



SZENT ISTVÁN EGYETEM

***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 LÁSZLÓ

GÖDÖLLŐ

2018

A doktori iskola

Megnevezése:

Növénytudományi Doktori Iskola

Tudományága:

Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok

Vezetője:

Dr. Helyes Lajos

Egyetemi tanár, az MTA doktora

Szent István Egyetem

Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar

Kertészeti Technológiai Intézet

Témavezető:

Dr. Kiss Erzsébet

Professor emeritus

Szent István Egyetem

Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar

Genetikai, Mikrobiológiai és Biotechnológiai

Intézet

.....
Dr. Helyes Lajos

Iskolavezető

.....
Dr. Kiss Erzsébet

Témavezető

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	5
2. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS.....	9
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	11
3.1 Az etilén és a poliaminok szerepe a gyümölcserésben.....	11
3.2 Az etilén és a poliamin metabolizmus a szerepe a sótolerancia kialakításában.....	13
3.3 Az etilén és a poliamin metabolizmus közös prekursorát előállító S-adenozil-L-metionin szintáz (SAMS) és a S-adenozil-L-metionin (SAM).....	18
3.4 A poliamin metabolizmus prekursor molekuláját termelő S-adenozil-L-metionin dekarboxiláz (SAMDC) és a dekarboxilált SAM (dcSAM).....	21
3.5 Az abiotikus stresszérzékelés és -válasz a növényekben.....	23
3.6 A sóstressz-válaszban szerepet játszó ion-, ozmotikus- és abszcizinsav (ABA) stresszjelzés.....	25
4. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	31
4.1. A felhasznált növényanyag és a génszekvenciák bioinformatikai elemzése	31
4.3. A pENTR klónozó- és a pGWB405 bináris vektorkonstrukciók	31
4.4. A <i>Nicotiana benthamiana</i> modellnövény közvetett transzformációja és tranziens expressziós vizsgálata <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101 törzs felhasználásával	33
4.5. A transzformáció sikerességének bizonyítása, a T ₁ generáció előállítása, előszelekciója és hasadási arányának vizsgálata	34
4.6. A növénynevelési paraméterek a sótolerancia vizsgálatához	34
4.7. A klorofill <i>a</i> és <i>b</i> mennyiségének mérése	35
4.8. A H ₂ O ₂ és a O ₂ ⁻ hisztokémiai detektálása	35
4.9. A H ₂ O ₂ mennyiség mérése	35
4.10. Az ionveszteség mérése	36
4.11. A prolin mennyiségének szemikvantitatív meghatározása	36
4.12. A lignin tartalom mérése	36
4.13. Az etilén termelés mérése	37
4.14. A poliaminok mennyiségének meghatározása HPLC-vel.....	37
4.15. Relatív expressziós vizsgálatok qPCR-rel.....	38
4.16. Mikroszkópos vizsgálat	39

4.17.	Statisztikai analízis	39
5.	EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK	41
5.1	A kutatás előzményei és a <i>FaSAMS</i> , <i>FaSAMD</i> C expressziós mintázata a szamóca gyümölcs érése során	41
5.2	A <i>FvSAMS</i> és a <i>FvSAMD</i> C ORF-ek pENTR TM /SD/D-TOPO klónozó vektorba ligálása.....	43
5.3	A <i>pGWB405::FvSAMS</i> és a <i>pGWB405::FvSAMD</i> C bináris vektorkonstrukciók előállítás.....	45
5.4	Az <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101 törzs transzformációja a <i>pGWB405::FvSAMS</i> és a <i>pGWB405::FvSAMD</i> C vektorkonstrukciókkal	47
5.5	A <i>Nicotiana benthamiana</i> modellnövény <i>Agrobacterium</i> közvetítette transzformációja és a T ₀ vonalak előszelekciója	48
5.6	A hosszútávú sóstressz hatásának vizsgálata a <i>FvSAMS</i> -t, <i>FvSAMD</i> C-t túltermelő és a vad típusú <i>Nicotiana benthamiana</i> növények élettani paramétereire	51
5.6.1	A biomassa produktum	51
5.6.2	A 300 mM NaCl hatása a transzgenikus és a vad típusú levélkorongokra.....	55
5.6.3	A klorofill <i>a</i> és <i>b</i> tartalom	57
5.6.4	A H ₂ O ₂ és O ₂ ⁻ hisztokémiai detektálása, a H ₂ O ₂ relatív mennyisége és a levélkorongok ionvesztése	57
5.6.5	A prolin mennyiség	60
5.6.6	A lignin tartalom	61
5.6.7	Az etilén és a poliaminok mennyisége.....	61
5.6.8	Az etilén, a poliamin, a nikotin és a lignin metabolizmusában résztvevő gének relatív expressziója ..	65
5.6.9	A hosszútávú sóstressz hatásának összesítése a transzgenikus vonalak és a vad típusú növények élettani paramétereire	67
5.7	A <i>FvSAMS::sGFP</i> és a <i>FvSAMD</i> C::sGFP fúziós fehérjék szubcelluláris lokalizációjának meghatározása és az aminosav szekvenciák bioinformatikai elemzése.....	69
5.8	Új tudományos eredmények	81
6.	KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	83
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	87
8.	SUMMARY	89
9.	IRODALOMJEGYZÉK	91
10.	MELLÉKLETEK	115
M2:	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	131

