvADC* gén konstitutív túltermeltetése nagyobb mértékben javította a vitalitást, mint a *FvSPDS* gén overexpressziója, az arginin táptalajhoz történő adagolása kisebb mértékű hatást indukált, mint a putrescin és spermidin kezelés. A közvetlen poliamin adagolásnak nagymértékű jótékony hatása várható volt, az arginin közvetlen hatása azonban kevésbé ismert. Az arginint más bioszintetikus útvonalak is fogyasztják, ezért kisebb mértékben erősíti a poliamin bioszintézist. Abban az esetben, amikor az *ADC* gén konstitutív túltermelése által a poliaminok előállítására fordítottuk az arginint, annak hatása jobban megjelent a vizsgált paraméterekben észlelt változásokban. A *FvADC* gén az urea cikluson keresztül a klorofill tartalmat is megnövelte a sejtekben, és a megemelkedett klorofill tartalom a jobb fotoszintetikus hatékonysággal kiegészülve segít még jobban hasznosítani a beérkező sugárzást.

A *FvSPDS* gén túltermelése a poliaminformák konverziójában tűnik hatásosabbnak. Az exogén putrescint és spermidint segít közvetlenül tovább alakítani, de magára a putrescin szintre is jótékony hatással bírt mindkét poliamin. A diamin putrescin és a hosszabb láncú spermidin és spermin egymáshoz viszonyított aránya döntő, a különböző poliaminformák mennyisége önmagában nem okoz jobb fiziológiai állapotot. A (Spd+Spm)/Put arány egyik esetben sem mutatott szignifikáns interakciót a vonalak tekintetében (ennek az értéknek az alakulására nincs hatással a *FvADC* vagy *FvSPDS* gének túltermelése), viszont az arginin vagy putrescin táptalajhoz történő adagolása növelte ezt az értéket. Ez az arány szigorú szabályozás alatt áll, irodalmi adatok alapján a szövet- és szerv differenciálódás irányításában tölt be meghatározó szerepet.



## 8. SUMMARY

In summary, it can be concluded that *FaADC* and *FaSPDS* showed a various expression in the fruit ripening of *Fragaria x ananassa* Duch. cv. 'Asia', which confirms their role in fruit ripening. Based on data from literature and from personal research, polyamines can prevent the impacts of internal cellular stresses during fruit formation and ripening. *FvADC* and *FvSPDS* genes from *Fragaria vesca* L. cv. 'Rügen' were successfully transformed into tissues of *Nicotiana tabacum* L. plants. The transcriptional activity of these newly introduced genes was demonstrated in the progenies of the transformed plants.

In case of stable transformants, chloroplastic and cytoplasmic localization of *FvSPDS::sGFP* fusion protein was observable in the epidermis cell layer. Enzymes of polyamine biosynthesis are the most active in the cytoplasm, and are transported to other organs for further utilization. Their continuous presence is eminently required in the nucleus and chloroplast. Chloroplastic localization of *FvADC::sGFP* fusion protein was ascertained. The translational activity of *FvADC::sGFP* construction was also in the extracellular space of palisade parenchyma cell layer. It was previously established, that the polyamines enhance the transcriptional activity of numerous genes involved in acquired systematic resistance, hence the activity of the ADC enzyme in the extracellular space can denotes the preparation of the defense system.

All of the applied culturing media supply had a positive effect on the physiological parameters of the examined plant lines. The elevated lignin content, the recovery of protein loss, and the ascended polyamine content suggest the deduction, that the attributes describing the fitness of the tobacco plants overexpressing the arginine decarboxylase enzyme (*FvADC*) ameliorated. This progress was more marked in case of the addition of putrescin, than of arginine. The advanced polyamine, lignin and protein content indicate well the positive effect of the exogenously applied putrescine and spermidine on the state of health of the plants overexpressing the spermidine synthase enzyme (*FvSPDS*).

The quantity of chlorophyll formed absolutely indifferently from every examined parameter in all three (Wt, *FvADC*, *FvSPDS*) tobacco lines. In the other hand, the ratio of chlorophyll forms represented a significant difference. Lignin, protein, spermidine, spermine, total polyamine content and (Spd+Spm)/Put ratio also showed a negative correlation with the *Ca/Cb* ratio, which infers the superior efficiency of the photosynthetic apparatus. In the order of strength of relationship, (Spd+Spm)/Put ratio, putrescine, spermine, total polyamine content is in a positive

correlation with the lignin content. This coherence foreshadows the role of polyamines in the enhanced rigidity of the cell walls.

The constitutive overexpression of the *FvADC* gene improved the vitality in a greater degree, then that of the *FvSPDS* gene, compared to the Wt. In addition, the exogenous putrescine and spermidine had a greater effect, than the arginine treatment. The large-scale positive influence of the direct addition of polyamines was expected, but the impact of straight arginine is less known. Arginine is consumed by several biosynthetic pathways; therefore, it can enhance the polyamine biosynthesis in a lesser extent. In the lines where the arginine is channeled in direction of polyamine production through the constitutive overexpression of the *ADC* gene, its effect manifested large better in the analyzed parameters. The *FvADC* gene enhanced the chlorophyll content of the cells through the urea-cycle, and the higher content, complemented with a better photosynthetic efficiency helps to harness much better the incoming radiation.

The overexpression of the *FvSPDS* gene appears to be more effective in the conversion of the different polyamine-forms. It enhances the direct conversion of exogenous putrescine and spermidine, and both polyamines have a positive impact on the putrescine content itself. The quantity of polyamine-forms *per se* is not involved in improving the physiological status, but the ratio of the diamine putrescine to the spermidine and spermine with longer chain is crucial. The (Spd+Spm)/Put ratio showed no significant interaction in point of each case lines (the overexpression of *FvADC* or *FvSPDS* genes had no impact to the conformation of this value), but the exogenous addition of arginine or putrescine to the culturing media was able to heighten this value. This ratio in under a strict regulation, it fills a fundamental role in the tissue- and organ differentiation, based on the literature.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

- ABELES F.B., MORGAN P.W. AND SALTVEIT M.E. JR. (1992). Ethylene in Plant Biology. San Diego, CA: Academic Press.
- AGOSTINELLI E., BELLI F., MOLINARI A., CONDELLO M., PALMIGIANI P., DALLA VEDOVA L., MARRA M., SEILER N. AND ARANCIA G. (2006). Toxicity of enzymatic oxidation products of spermine to human melanoma cells (m14): sensitization by heat and MDL 72527. *Acta Biochemistry And Biophysiology* 1763:1040–1050.
- AGUDELO-ROMERO P., BORTOLLOTTI C., PAIS M. S., TIBURCIO A. F. AND FORTES A. M. (2013). Study of polyamines during grape ripening indicate an important role of polyamine catabolism. *Plant Physiology and Biochemistry*, 67: 105–119.
- AGUDELO-ROMERO P., ALI K., CHOI Y. H., SOUSA L., VERPOORTE R., TIBURCIO A. F. AND FORTES A. M. (2014). Perturbation of polyamine catabolism affects grape ripening of *Vitis vinifera* cv. Trincaderia. *Plant Physiology and Biochemistry*, 74: 141-155.
- AHMAD M. S. A., ALI Q., ASHRAF M., HAIDER M. Z. AND ABBAS Q. (2009). Involvement of polyamines, abscisic acid and anti-oxidative enzymes in adaptation of Blue Panicgrass (*Panicum antidotale* Retz.) to saline environments. *Environmental and Experimental Botany*, 66: 409–417.
- AKIYAMA T. AND JIN S. (2007). Molecular cloning and characterization of an arginine decarboxylase gene up-regulated by chilling stress in rice seedlings. *Journal of plant physiology*, 164 (5): 645-654.
- ALABADÍ D. AND CARBONELL, J. (1999). Differential expression of two spermidine synthase genes during early fruit development and in vegetative tissues of pea. *Plant Molecular Biology*, 39: 933–943
- ALCÁZAR R., ALTABELLA T., MARCO F., BORTOLOTTI C., REYMOND M., KONCZ C., CARRASCO P. AND TIBURCIO A. F. (2010a). Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta*, 231 (6): 1237-1249.
- ALCÁZAR R., PLANAS J., SAXENA T., ZARZA X., BORTOLOTTI C., CUEVAS J., BITRIÁN M., TIBURCIO A. F. AND ALTABELLA T. (2010b). Putrescine accumulation confers drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants over-expressing the homologous arginine decarboxylase 2 gene. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48 (7): 547-52.

- ALCÁZAR R., BUENO M. AND TIBURCIO A. F. (2020). Polyamines: small amines with large effects on plant abiotic stress tolerance. *Cells*, 9: 2373.
- ALHARBY H. F., ALZHRANI, Y. M. AND RADY M. M. (2020). Seeds pretreatment with zeatins or maize grain-derived organic biostimulant improved hormonal contents, polyamine gene expression, and salinity and drought tolerance of wheat. *International Journal for Agriculture and Biology*. 24 (4): 714-724.
- ALET A., SÁNCHEZ D. H., CUEVAS J. C., MARINA M., CARRASCO P., ALTABELLA T., TIBURCIO A. F. AND RUIZ O. A. (2012). New insights into the role of spermine in *Arabidopsis thaliana* under long-term salt stress. *Plant Science*, 182: 94–100.
- ALEXANDER L. AND GRIERSON D. (2002). Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*, 53: 2039–2055.
- ALI R.M. (2000). Role of putrescine in salt tolerance of *Atropa belladonna* plant. *Plant Science*, 152: 173–179.
- AMARASINGHE, V. AND CARLSON, J. E. (1994). Subcellular localization of polyamines in embryogenic callus of white spruce (*Picea glauca*). *Canadian Journal of Botany*, 72 (6): 788-793.
- ANGELINI R., CONA A., FEDERICO R., FINCATO P., TAVLADORAKI P. AND TISI A. (2010). Plant amine oxidases “on the move”: an update. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(7): 560-564.
- AZAIZEH H. AND STEUDLE E. (1991). Effects of salinity on water transport of excised maize (*Zea mays* L.) roots. *Plant Physiology*, 97: 1136-1145.
- BACHRACH U. AND WANG Y. C. (2002). Cancer therapy and prevention by green tea: role of ornithine decarboxylase. *Amino Acids* 22: 1–13.
- BACHRACH U. (2005). Naturally occurring polyamines: interaction with macromolecules. *Current Protein Peptic Science* 6: 559-566.
- BACHRACH U. (2010). The early history of polyamine research. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48 (7): 490-495.
- BAGNI N. AND PISTOCCHI R. (1991). Uptake and transport of polyamine metabolism in plants. In: SLOCUM R. D. AND FLORES H. E., Eds. *Biochemistry and physiology of polyamines in plants*. CRC Press, Boca Raton, 105-118.
- BAL E. (2013). Effects of exogenous polyamine and ultrasound treatment to improve peach storability. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 73 ( 4): 435-440.

- BALOGH A., KONCZ T., TISZA V., KISS E. AND HESZKY L. (2005). Identification of ripening-related genes in strawberry fruit by cDNA-AFLP. *International Journal of Horticultural Science*, 4: 33-41.
- BARBUL A. (1986). Arginine: biochemistry, physiology, and therapeutic implications. *JPEN J Parenter Enteral Nutrition*, 10 (2): 227-238.
- BARTELS D. AND NELSON D. (1994). Approaches to improve stress tolerance using molecular genetics. *Plant, Cell & Environment*, 17: 659–667
- BASSARD J. E., ULLMANN P., BERNIER F., AND WERCK-REICHHART D. (2010). Phenolamides: bridging polyamines to the phenolic metabolism. *Phytochemistry*, 71 (16): 1808-1824.
- BAUER G. A., BAZZAZ F. A., MINOCHA R., LONG S., MAGILL A., ABER J. AND BERNTSON G. M. (2004). Effects of chronic N additions on tissue chemistry, photosynthetic capacity and carbon sequestration potential of a red pine (*Pinus resinosa* ait.) stand in the ne United States. *Ecological Forest Management* 196:173–186
- BAUSENWEIN U., MILLARD P., THORNTON B., AND RAVEN, J. A. (2001). Seasonal nitrogen storage and remobilization in the forb *Rumex acetosa*. *Functional Ecology*, 15: 370–377.
- BEAUMIER L., CASTILLO L., YU Y. M., AJAMI A. M. AND YOUNG V. R. (1996). Arginine: new and exciting developments for an "old" amino acid. *Biomedical and Environmental Sciences*, 9(2-3): 296-315.
- BELDA-PALAZÓN B., RUIZ L., MARTÍ E., TÁRRAGA S., TIBURCIO A. F., CULIÁÑEZ F., FARRÀS R., CARRASCO P. AND FERRANDO A. (2012). Aminopropyltransferases involved in polyamine biosynthesis localize preferentially in the nucleus of plant cells. *PLoS One*, 7: e46907.
- BELL E. AND MALMBERG R.L. (1990). Analysis of a cDNA encoding arginine decarboxylase from oat reveals similarity to the *Escherichia coli* arginine decarboxylase and evidence of protein processing. *Molecular and General Genetics*, 224: 431–436.
- BEN H. A., GHANEM M. E., BOUZID S. AND LUTTS S. (2009). Abscisic acid has contrasting effects on salt excretion and polyamine concentrations of an inland and a coastal population of the Mediterranean xero-halophyte species *Atriplex halimus*. *Annals of Botany*, 104: 925–936.
- BESFORD R. T., RICHARDSON C. M., CAPELL T. AND TIBURCIO A.F. (1993). Effect of polyamine on stabilization of molecular complexes in thylakoid membranes on osmotically stressed oat leaves. *Planta*, 189: 201–206.

- BHATNAGAR P., BHATNAGAR M. AND AMARJIT K. (2004). Production of solasodine by *Solanum laciniatum* using plant tissue culture technique. *Indian Journal of Experimental Biology*, 42: 1020-1023.
- BIASTOFF S., BRANDT W. AND DRÄGER B. (2009). Putrescine N-methyltransferase – The start for alkaloids. *Phytochemistry*, 70: 1708-1718.
- BLOCK M. A., TEWARI A. K., ALBRIEUX C., MARECHAL E. AND JOYARD J. (2002). The plant S-adenosyl-L-methionine: Mg-protoporphyrin IX methyltransferase is located in both envelope and thylakoid chloroplast membranes. *European Journal Biochemistry*, 269: 240–248.
- BOERJAN W., BAUW G., VAN MONTAGU M. AND INZÉ D. (1994). Distinct phenotypes generated by overexpression and suppression of S-adenosyl-L-methionine synthetase reveal developmental patterns of gene silencing in tobacco. *Plant Cell*, 6: 1401–1414.
- BOHNERT H. J., NELSON D. E. AND JENSON R. G. (1995). Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell*, 7: 1099–1111.
- BOHNERT H. J. AND JENSON R. G. (1996). Strategies for engineering water stress tolerance in plants. *Trends in Biotechnology*, 14: 89–97.
- BONGA J. M., ADERKAS P. AND VON ADERKAS P. (1992). *In vitro* culture of trees (Vol. 38). Springer Science & Business Media,
- BORGO L., MARUR C. J. AND VIEIRA L. G. E. (2015). Effects of high proline accumulation on chloroplast and mitochondrial ultrastructure and on osmotic adjustment in tobacco plants. *Acta Scientiarum Agronomy*, 37: 191–199.
- BORRELL A., CULIAÑEZ-MACIA A., ALTABELLA T., BESFORD R. T., FLORES D. AND TIBURCIO A. F. (1995). Arginine decarboxylase is localized in chloroplasts. *Plant Physiology*, 109: 771-776.
- BORTOLOTTI C., CORDEIRO A., ALCÁZAR R., BORRELL A., CULIAÑEZ-MACIÀ F. A., TIBURCIO A. F. AND ALTABELLA T. (2004), Localization of arginine decarboxylase in tobacco plants. *Physiologia Plantarum*, 120: 84-92.
- BOUCHEREAU A., AZIZ A., LARHER F. AND MARTIN-TANGUY J. (1999). Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science*, 140: 103-125.
- BRAY E. A. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*. 2: 48–54.
- BREGOLI A. M., SCARAMAGLI S., COSTA G., SABATINI E., ZIOSI V., BIONDI S. AND TORRIGIANI P. (2002). Peach (*Prunus persica*) fruit ripening: aminoethoxyvinylglycine (AVG) and exogenous polyamines affect ethylene emission and flesh firmness. *Physiologia Plantarum*, 114: 472-481.

- BRUMMELL D. A., DAL CIN V., CRISOSTO, C. H. AND LABAVITCH J. M., (2004). Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *Journal of Experimental Botany*, 55 (405): 2029-2039.
- BURTIN D. AND MICHAEL A. J. (1997). Overexpression of arginine decarboxylase in transgenic plants. *Biochemical Journal*, 325 (2): 331-337.
- BUSTAMANTE C. A., CIVELLO P. M. AND MARTINEZ G. A. (2009). Cloning of the promoter region of beta-xylosidase (FaXyl1) gene and effect of plant growth regulators on the expression of FaXyl1 in strawberry fruit. *Plant Science*, 177: 49–56.
- CAI Q., ZHANG J., GUO C., AND AL E. (2006). Reviews of the physiological roles and molecular biology of polyamines in higher plants. *Journal of Fujian Institute Of Education*, 7: 118–124.
- CAI Q. (2009). Progress in physiology of plant polyamines. *Fujian Science and Technology, Rice Wheat*, 27: 37–40.
- CAI G., SOBIESZCZUKNOWICKA E., ALOISI I., AND AL E. (2015). Polyamines are common players in different facets of plant programmed cell death. *Amino Acids*, 47: 27–44.
- CANTONI G. L. (1975). Biological methylation: selected aspects. *Annual Review of Biochemistry*, 44: 435–451.
- CASSOL T. AND MATTOO A. K. (2003). Do polyamines and ethylene interact to regulate plant growth, development and senescence? In: NATH P., MATTOO A. K., RANADE S. A. AND WEIL J. H. Eds. *Molecular insight in plant biology*. Science, Enfield, 121–132.
- CASTILLEJO C., DE LA FUENTE J. I., IANNETTA P., BOTELLA M. A. AND VALPUESTA V. (2004). Pectin esterase gene family in strawberry fruit: study of FaPE1, a ripening-specific isoform. *Journal of Experimental Botany*, 55: 909–918.
- CHAI Y. M., ZHANG Q., TIAN L., LI C. L., XING Y., QIN L. AND SHEN Y. Y. (2013). Brassinosteroid is involved in strawberry fruit ripening. *Plant Growth Regulation*, 69: 63–69.
- CHAMPA W. H., GILL M. I. S., MAHAJAN B. V. C., AND ARORA N. K. (2014). Postharvest treatment of polyamines maintains quality and extends shelf-life of table grapes (*Vitis vinifera* L.) cv. Flame Seedless. *Postharvest Biology and Technology*, 91: 57-63.
- CHEN D., MA X., LI C., ZHANG W., XIA G. AND WANG, M. (2014). A wheat aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene, *TaACO1*, negatively regulates salinity stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 33: 1815–1827.

