



MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

Növénytudományi Doktori Iskola

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

Doktori értekezés tézisei

MENDEL ÁKOS

GÖDÖLLŐ

2023

NÖVÉNYTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

TUDOMÁNYÁG:

NÖVÉNYTERMESZTÉSI ÉS KERTÉSZETI Tudományok

A DOKTORI ISKOLA VEZETŐJE:

DR. HELYES LAJOS

EGYETEMI TANÁR, AZ MTA LEVELEZŐ TAGJA
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 jóváhagyása

.....

Dr. Kiss Erzsébet

témavezető jóváhagyása

.....

Dr. Veres Anikó

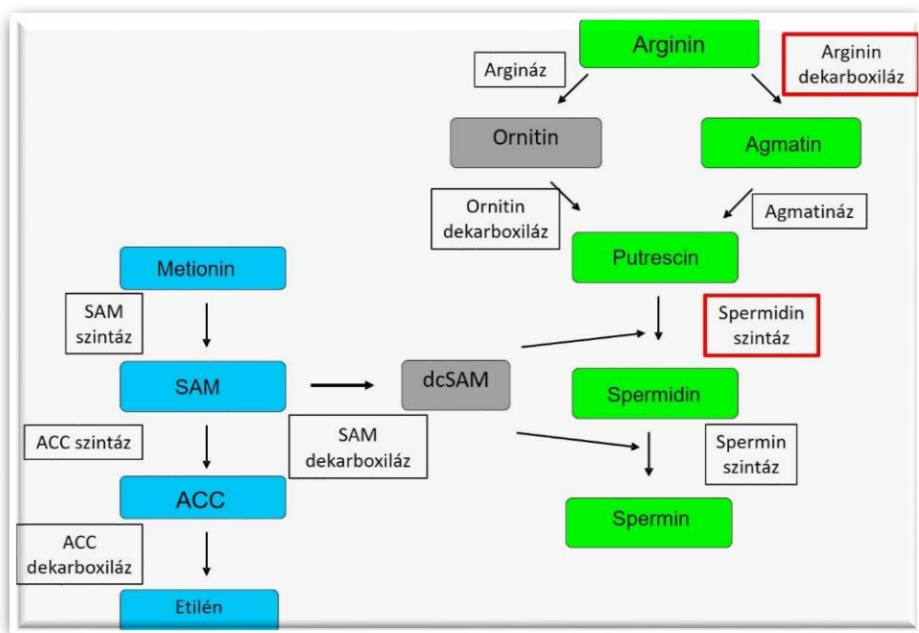
témavezető jóváhagyása

1. A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI ÉS CÉKITŰZÉSEK

A Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Genetika és Biotechnológiai Intézet jogelődeiben folytatott korábbi kutatásai során Balogh és munkatársai (2005) szamóca (*Fragaria x ananassa* Duch. cv. Elsanta) receptákulum és aszmag szövetek RNS-ujjlennyomatát vizsgálták. A gyümölcserés zöld, fehér, rózsaszín és piros szakaszaiban izolált RNS-ből kiindulva cDNS-AFLP módszerrel expressziós változást mutató géneket azonosítottak. 130 transzkriptum eredetű részleges cDNS-t izoláltak és szekvenáltattak, melyek között volt a poliaminok metabolizmusában résztvevő spermidin szintáz (DQ074728.1) is.

A kutatás korai szakaszában a poliamin metabolizmusban résztvevő gének, valamint az azok működéséért felelős promóterek vizsgálatára koncentráltunk. 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. Blissly) *RiSPSD* génjének szekvenciáját (KP980552.1) fel is töltöttük az NCBI nemzetközi adatbázisba. A különböző *Rosaceae* családba tartozó fajok azonos funkciót betöltő génjeiben nagyfokú hasonlóságot találtunk, 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 szamóca etiléntermelésében résztvevő *S-ademozil-L-metionin szintáz* (*FvSAMS*), valamint az etilén és poliamin bioszintézis közös enzimét kódoló *S-ademozil-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* növények esetében. Ezt a bioszintetikus útvonalat, mint ahogy az a **1. ábrán** is látható, az arginin dekarboxiláz (ADC), az ornitin dekarboxiláz (ODC), a SAM dekarboxiláz (SAMDC) és a spermidin szintáz (SPDS) szabályozza a növényekben (Hasegawa *et al.*, 2000).