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

35S_{pro}::sGFP = CaMV35S

promóter::*sGFP* vektorkonstrukció

ABA = abszcizinsav

ABI2 = Abelson interactor2 (Abelson kölcsönható fehérje2)

ACC = 1-aminociklopropán-1-karboxilsav

ACO = 1-aminociklopropán-1-karboxilsav oxidáz

ACS = 1-aminociklopropán-1-karboxilsav szintáz

ADC = arginin dekarboxiláz

AdoMet = S-adenozil-L-metionin

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

AMPK = AMP aktivált protein kináz

ANOVA = Analysis of variance (varianciaanalízis)

Arg = arginin

ARGOS = auxin regulated gene involved in organ size

ATP = adenzin trifoszfát

A. U. = arbitrary unit

BA = benziladenin

BR = brassinoszteroid

BUD2 = Bushy and dwarf2 (bokros és törpe2)

CAD = cinnamyl-alcohol dehydrogenase (fahéj-alkohol dehidrogenáz)

CBL = calcineurin B-like (calcineurin B-szerű)

CIPK = Calcineurin B-like interacting protein kinase (calcineurin B-vel kölcsönható kináz)

CnA = calcineurin A alegység

CnB = calcineurin B alegység

CNGC = cyclic nucleotid-gated channel (ciklikus nukleotid-gátolt csatorna)

CRZ1 = Calcineurin-responsive zinc finger transcription factor (calcineurin-válasz zink ujj transzkripció faktor)

CTR1 = constitutive triple response1

Cys = cisztein

DAB = 3, 3'-diaminobenzidin

dcSAM = dekarboxilált S-adenozil-L-metionin

DEG / ENaC = degenerin/epithelial sodium channels (degenerin/epitheliális nátrium csatornák)

DFC = Dense fibrillar center (a sejtmagvaccka sűrű fibrilláris központja)

EIL = ethylene insensitive like

EIN2 = ethylene insensitive2

EIN3 = ethylene insensitive3

ENA1 = ENA P-type ATPase1 (ENA p-típusú ATPáz1)

ER = endoplazmatikus retikulum

ERAD = ER associated degradation (ER-hez kötött degradáció)

ERF = ethylene-responsive element binding factor

FC = Fibrillar center (a sejtmagvaccka fibrilláris központja)

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

FvSAMS::sGFP = Fragaria vesca L. cv. Rügen S-adenozil-L-metionin szintáz::sGFP fúziós konstrukció

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

GA = gibberelinsav

GABA = γ -aminovajsav

GAPDH = gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz

GC = Granular component (a sejtmagvaccka granuláris komponense)

GHR1 = Guard cell hydrogen peroxide-resistant1

GLR = glutamate receptor-like channel
(glutamát receptor-szerű csatorna)

Glu = glutaminsav

GSNO = S-nitrozoglutation

GUS = β -glükoronidáz

H2A. Z = hiszton 2A. Z

HKT1 = high affinity K⁺ transporter1
(nagy káliumion affinitású traszporter1)

HSP = heat shock protein (hősokk fehérje)

IAA = Indole acetic acid (indolecetsav)

IBA = Indole-3-butyric acid (Indol-3-vajsav)

IP3 = inozit trifoszfát

JA = jasmonic acid (jázmonsav)

K2P = two-pore potassium channel (két pórúsú kálium csatorna)

Lys = lizin

MAPK = mitogén aktivált protein kináz

MAT = Metionin adenzil transzferáz

MES = metil észter szulfonát

MS = metionin szintáz

Mtase = MTáz (Adomet függő metiltranszferáz)

NAA = Naphthaleneacetic acid (naftil ecetsav)

NADPH oxidáz = Nicotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát oxidáz

NBT = Nitroblue-tetrazolium-chloride
(nitrokék-tetrazolium klorid)

NEIP2 = ethylene receptor-interacting protein2
(etilénreceptor-kölcsönható fehérje2)

NES = Nuclear export signal (sejtmagi export szignál)

NLS = Nuclear localization signal
(sejtmagi lokalizációs szignál)

NMP = N-metilputreszcin

NO = nitrogénoxid

NOD = Nucleolar localization sequence detector
(sejtmagvacska lokalizációs szekvencia detektor)

NoLS = Nucleolar localization signal
(sejtmagvacska lokalizációs szignál)

OD = optikai denzitás

ODC = ornitin dekarboxiláz

ORF = Open reading frame (nyitott leolvasási keret)

OSCA1 = reduced hyperosmolality-induced calcium increase1

PA = poliamin

PAO = poliamin oxidáz

PCD = Programmed cell death
(programozott sejthalál)