- CHEN D., SHAO Q., YIN L., YOUNIS A., ZHENG B. (2019). Polyamine function in plants: metabolism, regulation on development, and roles in abiotic stress responses. *Frontiers in plant science*, 1945.
- CHENG L., SUN R. R., WANG F. Y., PENG Z., KONG F. L., WU J. AND LU G. (2012). Spermidine affects the transcriptome responses to high temperature stress in ripening tomato fruit. *Journal of Zhejiang University Science* , 13 (4): 283-297.
- CHILDS A. C., MEHTA D. J. AND GERNER, E. W. (2003). Polyamine-dependent gene expression. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60: 1394–1406.
- CHIU W. L., NIWA Y., ZENG W., HIRANO T., KOBAYASHI H. AND SHEEN J. (1996). Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current biology*, 6 (3): 325-330.
- CHOU W. C., HUANG Y. W., TSAY W. S., CHIANG T. Y., HUANG D. D. AND HUANG H. J. (2004). Expression of genes encoding the rice translation initiation factor, eif5a, is involved in developmental and environmental responses. *Physiologia Plantarum*, 121: 50–57.
- CHOUDHARY S. P., KANWAR M., BHARDWAJ R., YU J. Q. AND TRAN L. S. P. (2012). Chromium stress mitigation by polyamine-brassinosteroid application involves phytohormonal and physiological strategies in *Raphanus sativus* L. *Plos One*, 7 (3): E33210.
- COHEN A. S., POPOVIC R. B. AND ZALIK S. (1979). Effects of polyamines on chlorophyll and protein content, photochemical activity and chloroplast ultrastructure of barley leaf discs during senescence. *Plant Physiology*, 64: 717–720.
- COHEN S. S. (1998). *A guide to the polyamines*. Oxford University Press, New York
- CONA A., REA G., ANGELINI R. AND AL E. (2006). Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in Plant Science*, 11: 80–88.
- CONCHA C. M., FIGUEROA N. E., POBLETE L. A., OÑATE F. A., SCHWAB W. AND FIGUEROA C. R. (2013). Methyl jasmonate treatment induces changes in fruit ripening by modifying the expression of several ripening genes in *Fragaria chiloensis* fruit. *Plant Physiology and Biochemistry*, 70: 433–444.
- CRUZ R. T., JORDAN W. R. AND DREW M. C. (1992). Structural changes and associated reduction of hydraulic conductance in roots of *Sorghum bicolor* L. following exposure to water deficit. *Plant Physiology*, 99: 203-212.
- CSUKASI F., OSORIO S., GUTIERREZ J. R., KITAMURA J., GIAVALISCO P., NAKAJIMA M., FERNIE A. R., RATHJEN J. P., BOTELLA M. A., VALPUESTA V. AND MEDINA-



- ESCOBAR N. (2011). Gibberellin biosynthesis and signalling during development of the strawberry receptacle. *New Phytology*, 191: 376–390.
- CVIKROVÁ M., GEMPERLOVÁ L., DOBRÁ J., MARTINCOVÁ O., PRÁŠIL I. T., GUBIS J. AND VANKOVÁ R. (2012). Effect of heat stress on polyamine metabolism in proline-over-producing tobacco plants. *Plant Science*, 182: 49-58.
- DARKO E., GIERCZIK K., HUDÁK O., FORGÓ P., PÁL M., TÜRKÖSI E., KOVÁCS V., DULAI S., MAJLÁTH I., MOLNÁR I., JANDA T. AND MOLNÁR-LÁNG M. (2017). Differing metabolic responses to salt stress in wheat-barley addition lines containing different 7h chromosomal fragments. *PLOS ONE*, 12 (3): E0174170.
- De DIOS P., MATILLA A. J. AND GALLARDO M. (2006). Flower fertilization and fruit development prompt changes in free polyamines and ethylene in damson plum (*Prunus insititia* L.). *Journal of Plant Physiology*, 163: 86–97.
- Del DUCA S., SERAFINI-FRACASSINI D. AND CAI G. (2014). Senescence and programmed cell death in plants: polyamine action mediated by trans-glutaminase. *Frontiers in plant science* 5:1–17.
- DeSCENZO R. A. AND MINOCHA S. C. (1993). Modulation of cellular polyamines in tobacco by transfer and expression of mouse ornithine decarboxylase cDNA. *Plant Molecular Biology*, 22: 113–127.
- DIBOUN I., MATHEW S., AL-RAYYASHI M., ELRAYESS M., TORRES M., HALAMA A., MÉRET M., MOHNEY R. P., KAROLY E. D., MALEK J. AND SUHRE K. (2015). Metabolomics of dates (*Phoenix dactylifera*) reveals a highly dynamic ripening process accounting for major variation in fruit composition. *BMC Plant Biology*, 15: 291.
- DIXON R. A. AND AMTZEN C. J. (1997). Transgenic plant technology is entering the era of metabolic engineering. *Trends in Biotechnology* 15: 441–444.
- DOCIMO T., REICHEL T., SCHNEIDER B., AND AL E. (2012). The first step in the biosynthesis of cocaine in *Erythroxylum coca*: the characterization of arginine and ornithine decarboxylases. *Plant Molecular Biology*, 78: 599–615.
- DONDINI L, DELDUCA S., DALL'AGATA L., BASSI R., GASTALDELLI M., DELLA MEA M., DI SANDRO A., CLAPAROLS I. AND SERAFINI-FRACASSINI D. (2003). Suborganellar localisation and effect of light on *Helianthus tuberosus* chloroplast transglutaminases and their substrates. *Planta*, 217: 84-95.
- DROLET G., DUMBROFF E. B., LEGGE R. L. AND THOMPSON J. E. (1986). Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochemistry*, 25: 367–371.

- DU J., SHU S., AN Y., ZHOU H., GUO S. AND SUN J. (2017). Influence of exogenous spermidine on carbon–nitrogen metabolism under Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> stress in cucumber root. *Plant Growth Regulation*, 81: 103–115.
- DUAN G. (2000). Effect of speridine on protein contents and protease during senescence of fixcsed wheat leaves. *Journal of Sichuan Teaching Collegium* 21: 44–47.
- EBEED H. T., HASSAN N. M. AND ALJARANI A. M. (2017). Exogenous applications of polyamines modulate drought responses in wheat through osmolytes accumulation, increasing free polyamine levels and regulation of polyamine biosynthetic genes. *Plant Physiology and Biochemistry*. 118: 438-448.
- EDREVA A., YORDANOV I., KARDIJEVA R. AND GESHEVA E. (1998). Heat shock responses of bean plants: involvement of free radicals, antioxidants and free radical/active oxygen scavenging systems. *Biologia Plantarum*, 41: 185–191.
- EMANUELSSON O., BRUNAK S., VON HEIJNE G. AND NIELSEN H. (2007). Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. *Nature Protocols*, 2: 953-971.
- ESHGHI S. AND JAMALI B. (2012). Using plant bioregulators to improve production and fruit quality of strawberry. In VII International Strawberry Symposium 1049: 395-400.
- ESPOSITO C. AND PORTA R. (2013). FAB mass spectrometric detection of e (γ–glutamyl) lysine crosslinks and (γ–glutamyl) polyamine derivatives produced by *transglutaminase in vitro*. *Advances in Post-Translational Modifications of Proteins and Aging*. 231: 73.
- FAN J., FENG, Z. AND CHEN N. (2020). Spermidine as a target for cancer therapy. *Pharmacological Research*, 159: 104943.
- FEIRER R. P., MIGNON G. AND LITVAY J. D. (1984). Arginine decarboxylase and polyamines required for embryogenesis in the wild carrot. *Science*, 223 (4643): 1433-1435.
- FIENBERG A. A., CHOI J. H., LUBICH W. P. AND SUNG Z. R. (1984). Developmental regulation of polyamine metabolism in growth and differentiation of carrot culture. *Planta*, 162 (6): 532-539.
- FOYER C. H. AND NOCTOR G. (2002). Photosynthetic nitrogen assimilation and associated carbon and respiratory metabolism. Kluwer, Boston
- FLUHR R. AND MATTOO A. K. (1996). Ethylene—biosynthesis and perception. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 15: 479–523.
- FONTECAVE M., ATTA M. AND MULLIEZ E.(2004). S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends in Biochemical Sciences*, 29 (5): 243-249.
- FORTES A. M., TEIXEIRA R. T. AND AGUDELO-ROMERO P. (2015). Complex interplay of hormonal signals during grape berry ripening. *Molecules*, 20: 9326–9343.

- FRANCESCHETTI M., FORMALÉ S., TASSONIA A., ZUCCHERELLI K., MAYER M. J. AND BAGNI N. (2004). Effects of spermidine synthase overexpression on polyamine biosynthetic pathway in tobacco plants. *Journal of Plant Physiology*, 161 (9):989-1001.
- FRANCO-MORA O., TANABE K., TAMURA F. and ITAI A. (2005). Effects of putrescine application on fruit set in 'Housui' Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Scientia Horticulturae*. 104 (3): 265-273.
- FRITZ C., PALACIOS-ROJAS N., FEIL R. AND STITT M. (2006). Regulation of secondary metabolism by the carbon-nitrogen status in tobacco: Nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *Plant Journal*, 46: 533–548.
- GALLOWAY G. L., MALMBERG R. L. AND PRICE R. A., (1998). Phylogenetic utility of the nuclear gene arginine decarboxylase: an example from *Brassicaceae*. *Molecular Biology and Evolution*, 15: 1312–1320.
- GALSTON A.W., KAUR-SHAHWHNEY R., ATABELLA T. AND TIBURCIO A.F. (1997). Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress. *Acta Botanica*, 110: 197-207.
- GEMPERLOVÁ L., NOVÁKOVÁ M., VAŇKOVÁ R., EDER J. AND CVIKROVÁ M. (2006). Diurnal changes in polyamine content, arginine and ornithine decarboxylase, and diamine oxidase in tobacco leaves, *Journal of Experimental Botany*, 57 (6): 1413–1421.
- GENCHI G. (2017). An overview on D-amino acids. *Amino Acids*, 49(9):1521-1533.
- GERATS A. G. M., KAYE C., COLLINS C. AND MALMBERG R. L. (1988). Polyamine levels in petunia genotypes with normal and abnormal floral morphologies. *Plant Physiology*. 86: 390– 393.
- GHIANI A., ONELLI E., AINA R., COCUCCI M. AND CITTERIO, S. (2011). A comparative study of melting and non-melting flesh peach cultivars reveals that during fruit ripening endo-polygalacturonase (endo-pg) is mainly involved in pericarp textural changes, not in firmness reduction. *Journal of Experimental Botany*, 62 (11): 4043-4054.
- GILL S.S. AND TUTEJA N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48 (12): 909-930.
- GIVEN N. K., VENIS M. A. AND GRIERSON D. (1988). Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit. *Planta*, 174: 402-406.
- GNAD F., GUNAWARDENA J. AND MANN M. (2011). PHOSIDA 2011: the posttranslational modification database. *Nucleic Acids Research*, 39: 253–260.

- GOMEZ-JIMENEZ M. C., PAREDES M. A., GALLARDO M., FERNANDEZ-GARCIA N., OLMOS E. AND SANCHEZ-CALLE I. M. (2010). Tissue-specific expression of olive S-adenosyl methionine decarboxylase and spermidine synthase genes and polyamine metabolism during flower opening and early fruit development. *Planta*, 232 (3): 629-47.
- GONG B., XIU L., VANDENLANGENBERG K. M., DAN W., SHASHA S., MIN W., YAN L., FENGUJIAN Y., QINGHUA S. AND XIUFENG W. (2014). Overexpression of S-adenosyl-L-methionine synthetase increased tomato tolerance to alkali stress through polyamine metabolism. *Plant Biotechnology Journal*, 12: 694-708.
- GONG X., SHI S., DOU F., SONG Y. AND MA F. (2017). Exogenous melatonin alleviates alkaline stress in *Malus hupehensis* rehd. by regulating the biosynthesis of polyamines. *Molecules*, 22 (9): 1542.
- GONZALEZ M. E., JASSO-ROBLES F. I., FLORES-HERNÁNDEZ E., RODRÍGUEZ-KESSLER M. AND PIECKENSTAIN F. L. (2021). Current status and perspectives on the role of polyamines in plant immunity. *Annals of Applied Biology*, 178: 244– 255.
- GOYAL, V., DEVI, S., MUNJAL, R. (2019). Role of polyamines in protecting plants from oxidative stress. *Reactive oxygen, nitrogen and sulfur species in plants: production, metabolism, signaling and defense mechanisms*, 143-157.
- GÓMEZ-GÓMEZ L. AND CARRASCO P. (1998). Differential expression of the S-adenosyl-L-methionine synthase genes during pea development. *Plant Physiology*, 117 (2): 397–405.
- GUO Z., TAN J., ZHUO C., WANG C., XIANG B. AND WANG Z. (2014). Abscisic acid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and nitric oxide interactions mediated cold-induced S-adenosylmethionine synthetase in *Medicago sativa* subsp. *falcata* that confers cold tolerance through up-regulating polyamine oxidation. *Plant Biotechnology Journal*, 12: 601–612.
- GUO J., WANG S., YU X., DONG R., LI Y., MEI X. AND SHEN Y. (2018). Polyamines regulate strawberry fruit ripening by abscisic acid, auxin, and ethylene. *Plant Physiology*, 177 (1): 339-351.
- GUPTA B., GUPTA K. AND SENGUPTA D. N. (2012a). Spermidine-mediated *in vitro* phosphorylation of transcriptional regulator OSBZ8 by SNF1-type serine/threonine protein kinase SAPK4 homolog in indica rice. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34: 1321-1336.
- GUPTA K., GUPTA B., GHOSH B. AND SENGUPTA D. N. (2012b). Spermidine and abscisic acid-mediated phosphorylation of a cytoplasmic protein from rice root in response to salinity stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34: 29–40.

- GUPTA, A., PANDEY, R., SINHA, R., CHOWDHARY, A., PAL, R. K. AND RAJAM, M. V. (2019). Improvement of post-harvest fruit characteristics in tomato by fruit-specific over-expression of oat arginine decarboxylase gene. *Plant Growth Regulation*. 88 (1): 61-71.
- HABERLANDT G. (1902). Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. (in German) *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien*. 111 (1): 69-91
- HÄMÄLÄINEN R. (1941). Über die quantitative bestimmung des spermins in organismus und sein vorkommen in menschlichen gewebe und körperflüssigkeiten. (in German) *Acta Soc. Med. "Duodecim" Ser. A*, 23: 97-165.
- HAMILL J. D., ROBINS R. J., PARR A. J., EVANS D. M., FURZE J. M. AND RHODES M. J. C. (1990). Overexpression of a yeast ornithine decarboxylase gene in transgenic roots of *Nicotiana glauca* can lead to enhanced nicotine accumulation. *Plant Molecular Biology*, 15: 27–38.
- HANDA A. K. AND MATTO A. K. (2010). Differential and functional interactions emphasize the multiple roles of polyamines in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 540-546.
- HANFREY C., SOMMER S., MAYER M. J. AND AL E. (2001). *Arabidopsis* polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. *Plant Journal* 27: 551–560.
- HÄNNIG E. (1904). Zur Physiologie pflanzlicher Embryonen. (in German) I. Über die Kultur von Cruciferen. Embryonen ausserhalb des Embryosacks. 62: 45-80.
- HANSON A. D., RIVOAL J., BURNET M. AND RATHINASABAPATHI B. (1994). Biosynthesis of quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in response to water deficit. In: Smirnoff N (ed) *Environment and plant metabolism*. Bios, Oxford, 189–198.
- HANZAWA Y., TAKAHASHI T. AND KOMEDA Y. (1997). *ACL5*, an *Arabidopsis* gene required for internode elongation after flowering. *The Plant Journal*. 12: 863– 874.
- HANZAWA Y., TAKAHASHI T., MICHAEL A. J., BURTIN D., LONG D., PINEIRO M., COUPLAND G. AND KOMEDA Y. (2000). *ACAULIS5*, an *Arabidopsis* gene required for stem elongation, encodes a spermine synthase. *EMBO Journal*. 19: 4248– 4256.
- HANZAWA Y., IMAI A., MICHAEL A. J., KOMEDA Y. AND TAKAHASHI T. (2002). Characterization of the spermidine synthase-related gene family in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 527(1-3): 176-180.