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

A poliaminok növelik a sejtek külső és belső membránjainak stabilitását, csökkentik az oxidatív sérülések mértékét, pufferelik az ozmotikus állapotot. Ezenkívül az egyes poliaminformák elősegítik a szabadgyökök eliminálásáért felelős antioxidáns enzimek termelődését.

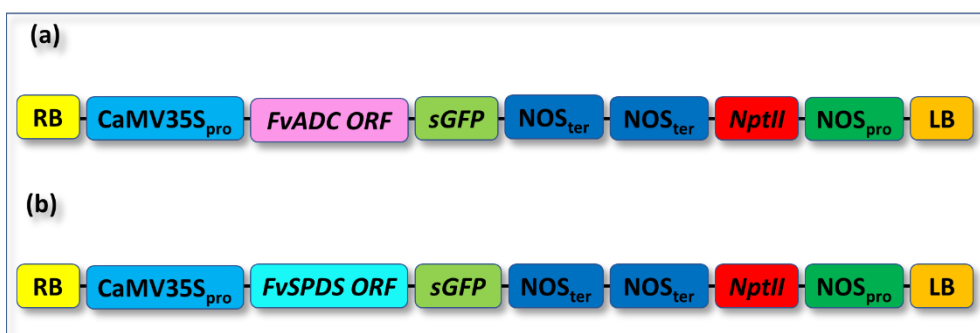
- Elsődleges célunk az arginin dekarboxiláz és spermidin szintáz enzimeket kódoló gének, és azok hatásmechanizmusának mélyebb megértése.
- Összehasonlító vizsgálatot végzünk a kontroll körülményeknek, illetve a hosszútávú arginin, putrescin és spermidin kezelésnek kitett *Fragaria vesca* arginin dekarboxiláz (FvADC) és spermidin szintáz (FvSPDS) enzimet túltermelő *Nicotiana tabacum* L. vonalak és a vad típus között.
- További célként tűztük ki, hogy meghatározzuk a *FvADC::sGFP* és a *FvSPDS::sGFP* enzimek szubcelluláris lokalizációját.
- Végül célul tűztük ki, hogy az eredmények elemzésével feltérképezzük a vizsgált paramétertek értékei közötti összefüggéseket, valamint a táptalaj-kiegészítők, illetve az átvitt gének hatását is kimutassuk.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. A felhasznált növényanyag és a genetikai transzformáció

A *Fragaria vesca* L. teljes genom szekvenciája elérhető a National Center for Biotechnology Information (NCBI) adatbázisban. 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).

A *FvADC* és *FvSPDS* szekvenciákat pGWB405 bináris vektorba ligáltuk. A pGWB405 bináris vektor konstitutív CaMV35S promótert és sGFP riportergént tartalmaz, amely alkalmas a szekvenciák C terminális fúzionáltatására (2. ábra).



2. ábra: A pGWB405::FvADC (a) és a pGWB405::FvSPDS (b) bináris vektorkonstrukciók. RB- right border (jobb oldali határrégió); CaMV35S_{pro} – karfiol mozaik vírus 35S konstitutív promótere; sGFP – szintetikus zöld fluoreszcens fehérjét kódoló gén; NOS_{ter} – nopalin szintáz terminátor régiója; NptII – neomicin foszfotransferáz II (kanamicin rezisztenciát kialakító gén); NOS_{pro} – nopalin szintáz promótere; LB – left border (bal oldali határrégió).

2.2. A genetikai transzformáció sikerességének bizonyítása

A szelektív MS táptalajon normálisan fejlődő növényekből PCR-rel pozitív eredményt adó növényekből izoláltuk az összes RNS-t, majd oligo(dT)18 primer felhasználásával cDNS-t szintetizáltunk. A transzgenről történő transzkripciót PCR-rel az előbb említett módszerrel vizsgáltuk a cDNS-ek felhasználásával.

Az öntermékenyítésből származó T1 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.

2.3. A növénynevelési paraméterek

Az arginin dekarboxiláz enzim génjének egy új, jelölt kópiáját hordozó vonalakat 150 mg/l arginint vagy 10 mg/l putrescint tartalmazó táptalajra helyeztük. A spermidin szintáz génnel transzformált vonalakat 10 mg/l putrescint vagy 10 mg/l spermidint tartalmazó táptalajon neveltük tovább (Bhatnagar *et al.*, 2004; Veerasamy és Chinnagounder 2013).