PKC = Protein kináz C

PMT = putreszcin N-metiltranszferáz

PP2C = type 2C protein phosphatase (2C típusú fehérje foszfatáz)

Pro = prolin

PUT = putreszcin

PYL = pyrabactin resistance-like
(pirabaktin rezisztencia-szerű)

PYR = pyrabactin resistance (pirabaktin rezisztencia)

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

RbohF/D = Respiratory burst oxidase homolog protein F/D

RCAR = regulatory component of ABA receptors
(ABA receptor szabályozó komponense)

RFP = Red fluorescent protein (piros fluoreszcens fehérje)

RGA1 = heterotrimer G fehérje alfa alegysége

RhoA GEF Net1A = RhoA guanine nucleotide exchange factor
neuroepithelial transforming1A

RLK = receptor-like kinase (receptor-szerű kináz)

ROS = reactive oxygen species (reaktív oxigén fajták)

SAE1 = SUMO Activating Enzyme Subunit 1
(SZUMOiláció aktiválta enzimalégység1)

SAHcy = S-adenozil-homocisztein

SAHH = S-adenozil-homocisztein hidroláz

SAM = S-adenozil-L-metionin

SAMDC = S-adenozil-L-metionin dekarboxiláz

SAMS = S-adenozil-L-metionin szintáz

SAUR = Small auxin up RNA

SCaBP= SOS3-like calcium binding protein (SOS3 szerű kalcium kötő fehérje)

Ser = szerin

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

SLAC1 = slow anion channel-associated1

SNF1 = sucrose non-fermenting1

SnRK = SNF1-related kinase (SNF1-hez hasonló kináz)

SOS = salt overly sensitive

SPD = spermidin

SPDS = spermidin szintáz

SPM = spermin

SPMS = spermin szintáz

TCA = trichloroacetic acid (triklór ecetsav)

TCTP = translationally controlled tumor protein

TDF = Transcript-derived fragment (transzkriptum eredetű fragmentum)

Thr = treonin

TRP = transient receptor potential channel

UPR = Unfolded Protein Response (kitekerekedett fehérjékre adott válaszreakció)

UTR = untranslated region (nem transzlálódó régió)

WT = wild type (vad típus)

2. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A Szent István Egyetem Genetikai, Mikrobiológiai és Biotechnológiai Intézet korábbi kutatásai során a szamóca (*Fragaria x ananassa* Duch. cv. Elsanta) receptákulum (gyümölcsrost) és az aszmag szövetek RNS-ujljenyomatának tanulmányozásakor az érésben expressziós változást mutató géneket azonosítottak a gyümölcsérés zöld, fehér, rózsaszín és piros szakaszában. 130 transzkriptum eredetű fragmentumot, részleges cDNS-t izoláltak és szekvenáltattak meg. A szekvenált transzkriptumok között volt a poliamin metabolizmusban résztvevő spermidin szintáz (DQ074728.1) és egy a poliamin és etilén metabolizmus közös prekursor molekuláját szintetizáló enzim gén, a S-adenozil-L-metionin (SAM) függő metiltranszferáz is (AY873806). Az általunk kiválasztott és vizsgálni kívánt SAM szintáz (*SAMS*) és SAM dekarboxiláz (*SAMDC*) nem szerepelt a szekvenált transzkriptumok között, azonban a *SAMS* szintetizálja az etilén és poliamin metabolizmus közös prekursor molekuláját a S-adenozil-L-metionint, míg a *SAMDC* termeli a dekarboxilált SAM-ot (dcSAM), ami a poliamin metabolizmus prekursor molekulája. Az etilén alapvető jelmolekula, a poliaminokkal együtt számos szabályozási mechanizmusban vesz részt a növények fejlődése és a termések érése során, ezért célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk szerepet játszhatnak-e a *SAMS* és a *SAMDC* gének a szamóca gyümölcs érésében.

Ugyanakkor mind az etilén, mind a poliaminok fontos funkciót töltenek be a növények biotikus és abiotikus stresszválaszaiban, továbbá fokozott mennyiségben pozitív hatásuk van a növények sótoleranciájára is. Számos korábbi tanulmány számol be azonban az etilén és a poliamin metabolizmus antagonisztikus hatásáról különböző biotikus és abiotikus stresszek hatására, ezért a két metabolizmus közös molekuláját a SAM-ot termelő SAM szintáz enzim, illetve a poliamin metabolizmus prekursor molekuláját a dekarboxilált SAM-ot szintetizáló SAM dekarboxiláz enzim túltermeltetésével tisztább képet alkothatunk a két metabolizmus különböző élettani folyamatokban betöltött szerepéről, ezáltal meg tudjuk határozni, hogy a „SAM többlet”, illetve a „SAM hiány” hogyan befolyásolja a poliamin/etilén arányt. Ebben a tanulmányban másik célul tűztük ki, hogy összehasonlító vizsgálatot végzünk a kontroll körülményeknek, illetve a hosszútávú sóstressznek kitett a nem utóérő *Fragaria vesca* L. cv. Rügen szamócából izolált *Fragaria vesca* SAM szintáz (FvSAMS) és SAM dekarboxiláz (FvSAMDC) enzimet túltermelő *Nicotiana benthamiana* vonalak és a vad típus között. Az eddigi tanulmányokban már külön-külön vizsgálták a *SAMS* és a *SAMDC* enzimek túltermeltetésének hatását a növények abiotikus stressztűrésére és bizonyították, hogy mind a *SAMS*, mind a *SAMDC* túltermeltetése fokozza a növények különféle abiotikus stresszekkel szembeni toleranciáját, egy kísérleti rendszerben azonban még nem vizsgálták ezt a két enzimet, ami lehetővé teszi, hogy a vizsgált növényélettani paraméterek kvantitatív módon viszonyíthatóak legyenek egymáshoz, így tisztább képet