- HAO Y., HUANG B., JIA D. AND AL, E. (2018). Identification of seven polyamine oxidase genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and their expression profiles under physiological and various stress conditions. *Journal of Plant Physiology* 228: 1–11.
- HASHIMOTO T., TAMAKI K., SUZUKI K. AND YAMADA Y. (1998). Molecular cloning of plant spermidine synthases. *Plant and Cell Physiology*, 39 (1): 73–79.
- HASEGAWA P. M., BRESSAN R. A., ZHU J. K. AND BOHNERT H. J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51: 463-99.
- HATANAKA T., SANO H. AND KUSANO T. (1999). Molecular cloning and characterization of coffee cDNA encoding spermidine synthase. *Plant Science*, 140: 161–168.
- HAVELANGE A., LEJEUNE P., BERNIER .A, KAUR-SAWHNEY R. AND GALSTON A. W. (1996). Putrescine export from leaves in relation to floral transition in *Sinapis alba*. *Physiologia Plantarum*, 96: 59-65.
- HEIMER Y. M. AND MIZRAHI Y. (1982). Characterization of ornithine decarboxylase of tobacco cells and tomato ovaries. *Biochemical Journal*, 201: 373–376.
- HU W.W., GONG H. AND PUA E.C. (2006). Modulation of SAMDC expression in *Arabidopsis thaliana* alters *in vitro* shoot organogenesis. *Physiologia Plantarum*, 128: 740–750.
- HU X., ZHANG Y., SHI Y., ZHANG Z., ZOU Z., ZHANG H. AND ZHAO J. (2012). Effect of exogenous spermidine on polyamine content and metabolism in tomato exposed to salinity-alkalinity mixed stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 57: 200-209.
- HUMMEL I., BOURDAIS G., GOUESBET G., COUÉE I., MALMBERG R. L. AND EL AMRANI A. (2004). Differential gene expression of arginine decarboxylase ADC1 and ADC2 in *Arabidopsis thaliana*: characterization of transcriptional regulation during seed germination and seedling development. *New Phytologist*, 163 (3): 519-531.
- IGARASHI K. AND KASHIWAGI K. (2015). Modulation of protein synthesis by polyamines. *IUBMB life* 67, 160–169.
- IMAI A., MATSUYAMA T., HANZAWA Y., AKIYAMA T., TAMAOKI M., SAJI H., SHIRANO Y., KATO T., HAYASHI H., SHIBATA D.,TABATA S., KOMEDA Y. AND TAKAHASHI T. (2004). *Spermidine synthase* genes are essential for survival of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 135: 1565–1573.
- IQBAL M. AND ASHRAF M. (2012). Gibberellic acid mediated induction of salt tolerance in wheat plants: growth, ionic partitioning, photosynthesis, yield and hormonal homeostasis. *Environmental and Experimental Botany*, 86:76-85.

- ISLAM M. J., UDDIN M. J., HOSSAIN M. A., HENRY R., BEGUM M. K., SOHEL M. A. T., MOU M. A., AHN J., CHEONG E. J. AND LIM Y. S. (2022) Exogenous putrescine attenuates the negative impact of drought stress by modulating physio-biochemical traits and gene expression in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). PLoS One. 17 (1): e0262099.
- IYER R. K., KIM H. K., TSOA R. W., GRODY W. W. AND CEDERBAUM S. D. (2002). Cloning and characterization of human agmatinase. Molecular Genetics and Metabolism, 75 (3): 209-218.
- JANDA T., GONDOR O. K., YORDANOVA R., SZALAI G. AND PÁL M. (2014). Salicylic acid and photosynthesis: signalling and effects. Acta Physiologiae Plantarum, 36 (10): 2537-2546.
- JANG S. J., WI S. J., CHOI Y. J., AN G. AND PARK K. Y. (2012). Increased polyamine biosynthesis enhances stress tolerance by preventing the accumulation of reactive oxygen species: T-DNA mutational analysis of *Oryza sativalysine* decarboxylase-like protein 1. Molecules and Cells, 34: 251-262.
- JÄNNE J., ALHONEN L., PIETILA M. AND KEINANEN T. A. (2004). Genetic approaches to the cellular functions of polyamines in mammals. European Journal of Biochemistry, 271: 877–894.
- JIA Y. X., SUN J., GUO S. R., LI J., HU X. H. AND WANG S. P. (2010). Effect of root-applied spermidine on growth and respiratory metabolism in roots of cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings under hypoxia. Russian Journal of Plant Physiology, 57: 648–655.
- JIA H. F., CHAI Y. M., LI C. L., LU D., LUO J. J., QIN L. AND SHEN Y. Y. (2011). Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. Plant Physiology, 157:188–199.
- JIMÉNEZ BREMONT J. F., MARINA M., GUERRERO-GONZALEZ M. D. L. L., ROSSI F. R., SÁNCHEZ-RANGEL D., RODRÍGUEZ-KESSLER M., RUIZ O. A. AND GÁRRIZ, A. (2014). Physiological and molecular implications of plant polyamine metabolism during biotic interactions. Frontiers in Plant Science, 5: 95.
- JOO D. J., SHIN W. S., KIM Y. H., KIM J. H., CHOI J. H., CHOI S. J. AND PARK L. S. (2003). Effect of polyamine flocculant types on dye wastewater treatment. Separation Science and Technology. 38 (3): 661-678.
- JIU S., HAIDER M. S., KURJOGI M. M., ZHANG K., ZHU, X. AND FANG, J. (2018). Genome-wide characterization and expression analysis of sugar transporter family genes in woodland strawberry. The Plant Genome, 11 (3): 170103.

- JONES H. G. AND JONES M. B. (1989). Plants under stress. Introduction: some terminology and common mechanisms. In: seminar series of Society For Experimental Biology.
- JUNKER A., FISCHER J., SICHHART Y., BRANDT W. AND DRAEGER B. M. (2013). Evolution of the key alkaloid enzyme putrescine n-methyltransferase from spermidine synthase. *Frontiers in plant science*, 4: 260.
- KABIR A. AND SURESH KUMAR, G. (2013). Binding of the biogenic polyamines to deoxyribonucleic acids of varying base composition: base specificity and the associated energetics of the interaction. *PLoS One*, 8 (7): e70510.
- KAKKAR R. K., NAGAR P. K. AND AHUJA P. (2000). Polyamines and plant morphogenesis. *Biologia Plantarum*, 43: 1–11.
- KAKKAR R. K. AND SAWHNEY V. K. (2002). Polyamine research in plants—a changing perspective. *Physiologia Plantarum*. 33 116 (3): 281-292.
- KASUKABE Y., HE L., NADA K., MISAWA S., IHARA I. AND TACHIBANA S. (2004). Overexpression of spermidin synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*, 45 (6): 712-722.
- KAUR-SAWHNEY R., TIBURCIO A. F., ATABELLA T. AND GALSTON A. W. (2003). Polyamines in plants: An overview. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 2: 1-12.
- KAVI KISHORE P. B., HONG Z., MIAO G. H., HU C. A. A. AND VERMA D. P. S. (1995). Overexpression of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology*, 108 (4): 1387-1394.
- KHAN A. J. AND MINOCHA S. C. (1991). Polyamines and somatic embryogenesis in carrot II; the effects of cyclohexylammonium phosphate, *Journal of Plant Physiology*, 137: 446–452.
- KHAN A. S. AND SINGH Z. (2010). Pre-harvest application of putrescine influences Japanese plum fruit ripening and quality. *Food Science and Technology International*, 16: 53–64.
- KIM J. S., SHIM I. S. AND KIM M. J. (2010). Physiological response of Chinese cabbage to salt stress. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology*, 28: 343–352.
- KING J. E. AND GIFFORD D. J. (1997). Amino acid utilization in seeds of loblolly pine during germination and early seedling growth (I. arginine and arginase activity). *Plant Physiology*, 113: 1125–1135.
- KISLYUK L. M., BUBOLO L. S., PALEEVA T. V. (1992). Heat shock effects on primary thermostability and reparability of photosynthesis and on the ultrastructure of mesophyll cells in strawberry (*Fragaria vesca* L.). *Fiziologija rastenij*, 39 (5): 939-948.



- KOROLEV S., IKEGUCHI Y., SKARINA T., BEASLEY S., ARROWSMITH C., EDWARDS A. AND SAVCHENKO A. (2002). The crystal structure of spermidine synthase with a multisubstrate adduct inhibitor. *Nature Structural Biology*, 9 (1): 27-31.
- KOSUGI S., HASEBE M., TOMITA M. AND YANAGAWA H. (2009). Systematic identification of yeast cell cycle-dependent nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 10171-10176.
- KOUSHESH S. M., ARZANI K. and BARZEGAR M. (2012). Postharvest polyamine application alleviates chilling injury and affects apricot storage ability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60 (36): 8947-8953.
- KOVÁCS L., MENDEL Á. AND KISS E. (2015). A málna (*Rubus idaeus* L.) és a fekete eperfa (*Morus nigra* L.) spermidin-szintáz gén szekvenciájának meghatározása. *Kertgazdaság*. 47 (2): 72-78.
- KOVÁCS L. (2018). A *Fragaria vesca* L. cv. 'Rügen' S-adenozil-L-metionin szintáz (FvSAMS) és dekarboxiláz (FvSAMDC) túltermeltetésének összehasonlító vizsgálata a sóstresszelt *Nicotiana benthamiana* növényekben. Doktori (PhD) értekezés
- KOVÁCS L., MENDEL Á., SZENTGYÖRGYI A., FEKETE S., SÖRE F., POSTA K. AND KISS E. Comparative analysis of overexpressed *Fragaria vesca* S-adenosyl-L-methionine synthase (FvSAMS) and decarboxylase (FvSAMDC) during salt stress in transgenic *Nicotiana benthamiana*. *Plant Growth Regulation*, 2020, 91:53–73.
- KOVÁCS V., GONDOR O.K., SZALAI G., MAJLÁTH I., JANDA T. AND PÁL M., (2014). UV-B radiation modifies the acclimation processes to drought or cadmium in wheat, *Environmental and Experimental Botany*, 100: 122-131,
- KUSANO T., YAMAGUCHI K., BERBERICH T. AND TAKAHASHI Y. (2007). Advances in polyamine research. *Current topics in plant resources* 120: 345–350.
- KUZNETSOV V. V. AND SHEVYAKOVA N. I. (2007): Polyamines and stress tolerance of plants. *Plant Stress* 1 (1): 50-71.
- LA COUR T., KIEMER L., MØLGAARD A., GUPTA R., SKRIVER K. AND BRUNAK S. (2004). Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Engineering, Design and Selection*, 17 (6): 527-536.
- LADENBURG A. AND ABEL J. (1888). Überdasaethylenimin (spermine). (in German) *Ber Dtsch Chem Ges* 21:758–766.
- LAZZARATO L., TREBBI G., PAGNUCCO C., FRANCHIN C., TORRIGIANI P. AND BETTI L. (2009). Exogenous spermidine, arsenic and  $\beta$ -aminobutyric acid modulate tobacco

- resistance to tobacco mosaic virus, and affect local and systemic glucosylsalicylic acid levels and arginine decarboxylase gene expression in tobacco leaves. *Journal of Plant Physiology*, 166: 90–100.
- LEE T. M. (1997). Polyamine regulation of growth and chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) roots cultured *in vitro*. *Plant Science*, 122 (2): 111-117.
- LEEUWENHOEK, A. V. (1978). Observationes D. Anthonii Lewenhoeck, de natis'e semine genitali animalculis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 12 (142): 1040-1046.
- LECHOWSKA K., WOJTYLA L., QUINETM., KUBALA SZ., LUTTS S. AND GARNCZARSKA M. (2021). Endogenous polyamines and ethylene biosynthesis in relation to germination of osmoprimed brassica napus seeds under salt stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 23: 349.
- LEGOCKA J. AND SOBIESZCZUK-NOWICKA E. (2012). Sorbitol and NaCl stresses affect free, microsome-associated and thylakoid-associated polyamine content in *Zea mays* and *Phaseolus vulgaris*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34: 1145–1151.
- LENIS Y. Y., ELMETWALLY M. A., MALDONADO-ESTRADA J. G. AND BAZER F. W. (2017). Physiological importance of polyamines. *Zygote*. 25 (3): 244-255.
- LI C., JIAO J. AND WANG G. (2004). The important roles of reactive oxygen species in the relationship between ethylene and polyamines in leaves of spring wheat seedlings under root osmotic stress. *Plant Science*, 166: 303–315.
- LI C. L., JIA H. F., CHAI Y. M. AND SHEN Y. Y. (2011). Abscisic acid perception and signaling transduction in strawberry: A model for non-climacteric fruit ripening. *Plant Signaling and Behaviour*, 6: 1950–1953.
- LI S., JIN H. AND ZHANG Q. (2016). The effect of exogenous spermidine concentration on polyamine metabolism and salt tolerance in Zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.) subjected to short-term salinity stress. *Frontiers of plant sciences*, 7: 1221.
- LI S., CUI L., ZHANG Y., WANG Y. AND MAO P. (2017), the variation tendency of polyamines forms and components of polyamine metabolism in Zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.) to salt stress with exogenous spermidine application. *Frontiers of Physiology* 8: 208.
- LIANG Y. L. AND LUR, H. S. (2002). Conjugated and free polyamine levels in normal and aborting maize kernels. *Crop Science*, 42 (4): 1217-1224.
- LIU D., ZENG Y., QIU C. AND LIN Q. (2021). Molecular cloning and adversity stress expression analysis of spds genes in mulberry (*Morus notabilis*). *Russian Journal of Plant Physiology*, 68: 1186–1193.

- LIU J. H., KITASHIBA H., WANG J., BAN Y. AND MORIGUCHI T. (2007). Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. *Plant Biotechnology Journal*, 24: 117–126.
- LIU J. H., INOUE H. AND MORIGUCHI T. (2008). Salt stress-mediated changes in free polyamine titers and expression of genes responsible for polyamine biosynthesis of apple *in vitro* shoots. *Environmental and Experimental Botany*, 62: 28-35.
- LIU J., YU B. J. AND LIU Y. L. (2006). Effects of spermidine and spermine levels on salt tolerance associated with tonoplast H<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-PPase activities in barley roots. *Plant Growth Regulation*, 49: 119–126.
- LIU J. H., BAN Y., WEN X., NAKAJIMA I. AND MORIGUCHI T. (2009). Molecular cloning and expression analysis of an arginine decarboxylase gene from peach (*Prunus persica*). *Gene*, 429:10–17.
- LIU T., KIM D. W., NIITSU M. AND AL E. (2014). Polyamine oxidase 7 is a terminal catabolism-type enzyme in *Oryza sativa* and is specifically expressed in anthers. *Plant Cell Physiology*, 55: 1110–1122.
- LIU Q., NISHIBORI N., IMAI I. AND AL E. (2016). Response of polyamine pools in marine phytoplankton to nutrient limitation and variation in temperature and salinity. *Marine Ecology Progress Series*, 544: 93–105.
- LIU W., TAN M., ZHANG C. AND AL, E. (2017). Functional characterization of murB-potABCD operon for polyamine uptake and peptidoglycan synthesis in *Streptococcus suis*. *Microbiological research*, 207: 177–187.
- LOKESH V., MANJUNATHA G., HEGDE N. S., BULLE M., PUTHUSSERI B., GUPTA K. J. AND NEELWARNE B. (2019). Polyamine induction in postharvest banana fruits in response to no donor SNP occurs via l-arginine mediated pathway and not via competitive diversion of s-adenosyl-l-methionine. *Antioxidants*, 8 (9): 358.
- LOSAK T. AND RICHTER R. (2005). Split nitrogen doses and their efficiency in poppy (*Papaver somniferum* L.) nutrition. *Plant, Soil, and Environment, UZPI*, 50: 484–488.
- LUTTS S., HAUSMAN J., QUINET M. AND LEFÈVRE I. (2013). Polyamines and their roles in the alleviation of ion toxicities in plants. In: AHMAD P., AZOOZ M. AND PRASAD M. Eds. *Ecophysiology and responses of plants under salt stress*. Springer, New York, USA, 315–353.
- MADER J. C. (1997). Studies on polyamines in *Solanum tuberosum in vitro*: effects of DFMO, DFMA, chlorogenic acid and putrescine on the endogenous distribution of polyamines, tuberization and morphology. *Journal of Plant Physiology*, 150 (1-2): 141-152.