2.4. A klorofill mennyiségének mérése

Az összklorofill-tartalom, valamint a klorofill *a* és *b* mennyiségének meghatározását Porra *et al.* (1989) módszere alapján végeztük. A klorofill *a* (*Ca*) és a klorofill *b* (*Cb*), valamint az összklorofill (*Ct*) tartalmat az alábbi képletek felhasználásával határoztuk meg:

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

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

$$Ct=Ca+Cb.$$

2.5. A lignin tartalom mérése

A hajtások lignin mennyiségének meghatározásához első lépéseként fehérjementes sejtfal-kivonatot készítettünk. A lignin mennyiségének meghatározásához Moreria-Vilar *et al.*, (2014) acetyl-bromidos módszerét alkalmaztuk.

2.6. A poliaminok, valamint a prolin mennyiségének meghatározása HPLC-vel

Smith és Davies (1985) a módszere szerint a szabad poliamin frakcióból, valamint a prolinból danzil-kloriddal származékot képeztünk. A meghatározását HPLC módszerrel, Németh *et al.* (2002) alapján végeztük.

2.7. Mikroszkópos vizsgálat

A fúziós zöld fluorescens fehérjék (FvADC::sGFP, FvSPDS::sGFP) vizuális detektálását Leica TCS SP8 lézerletapogatású konfokális mikroszkóppal valamint Leica/Leitz fluoreszcens sztereó mikroszkóppal végeztük fixálás nélkül vizsgáltuk az adaxiális oldaláról.

2.8. Statisztikai analízis

A vizsgálatokhoz szükséges növényi mintát 3-3 növényegyed egyenlő arányban gyűjtött levelei képezték, így az eredmények 9 mérésből származnak. Az adatok kiértékeléséhez egytényezős varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk. A szórás-homogenitás megfelelőségét a Levene teszt, és a varianciarány-próba alapján ellenőriztük. Tukey féle *post hoc* teszttel, valamint Games-Howell teszttel határoztuk meg a szignifikánsan eltérő csoportokat. Az adatok összefüggésének vizsgálatához korrelációanalízist végeztünk. A kapott értékeket - kezelések és vonalak szerint - interakcióvizsgálattal elemeztük. Az adatok kiértékeléséhez IBM SPSS v.27 programot használtuk.

3. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

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

A *Fragaria vesca* genomra tervezett primerek PCR-rel történő ellenőrzés során 100%-osan működtek a *Fragaria x ananassa* Duch. cv. 'Asia' fajta genomi DNS-ével, ezért a zöld, fehér, rózsaszín és piros érési stádiumú gyümölcsök receptákulum és aszmag szöveteiből együttesen izolált RNS-ről visszaírt cDNS-en qPCR-t indítottunk. A *FaADC* gén esetében 14-szer nagyobb relatív expressziót mértünk a zöld érési stádiumban lévő gyümölcsben, mint a fehér stádiumban, és közel 40-szer nagyobbat, mint a rózsaszín és piros stádiumban. A *FaADC*-hez hasonló expressziós mintázatot kaptunk a *FaSPDS* gén esetében, a zöld gyümölcsben több, mint 10-szer nagyobb relatív expressziót detektáltunk, mint a fehér és a rózsaszín érési stádiumokban. Mindkét gén relatív expressziója kizárólag a zöld érési stádiumban volt kimagasló. (Mendel *et al.*, 2018).

3.2. A *FvADC* és *FvSPDS* enzimek sejten belüli lokalizációja

A *FvADC*::sGFP az epidermális sejtekben az sGFP a klorofillal azonos mintázatú helyeken detektálható, így kloroplasztisz lokalizációt állapítottunk meg, míg az oszlopos parenchima sejtek esetében a sejtközötti térben detektálható volt az sGFP jele.

Az *FvSPDS*::sGFP a kloroplasztiszokkal megegyező helyeken is mutatott fluorescens jelet, így kloroplasztiszi lokalizációt állapítottunk meg. Az oszlopos parenchima sejtek esetében a mi kísérletünkben is detektálható volt az sGFP jele a citoplazmában. 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.) (Maruri-López és Jiménez-Bremont *et al.*, 2014). *Morus spp.* *SPDS* génjeiben nem találtak szignál peptidet kódoló szekvenciát, lokalizációját a funkciója határozta meg (Liu *et al.*, 2021). A növényi *SPDS* enzimek nem tartalmaznak tranzit peptid specifikus szekvenciákat, és a *sGFP* sem módosítja az expressziós mintázatot.