alkothatunk a két enzim sóstresszben betöltött szerepéről. Munkánk során megvizsgáltuk, hogy az eltérő etilén/poliamin arány milyen hatással van a növények fejlődésére, öregedésére és sótoleranciájára. A kísérletben a transzgénikus vonalakat és a vad típusú növényeket *in vitro* kontroll körülményeknek, illetve 10 mM NaCl stressznek tettük ki. Meghatároztuk az etilén és a poliaminok mennyiségét, a klorofill *a*, *b* és a lignin tartalmát, az ionveszteséget, a relatív H₂O₂ és O₂⁻ mennyiséget, a növekedési erélyt, a szárhosszt, a biomassza produktumot, a prolin tartalmát, valamint a transzgénikus levélkorongok nagy dózisu 300 mM NaCl stresszre adott választát. Emellett mértük az etilén és a poliamin, valamint a S-nikotin és a L-lignin metabolizmusában, illetve a SAM reciklizációjában résztvevő gének relatív expresszióját (*SAM szintáz*, *SAM dekarboxiláz*, *ACC szintáz*, *spermidin szintáz*, *spermin szintáz*, *S-adenozil-homocisztein hidroláz*, *putreszcin N-metiltranszferáz*, *fahéj-alkohol dehidrogenáz*), mivel ezek a gének olyan metabolizmusokban játszanak szerepet, amelyek számára a SAM szolgál szubsztrátként.

További célként tűztük ki, hogy meghatározzuk a *FvSAMS::sGFP* és a *FvSAMDC::sGFP* enzimek szubcelluláris lokalizációját, illetve a lehetséges sejt-kompartimentbeli változását sóstressz hatására, mivel a kísérletben alkalmazni kívánt pGWB405 bináris vektor a konstitutív CaMV35S promótert tartalmazza és a vizsgálni kívánt inszertek (*FvSAMS*, *FvSAMDC*) a *sGFP*-vel történő C-terminális fúzionáltatásra alkalmas. A korábbi tanulmányokban a SAMS-t citoplazmás lokalizációjú enzimként jellemzik növényekben, de újabb kutatások szerint a patkány esetében, már sejtmagi és citoplazmás lokalizációt detektáltak, míg a SAMDC enzim esetében kloroplasztisz, mitokondriális és citoszolikus aktivitásról számolnak be a növényekben és citoplazmás lokalizációról emlősökben.

Végül célul tűztük ki, hogy bioinformatikai elemzéssel prediktáljuk a *FvSAMS* és a *FvSAMDC* enzimek poszttranszlációs módosításában szerepet játszó lehetséges aminosav származékokat is.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

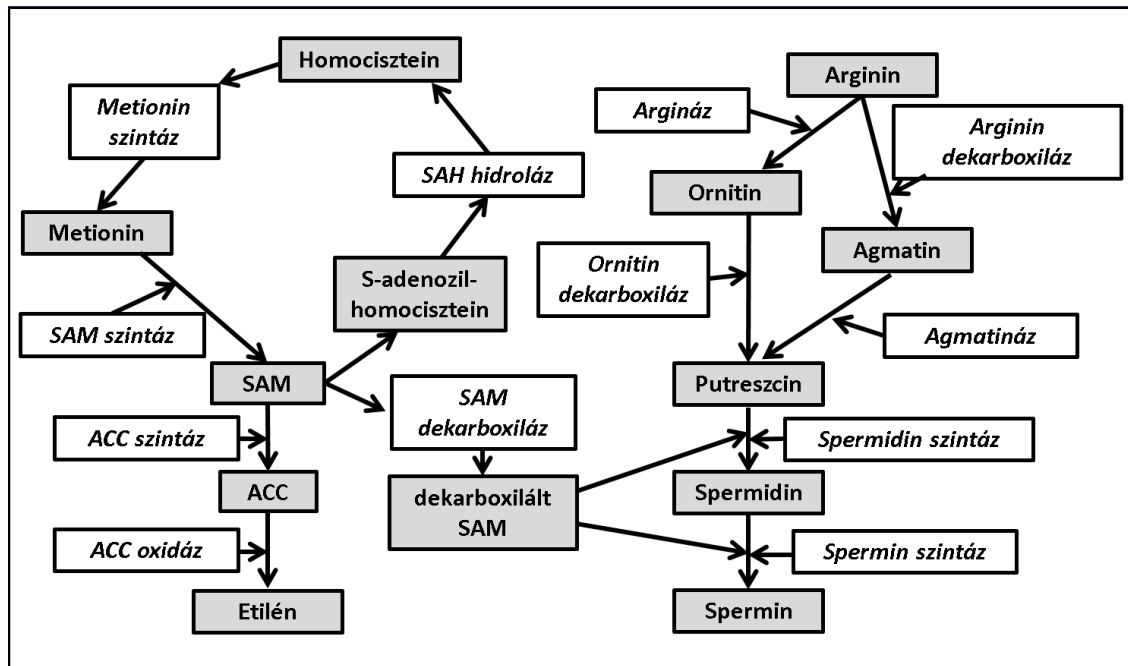
3.1 Az etilén és a poliaminok szerepe a gyümölcsérésben