- MAHAJAN S. AND TUTEJA N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444: 139-158.
- MAJUMDAR R., BARCHI B., TURLAPATI S. A., GAGNE M., MINOCHA R., LONG S. AND MINOCHA S. C. (2016). Glutamate, ornithine, arginine, proline, and polyamine metabolic interactions: the pathway is regulated at the post-transcriptional level. *Frontiers in Plant Science*, 7:78.
- MALIK, A. U. AND ZORA, S. (2005). Pre-storage application of polyamines improves shelf-life and fruit quality of mango. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 80 (3): 363-369.
- MALMBERG R. L. AND CELLINO M. L. (1994). Arginine decarboxylase of oats is activated by enzymatic cleavage into two polypeptides. *The Journal of Biological Chemistry*, 269: 2703–2706.
- MARCO F., BUSÓ E. AND CARRASCO P. (2014). Overexpression of *samdc1* gene in *Arabidopsis thaliana* increases expression of defense-related genes as well as resistance to *Pseudomonas syringae* and *Hyaloperonospora Arabidopsidis*. *Frontiers in Plant Science*, 5: 115.
- MARIANI P., DORAZI D. AND BAGNI N. (1989). Polyamines in primary walls of carrot cells: endogenous content and interactions. *Journal of Plant Physiology*, 135: 508–510.
- MARTIN-TANGUY J. (2001): Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Regulation*, 34: 135-48.
- MARURI-LÓPEZ I. AND JIMÉNEZ-BREMONT J. F. (2017). Hetero- and homodimerization of *Arabidopsis thaliana* arginine decarboxylase AtADC1 and AtADC2, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 484 (3): 508-513,
- MATTHEWS H. R. (1993). My favourite molecule: polyamines, chromatin structure and transcription. *Bioessays*, 15 (8): 561-566.
- MATTOO A. K., SOBOLEV A. P., NEELAM A., GOYAL R. K., HANDA A.K. AND SEGRE A. L (2006). Nuclear magnetic resonance spectroscopy based metabolite profiles of transgenic tomato fruit engineered to accumulate polyamines spermidine and spermine reveal enhanced anabolic nitrogen-carbon interactions. *Plant Physiology*, 142: 1759–1770.
- MATTOO A. K. AND HANDA A.K. (2008). Higher polyamines restore and enhance metabolic memory in ripening fruit. *Plant Science*, 174: 386–393.
- MATTOO A. K., MINOCHA S. C., MINOCHA R. AND HANDA A. K. (2010). Polyamines and cellular metabolism in plants: transgenic approaches reveal different responses to diamine

- putrescine versus higher polyamines spermidine and spermine. *Amino Acids*, 38 (2): 405-13.
- MATTOO A. K., FATIMA T., UPADHYAY R. K. AND HANDA A. K. (2015). Polyamines in plants: biosynthesis from arginine, and metabolic, physiological and stress-response roles. *Amino Acids in Higher Plants*, 177-194.
- McCUE K. F. AND HANSON A. D. (1990). Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends in Biotechnology* 8: 358–362.
- McCURDY R. D., MCGRATH J. J. AND MACKAY-SIM A. (2008). Validation of the comparative quantification method of real-time PCR analysis and a cautionary tale of housekeeping gene selection. *Gene Therapy and Molecular Biology*, 12: 15-24.
- McWHINNEY D. R., DESHONG P. AND RODKEY L. S. (1995). Development of crosslinked polyamines suitable for synthesizing complex ampholytes for isoelectric focusing. *Applied And Theoretical Electrophoresis: The Official Journal of the International Electrophoresis Society*. 4 (4): 167-173.
- MEHTA A. M., SAFTNER R. A., SCHAEFFER G. W. AND MATTOO A. K. (1991). Translational modification of an 18 kilodalton polypeptide by spermidine in rice cell suspension cultures. *Plant Physiology*, 95: 1294–1297.
- MEHTA R. A., CASSOL T., LI N., ALI N., HANDA A. K. AND MATTOO A. K. (2002). Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality and vine life. *Nature Biotechnology*, 20:613–618.
- MENDEL Á., KOVÁCS L., HIDVÉGI N. AND KISS E. (2013). Isolation and characterization of promoters of genes involved in polyamine metabolism in strawberry. *Hungarian Molecular Life Sciences 2013: Programme and book of abstracts*, 287.
- MENDEL Á., KOVÁCS L. AND KISS E. (2013). A számóca poliamin metabolizmusában működő SAM-dekarboxiláz és SAM-szintáz gének promótereinek izolálása és jellemzése. In: Ferencz, Á (szerk.) "Környezettudatos gazdálkodás és menedzsment" : Gazdálkodás és Menedzsment Tudományos Konferencia. I-II kötet, pp. 208-212.
- MENDEL Á., KOVÁCS L., SZENTGYÖRGYI A., FEKETE S., POSTA K. AND KISS E. (2018). Expression patterns of ethylene and polyamine biosynthetic genes during fruit ripening in strawberry. *Studia Universitatis „Vasile Goldiș” Seria Stiintele Vietii*, 28 (4): 174-182.
- MENDEL Á., KOVÁCS L. AND KISS E. (2021). Effect of arginine, putrescine and spermidine on the polyamine, proline and chlorophyll content of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Acta Agraria Debreceniensis*, (2): 39-43.

- MENGOLI M., CHRIQUI D. AND BAGNI N. (1992). Putrescine biosynthesis and oxidation in normal and hairy root tobacco plants. *Journal of Plant Physiology*, 140: 153–155.
- METCALF B. W., BEY P., DANZIN C., JUNG M. J., CASARA P. AND VEVERT J.P. (1978). Catalytic irreversible inhibition of mammalian ornithine decarboxylase. *Journal of the American Chemical Society*, 100: 2551-2553.
- MINOCHA S. C. (1988). Relationship between polyamine and ethylene biosynthesis in plants and its significance for morphogenesis in cell cultures. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 250: 601–616.
- MINOCHA R., SHORTLE W. C., COUGHIN D. J. J. AND MINOCHA S. C. (1996). Effects of aluminum on growth, polyamine metabolism, and inorganic ions in suspension cultures of red spruce (*Picea rubens*). *Canadian Journal for Forest Research*, 26: 550–559.
- MINOCHA R., LEE J. S., LONG S., BHATNAGAR P. AND MINOCHA S. C. (2004). Physiological responses of wild type and putrescine-overproducing transgenic cells of poplar to variations in the form and concentration of nitrogen in the medium. *Tree Physiology*, 24: 551–560.
- MINOCHA S. C., PAPA N. S., KHAN A. J. AND SAMUELSEN A. I. (1991). Polyamines and somatic embryogenesis in carrot III; effects of methylglyoxal bis(guanylhydrazone). *Plant Cell Physiology*, 32: 395–402.
- MINOCHA S. C. AND MINOCHA R. (1995). *Role of polyamines in somatic embryogenesis*. Springer, Berlin, Heidelberg
- MIRDEHGHAN S. H., ESMAEILIZADEH M. AND PIRZAD F. (2015). Effect of pre-harvest application of polyamines on quality and shelf life of kiwifruit *cv.* Hayward. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 46 (3): 387-398.
- MISTRY S. K., BURWELL T. J., CHAMBERS R. M. RUDOLPH-OWEN L., SPALTMANN F., COOK W. J. AND MORRIS S. M. JR (2002). Cloning of human agmatinase. An alternate path for polyamine synthesis induced in liver by hepatitis b virus. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 282 (2): G375-G381.
- MITSUMI Y., TAKAHASHI Y., BERBERIC T., MIYAZAKI, A., MATSUMURA H., TAKAHASHI H., TERAUCHI R. AND KUSANO T. (2009). Spermine signaling plays a significant role in the defense response of *Arabidopsis thaliana* to cucumber mosaic virus. *Journal of Plant Physiology*, 166: 626-643.
- MIURA K. (2013). Nitrogen and phosphorus nutrition under salinity stress. In: AHMAD P., PRASAD M. N. V. AND AZOOZ M. M. Eds. *Ecophysiology and responses of plants under salt stress*. Springer, New York, 425–441.

- MO H. AND PUA E.C. (2002). Up-regulation of arginine decarboxylase gene expression and accumulation of polyamines in mustard (*Brassica juncea*) in response to stress. *Physiologia Plantarum* 114: 439–449.
- MOHAMMADI H., GHORBANPOUR M. AND BRESTIC M. (2018). Exogenous putrescine changes redox regulations and essential oil constituents in field-grown *Thymus vulgaris* L. under well-watered and drought stress conditions. *Industrial Crops and Products*, 122: 119–132.
- MOHAPATRA S., MINOCHA R., LONG S. AND MINOCHA S. C. (2009a). Putrescine overproduction negatively impacts the oxidative state of poplar cells in culture. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 262–271.
- MOHAPATRA S., MINOCHA R., LONG S. AND MINOCHA S. C. (2009b). Transgenic manipulation of a single polyamine in poplar cells affects the accumulation of all amino acids. *Amino Acids*, 38: 1117–1129.
- MOINARD, C., CYNOBER, L. AND DE BANDT, J. P. (2005). Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clinical Nutrition*. 24: 184–97.
- MONTAGUE M. J., KOPPENBRINK J. W. & JAWORSKI E. G. (1978). Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota*: I. Changes in intracellular content and rates of synthesis. *Plant Physiology*, 62 (3): 430-433.
- MONTAGUE M. J., ARMSTRONG T. A. AND JAWORSKI E. G., (1979). Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota* II; changes in arginine decarboxylase activity. *Plant Physiology*, 63: 341–345.
- MONTASSER-KOUHSARI S., KEITH G. AND WEIL G. H. (1978). Methylation of yeast tRNAPhe by enzymes from cytoplasm, chloroplasts and mitochondria of *Phaseolus vulgaris*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 521: 576–583.
- MOREIRA-VILAR F. C., SIQUEIRA-SOARES R. DE C., FINGER-TEIXEIRA A., MATIAS DE OLIVEIRA D., ANA PAULA FERRO A. P., JACKSON DA ROCHA G., MARIA DE LOURDES L. FERRARESE, DANTAS DOS SANTOS W. AND FERRARESE-FILHO O. (2014). The acetyl bromide method is faster, simpler and presents best recovery of lignin in different herbaceous tissues than Klason and thioglycolic acid methods. *PLOS ONE*, 9 (10): e110000.
- MORGAN P.W. AND DREW M.C. (1997): Ethylene and plant responses to stress. *Physiologia Plantarum*, 100: 620–630.
- MORRIS S. M. JR (2002). Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 22 (1): 87-105.

- MORRIS S. M. JR, (2004). Enzymes of arginine metabolism. *The Journal of Nutrition*, 134 (10): 2743S-2747S.
- MORTAZAVI S. M. H., SIRUIE B., MOALEMI N. AND ESHGHI S. (2012). The effects of polyamines and UV-C irradiation on postharvest quality of strawberry fruit. In: VII. International Strawberry Symposium, 1049: 749-754.
- MOSCHOU P. N., PASCHALIDIS K. A., DELIS I. D., ANDRIOPOULOU A. H., LAGIOTIS G. D., YAKOUMAKIS D. I. AND ROUBELAKIS-ANGELAKIS K. A. (2008a). Spermidine exodus and oxidation in the apoplast induced by abiotic stress is responsible for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signatures that direct tolerance responses in tobacco. *The Plant Cell*, 20: 1708–1724.
- MOSCHOU P. N., DELIS I. D., PASCHALIDIS K. A. AND ROUBELAKIS-ANGELAKIS K. A. (2008b). Transgenic tobacco plants overexpressing polyamine oxidase are not able to cope with oxidative burst generated by abiotic factors. *Physiologia Plantarum*, 133: 140–156.
- MOSCHOU P. N., PASCHALIDIS K. A. AND ROUBELAKIS-ANGELAKIS K. A. (2008C). Plant polyamine catabolism. *Plant Signaling and Behavior*, 3: 1061–1066.
- MOVAHED N., ESHGHI S., TAFAZOLI E. AND JAMALI B. (2010). Effects of polyamines on vegetative characteristics, growth, flowering and yield of strawberry ('Paros' and 'Selva'). In: XXVIII. International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010), 926: 287-293.
- MURKOWSKI A. (2001). Heat stress and spermidine: effect on chlorophyll fluorescence in tomato plants. *Biologia Plantarum*, 44 (1): 53-57.
- MUSTAFAVI S. H., BADI H. N., SEKARA A., MEHRAFARIN A., JANDA T., GHORBANPOUR M. AND RAFIEE H. (2018). Polyamines and their possible mechanisms involved in plant physiological processes and elicitation of secondary metabolites. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40:102.
- MÜLLER M. AND MUNNÉ-BOSCH S. (2015). Ethylene response factors: a key regulatory hub in hormone and stress signaling. *Plant Physiology*, 169: 32-41.
- NAM K. H., LEE S. H. AND LEE J. (1997). Differential expression of ADC mRNA during development and upon acid stress in soybean (*Glycine max*) hypocotyls. *Plant and Cell Physiology* 38: 1156–1166.
- NAMBEESAN S., MATTOO A. K. AND HANDA A. K. (2008): Polyamines and regulation of ripening and senescence. In: PALIYATH G., MURR D. P., HANDA A. K. AND LURIE S. Eds. *Postharvest biology and technology of fruits, vegetables, and flowers*. Wiley-Blackwell, USA, 319–340.



- NAMBEESAN S., ABUQAMAR S., LALUK K., MATTOO A. K., MICKELBART M. V., FERRUZZI M. G., MENGISTE T. AND HANDA A. K. (2012). Polyamines attenuate ethylene-mediated defense responses to abrogate resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. *Plant Physiology*, 158: 1034–1045.
- NAS M. N. (2004). Inclusion of polyamines in the medium improves shoot elongation in hazelnut (*Corylus avellana* L.) micropropagation. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 28 (3): 189-194.
- NANDY S., DAS T., TUDU C. K., MISHRA T., GHORAI M., GADEKAR V. S., ANAND U., KUMAR M., BEHL T., SHAIKH N. K., JHA N. K., SHEKHAWAT M. S., PANDEY D. K, DWIVEDI P., RADHA AND DEY A. (2022). Unravelling the multi-faceted regulatory role of polyamines in plant biotechnology, transgenics and secondary metabolomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-25.
- NÉMETH M., JANDA T., HORVÁTH E., PÁLDI E. AND SZALAI G. (2002). Exogenous salicylic acid increases polyamine content but may decrease drought tolerance in maize. *Plant Science*, 162 (4): 569-574.
- NEVES G. Y. S., MARCHIOSI R., FERRARESE M. L. L., SIQUEIRA-SOARES R. C. AND FERRARESE-FILHO O. (2010). Root growth inhibition and lignification induced by salt stress in soybean. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 196: 467-473.
- NOH E. AND MINOCHA S. C. (1994). Expression of a human s-adenosyl-methionine decarboxylase cDNA in transgenic tobacco and its effects on polyamine biosynthesis. *Transgenic Researches*, 3: 26–35.
- NORDIN A. AND NÄSHOLM T. (1997). Nitrogen storage forms in nine boreal understorey plant species. *Oecologia*, 110: 487–492.
- ONDO OVONO P., KEVERS C. AND DOMMES J. (2010). Tuber formation and development of *Dioscorea cayenensis–Dioscorea rotundata* complex *in vitro* effect of polyamines. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 46 (1): 81-88.
- PASCHALIDIS K. A. AND ROUBELAKIS-ANGELAKIS K. A. (2005). Sites and regulation of polyamine catabolism in the tobacco plant. Correlations with cell division/expansion, cell cycle progression, and vascular development. *Plant Physiology*, 138 (4): 2174–2184.
- PANICOT M., MINGUET E. G., FERRANDO A., ALCAZÁR R., BLÁZQUEZ M. A., CARBONELL J., ATABELLA T., KONCZ C. AND TIBURCIO A. F. (2002). Polyamin metabolon involving aminopropyl transferase complexes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 14: 2539-2551.

- PAUL S. AND ROYCHOUDHURY A. (2017). Seed priming with spermine and spermidine regulates the expression of diverse groups of abiotic stress-responsive genes during salinity stress in the seedlings of Indica rice varieties. *Plant Gene* 11: 124–132.
- PARK M. H., COOPER H. L. AND FOLK J. E. (1981). Identification of hypusine, an unusual amino acid, in a protein from human lymphocytes and of spermidine as its biosynthetic precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78: 2869–2873.
- PARK J. H., ARAVIND L., WOLFF E. C, KAEVEL J., KIM Y. S. AND PARK M. H. (2006). Molecular cloning, expression, and structural prediction of deoxyhypusine hydroxylase: a heat-repeat-containing metalloenzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103: 51–56.
- PASCHALIDIS K. AND ROUBELAKIS-ANGELAKIS K. A. (2005). Sites and regulation of polyamine catabolism in the tobacco plant correlations with cell division/expansion, cell cycle progression, and vascular development. *Plant Physiology*, 138: 2174–2184.
- PATEL J., ARIYARATNE M., AHMED S., GE L., PHUNTUMART V., KALINOSKI A. AND MORRIS P. F. (2017). Dual functioning of plant arginases provides a third route for putrescine synthesis. *Plant Science*, 262: 62-73.
- PATEL N., GANTAIT S. AND PANIGRAHI J. (2019). Extension of postharvest shelf-life in green bell pepper (*Capsicum annuum* L.) using exogenous application of polyamines (spermidine and putrescine). *Food Chemistry*, 275: 681-687.
- PÁL M., HORVÁTH E., JANDA T., PÁLDI E. AND SZALAI G. (2006). Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 169 (2): 239-246.
- PÁL M., KOVÁCS V., VIDA G., SZALAI G. AND JANDA T. (2013). Changes induced by powdery mildew in the salicylic acid and polyamine contents and the antioxidant enzyme activities of wheat lines. *European Journal of Plant Pathology*, 135 (1): 35-47.
- PÁL M., SZALAI G. AND JANDA T. (2015). Speculation: polyamines are important in abiotic stress signaling. *Plant Science*, 237: 16-23.
- PÁL M., TAJTI J., SZALAI G., PEEVA V., VÉGH B. AND JANDA T. (2018). Interaction of polyamines, abscisic acid and proline under osmotic stress in the leaves of wheat plants. *Scientific reports*, 8 (1): 12839.
- PEDROS A. R., MACLEOD M. R., ROSS H. A., MCRAE D., TIBURCIO A. F., DAVIES H. V. AND TAYLOR M. A. (1999). Manipulation of s-adenosylmethionine decarboxylase activity in potato tubers. *Planta*, 209 (1): 153-160.

- PEGG A. E. (2016). Functions of polyamines in mammals. *Journal of Biological Chemistry*, 291: 14904–14912.
- PENG J., LI Z., WEN X., LI W., SHI H., YANG L., ZHU H. AND GUO H. (2014). Salt-induced stabilization of EIN3/EIL1 confers salinity tolerance by deterring ROS accumulation in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics*, 10 (10): e1004664.
- PEREMARTI A., BASSIE L., CHRISTOU P. AND CAPELL T. (2009). Spermine facilitates recovery from drought but does not confer drought tolerance in transgenic rice plants expressing *Datura stramonium* S-adenosylmethionine decarboxylase. *Plant Molecular Biology*, 70: 253–264.
- PEREMARTI A., BASSIE L., ZH C., CHRISTOU P., CAPELL T. (2010). Molecular characterization of the arginine decarboxylase gene family in rice. *Transgenic Research*, 19: 785–797.
- PÉREZ-AMADOR M. A., CARBONELL J. AND GRANEL A. (1995). Expression of arginine decarboxylase is induced during early fruit development and in young tissues of *Pisum sativum* (L.). *Plant Molecular Biology*, 28: 997-1009.
- PÉREZ-AMADOR M. A., LEON J., GREEN P. J. AND CARBONELL J. (2002). Induction of the arginine decarboxylase ADC2 gene provides evidence for the involvement of polyamines in the wound response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 130:1454–1463.
- PÉREZ-VICENTE A., MARTÍNEZ-ROMERO D., CARBONELL Á., SERRANO M., RIQUELME F., GUILLÉN F. AND VALERO D. (2002). Role of polyamines in extending shelf life and the reduction of mechanical damage during plum (*Prunus salicina* lindl.) storage. *Postharvest Biology and Technology*, 25 (1): 25-32.
- PERKINS-VEAZIE P. (1995). Growth and ripening of strawberry fruit. *Horticultural Reviews*, 17: 267-297.
- PERKINS-VEAZIE P. M., HUBER D. J. AND BRECHT J. K. (1996). In vivo growth and ripening of strawberry fruit in the presence of ACC, STS or propylene. *Annals of Applied Biology*, 128:105-116.
- PEYNEVANDI K. M., RAZAVI S. M. AND ZAHRI S. (2018). The ameliorating effects of polyamine supplement on physiological and biochemical parameters of *Stevia rebaudiana* Bertoni under cold stress. *Plant Production Science*, 21: 123–131.
- PHENGCHAT R., TAKATA H., MORI, K. INADA N., MURAKOSHI H., UCHIYAMA S. AND FUKUI K. (2016). Calcium ions function as a booster of chromosome condensation. *Scientific Reports*, 6: 38281.
- PIERIK R. L. M. (1997). *In vitro* culture of higher plants. Springer science & business media.