3.3. A vizsgált paraméterek értékelése a kezelések tükrében

A vizsgált paraméterek (klorofill, lignin, prolin, putrescin, spermidin, spermin, és összpoliamin tartalmak) értékeinél 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.

A klorofill esetében csak az arginin kezelés eredményezett szignifikánsan magasabb értéket a vad típusúaknál, valamint a putrescin hozzáadása okozott szignifikáns csökkenést a FvSPDS növényeknél. A többi esetben nem tudtunk kimutatni változást. Méréseink alapján a *Ca/Cb* arány szintén csak az arginin kezelésnél emelkedett meg a vad típusnál és a FvADC-nél. Putrescin hatására mindkét transzformáns csoportnál, míg a spermidin hatására a vad típusnál és a FvSPDS-nél csökkent ez az érték.

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.

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.

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 egyedeinél 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 vad típusú növények esetében kimutatható, hogy az arginin és a putrescin táptalajhoz történő adagolása szignifikánsan növelte (Spd+Spm)/Put arányt. 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.

3.4. A vizsgált paraméterek közötti összefüggések

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

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

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 képest 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 szamóca spermidin 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 hatásfok javításához. A putrescin a SPDS enzim szubsztrátjaként a poliaminok 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.

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.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Bizonyítottuk, hogy a *FaADC* és a *FaSPDS* változó expressziót mutatott a számoça gyümölcsének korai érése során. Korábbi kísérleteink alapján már leírtuk, hogy a poliamin bioszintézisért felelős számos gén részt vesz a gyümölcsérésben is, tehát a poliaminok fontos szerepet töltenek be a minőségi változások során. A poliaminok fokozzák az antioxidáns rendszer enzimeinek aktivitását, csökkentik a Na^+ toxicitását a H_2O_2 és O_2^- mennyiségét, valamint fokozzák a membránok stabilitását, így segíthetnek a gyümölcsök kialakulásakor és érésekor fellépő sejtszintű belső stressz hatásait csökkenteni, ellensúlyozni.

A *Fragaria vesca* L. cv. 'Rügen' *FvADC* és *FvSPDS* génekkel sikeresen transzformáltunk *Nicotiana tabacum* L. növények szöveteit, melyek utódaiban a vizsgált gének transzkripciós 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.

Minden vizsgálatot, minden mérést elvégeztünk vad típusú *N. tabacum* L. növényeken, valamint *FvADC* és *FvSPDS* enzimeket 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 vitalitásra, mint a *FvSPDS* gén overexpressziója. Ezzel ellentétben az arginin táptalajhoz történő adagolása kisebb mértékű hatást indukált, mint a putrescin és spermidin kezelés. Úgy tűnik, az arginin egyéb bioszintetikus útvonalakban betöltött szerepe miatt (aminosav-, prolin-, GABA bioszintézis, citrát kör, urea ciklus, *etc.*) nem tud akkora 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 felé tereltük az arginint (*ADC* gén overexpressziója által), annak hatása jobban megjelent a vizsgált paraméterekben észlelt változásokban.

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 rendelkezik. 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 hasznossága atomban még nincs kellően bizonyítva.

5. 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* L. növényekben.
3. GFP fúziós fehérjék segítségével megállapítottuk a FvADC intracelluláris lokalizációját.
4. Kimutattuk, hogy a FvADC enzimet túltermelő *N. tabacum* L. 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. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN ÍRT TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

Tudományos cikkek (angol nyelvű)

Mendel Á., Kovács L., Szentgyörgyi A., Fekete S., Posta K., Kiss E. (2018). Expression patterns of ethylene and polyamine biosynthetic genes during fruit ripening in strawberry. *Studia Universitatis „Vasile Goldiş” Seria Stiintele Vietii (Life Science Series)*, 28: (4) **IF: 0,199**

Kovács L., **Mendel Á.**, Szentgyörgyi A., Fekete S., Söre F., Posta K., Kiss E. (2020). 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*, 91. 53-73. **IF: 3,412**

Mendel Á., Kovács L., Kiss E. (2021). Effect of arginine, putrescine and spermidine on the polyamine, proline and chlorophyll content of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Acta Agraria Debrecniensis*, 2. 39-43.