Az érés során a gyümölcsök cukor tartalmában, textúrájában, színében, ízében és aromájában bekövetkező jelentős változásokat a fitohormonok szabályozzák. A gyümölcsérés kétféle típusát különböztetjük meg, az egyik az utóérő (klimaktérikus), a másik a nem utóérő (nem-klimaktérikus) változat. A klimaktérikus gyümölcsérés modellnövénye a paradicsom (*Solanum lycopersicum* L.) és jól ismert tény, hogy az etilén kulcsszerepet játszik az érésében (Alexander és Grierson, 2002). Ezzel szemben a nem-klimaktérikus gyümölcsérés modellnövénye a szamóca (*Fragaria x ananassa* Duch.), a szamóca gyümölcsérésekor azonban nincs hasonló etiléncsúcs, mint a paradicsoméban. A szamócában az etilén mennyisége a zöld érési fázisban a legnagyobb, majd a fehér fázisra visszaesik, ezt követően a piros érési fázisig enyhén emelkedik (Perkins-Veazie et al., 1996; Sun et al., 2013), míg a paradicsomban az érés kezdetekor, a narancssárga fázisban drámaian megnő az etiléntermelés, ami az érés előrehaladtával csökken (Van de Poel et al., 2012). A szamóca gyümölcs érését számos növényi hormon, komplex módon szabályozza (Shen és Rose, 2014). A szamóca gyümölcs fejlődése során az abszcizinsav (ABA) szint fokozatos növekedése csökkenti az auxin (indolecetsav /IAA/) mennyiségét, ezért azt feltételezik, hogy az ABA/IAA arány szignálként szolgál a gyümölcsérés beindításához (Perkins-Veazie, 1995). Az auxin indukálja a receptákulum sejtjeinek megnyúlását, viszont gátolja az érést (Given et al., 1988), míg a fokozódó mennyiségű ABA beindítja a gyümölcsök érését (Jia et al., 2011). Bár az exogén etilén alkalmazása nem gyakorol különösebb hatást a szamóca érésére, de represszálja számos, a gyümölcshús puhulásában szerepet játszó gén expresszióját (pl.: β -galaktozidáz, pektinmetilészteráz, β -xilozidáz) (Trainotti et al., 2001; Castillejo et al., 2004; Bustamante et al., 2009), tehát az etilén közvetve más hormonokkal, az abszcizinsavval (ABA) (Li et al., 2011); a gibberelinsavval (GA) (Csukasi et al., 2011), az auxinnal (IAA) (Given et al., 1988), a jázmonsavval (JA) (Concha et al., 2013) és a brassinoszteroidokkal (BR) (Chai et al., 2013) együtt szabályozza a szamóca gyümölcs érését.

A S-adenozil-L-metionin (SAM) a közös prekursor molekulája az etilén és a poliamin metabolizmusnak (Minocha, 1988; Martin-Tanguy, 2001). Az etilén bioszintézise során a SAM-ból az 1-aminociklopropán-1-karboxilsav szintáz (ACS) 1-aminociklopropán-1-karboxilsavat (ACC) szintetizál, majd a 1-aminociklopropán-1-karboxilsav oxidáz (ACO) az ACC-t etilénné alakítja (Yang és Hoffmann, 1984). Ha a SAM dekarboxilálódik a SAM dekarboxiláz (SAMDC) által, akkor a dekarboxilált SAM (dcSAM) a magasabb rendű poliaminok (spermidin /Spd/ és spermin /Spm/) szintéziséhez szolgáltatja az aminopropil csoportot, amit a spermidin- és spermin szintáz használ fel a reakciók során (**1. ábra**). Az **1. ábrán** látható, hogy a SAMDC a Spd és a

Spm szintézisében (Mehta et al., 2002; Hu et al., 2006), míg a közös prekursor molekulát szintetizáló SAM szintáz (SAMS) mind az etilén, mind a poliamin metabolizmusban limitáló enzim lehet, de a SAM elsődlegesen poliaminokká alakul (De Dios et al., 2006; Khan és Singh., 2010). Verseny a két útvonal között akkor alakulna ki, ha a SAM mennyisége korlátozó tényező lenne, de a poliamin és az etilén bioszintézis a sejten belüli SAM mennyiség ~10%-át használja csak fel (Ravanel et al 1998), és a SAM bőséges mennyiségben van jelen a sejtben (Bregoli et al., 2002). Woodson et al. (1992) azt bizonyította, hogy a szegfűben a megnövekedett etilén bioszintézist nem kísérte fokozott SAMS mRNS termelés.