- PIERUZZI F. P., DIAS L. L. C., BALBUENA T. S., SANTA-CATARINA C., SANTOS, A. L. W. AND FLOH E. I. S. (2011). Polyamines, IAA and ABA during germination in two recalcitrant seeds: *Araucaria angustifolia* (Gymnosperm) and *Ocotea odorifera* (Angiosperm). *Annals of Botany*, 108 (2): 337-345.
- PIGNATTI C., TANTINI B., STEFANELLI C. AND FLAMIGNI F. (2004). Signal transduction pathways linking polyamines to apoptosis. *Amino Acids*, 27: 359–365.
- PLANCHET E., VERDU J., DELAHAIE J., CUKIER C., GIRARD C., MORÈRE-LE PAVEN M. C. AND LIMAMI A. M. (2014). Abscisic acid-induced nitric oxide and proline accumulation in independent pathways under water-deficit stress during seedling establishment in *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany*, 65 (8): 2161-70.
- PODWYSZYŃSKA M., KOSSON R. AND TREDER J. (2015). Polyamines and methyl jasmonate in bulb formation of *in vitro* propagated tulips. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 123 (3): 591-605.
- PORANKIEWICZ J. AND GWÓŹDŹ E. A.: (1993). Heat shock proteins and their role in plant cell. *Post Biol Komórki*, 20 (2): 155–170.
- PORRA R. J., THOMPSON W. A. AND KRIEDEMANN P. E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 975: 384-394.
- PRIMIKIRIOS N. I. AND ROUBELAKIS-ANGELAKIS K. A. (1999). Cloning and expression of an arginine decarboxylase cDNA from *Vitis vinifera* L. cell-suspension cultures. *Planta* 208: 574–582.
- RAEISI M., SAMAN, R. B. AND HONARVAR M. (2013). Application of exogenous spermidine treatment for reducing of chilling on fruit quality and quantity of Valencia orange *var.* Olinda. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 2: 1292-1297.
- RAJAM M. V. (1997). Polyamines. In: PRASAD M. N. V. Ed. *Plant Ecophysiology*. John Wiley New York, 343–374.
- RAMEZANIAN A. AND RAHEMI M. (2009). Effect of pre-storage application of spermidine, calcium chloride and hot water on chilling injury of cold stored pomegranate. In: VI International Postharvest Symposium, 877: 491-498.
- RASTOGI R., DULSON J. AND ROTHSTEIN S. J. (1993). Cloning of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) arginine decarboxylase gene and its expression during fruit ripening. *Plant Physiology*, 103: 829-834.

- RAVANEL S., GAKIERE B., JOB D. AND DOUCE R. (1998). The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 7805–7812.
- RENNENBERG H., KREUTZER K., PAPEN H. AND WEBER P. (1998). Consequences of high loads of nitrogen for spruce (*Picea abies*) and beech (*Fagus sylvatica*) forests. *New Phytology*, 139 (7): 1–86.
- RENNENBERG H., WILDHAGEN H. AND EHLTING B. (2010). Nitrogen nutrition of poplar trees. *Plant Biology*, 12: 275–291.
- ROBIE C. A. AND MINOCHA, S. C. (1989). Polyamines and somatic embryogenesis in carrot. I. The effects of difluoromethylornithine and difluoromethylarginine. *Plant Science*, 65 (1): 45-54.
- RODRÍGUEZ-KESSLER M., ALPUCHE-SOLÍS A. G., RUIZ O. A. AND JIMENEZ-BREMONT J. F. (2006). Effect of salt stress on the regulation of maize (*Zea mays* L.) genes involved in polyamine biosynthesis. *Plant Growth Regulation*, 48 (2): 175-185.
- ROEDER S., DRESCHLER K., WIRTZ M., CRISTESCU S. M., FRANS J. M. VAN HARREN, HELL R. AND PIECHULLA B. (2009). SAM levels, gene expression of SAM synthase, methionine synthase and ACC oxidase, and ethylene emission from *N. suaveolens* flowers. *Plant Molecular Biology*, 70: 535-546.
- ROMERO F. M., MAIALE S. J., ROSSI F. R., MARINA M., RUÍZ O. A. AND GÁRRIZ A. (2018). Polyamine metabolism responses to biotic and abiotic stress. In: ALCAZAR R. AND TIBURCIO A. F. Eds. *Polyamines: methods and protocols, methods in molecular biology*, 1694: 37-49.
- ROSENHEIM O. (1924). The isolation of spermine phosphate from semen and testis. *Biochemical Journal*, 18: 1253–1263.
- ROUSTAN J. P., LATCH, A. AND FALLOT J. (1994). Role of ethylene on induction and expression of carrot somatic embryogenesis: relationship with polyamine metabolism. *Plant Science*, 103 (2): 223-229.
- ROY M. AND GOSH B. (1996). Polyamines, both common and uncommon, under heat stress in rice (*Oryza sativa*) callus. *Physiologiae Plantarum*, 98: 196–200.
- ROY P., NIYOGI K., SENGUPTA D. N. AND GHOSH B. (2005): Spermidine treatment to rice seedlings recovers salinity stress-induced damage of plasma membrane and PM-bound H<sup>+</sup>-ATPase in salt-tolerant and salt-sensitive rice cultivars. *Plant Science*, 168: 583-591.

- RUGINI E., JACOBONI A. AND LUPPINO M. (1993). Role of basal shoot darkening and exogenous putrescine treatments on *in vitro* rooting and on endogenous polyamine changes in difficult-to-root woody species. *Scientia Horticulturae*, 53 (1-2): 63-72.
- RUSSELL D. H. (1971). Increased polyamine concentrations in the urine of human cancer patients. *Nature*, 233: 144-145.
- SAGOR G. H. M., CONG R. Z., BERBERICH T., TAKAHASHI H., TAKAHASHI Y. AND KUSANO T. (2009). Spermine signaling in defense reaction against avirulent viral pathogen in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling and Behavior*, 4 (4): 316-318.
- SAHA J., BRAUER E. K., SENGUPTA A., POPESCU S. C., GUPTA K. AND GUPTA B. (2015). Polyamines as redox homeostasis regulators during salt stress in plants. *Frontiers in Environmental Sciences*, 3: 1-13.
- SALEETHONG P., SANITCHON J., KNOG-NGERN K. AND THEERAKULPISUT P. (2011). Pretreatment with spermidine reverse inhibitory effects of salt stress in two rice (*Oriza sativa* L.) cultivars differing in their tolerance. 'Asia'n Journal of Plant Science, 10: 245–254.
- SÁNCHEZ-AGUAYO I., RODRÍGUEZ-GALÁN J. M., GARCÍA R., TORREBLANCA J. AND PARDO J. M. (2004). Salt stress enhances xylem development and expression of S-adenosyl-L-methionine synthase in lignifying tissues of tomato plants. *Planta*, 220: 278–285.
- SÁNCHEZRODRÍGUEZ, E., ROMERO, L. AND RUIZ, J. M. (2016). Accumulation of free polyamines enhances the antioxidant response in fruits of grafted tomato plants under water stress. *Journal of Plant Physiology*, 190: 72–78.
- SANFORD J. C., SMITH F. D. and RUSSELL J. A. (1993). Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods in enzymology*. 217: 483-509.
- SCHLEIDEN M. J. (1838). Beiträge zur Phytogenesis. *Archiv für Anatomie, Physiologie, und wissenschaftliche Medicin*, 137-176.
- SCHREINER P. (1878). Über eine neue organische basis in thierischen organismen. *Liebigs Annalen der Chemie*, 194: 68–84.
- SCHUBER F. (1989). Influence of polyamines on membrane function. *Biochemical Journal*, 260: 1–10.
- SCHWANN T. (1839). Mikroskopische Untersuchungen ueber die Ueberstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Thiers und Pflanzen.
- SCOTT M. S., TROSHIN P. V. AND BARTON G. J. (2011). NoD: a Nucleolar localization sequence detector for eukaryotic and viral proteins. *BMC Bioinformatics*, 12: 317.

- SEEMANN J. R., BERRY J. A. AND DOWNTON W. J. S. (1984). Photosynthetic response and adaptation to high temperature in desert plants. A comparison of gas exchange and fluorescence methods for studies of thermal tolerance. *PLANT PHYSIOLOGY*, 75: 364–368.
- SEIFI H. S., ZAREI A., HSIANG T. AND SHELP B. J. (2019). Spermine is a potent plant defense activator against gray mold disease on *Solanum lycopersicum*, *Phaseolus vulgaris*, and *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology*, 109 (8):1367-1377.
- SERAFINI-FRACASSINI D., SANDRO A. D. AND DUCA S. D. (2010). Spermine delays leaf senescence in *Lactuca sativa* and prevents the decay of chloroplast photosystems. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 602–611.
- SERRANO M., ZAPATA P. J., MARTÍNEZ-ROMERO D., DÍAZ-MULA H. M. AND VALERO, D. (2016). Polyamines as an ecofriendly postharvest tool to maintain fruit quality. *Eco-Friendly Technology for Postharvest Produce Quality*. 219-242.
- SEQUERA-MUTIOZABAL M., ANTONIOU C., TIBURCIO A. F., ALCÁZAR R. AND FOTOPOULOS V. (2017). Polyamines: emerging hubs promoting drought and salt stress tolerance in plants. *Current Molecular Biology Reports*, 3 (1): 28-36.
- SHAHID M. A., BALAL R. M., PERVEZ M. A., ABBAS T., AQEEL M. A., JAVAID M. M. AND GARCIA-SANCHEZ F. (2014). Exogenous proline and proline-enriched *Lolium perenne* leaf extract protects against phytotoxic effects of nickel and salinity in *Pisum sativum* by altering polyamine metabolism in leaves. *Turkish Journal of Botany*, 38 (5): 914-926.
- SHANTZ L. M. AND PEGG A. E. (1999). Translational regulation of ornithine decarboxylase and other enzymes of the polyamine pathway. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 31 (1): 107-122.
- SHAO L., BHATNAGAR P., MAJUMDAR R., MINOCHA R. AND MINOCHA S. C. (2014). Putrescine overproduction does not affect the catabolism of spermidine and spermine in poplar and *Arabidopsis*. *Amino Acids*. 46 (3): 743-57.
- SHEN W., KAZUYOSHI N. AND SHOJI T. (2000): Involvement of polyamines in the chilling tolerance of cucumber cultivars. *Plant Physiology*, 124 (1): 431–440.
- SHEN B., LI C. AND TARCZYNSKI M. C. (2002). High free-methionine and decreased lignin content result from a mutation in the *Arabidopsis* S-adenosyl-L-methionine synthetase 3 gene. *Plant Journal*, 29: 371–380.
- SHEN Y. Y. AND ROSE J. K. C. (2014). ABA metabolism and signaling in fleshy fruits. In: ZHANG D. P. Ed. *Abscisic acid: metabolism, transport and signaling*. 271–286.

- SHEOKAND S., KUMARI A. AND SAWHNEY V. (2008). Effect of nitric oxide and putrescine on antioxidative responses under NaCl stress in chickpea plants. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 14: 355–362.
- SHI D. C. AND YIN L. J. (1993). Difference between salt (NaCl) and alkaline (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) stresses on *Puccinellia tenuiflora* (Griseb.) Scribn et Merr. plants. *Acta Botanica Sinica*, 3: 144–149.
- SHI K., HUANG Y. Y., XIA X. J., ZHANG Y. L., ZHOU Y. H. AND YU J. Q. (2008). Protective role of putrescine against salt stress is partially related to the improvement of water relation and nutritional imbalance in cucumber. *Journal of Plant Nutrition*, 31: 1820–1831.
- SHU S., GUO S R, SUN J. AND YUAN L. Y. (2012). Effects of salt stress on the structure and function of the photosynthetic apparatus in *Cucumis sativus* and its protection by exogenous putrescine. *Physiologia Plantarum*, 146 (3): 285-96.
- SHU S., YUAN L. Y., GUO S. R., SUN J. AND YUAN Y. H. (2013). Effects of exogenous spermine on chlorophyll fluorescence, antioxidant system and ultrastructure of chloroplasts in *Cucumis sativus* L. under salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 63: 209-216.
- SHUKLA V., MA Y. and MEREWITZ E. (2015). Creeping bentgrass responses to drought stress and polyamine application. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 140 (1): 94-101.
- SHULAEV V., SARGENT D. J., CROWHURST R. N., MOCKLER T. C., FOLKERTS O., DELCHER A. L., JAISWAL P., MOCKAITIS K., LISTON A., MANE S. P., BURNS P., DAVIS T. M., SLOVIN J. P., BASSIL N., HELLENS R. P., EVANS C., HARKINS T., KODIRA C., DESAN B., CRASTA O. R., JENSEN R. V., ALLAN A. C., MICHAEL T. P., SETUBAL J. C., CELTON J., REES D. J. G., WILLIAMS K. P., HOLT S. H., ROJAS J. J. R., CHATTERJEE M., LIU B., SILVA H., MEISEL L., ADATO A., FILICHKIN S. A., TROGGIO M., VIOLA R., ASHMAN T., WANG H., DHARMAWARDHANA P., ELSER J., RAJA R., PRIEST H. D., BRYANT D. W. JR., FOX S. E., GIVANS. A., WILHELM L. J., NAITHANS., CHRISTOFFELS A., SALAMA D. Y., CARTER J, GIRONA E. L., ZDEPSKI A., WANG W., KERSTETTER R. A., SCHWAB W., KORBAN S. S., DAVIK J., MONFORT A., DENOYES-ROTHAN B., ARUS P., MITTLER R., FLINN B, AHARONI A., BENNETZEN J. L., SALZBERG S. L., DICKERMAN A. W., VELASCO R., BORODOVSKY M., VEILLEUX R. E. AND FOLTA K. M. (2011). The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nature Genetics*, 43: 109-116.



- SIMPSON C. G., CULLEN D. W., HACKETT C. A., SMITH K., HALLETT P. D., MCNICOL J., WOODHEAD M. AND GRAHAM J. (2016). Mapping and expression of genes associated with raspberry fruit ripening and softening. *Theoretical and Applied Genetics*, 130: 557-572.
- SIVAMANI E., DELONG R. K. AND QU R. (2009). Protamine-mediated dna coating remarkably improves bombardment transformation efficiency in plant cells. *Plant Cell Reports*. 28 (2): 213-221.
- SLOCUM R. D. (1991). Tissue and subcellular localization of polyamines and enzymes of polyamine metabolism. In: SLOCUM R. D. AND FLORES H. E., Eds. *Biochemistry And Physiology of Polyamines in Plants*, 93–105.
- SLOCUM R. D. (2005). Genes, enzymes and regulation of arginine biosynthesis in plants.. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43 (8): 729–745.
- SMITH T. A. (1985). Polyamines. *Annual Review of Plant Physiology*, 36 (1): 117–143.
- SMITH M. A. AND DAVIES P. J. (1985). Separation and quantitation of polyamines in plant tissue by High Performance Liquid Chromatography of their dansyl derivatives. *Plant Physiology*, 78: 89-91.
- SMITA, R. AND UPENDRANATH D. (2008). Manipulation of lignin in plants with special reference to O-methyltransferase. *Plant Science*, 174: 264–277.
- SOBIESZCZUK-NOWICKA E. AND LEGOCKA J. (2013). Plastid-associated polyamines: their role in differentiation, structure, functioning, stress response and senescence, *Plant Biology*, 16 (2): 297-305.
- SOUDEK P., URSU M., PETROVÁ Š. AND VANĚK T. (2016). Improving crop tolerance to heavy metal stress by polyamine application. *Food chemistry*. 213: 223-229.
- SOYKA S. AND HEYER A. G. (1999): *Arabidopsis* knockout mutation of *ADC2* gene reveals inducibility by osmotic stress. *FEBS Letters*, 458 (2): 219-223.
- SRIVASTAVA A., CHUNG S. H., FATIMA T., DATSENKA T., HANDA A. K. AND MATTOO A. K. (2007). Polyamines as anabolic growth regulators revealed by transcriptome analysis and metabolite profiles of tomato fruits engineered to accumulate spermidine and spermine. *Plant Biotechnology*. 24: 57–70.
- STARCK Z., WAZYNSKA Z. AND KUCEWICZ O. (1993). Comparative effects of heat stress on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tomato plants with source-sink modulated by growth regulators. *Acta Physiologiae Plantarum*, 16: 125–133.