Tudományos cikkek (magyar nyelvű)

Kovács L., **Mendel Á.**, 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.

Konferencia és előadás összefoglalók (angol nyelvű)

Kovács L., **Mendel Á.**, Szentgyörgyi A. Kiss E. (2016). Overexpression of *Fragaria vesca* SAM-synthase1 and SAM-decarboxilase1 proteins in *Nicotiana benthamiana*. *Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája (FIBOK) 2016. Program és Összefoglalók*, p-93.

Kovács L., **Mendel Á.**, Tóth Sz., Szentgyörgyi A., Kiss E., Toldi O. (2015). Increased SAM pool and PA/Ethylene ratios in transgenic *Nicotiana benthamiana* plants resulted in marked changes in salt tolerance, protein content and biomass production. *Hungarian Molecular Life Sciences 2015: Eger, 2015. március 27-29.: Összefoglalók*: p 142.

Tóth Sz., Kovács L., **Mendel Á.**, Szentgyörgyi A., Kiss E., Toldi O. (2015). Overexpression of a heterologous polyamineoxidase, involved in polyamine catabolism, activates both necrotic and vacuolar programmed cell death in

tobacco. Hungarian Molecular Life Sciences 2015: Eger, 2015. március 27-29.: Összefoglalók: O-054, ISBN: 978-615-5270-15-4.

Mendel Á., Kovács L., Hidvégi N., Kiss E. (2013). Isolation and characterization of promoters of genes involved in polyamine metabolism in strawberry. Hungarian Molecular Life Sciences 2013: programme & book of abstracts. 287 p.

Konferencia kiadvány (magyar nyelvű)

Kovács L., **Mendel Á.**, Tóth Sz., Szentgyörgyi A., Kiss E. (2014). *Fragaria vesca* Sam DC1 gén funkcionális jellemzése. XX. Növénynevelési Tudományos Napok: Magyar Tudományos Akadémia Székháza, Budapest, Összefoglalók. p. 254-258.

Mendel Á., Kovács L., Tóth Sz., Szentgyörgyi A., Kiss E. (2014). *Fragaria vesca* S-adenozilmetionin szintáz gén (SAM-Sy) funkcionális jellemzése. XX. Növénynevelési Tudományos Napok: Magyar Tudományos Akadémia Székháza, Budapest, Összefoglalók. p. 299-303.

Mendel Á., Kovács L., Tóth Sz., Kiss E. (2013). A szamóca poliamin metabolizmusában működő SAM-dekarboxiláz és SAM-szintáz gének promótereinek izolálása és jellemzése. Gazdálkodás és Menedzsment Tudományos Konferencia, 2013. Szeptember 5., Kecskemét p. 208-212.

Tóth Sz., Kovács L., **Mendel Á.**, Szentgyörgyi A., Kiss E., Toldi O. (2015). A poliamin (PA) lebontásában résztvevő heterológ PA-oxidáz növeli a stressz-érzékenységet transzgenikus dohányban a PA szint csökkentése nélkül. XXI. Növénynevelési Tudományos Napok: Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutató Központ, Martonvásár, 2015. március 11-12.: Összefoglalók. p. 48.

Kovács L., **Mendel Á.**, Tóth Sz., Szentgyörgyi A., Kiss E., Toldi O. (2015). A szenescenciaindukciója és késleltetése a poliamin/etilén arány változtatásával transzgenikus *Nicotianabenthamiana* növényekben. XXI. Növénynevelési Tudományos Napok: Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutató Központ, Martonvásár, 2015. március 11-12.: Összefoglalók. p. 96.

Mendel Á., Kovács L., Hidvégi N., Kiss E. (2013). A szamóca poliamin metabolizmusában működő gének promótereinek izolálása és jellemzése. XIX. Növénynevelési Tudományos Nap. Összefoglalók. p. 118.

Szentgyögyi A., **Mendel Á.**, Kovács L., Kiss E. (2017). A szamóca S-adenozil-L-metionin szintáz (SAMS) enzimet kódoló gén expressziójának vizsgálata és a SAMS fehérje lokalizációjának meghatározása. XXIII. Növénynevelési Tudományos Napok, MTA, 2017. március 7., Összefoglalók. p. 147.

7. IRODALOMJEGYZÉK

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.

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.

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.

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. (2020). 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*, 91:53–73.

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.

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.

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., 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.

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.

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.

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.

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.

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.