A poliaminokat (PA) nem sorolják a növényi hormonok közé, de a fitohormonokhoz hasonlóan számos élettani és fejlődési folyamatban (növekedés, öregedés, stresszválasz) vesznek részt (Mariani et al., 1989; Nambeesan et al., 2008). A poliaminok fokozzák a sejtek megnyúlását és az aroma vegyületek kialakulását a szőlőbogyó (*Vitis vinifera* L.) érése során (Agudelo-Romero et al., 2013; Fortes et al., 2015), továbbá fontos szerepet játszanak a málna (*Rubus occidentalis* L.) és a datolya (*Phoenix dactylifera* L.) gyümölcserésben is (Diboun et al., 2015; Simpson et al., 2016). A poliaminok exogén alkalmazása viszont gátolta a barack (*Prunus persica*) érését és a gyümölcshúsának puhulását (Bregoli et al., 2002; Torrigiani et al., 2012). A poliaminok nemcsak a szamóca gyümölcs fejlődésében (Tilak és Raymond, 1996), hanem az érésében is nélkülözhetetlenek (Guo et al., 2018). Amíg a szamócában a poliaminok közül a spermidin és különösen a spermin mennyisége növekvő tendenciát mutat az érés előrehaladtával, addig a putreszcin szint fokozatosan csökken a piros érési fázisig (Guo et al., 2018). Ezzel ellentétben a paradicsomban a putreszcin szint fokozatos növekedéséről és a spermidin, spermin szint enyhe csökkenéséről számolnak be (Van de Poel et al., 2012). Látható tehát, hogy a nem klimakterikus szamócában és a klimakterikus paradicsomban eltérő módon vesznek részt a különböző poliaminok a gyümölcsök érésében.



1 ábra: Az etilén és a poliamin metabolizmusban résztvevő enzimek és termékeik. Fehér háttérű téglalap = enzim; szürke háttérű téglalap= vegyület. (Forrás: Hatanaka et al., 1999; Hobbs et al., 2005).

Az irodalmi adatok alapján megállapítható, hogy az etilén és a poliaminok a többi fitohormonnal együtt komplex módon szabályozzák a nem klimakterikus szamóca gyümölcs érését.

3.2 Az etilén és a poliamin metabolizmus a szerepe a sótolerancia kialakításában

A különböző abiotikus stressztípusok minden évben jelentős gazdasági veszteséget okoznak (Mahajan és Tuteja, 2005). Az egyik ilyen abiotikus stressztípus a sóstressz, az alkáli fém sók és a természetes só azonban kétféle típusú stresszt váltanak ki a növényekben (Shi és Yin, 1993). A művelt területek nagy hányadán a talaj tartalmaz annyi sót, ami jelentősen csökkenti a termésmennyiségeket világszerte, ezért a sóstressz molekuláris hátterének feltérképezése megkönnyítheti a sótoleráns növényfajták kiválogatását.

A fitohormonok nemcsak a gyümölcsök érésében, hanem a sóstresszre adott válaszokban is kulcsfontosságú szerepet játszanak. Az etilén a növények növekedését és fejlődését is szabályozza, sóstressz esetén azonban stresszhormonként viselkedik (Abeles et al., 1992). Az etilén- és a közvetlen prekursora, az ACC mennyisége a só- és más abiotikus stresszek hatására is nő (Morgan és Drew, 1997). Az *Arabidopsis thaliana* két haplotípusában az ACC felhalmozódása fokozódott sóstressz hatására a levelekben és a gyökerekben is (Ellouzi et al., 2014). A sóstresszelt szója *Lee68* sótoleráns genotípusában is nagyobb mértékben növekedett az etilén bioszintézisben résztvevő enzimek és termékeik mennyisége, mint a sóérzékeny *Jackson* genotípusban (Ma et al., 2012). Mind az etilén, mind az ACC exogén alkalmazása növelte az *Arabidopsis* sótoleranciáját