- SUN J. H., LUO J. J., TIAN L., LI C. L., XING Y. AND SHEN Y. Y. (2013). New evidence for the role of ethylene in strawberry fruit ripening. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32: 461-470.
- SUN X., WANG Y., TAN J. AND AL E. (2018). Effects of exogenous putrescine and D-Arg on physiological and biochemical indices of anthurium under chilling stress. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 34: 152–157.
- SZABADOS L. AND SAVOURÉ A. (2010). Proline: A multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15: 89–97.
- SZALAI G., JANDA K., DARKÓ É., JANDA T., PEEVA V. AND PÁL M. (2017). Comparative analysis of polyamine metabolism in wheat and maize plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 112: 239-250.
- SZEPESI Á. (2011). Interaction between salicylic acid and polyamines and their possible roles in tomato hardening processes. *Acta Biologica Szegediensis*, 55 (1): 165-166.
- TABOR C. W. AND TABOR H. (1984). Polyamines. *Annual Review of Biochemistry* 53: 749-790.
- TAKÁCS Z., POÓR P. AND TARI I. (2016). Comparison of polyamine metabolism in tomato plants exposed to different concentrations of salicylic acid under light or dark conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 108: 266-278.
- TAKAHASHI Y., BERBERIC, T., MIYAZAKI A., SEO S., OHASHI Y. AND KUSANO T. (2003). Spermine signalling in tobacco: activation of mitogen-activated protein kinases by spermine is mediated through mitochondrial dysfunction. *Plant Journal*, 36:8 20-829.
- TAKAHASHI Y., UEHARA Y., BERBERICH T., ITO A., SAITOH H., MIYAZAKI A., TERAUCHI R. AND KUSANO T. (2004). A subset of hypersensitive response marker genes, including *hsr203j*, is the downstream target of a spermine signal transduction pathway in tobacco. *Plant Journal*, 40: 586-595.
- TAKAHASHI Y., ONO K., AKAMINE Y., ASAN, T., EZAKI M. AND MOURI I. (2017). Highly-expressed polyamine oxidases catalyze polyamine back conversion in *brachypodium distachyon*. *JOURNAL OF PLANT RESEARCH*, 131: 341–348.
- TAKEDA T., HAYAKAWA F., OE K. AND MATSUOKA H. (2002). Effects of exogenous polyamines on embryogenic carrot cells. *Biochemical Engineering Journal*, 12 (1): 21-28.
- TAKIGAWA M., ENOMOTO M., NISHIDA Y., PAN H.O., KINOSHITA A. AND SUZUKI F. (1990). Tumor angiogenesis and polyamines:  $\alpha$ -difluoromethylornithine, an irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, inhibits b16 melanoma-induced angiogenesis in ovo

- and the proliferation of vascular endothelial cells *in vitro*. *Cancer Reserarches*. 50: 4131–8.
- TAMURA F., ITAI A., FRANCO-MORA O. AND TANABE K. (2006). The influence of putrescine on fruit set and fruit size in 'housui' japanese pear. XXVII International Horticultural Congress-IHC2006: International Symposium on Endogenous and Exogenous Plant Bioregulators. 774: 297-300.
- TANG W. AND NEWTON R. J. (2005). Polyamines reduce salt-induced oxidative damage by increasing the activities of antioxidant enzymes and decreasing lipid peroxidation in Virginia pine. *Plant Growth Regulation*, 46: 31–43.
- TARCZYNSKI M. C., JEHSEN R. G. AND BOHNERT H. J. 1(992). Expression of a bacterial *mtld* gene in transgenic tobacco leads to production and accumulation of mannitol. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES*, 89 (7): 2600–2604.
- TAREZYNSKI M. C., JENSEN R. G. AND BOHNERT H. J. (1993). Stress-protection of transgenic tobacco by production of osmolyte mannitol. *Science*, 259: 508-510.
- TASSONI A., BUUREN M. V., FRANCESCHETTI M., AND AL E. (2000). Polyamine content and metabolism in *arabidopsis thaliana* and effect of spermidine on plant development. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38: 383–393.
- THEBUT R. AND SANTARIUS K. A. (1982). Effects of high temperature stress on various biomembranes of leaf cell in situ and *in vitro*. *Plant Physiology*, 70: 200–205.
- TILAK P. AND RAYMOND M. A. (1996). Polyamines in normal and auxin-induced strawberry fruit development. *Physiologia Plantarum*, 98: 447-454.
- TOME M. E. AND GERNER E. W (1997.) Cellular eukaryotic initiation factor 5a content as a mediator of polyamine effects on growth and apoptosis. *Neurosignals*, 6 (3):150–156.
- TORRIGIANI P., SERAFINI-FRACASSINI D., BIONDI S. AND BAGNI N. (1986). Evidence for the subcellular localization of polyamines and their biosynthetic enzymes in plant cells. *Journal of Plant Physiology*, 124: 23-29.
- TORRIGIANI P., BRESSANIN D., RUIZ K. B., TADIELLO A., TRAINOTTI L., BONGHI C., ZIOSI V. AND COSTA G. (2012). Spermidine application to young developing peach fruits leads to a slowing down of ripening by impairing ripening-related ethylene and auxin metabolism and signaling. *Physiology Plantarum*, 146: 86–98.
- TORRIGIANI P., BREGOLI A. M., ZIOSI V., SCARAMAGLI S., CIRIACI T., RASORI A. AND COSTA, G. (2004). Pre-harvest polyamine and aminoethoxyvinylglycine (AVG) applications modulate fruit ripening in Stark Red Gold nectarines (*Prunus persica* L. Batsch). *Postharvest Biology and Technology*. 33 (3): 293-308.

- TORRIGIANI P., BREGOLI A. M., ZIOSI V. AND COSTA G. (2008). Molecular and biochemical aspects underlying polyamine modulation of fruit development and ripening. *Stewart Postharvest Reviews*, 4 (2): 1-12.
- TRAINOTTI L., SPINELLO R., PIOVAN A., SPOLAORE S. AND CASADORO G. (2001).  $\beta$ -Galactosidases with a lectin-like domain are expressed in strawberry. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1635–1645.
- TRAINOTTI L., ZANIN D. AND CASADORO G., (2003). A cell wall-oriented genomic approach reveals a new and unexpected complexity of the softening in peaches. *Journal of Experimental Botany*, 54 (389): 1821-1832.
- TUN N. N., BEGUM T., SILVEIRA V., HANDRO W., IOCHEVET E., FLOH S. AND SCHERER G. F. E. (2006). Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Physiology*, 47 (3): 346-354.
- UEHARA Y., TAKAHASHI Y., BERBERICH T., MIYAZAKI A., TAKAHASHI H., MATSUI K. AND KUSANO T. (2005). Tobacco ZFT1, a transcriptional repressor with a cys2/his2 type zinc finger motif that functions in spermine-signaling pathway. *Plant Molecular Biology*, 59 (3): 435-448.
- UPRETI K. K. AND MURTI G. S. R. (2010). Response of grape rootstocks to salinity: changes in root growth, polyamines and abscisic acid. *Biologia Plantarum*, 54: 730–734.
- URANO K., YOSHIBA Y., NANJO T., IGARASHI Y., SEKI M., SEKIGUCHI F., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. AND SHINOZAKI K. (2003). Characterization of arabidopsis genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages. *Plant Cell and Environment*, 26: 1917–1926.
- URANO K., YOSHIBA Y., NANJO T., IGARASHI Y., SEKI M., SEKIGUCHI F., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. AND SHINOZAKI K. (2003). Characterization of *Arabidopsis* genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages. *Plant, Cell and Environment*, 26 (11): 1917-1926.
- URANO K., YOSHIBA Y., NANJO T., ITO T., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. AND SHINOZAKI K. (2004). *Arabidopsis* stress-inducible gene for arginine decarboxylase *AtADC2* is required for accumulation of putrescine in salt tolerance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313 (2): 369-375.
- URANO K., HOBBO T. AND SHINOZAKI K. (2005). *Arabidopsis ADC* genes involved in polyamine biosynthesis are essential for seed development. *FEBS letters*, 579 (6): 1557-1564.

- VANCE C. P., KIRK T. K. AND SHERWOOD R. T. (1980). Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 18: 259–298.
- VAN DE POEL B., BULENS I., OPPERMAN Y., HERTOOG M. L., NICOLAI B. M., SAUTER M. AND GEERAERD A. H. (2012). S-adenosyl-L-methionine usage during climacteric ripening of tomato in relation to ethylene and polyamine biosynthesis and transmethylation capacity. *Physiologia Plantarum*, 148: 176-188.
- VAN ETTEN C. H., WOLFF, I. A., JONES, Q. AND MILLER R. W. (1963). Amino acid composition of seeds from 200 angiospermous plant species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 11: 399–410.
- VEERASAMY G. AND CHINNAGOUNDER S. (2013). Effect of polyamines on *in vitro* organogenesis using shoot tip explants of *Stevia rebaudiana* Bert. *International Journal of Current Biotechnology*, 1 (1): 16-18.
- VERMA S. AND MISHRA S. N. (2005). Putrescine alleviation of growth in salt stressed *Brassica juncea* by inducing antioxidative defense system. *Journal of Plant Physiology*, 162: 669–677.
- VERSLUES P. E. AND SHARMA S. (2010). Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 8.
- VIERLING E. (1991). The roles of heat shock protein in plants.-*Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 579–620.
- WISEK W. J. (1986). Arginine needs, physiological state and usual diets. A reevaluation. *The Journal of nutrition*, 116 (1): 36-46.
- VONDRÁKOVÁ Z., ELIÁŠOVÁ K., VÁGNER M. AND AL E. (2015). Exogenous putrescine affects endogenous polyamine levels and the development of *Picea abies* somatic embryos. *Plant Growth Regulation*, 75: 405–414.
- VUOSKU J., KARPPINEN K., MUILU-MÄKELÄ R., KUSANO T., SAGOR G. H. M. AND AVIA K. (2018). Scots pine aminopropyltransferases shed new light on evolution of the polyamine biosynthesis pathway in seed plants. *Annals of Botany*, 121: 1243–1256.
- WALDEN R., CORDEIRO A. AND TIBURCIO F. (1997). Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. *Plant Physiology*, 113: 1009-1013.
- WALKER M. A., ROBERTS D. R., SHIH C. Y. AND DUMBROFF E. B. (1985). Requirement for polyamines during the cell division phase of radicle emergence in seeds of *Acer saccharum*, *Plant Cell Physiology*, 26: 967–972.
- WALTERS D. R., WILSON P. W. F. AND SHUTTLETON, M. A. (1985). Relative changes in levels of polyamines and activities of their biosynthetic enzymes in barley infected with

- the powdery mildew fungus, *Erysiphe graminis dc ex merat f. Sp. Hordei* Marchal. *New Phytologist*, 101 (4): 695-705.
- WALTERS D. R. AND WYLIE M. A. (1986). Polyamines in discrete regions of barley leaves infected with the powdery mildew fungus, *Erysiphe graminis*. *Physiologia Plantarum*, 67 (4): 630-633.
- WALTERS D. (2003a). Resistance to plant pathogens: possible roles for free polyamines and polyamine catabolism. *New Phytologist*, 159 (1): 109-115.
- WALTERS, D. R. (2003b). Polyamines and plant disease. *Phytochemistry*, 64 (1): 97-107.
- WANG J., SHEEHAN M. AND TIMKO M. P. (2000). Differential expression of two members of the nuclear gene family encoding arginine decarboxylase in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 9 (2): 57-65.
- WANG J., SHEEHAN M., BROOKMAN H. AND TIMKO M. P. (2000). Characterization of cdnas differentially expressed in roots of tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Burley 21) during the early stages of alkaloid biosynthesis. *Plant Science*, 158 (1-2): 19-32.
- WANG, C., FAN, L., GAO, H., WU, X., LI, J., LV, G. AND GONG B. (2014). Polyamine biosynthesis and degradation are modulated by exogenous gamma-aminobutyric acid in root-zone hypoxia-stressed melon roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 82: 17-26.
- WANG Q., ZHANG Z., WU B. AND ZHANG H. (2019). Effect of spermidine and d-arginine treatments on ethylene synthesis in xinjiang ‘Saimaiti’ apricot. *Scientia Horticulturae*, 245: 289-293.
- WANG X., SHI G. AND XU Q. (2003). Toxic effects of Cr<sup>6+</sup> on *Nymphoides peltatum* mitigated by exogenous polyamine. *ACTA SCIENTICA CIRCUMST.* 23: 689–693.
- WANG X. AND SHI G. (2004). Effect of exogenous spermidine on anti-Hg<sup>2+</sup> stress ability of amaranth. *Journal of Plant Physiolog and Molecular Biology*, 30: 69–74.
- WANG X., SHI G., XU Q. AND HU J. (2007). Exogenous polyamines enhance copper tolerance of *Nymphoides peltatum*. *Journal of Plant Physiology* 164 (8):1062-70.
- WANG C., ZHU Y. L., YANG L F. AND YANG H. S. (2011). Effects of nacl stress on polyamines metabolism in vegetable soybean. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*, 22 (11): 2883-93.
- WARTON K., FOSTER N. C., GOLD W. A. AND STANLEY K. K. (2004). A novel gene family induced by acute inflammation in endothelial cells. *Gene*, 342: 85-89.
- WATSON M. B. AND MALMBERG R. L. (1996). Post-translational regulation of *Arabidopsis* arginine decarboxylase in response to potassium-deficiency stress. *Plant Physiology*. 111: 1077– 1083.

- WATSON M. B., EMORY K. K., PIATAK R. M. AND MALMBERG R. L. (1998). Arginine decarboxylase (polyamine synthesis) mutants of *Arabidopsis thaliana* exhibit altered root growth. *The Plant Journal*, 13: 231–239.
- WHETTEN R. W., MACKAY J. J. AND SEDEROFF R. R. (1998). Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 585–609.
- WINTER G., TODD C. D., TROVATO M., FORLANI G. AND FUNCK D. (2015). Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Frontiers in plant science*, 6: 534.
- WOLFF E. C., KANG K. R., KIM Y. S. AND PARK M. H. (2007). Posttranslational synthesis of hypusine: evolutionary progression and specificity of the hypusine modification. *Amino Acids*, 33: 341–350.
- WU G. AND MORRIS S. M. Jr. (1998). Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochemical Journal*, 336 (1): 1-17.
- WU M., TIAN T., LIU H., ZHANG H., QIU Z., QIAO G. AND WEN X. (2020). Shelter covering altered polyamines accumulation of cherry (*Prunus pseudocerasus* Lindl.) via elevating the expression of spermidine synthase (SPDS) gene, *Scientia Horticulturae*, 270: 109440.
- XU C., WU X. AND ZHANG H. (2009). Impact of D-Arg on drought resistance and endogenous polyamines in mycorrhizal *Pinus massoniana*. *Journal of Nanjing Forestry University*, 33: 019–023.
- XU D., GUO J. AND XU L. (2014). The relationship between polyamine oxidase activity and lignin deposition and chrysanthemum flower bud differentiation. *Acta Agriculturae Boreali Sinica* 29: 164-169.
- XU L. (2015). The effect of polyamine on flower bud differentiation and bud germination of chrysanthemum. *Shandong Agricultural University*, 31–36.
- XUE Y., LIU Z., GAO X., JIN C., WEN L., YAO X. AND REN J. (2010). GPS-SNO: Computational prediction of protein S-nitrosylation sites with a modified GPS algorithm. *PloS One*, 5: e11290.
- YADAV J. S. AND RAJAM M. V. (1997). Spatial distribution of free and conjugated polyamines in leaves of *Solanum melongena* L. associated with differential morphogenetic capacity: efficient somatic embryogenesis with putrescine. *Journal of Experimental Botany*, 48: 1537–1545.

- YAMAKAWA H., KAMADA H., SATOH M. AND OHASHI Y. (1998). Spermine is a salicylate-independent endogenous inducer for both tobacco acidic pathogenesis-related proteins and resistance against tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology*, 118: 1213–1222.
- YAMAMOTO A., SAWADA H., SHIM I. S., USUI K. AND FUJIHARA S. (2011). Effect of salt stress on physiological response and leaf polyamine content in NERICA rice seedlings. *Plant, Soil and Environment*, 57: 571–576.
- YANG S. F. AND HOFFMAN N. E. (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 35: 155-189.
- YANG L. I. U., HONG X. U., WEN X. X. AND LIAO Y. C. (2016). Effect of polyamine on seed germination of wheat under drought stress is related to changes in hormones and carbohydrates. *Journal of Integrative Agriculture*, 15 (12): 2759-2774.
- YU Y., JIN C., SUN C., WANG J., YE Y., ZHOU W., LU L. AND LIN X. (2016). Inhibition of ethylene production by putrescine alleviates aluminium-induced root inhibition in wheat plants. *Scientific Reports*, 6: 18888.
- YUAN F., YANG H., XUE Y., KONG D., YE R., LI C., ZHANG J., THEPRUNGSIRIKUL L., SHRIFT T., KRICHILSKY B., JOHNSON D. M., SWIFT G. B., HE Y., SIEDOW J. N. AND PEI Z. M. (2014). OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked Ca<sup>2+</sup> increases vital for osmosensing in *Arabidopsis*. *Nature*, 514: 367–371.
- YUE Q. Y., GAO B. Y., WANG Y., ZHANG H., SUN X., WANG S. G. AND GU R. R. (2008). Synthesis of polyamine flocculants and their potential use in treating dye wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 152 (1): 221-227.
- ZAPATA P. J., SERRANO M., PRETEL M. T., AMOROS A. AND BOTELLA M. A. (2003). Changes in ethylene evolution and polyamine profiles of seedlings of nine cultivars of *Lactuca sativa* L. in response to salt stress during germination. *Plant Science*, 164: 557–563.
- ZAPATA P. J., SERRANO M., PRETEL M. T., AMOROS A. AND BOTELLA M. A. (2004). Polyamines and ethylene changes during germination of different plant species under salinity. *Plant Science*, 167: 781–788.
- ZEID I. M. AND SHEDEED Z. A. (2007). Alterations in nitrogen metabolites after putrescine treatment in alfalfa under drought stress. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 10 (9): 1513-1518.
- ZELLER E. A. (1938). Diamine-oxydase. *Advanced Enzymology*, 2: 93-112.
- ZELLER E. A. (2012). Monoamine and polyamine analogues. *Metabolic inhibitors*, 2: 53-78.



- ZHANG Y., NIE X., DONG F., PAN N., DING C., LIU C. and XIA X. (2022). Polyamine-modified polyacrylonitrile fibers for efficient removal of U (VI) from real fluorine-contained low-level radioactive wastewater. *Journal of Water Process Engineering*, 45: 102452.
- ZHAO F. G. AND QIN P. (2004): Protective effect of exogenous polyamines on root tonoplast function against salt stress in barley seedlings. *Plant Growth Regulation*, 42: 97–103.
- ZHAO F., SONG C. P., HE, J. AND ZHU H. (2007). Polyamines improve K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> homeostasis in barley seedlings by regulating root ion channel activities. *Plant Physiology*, 145: 1061–1072.
- ZHOU J. G., HU H. L., ZHU Y. L., ZHANG G. W. AND LIU Z. L. (2008). Effects of NaCl stress on free polyamines content and reactive oxygen species level in pumpkin roots. (in Chinese) *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*, 19 (9):1989-94.
- ZHOU Y., DIAO M., CHEN X., CUI J., PANG S., LI Y., HOU C. AND LIU H. Y. (2019). Application of exogenous glutathione confers salinity stress tolerance in tomato seedlings by modulating ions homeostasis and polyamine metabolism. *Scientia Horticulturae*, 250: 45-58.
- ZHU H., DING G. H., FANG K., ZHAO F. G. AND QIN P. (2006). New perspective on the mechanism of alleviating salt stress by spermidine in barley seedlings. *Plant Growth Regulation*, 49: 147–156.
- ZHUO C., LIANG L., ZHAO Y., GUO Z. AND LU S. (2018). A cold responsive ethylene responsive factor from *Medicago falcata* confers cold tolerance by up-regulation of polyamine turnover, antioxidant protection, and proline accumulation. *Plant, Cell and Environment*, 41 (9): 2021-2032.
- ZIOSI V., BREGOLI A. M., BONGHI C., FOSSATI T., BIONDI S., COSTA, G. AND TORRIGIANI P. (2006). Transcription of ethylene perception and biosynthesis genes is altered by putrescine, spermidine and aminoethoxyvinylglycine (AVG) during ripening in peach fruit (*Prunus persica*). *New Phytologist*, 172 (2): 229-238.

https1: <https://www.cleanwat.com>

https2: <https://www.sigmaaldrich.com>



## 10. MELLÉKLETEK

### 10.1. Totál DNS izolálás (DNeasy® Plant Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany)

- Elporítunk ~100-200 mg friss növényi mintát folyékony nitrogénben, az elporított növényi anyagot 1,5 ml-es Eppendorf csőbe helyezük és rámérünk 400 µl AP1 puffert + 4 µl RNázA-t, majd VORTEX-szel homogenizáljuk.
- A mintákat 10 percig 65°C-on inkubáljuk (közben 2-3-szor összerázzuk), ezt követően 130 µl P3 puffert adunk a mintákhoz, majd összerázzuk és 5 percre jégre helyezük.
- Ezután a mintákat átmérjük egy szűrővel ellátott kolumnába (QIAshredder Mini spin column), amelyet egy 2 ml-es gyűjtőcsőbe helyezünk, majd 2 percig 11000 g fordulatszámon centrifugáljuk.
- Az alulúszót átmérjük új Eppendorf csőbe és az átmért mennyiséghez mérten 1,5-szörös AW1 puffert adunk a lizátumhoz, majd összeszuszpendáljuk.
- A mintákból 650 µl-ereket átmérünk egy szűrővel ellátott kolumnába (DNeasy Mini spin column), amelyet egy 2 ml-es gyűjtőcsőbe helyezünk, majd 1 percig 6000 g fordulatszámon centrifugáljuk, az alulúszót kiöntjük.
- Következő lépésben hozzáadunk 500 µl AW2 puffert és 1 percig 6000 g fordulatszámon centrifugáljuk, az alulúszót kiöntjük és a lépést megismételjük.
- A DNeasy Mini spin kolumnát egy tiszta 1,5 ml Eppendorf csőbe helyezük és közvetlenül a membránra 100 µl AE puffert pipetázunk, 5 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk, majd 1 percig 6000 g fordulatszámon centrifugáljuk.
- A nagyobb DNS koncentráció elérése érdekében a leoldó puffer mennyisége csökkenthető.
- A DNS koncentrációját és tisztaságát NanoDrop ND-1000 UV/Vis spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies, USA) ellenőrizzük.
- A DNS-t -20°C-on tároljuk.

### 10.2 Plazmid DNS izolálása *Escherichia coli* sejtekből (PureYield™ Plasmid Miniprep System, Promega, Madison, USA)

DNS tisztítás centrifugálással:

- Mérjük ki 600 µl baktériumkultúrát egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe és adjunk hozzá 100 µl sejtlízis puffert (Cell Lysis Buffer), majd keverjük össze a cső fel-le forgatásával.

- Adjunk hozzá 350 µl hideg (4-8°C-os) semlegesítő oldatot (Neutralization Solution), majd keverjük össze forgatással és centrifugáljuk 11000 g fordulatszámon 3 percig (lizátum készítés).
- A leülepedett sejttörmelék felkavarása nélkül mérjük át a felülúszót (kb. 900 µl) egy gyűjtőcsőbe helyezett PureYield™ membránra, majd 11000 g fordulatszámon 15 másodpercig centrifugáljuk.
- Az alulúszót öntsük ki, a membránra mérjük rá 200 µl endotoxin semlegesítő oldatot (Endotoxin Removal Wash) és 11000 g fordulatszámon 15 másodpercig centrifugáljuk.
- Az alulúszót öntsük ki, a membránra mérjük rá 400 µl membránmosó oldatot (Column Wash Solution) és 11000 g fordulatszámon 30 másodpercig centrifugáljuk (mosás).
- Helyezzük át a membránt egy tiszta 1,5 ml-es Eppendorf csőbe, és mérjük a membránmátrixra 30 µl leoldó puffert (Elution Buffer) vagy nukleáz-mentes vizet. Hagyjuk szobahőmérsékleten 1 percig állni, majd 11000 g fordulatszámon 15 másodpercig centrifugáljuk az izolátumokat, hogy leoldjuk a membránról a plazmid DNS-t.
- A plazmid DNS koncentrációját és tisztaságát NanoDrop ND-1000 UV/Vis spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies, USA) ellenőrizzük.
- A plazmid DNS-t -20°C-on tároljuk.

### **10.3 Totál RNS izolálás (Total RNA Mini Kit Plant Geneaid®, New Taipei City, Taiwan)**

- Elporítunk 100 mg növényi mintát folyékony nitrogénben, az elporított mintákat egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe helyezük, 500 µl RB puffert és 5 µl β-merkaptóetanolt adunk hozzá (lízis), majd VORTEX-szel homogenizáljuk.
- A mintákat 60°C-on 5 percig inkubáljuk, majd a gyűjtőcsőbe helyezett szűrős kolumnába (Filter Column) pipetázuk és 1 percig 1000 g fordulatszámon centrifugáljuk.
- Az alulúszóhoz, az alulúszóhoz mérten fél mennyiségű abszolút etanol adunk, összerázzuk, majd ezt egy másik szűrővel ellátott oszlopra (RB Column) átpipetázuk és 14000-16000 g fordulatszámon 1 percig centrifugáljuk (RNS megkötése).
- Az alulúszót kiöntjük, a szűrős oszlopra 80 µl DNáz-t pipetázunk és 15 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk, majd 400 µl W1 puffert adunk hozzá, végül 14000-16000 g fordulatszámon 30 másodpercig centrifugáljuk.

- Az alulúszót kiöntjük és a szűrős oszlopra 600 µl mosó puffert (Wash Buffer) (etanollal kiegészített) pipetázunk, majd 14000-16000 g fordulatszámon 30 másodpercig centrifugáljuk (mosás).
- Az alulúszót kiöntjük és az üres RB oszlopot 3 percig 14000-16000 g fordulatszámon centrifugáljuk.
- A RB oszlopot 1,5 ml-es Eppendorf csőbe helyezük, 50 µl RNáz mentes vizet pipetázunk az oszlop mátrixára és minimum 2 percig állni hagyjuk, végül 1 percig 14000-16000 g fordulatszámon centrifugáljuk (leoldás).
- A RNS koncentrációját és tisztaságát NanoDrop ND-1000 UV/Vis spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies, USA) ellenőrizzük.
- Az RNS-t -80°C-on tároljuk.

#### 10.4 Reverz-transzkripció (RT-PCR) (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit ThermoFisher Scientific®, Waltham, USA)

- A következő reagenseket összemérik egy steril, nukleáz-mentes csőbe, jégen dolgozva.

Templát RNS	totál RNS vagy poly(A) mRNS vagy specifikus RNS	0,1 ng- 5 µg 10 pg- 0,5 µg 0,01 pg- 0,5 µg
Primer	oligo (dT) <sub>18</sub> primer vagy random hexamer primer vagy génspecifikus primer	1 µl 1 µl 15-20 pmol
Steril bidesztvíz		1-12 µl
5X Reakció puffer		4 µl
RiboLock RNáz Inibitor (20 u/µl)		1 µl
10 mM dNTP Mix		2 µl
RevertAid M-MuLV Reverz Transzkriptáz (200 u/µl)		1 µl
Teljes térfogat:		20 µl

- Oligo(dT)<sub>18</sub> vagy génspecifikus primer felhasználása során a mintákat 1 óráig inkubáljuk 42°C-on. Random hexamer primer esetén egy 5 perces 25°C-os előinkubáció is szükséges.
- A reakció leállításához 5 percig 70°C-on inkubáljuk a mintákat.

## 10.5 A PCR reakcióelegy összetevői

PCR reakcióelegy összetevői a plazmid, a genomi DNS és a cDNS esetén (20 µl végtérfogathoz):

- 14 µl steril desztillált víz;
- 2 µl puffer (10x koncentrációjú) (előtte VORTEX-elni);
- 0,8 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM) (előtte VORTEX-elni);
- 0,6 µl primer (forward) (10 pM/µl koncentrációjú oldatból);
- 0,6 µl primer (reverz) (10 pM/µl koncentrációjú oldatból);
- 1 µl dNTP (2 mM);
- 0,5 µl Taq (2,5 unit/µl);
- 0,5 µl templát DNS (20-50 ng);
- Kolónia PCR esetén fogvájóhegynyi baktériumkolóniát teszünk a PCR mixbe és mintánként 0,5 µl-rel növeljük a steril desztillált víz mennyiségét.

## 10.6 Az inszertek visszatisztítása agaróz gélből (Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega, Madison, USA)

DNS tisztítás centrifugálással:

- Elektroforézist követően kivágjuk a DNS fragmentumot az agaróz gélből és egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe helyezük.
- 10 µl/10 mg gél mennyiségű membránkötő oldatot (Membrane Binding Solution) adunk a mintákhoz, majd 50-65°C-on addig inkubáljuk, amíg a gél teljesen felolvad.
- Tegyük a SV membránt egy gyűjtőcsőbe és mérjük a membránra a felolvadt gélkeveréket, majd szobahőmérsékleten 1 percig inkubáljuk.
- Ezután a mintákat 1 percig 16000 g fordulatszámon centrifugáljuk, az alulúszót kiöntjük (DNS megkötése).
- Mérjük a membránra 700 µl etanollal kiegészített membránmosó oldatot (Membrane Wash Solution) és 16000 g fordulatszámon 1 percig centrifugáljuk, majd az alulúszót öntsük ki.
- Ismételjük meg az előző lépést 500 µl membránmosó oldattal és 16000 g fordulatszámon 5 percig centrifugáljuk.
- Öntsük ki az alulúszót, majd nyitott tetővel 16000 g fordulatszámon 1 percig centrifugáljuk a mintákat, hogy a maradék etanol is elpárologjon (mosás).

- Tegyük át a membránt egy tiszta 1,5 ml-es Eppendorf csőbe és mérjük rá 50 µl nukleáz-mentes vizet, szobahőmérsékleten 1 percig inkubáljuk, majd 16000 g fordulatszámon 1 percig centrifugáljuk (leoldás).
- Az agaróz gélből visszatisztított DNS koncentrációját és tisztaságát NanoDrop ND-1000 UV/Vis spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies, USA) ellenőrizzük.
- A DNS-t -20°C-on tároljuk.

### **10.7 Az inszertek ligálása a pENTR/D/Topo klónozó vektorba (Invitrogen™ Gateway™, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA)**

A reakcióelegy összetevői:

- 0,5-4 µl (5-10 ng) visszatisztított PCR termék;
- 1 µl sóoldat;
- 1 µl pENTR/D-TOPO linearizált plazmid DNS;
- Ha szükséges, steril desztillált vízzel 6 µl-re kiegészítjük a reakcióelegyet;
- Ezután a reakcióelegyet összeszuszpendáljuk és 30 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk.

### **10.8 Az inszertek ligálása a pGWB405 bináris vektorba LR Klonáz enzim alkalmazásával (Invitrogen™ Gateway™, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA)**

1,5ml-es Eppendorf csőbe a következő reakcióelegyet mérjük össze:

- a megfelelő konstrukciót tartalmazó pENTR/D-TOPO vektorból 2 µl (50-150 ng);
- pGWB405 bináris vektorból 1 µl (150ng/ µl);
- TE pufferből (pH 8) 5 µl;
- Ezután a kiolvasztott és a VORTEX-szelt LR Klonáz enzim mixből 2 µl-t adunk hozzá, majd 1 órán át 25°C-on inkubáljuk, végül 1 µl Proteináz K-t mérünk a mintákhoz és 10 percre 37°C-ra fokra helyezzük, ezzel inaktiváljuk a reakciót.

### **10.9 A kompetens *Escherichia coli* sejtek transzformálása**

- Kompetens *E. coli* 'JM109'-es törzsből kimérünk 50 µl-eket, majd a bejutatni kívánt plazmidokból hozzáadunk 2 µl-eket és fél óráig jégen inkubáljuk.
- Ezután a baktériumoszuszpenziót 45-50 másodpercre 42°C-os vízfürdőbe helyezzük, majd egyből visszatesszük 2 percre a jégre.

- 2 perc elteltével hozzáadunk 250 µl SOC (Melléklet 10.11) folyékony táptalajt a mintákhoz és másfél-két órára 37°C-os rázógépbé helyezzük.
- Az idő leteltével a mintákat 11000 g fordulatszámon 5 percig centrifugáljuk, a felülúszóból 150 µl-t kipipettázunk és a maradék 100 µl-t összeszuszpendáljuk a letapadt baktériumkolóniákkal és ebből a baktériumszuspenzióból veszünk ki 50 µl-t, majd a konstrukciónak megfelelő szilárd antibiotikus LB táptalajra szélesztjük.

#### **10.10 *Agrobacterium tumefaciens* ‘GV3101’ törzs transzformációja bináris vektorral**

- A szilárd YEP vagy LB + rifampicin (50 mg/l) táptalajon kiszélesztett *Agrobacterium tumefaciens* ‘GV3101’ baktériumtörzsből fogvájónyit helyezünk 5 ml YEP vagy LB + 10 µl rifampicin (50 mg/l) folyékony táptalajba és ’overnight’ 28°C-on rázatjuk.
- Másnap a folyékony törzstenyészetből 2 ml-t kimérünk és hozzáadjuk 50 ml folyékony YEP vagy LB + 100 µl rifampicin (50 mg/l) táptalajhoz, majd 4 órán át inkubáljuk 28°C-on.
- Az inkubáció után a kultúrát 10 percre jégre tesszük, majd szétmérjük 10 ml-ekre és a 4°C-ra hűtött centrifugában 5 percig 5000 g fordulatszámon centrifugáljuk.
- A felülúszót leöntjük, a baktériumokat összeszuszpendáljuk 10 ml jéghideg 20 mM-os CaCl<sub>2</sub>-dal és az előző pontban leírt kondíciókkal újracentrifugáljuk.
- A felülúszót ismét leöntjük és a baktériumokat újraszuszpendáljuk 1 ml jéghideg CaCl<sub>2</sub>-dal, ezután jégen dolgozva 150 µl-eket pipettázunk Eppendorf csövekbe (attól függően, hogy mennyi plazmida akarunk transzformálni).
- A 150 µl mennyiségekre szétporciózott baktérium-szuspenzióhoz hozzáadunk 5-10 µl (0,5-1µg) plazmidot, összerázzuk és azonnal folyékony nitrogénbe helyezzük az Eppendorf csöveket 1 percre.
- Végül 28°C-on kiengedjük a megfagyott baktériumkultúrát és hozzáadunk 1 ml folyékony YEP vagy LB táptalajt, majd 28°C-on ’overnight’ rázatjuk.
- Másnap a baktériumkultúrát 5000 g fordulatszámon 10 percig centrifugáljuk, a felülúszót leöntjük, majd a maradék felülúszóval összeszuszpendáljuk a baktériumokat és szilárd YEP vagy LB + a konstrukciónak megfelelő antibiotikumot tartalmazó táptalajra szélesztjük a baktérium-szuspenziót.

#### **10.11 Felhasznált táptalajok**

##### **YEP táptalaj (1 literhez):**



- 10 g pepton;
- 1 g cukor;
- 5 g élesztő kivonat;
- 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ;
- 15 g bakterológiai agar hozzáadása, ha szilárd táptalajt akarunk készíteni;
- Antibiotikum hozzáadása a körülbelül 45-50°C-ra visszahűtött táptalajhoz. Az optimális pH: 7,2.

#### **MS táptalaj (1 literhez):**

- 100 ml MS makro (Összetevők: 1900 mg/l  $\text{KNO}_3$ ; 1650 mg/l  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 440 mg/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 370 mg/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 170 mg/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ );
- 1 ml MS mikro (Összetevők: 22,30 mg/l  $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ; 8,60 mg/l  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 6,20 mg/l  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0,83 mg/l KJ; 0,25 mg/l  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,025 mg/l  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,025 mg/l  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ );
- 5 ml Fe-EDTA;
- 100 mg inozit;
- 100 µl thiamin (0,1 mg/l);
- 100 µl piridoxin (0,1 mg/l);
- 500 µl nikotinsav (0,5 mg/l);
- 2 ml glicin (2 mg/l);
- Cukor 30 g;
- Hormonok hozzáadása a dohány esetében 1 mg/l benziladenin (BAA) és 0,2 mg/l naftilecetsav (NAA);
- 7 g növényi agar hozzáadása, ha szilárd táptalajt akarunk készíteni;
- Antibiotikum hozzáadása a körülbelül 45-50°C-ra visszahűtött táptalajhoz.
- Az optimális pH dohány esetében: 5,6-5,8.