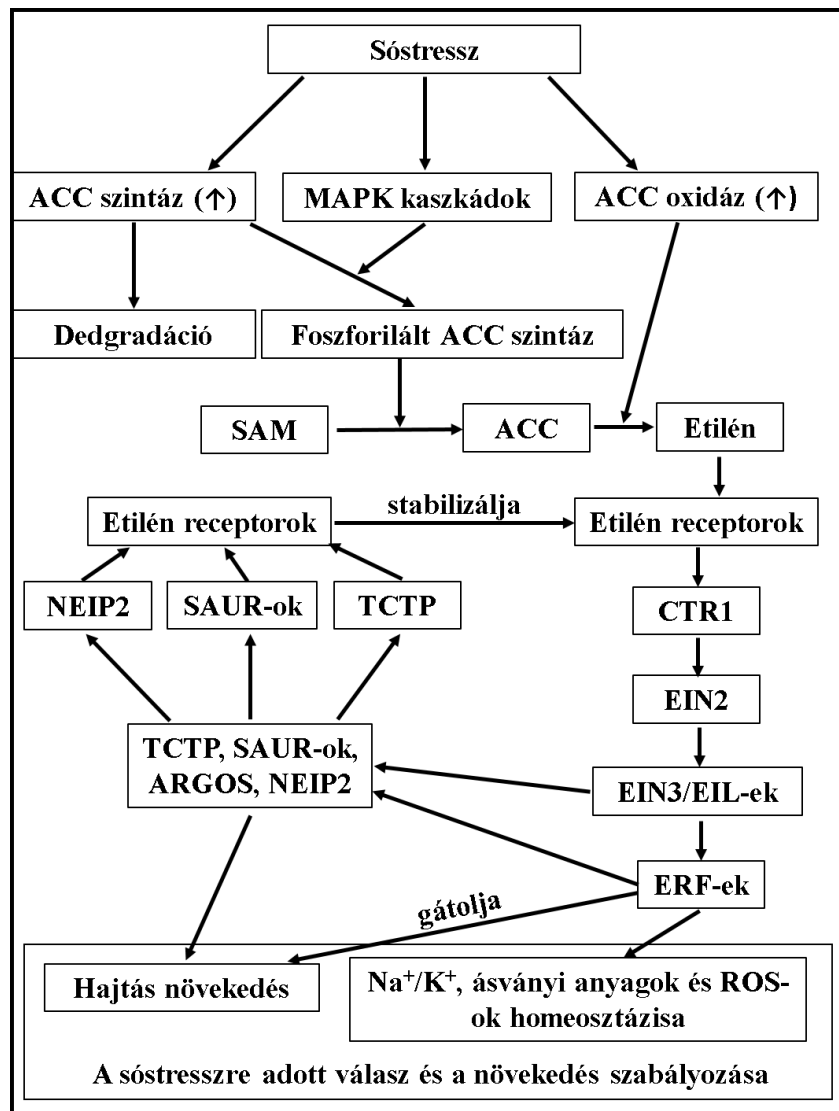
azáltal, hogy fokozta az antioxidáns rendszer enzimeinek expresszióját (Cao et al., 2007; Peng et al., 2014). A sóstressz esetén nemcsak az ACC szintáz (ACS) expressziója növekedik, hanem az ACC oxidáz (ACO) enzimaktivitása is (Kukreja et al., 2005). Gyapotban a rövid- és hosszútávú sóstressz is fokozta az ACO expresszióját (Peng et al., 2014), búzában azonban az *ACO1* expressziójának csökkenéséről számolnak be só- és más abiotikus stresszek hatására (Chen et al., 2014). Míg az etilén bioszintézisnek és a szignál transzdukciós útvonalának indukciója növeli a növények sótoleranciáját, addig a gátlása a növények sóérzékenységhez vezet.

Az ACS nemcsak transzkripciós, hanem posztttranszkripciós szinten is szabályozva van. Az ACS egyik ilyen posztttranszkripciós módosítása, hogy a stressz aktivált MAPK kaszkádok foszforilálják, ezáltal gátolják a 26S proteozóma (intracelluláris fehérje bontást végző multiprotein enzim komplexum) általi degradációját. Az *Arabidopsis*-ban a biotikus és az abiotikus stressz esetén is aktiválódik a MAPK6 (MPK6), ami foszforilálja az ACS2-t és az ACS6-ot, ezáltal fokozva az etilén termelést (Liu és Zhang, 2004), míg a MPK6 gén kiütése T-DNS inszercióval fokozta a sóérzékenységet (Shen et al., 2014). A MAPK kaszkádok mellett a kalcium függő protein kinázok (CDPK) is foszforilálhatják, az ACS-t, ami fokozza az ACC mennyiségét a stresszes szövetekben (Tatsuki és Mori, 2001; Kamiyoshihara et al., 2010).