#### **LB táptalaj (1 literhez):**

- 5 g élesztőkivonat;
- 10 g tripton;
- 10 g NaCl;
- 15 g bakterológiai agar hozzáadása, ha szilárd táptalajt akarunk készíteni;
- Antibiotikum hozzáadása a körülbelül 45-50°C-ra visszahűtött táptalajhoz.

- Az optimális pH: 7.

### S.O.C. táptalaj (1 literhez):

- 20 g tripton;
- 5 g élesztőkivonat;
- 50 mg NaCl;
- 186 mg KCl;
- 952 mg MgCl<sub>2</sub>;
- 1,2 g MgSO<sub>4</sub>;
- 3,6 g glükóz;
- Az optimális pH: 7.

### 10.12 A pENTR-D-TOPO restrikciós térképe:

Enzyme	Recognition	frequency	Positions
AclI	AA'CG TT	1	365
AflIII	C'TTAA G	1	555
AflIII	A'CryG T	3	231, 1879, 2575
AhdI	GACnn n'nnGTC	1	550
AlwI	GGATCnnnn'n	5	1262, 1657, 1931, 1929, 2017
AlwNI	CAG_nnn'CTG	1	2166
ApaI	G_GGCC'C	1	568
ApaLI	G'TGCA_C	1	2261
ApoI	r'AATT_y	2	1013, 1197
AscI	GG'CGCG_CC	1	698
AseI	AT'TA_AT	3	167, 226, 1599
AsiSI	GCG_AT'CGC	1	1400
AvaI	C'yCGr_G	1	561
BanII	G_rGCy'C	2	568, 1055
BbsI	GAAGACnn'nnnn	1	438
BceAI	ACGGCnnnnnnnnnn'nn	5	336, 562, 1719, 1856, 2075
BciVI	GTATCCnnnnn_n'	1	2377
BfrBI	ATG'CAT	2	1248, 1514
BmeI580I	G_kGCm'C	2	568, 2265
BmrI	ACTGGGnnnn_n'	2	436, 518
BmtI	G_CTAG'C	2	244, 510
Bpu10I	CC'TnA_GC	1	1417
BpuEI	CTTGAGnnnnnnnnnnnn'nn'	3	1951, 2192, 2490
BsaHI	Gr'CG_yC	1	328
BsaJI	C'CnnG_G	5	670, 688, 1271, 1673, 2415
BsaWI	w'CCGG_w	3	1535, 2222, 2369
BsaXI	ACnnnnnCTCCnnnnnnn'nnn'	1	157
BsaXI	GGAGnnnnnGTnnnnnnnnn'nnn'	1	127
BseMII	CTCAGnnnnnnnn'nn'	5	412, 445, 1431, 1883, 2292
BseYI	C'CCAG_C	2	707, 2271
BsiEI	CG_ry'CG	4	85, 676, 1400, 2241
BsiHKAI	G_wGCw'C	1	2265
BsmI	GAATG_Cn'	2	1284, 1361
BsmAI	GTCTCn'nnnn	2	883, 1416
BsmBI	CGTCTCn'nnnn	1	1416
BsmFI	GGGACnnnnnnnnn'nnnn	1	1851
Bsp1286I	G_dGCh'C	3	568, 1055, 2265
BspCNI	CTCAGnnnnnnn'nn'	5	411, 446, 1430, 1884, 2293
BspHI	T'CATG_A	2	924, 1851

BsrBI	CCG'CTC	2	66, 377
BsrDI	GCAATG_nn'	3	633, 743, 898
BsrFI	r'CCGG_y	1	1354
BsrGI	T'GTAC_A	2	652, 718
BssHII	G'CGCG_C	1	698
BssSI	C'ACGA_G	1	2402
BstYI	r'GATC_y	3	1649, 1923, 1934
BtgI	C'CryG_G	1	670
BtsI	GCAGTG_nn'	3	215, 1261, 1348
DrdI	GACnn_nn'nnGTC	1	2473
EaeI	y'GGCC_r	3	156, 547, 673
EagI	C'GGCC_G	1	673
EarI	CTCTTCn'nnn_	3	112, 244, 1213
EciI	GGCGGAnnnnnnnnn_nn'	3	399, 2373, 2519
Eco57I	CTGAAGnnnnnnnnnnnn_nn'	1	2033
Eco57MI	CTGrAGnnnnnnnnnnnn_nn'	1	2033
EcoNI	CCTnn'n_nnAGG	1	1312
EcoO109I	rG'GnC_Cy	1	565
EcoRV	GAT'ATC	1	818
FalI	AAGnnnnnCTTnnnnnnnn_nnnnn'	2	732, 764
FauI	CCCGCnnnn'nn_	4	155, 197, 317, 344
HaeII	r_GCGC'y	2	125, 2335
HgaI	GACGCnnnnn'nnnnn_	4	317, 1870, 1885, 2463
Hin4I	GAynnnnnvTCnnnnnnnn_nnnnn'	5	536, 568, 1073, 1105, 1615
Hin4I	GAbnnnnnrTCnnnnnnnn_nnnnn'	5	536, 568, 1073, 1105, 1647
HincII	GTy'rAC	1	502
HpaI	GTT' AAC	1	502
Hpy8I	GTn'nAC	3	411, 502, 2263
MluI	A'CGCG_T	2	231, 1879
MlyI	GAGTCnnnnn'	4	105, 840, 1633, 2199
MspAII	CmG'CKg	5	175, 672, 813, 1992, 2237
NheI	G'CTAG_C	2	240, 506
NlaIV	GGn'nCC	5	566, 567, 668, 2508, 2547
NotI	GC'GGCC_GC	1	673
NruI	TCG'CGA	1	1057
NsiI	A_TGCA'T	2	1250, 1516
NspI	r_CATG'y	1	2579
PciI	A'CATG_T	1	2575
PflMI	CCAn_nnn'nTGG	1	1663
PleI	GAGTCnnnn'n_	4	104, 839, 1632, 2199
PsiI	TTA'TAA	2	639, 735
PspOMI	G'GGCC_C	1	564
PvuI	CG_AT'CG	1	1400
PvuII	CAG'CTG	2	175, 813
SacII	CC_GC'GG	1	673
SapI	GCTCTTCn'nnn_	1	112
SfcI	C'TryA_G	3	824, 2119, 2310
SmlI	C'TyrA_G	4	555, 1930, 2207, 2469
SspI	AAT'ATT	1	1325
StyI	C'CwwG_G	1	688
TaqII	GACCGAnnnnnnnnn_nn'	2	99, 1654
TatI	w'GTAC_w	2	652, 718
TspGWI	ACGGAnnnnnnnnn_nn'	3	268, 1209, 1221

### 10.13 A pGWB 405 restrikiós térképe:

Enzyme	Recognition	frequency	Positions
AccI	GT'mk_AC	4	764, 2172, 2767, 8393
AclI	AA'CG_TT	3	1725, 5752, 10452
AflIII	C'TTAA_G	2	3686, 4309
AgeI	A'CCGG_T	1	8880
AleI	CACnn'nnGTG	3	2943, 3093, 3270
AlwNI	CAG_nnn'CTG	4	2417, 7754, 10574, 10642
ApaI	G_GGCC'C	1	4465
ApaLI	G'TGCA_C	4	2538, 6755, 7849, 8347

AscI	GG'CGCG_CC	1	4069
BamHI	G'GATC_C	3	1388, 2091, 2907
BanII	G_rGCy^C	3	3645, 4465, 5037
BbeI	G_GCGC^C	2	5399, 8593
BbsI	GAAGACnn'n'nnnn_	4	803, 1028, 1031, 12294
BbvCI	CC'TCA_GC	1	2363
BcgI	CGAnnnnnnTGCnnnnnnnnnn_nn'	5	3037, 6437, 9086, 9173, 10747
BcgI	GCAnnnnnnTCGnnnnnnnnnn_nn'	5	3003, 6471, 9052, 9139, 10713
BciVI	GTATCCnnnnn_n'	4	5180, 5583, 7965, 9448
BclI	T'GATC_A	2	6194, 6678
BfrBI	ATG^CAT	3	3775, 4224, 7443
BlpI	GC'TnA_GC	2	5706, 6789
BmtI	G_CTAG^C	2	5649, 9378
BplI	GAGnnnnnCTCnnnnnnnnn_nnnnn'	2	4715, 4747
Bpu10I	CC'TnA_GC	5	1411, 2363, 3516, 3534, 4480
BsaI	GGTCTCn'n'nnnn_	3	397, 2647, 8971
BsaBI	GATnn'nnATC	5	2522, 3720, 4279, 5539, 11055
BseRI	GAGGAGnnnnnnnn_nn'	4	838, 1017, 2943, 9103
BsiWI	C^GTAC_G	1	9490
BsmBI	CGTCTCn'n'nnnn_	3	1862, 8520, 11358
BspEI	T^CCGG_A	3	838, 1634, 3920
BspHI	T^CATG_A	1	5839
BsrGI	T^GTAC_A	4	1187, 2482, 2884, 3622
BssSI	C^ACGA_G	5	999, 3093, 4676, 4802, 7990
BstAPI	GCA_n'nn'nTGC	3	6075, 8346, 9926
BstBI	TT^CG_AA	1	4714
BstEII	G^GTnAC_C	1	6640
BstXI	CCAn_nnnn'nTGG	1	2626
BstZ17I	GTA^TAC	2	2173, 8394
Bsu36I	CC'TnA_GG	1	5661
ClaI	AT^CG_AT	1	9296
DraI	TTT^AAA	5	15, 93, 1558, 1897, 8818
DraIII	CAC_nnn^GTG	2	6617, 7237
DrdI	GACnn_nn'nnGTC	4	760, 5373, 8061, 8474
EcoICRI	GAG^CTC	1	3643
EcoNI	CCTnn'n_nnAGG	1	9064
EcoO109I	rG^GnC_Cy	2	319, 654
EcoRI	G^AATT_C	3	1638, 4083, 5846
EcoRV	GAT^ATC	3	1065, 4400, 4526
FseI	GG_CCGG^CC	3	9726, 11305, 11831
FspI	TGC^GCA	3	161, 5296, 9161
HincII	GTy^rAC	5	738, 2230, 2768, 10413, 11815
HindIII	A^AGCT_T	1	302
KasI	G^GCGC_C	2	5395, 8589
MfeI	C^AATT_G	1	809
MmeI	TCCrACnnnnnnnnnnnnnnnnnn_nn'	5	1054, 7197, 7770, 7954, 12320
NarI	GG'CG_CC	2	5396, 8590
NcoI	C^CATG_G	4	629, 1939, 2911, 4962
NdeI	CA^TA_TG	2	8342, 10832
NheI	G^CTAG_C	2	5645, 9374
NotI	GC^GGCC_GC	3	8676, 9966, 11499
NsiI	A_TGCA^T	3	3777, 4226, 7445
PciI	A^CATG_T	5	3766, 4229, 8163, 8871, 12273
PflMI	CCAn_nnn'nTGG	3	1870, 9709, 10574
PmeI	GTTT^AAAC	1	93
PpiI	GAACnnnnnCTCnnnnnnnnn_nnnnn'	3	2919, 3237, 7457
PpiI	GAGnnnnnGTTcnnnnnnn_nnnnn'	3	2951, 3269, 7489
PpuMI	rG^GwC_Cy	2	319, 654
PshAI	GACnn'nnGTC	1	974
PspOMI	G^GGCC_C	1	4461
PsrI	GAACnnnnnnTACnnnnnnn_nnnnn'	1	709
PsrI	GTAnnnnnnGTTcnnnnnnn_nnnnn'	1	677
PstI	C_TGCA^G	3	318, 2764, 5349
PvuI	CG_AT^CG	4	182, 3659, 4342, 6861
PvuII	CAG^CTG	3	211, 1538, 5292
RsrII	CG^GwC_CG	1	4879
SacI	G_AGCT^C	1	3645

SacII	CC_GC'GG	1	5733
SalI	G'TCGA_C	1	2766
SapI	GCTCTTCn'nnn_	4	4841, 5051, 8280, 8755
SbfI	CC_TGCA'GG	1	318
ScaI	AGT'ACT	3	531, 2055, 12351
SexAI	A'CCwGG_T	4	9539, 9689, 10049, 10813
SfiI	GGCCn_nnn'nGGCC	5	9719, 10031, 11298, 11307, 11741
SfoI	GGC'GCC	2	5397, 8591
SgrAI	Cr'CCGG_yG	1	8592
SmaI	CCC'GGG	1	2509
SphI	G_CATG'C	3	312, 4997, 12386
SrfI	GCCC'GGGC	1	2509
SspI	AAT'ATT	2	1950, 5640
Tth111I	GACn'n_nGTC	3	5279, 6040, 8419
XbaI	T'CTAG_A	3	1167, 2085, 2901
XcmI	CCAnnnn_n'nnnnTGG	2	10821, 11976
XhoI	C'TCGA_G	1	1312
XmaI	C'CCGG_G	1	2507
XmnI	GAAnn'nnTTC	4	730, 1025, 3916, 3928

#### 10.14 A *FvADC* ORF restrikciós térképe:

Enzyme	Recognition	frequency	Positions
AccI6I	TGCGCA	1	2258
Asp700I	GAAnnnnTTC	1	1709
AviII	TGCGCA	1	2258
BsaAI	yACGTR	1	1253
BstBAI	yACGTR	1	1253
DraI	TTTAAA	1	2803
Ecl136II	GAGCTC	1	2294
Eco32I	GATATC	1	216
Eco53kI	GAGCTC	1	2294
EcoICRI	GAGCTC	1	2294
EcoRV	GATATC	1	216
FspI	TGCGCA	1	2258
HincII	GTyrAC	1	1210
HindII	GTyrAC	1	1210
HpaI	GTTAAC	1	1210
KspAI	GTTAAC	1	1210
MroXI	GAAnnnnTTC	1	1709
MspA1I	CmGCKG	1	1989
NaeI	GCCGGC	1	427
NsbI	TGCGCA	1	2258
PdiI	GCCGGC	1	427
PdmI	GAAnnnnTTC	1	1709
Ppu21I	yACGTr	1	1253
XmnI	GAAnnnnTTC	1	1709
BsaBI	GATnnnnATC	2	161, 1436
BalI	TGGCCA	4	942, 1032, 1168, 2373
MlsI	TGGCCA	4	942, 1032, 1168, 2373
MluNI	TGGCCA	4	942, 1032, 1168, 2373
MscI	TGGCCA	4	942, 1032, 1168, 2373
Msp20I	TGGCCA	4	942, 1032, 1168, 2373
MlyI	GAGTC	5	792, 1440, 2067, 2167, 2702
SchI	GAGTC	5	792, 1440, 2067, 2167

#### 10.15 A *FvSPDS* ORF restrikciós térképe:

Enzyme	Recognition	frequency	Positions
AccBSI	CCGCTC	1	61
Asp700I	GAAnnnnTTC	1	777
AssI	AGTACT	1	532
BmcAI	AGTACT	1	532
BoxI	GACnnnnGTC	1	927

BsrBI	CCGCTC	1	61
BstPAI	GACnnnnGTC	1	927
DraI	TTTAAA	1	691
MbiI	CCGCTC	1	61
MroXI	GAAnnnnTTC	1	777
MslI	CAYnnnnRTG	1	670
PdmI	GAAnnnnTTC	1	777
PshAI	GACnnnnGTC	1	927
RseI	CAYnnnnRTG	1	670
ScaI	AGTACT	1	532
SmiMI	CAynnnnrG	1	670
XmnI	GAAnnnnTTC	1	777
ZrmI	AGTACT	1	532
AanI	TTATAA	2	1057, 1341
HincII	GTyrAC	2	199, 911
HindII	GTyrAC	2	199, 911
MspAI	CmGCkG	2	204, 422
PsiI	TTATAA	2	1057, 1341
PvuII	CAGCTG	2	204, 422
MlyI	GAGTC	3	4, 58, 726
SchI	GAGTC	3	4, 58, 726

## **M2: KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Kiss Erzsébetnek, hogy munkámat nagyfokú odafigyeléssel, türelemmel irányította, és hasznos szakmai tanácsokkal látott el, valamint Dr. Veres Anikónak, hogy lehetővé tette a dolgozat elkészülését.

Köszönöm Dr. Heszky Lászlónak, Dr. Kiss Erzsébetnek és Dr. Toldi Ottónak, Dr. Varga Lászlónak a Genetika és Biotechnológia Intézet korábbi Intézetigazgatóinak és a jelenlegi Intézetigazgatójának, Dr. Posta Katalinnak, hogy munkámat a Genetika Biotechnológia Intézetben végezhettem.

Külön köszönöm Dr. Kovács Lászlónak, hogy a kezdő PhD éveim alatt hasznos gyakorlati tanácsokkal látott el, valamint a kutatás gyakorlati kivitelezésében nyújtott fáradhatatlan, lelkes segítségért.

Köszönöm továbbá a Genetika és Biotechnológia Intézet összes volt és jelenlegi munkatársának a munkám támogatását.

Végül köszönöm a családomnak, hogy türelmükkel, szeretetükkel és folyamatos biztatásukkal támogattak a munkám megvalósítása során.

A kutatást az OTKA K101195, a TÁMOP-4.2.2.B-10/1 „A tehetséggondozás és kutatóképzés komplex rendszerének fejlesztése a Szent István Egyetemen”, a SZIE MKK Kutató Kari Kiválósági Támogatás - 1476-4/2016/FEKUT) és az Emberi Erőforrások Minisztériumának ÚNKP-16-2 Új Nemzeti Kiválóság Programja, valamint a a EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.