A sóstressz esetén tehát a MAPK kaszkádok aktiválódnak, ami stabilizálja az ACC szintázokat, indukálva ezzel az etilén termelést. A sóstressz hatására az ACC szintáz és az ACC oxidáz transzkripciója is fokozódik. A sóstressz indukált etilén szignál főként a CTR1-EIN2-EIN3 receptor-útvonalon keresztül adódik át, ezáltal számos a növényi növekedésben és a sóstresszre adott válaszban is szerepet játszó effektort szabályoz. Megfelelő koncentrációban az etilén elősegíti a Na^+/K^+ , a tápanyagok és a ROS-ok homeosztázisát, így fokozva a növények sótoleranciáját (Jiang et al., 2013). Habár az ACC szintázok és oxidázok expressziója fokozódik sóstressz esetén, de feltételezések szerint a megnövekedett etilén mennyiség negatív hatással van a növények növekedésére. A fokozott mennyiségű ACC gátolta a paradicsom magoncok fejlődését (Albacete et al., 2009), növelte a Na^+ felhalmozódását a levelekben, ami oxidatív stresszt váltott ki és indukálta a levelek szenescenciáját (Ghanem et al., 2008). A túlzott etilénválaszból keletkező károk elkerülésére a növények néhány negatív 'feed-back' mechanizmust fejlesztettek ki, amelyek szabályozzák a túlzott válaszreakciót, így biztosítva a hajtások növekedését. Ebben néhány kis fehérje, mint a TCTP (translationally controlled tumor protein), a NEIP2 (ethylene receptor-interacting protein2), a SAUR-ok (auxin regulated gene involved in organ size) és az ARGOS (auxin regulated gene involved in organ size) is kulcsszerepet töltenek be. A NEIP2 és a TCTP fehérje etilén hatására indukálódik és fokozott expressziójuk csökkenti az etilénválaszt és növeli a vegetatív növekedést (Cao et al., 2015; Tao et al., 2015). A NEIP2 és a TCTP fehérjék hatásához hasonlóan az auxin által szabályozott kis fehérjék a SAUR és az ARGOS is gátolja az

etilén jelátvitelt és növeli a sejtosztódást, a sejtmegegyülést, ezáltal fokozva a magoncok növekedését (Li et al., 2015; Rai et al., 2015) (2. ábra).

Az irodalmi adatok alapján elmondható, hogy az etilén sóstresszben betöltött szerepe nagyban függ a koncentrációjától, míg nagy koncentrációban gátolja a magoncok növekedését, addig megfelelő koncentrációban növeli az antioxidáns enzimek aktivitását, ezáltal a ROS-ok homeosztázisát és szabályozza a Na^+/K^+ egyensúlyt is, fokozva ezzel a növények adaptációját a sós környezethez.



2. ábra: Az etilén szerepe sóstressz hatásra. A ↑ az expresszió fokozódását jelöli. Rövidítések: ACC - 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid; SAM - S-adeosyl-L-methionine; TCTP - translationally controlled tumor protein; ARGOS - auxin regulated gene involved in organ size; NEIP2 - ethylene receptor-interacting protein2; SAUR - Small auxin up RNA; CTR1 - constitutive triple response1; EIN2 - ethylene insensitive2; EIN3 - ethylene insensitive3; EIL - ethylene insensitive like; ERF - ethylene-responsive element binding factor (Forrás: Tao et al., 2015).

Az etilén mellett, a minden növényi sejtben jelenlevő poliaminok is fontos szerepet töltenek be a növények sótoleranciájának kialakításában, valamint a biotikus és az abiotikus stresszekre adott válaszreakcióban (Kasukabe et al., 2004; Alcázar et al., 2010). A nitrogéntartalmú ozmolitok közül a prolin és a poliaminok a legfontosabbak (Tarezynski et al., 1993; Kavi Kishore et al., 1995; Bouchereau et al., 1999). A poliaminok kötött formájukban kovalens kötéseket alkotnak a makromolekulákkal (nukleinsavak, fehérjék) (Gill és Tuteja, 2010) és aktiválhatják a nukleokapszid kináz fehérjét, ezáltal szabályozni tudják néhány a foszforilációban résztvevő fehérje aktivációját. A poliamin felvétel sejt szinten egy nagyon gyors és aktív folyamat, megközelítőleg 1-2 perc alatt eléri a telítettséget, a felvett poliaminokat a sejt többnyire a vakuolumban tárolja (Bagni és Pistocchi A poliaminok abiotikus stressz esetén szerepet játszanak az ozmotikus szabályozásban, a membránstabilitásban, a szabad gyökök eltávolításában és a sztómák mozgásának szabályozásában (Liu et al., 2007). Habár néhány tanulmány szerint csökken az endogén poliaminok mennyisége sóstressz hatására az almában, a kukoricában és a babban (Liu et al. 2008; Legocka és Sobieszczuk-Nowicka 2012), de a sóstresszelt szőlőben és a búzában főként a poliaminok felhalmozódásáról számolnak be (Upreti és Murti 2010; Iqbal és Ashraf 2012). A nagyobb mértékű sótoleranciát elsődlegesen a fokozott mennyiségű spermidin és spermin mennyiségekkel magyarázzák (Ahmad et al. 2009; Ben et al. 2009; Yamamoto et al., 2011; Alet et al., 2012). Zapata et al. (2003, 2004) különböző növényfajokban vizsgálták a sóstressz hatását az endogén poliamin szintekre és azt tapasztalták, hogy sóstressz esetén a putreszcin mennyisége csökken, de a spermidiné és a sperminé nő, míg a sóstresszelt kínai kel magoncok esetében a spermidin szint csökkent, viszont a spermin szint növekedett (Kim et al., 2010). A spermidin megóvhatja a plazmamembránt, úgy, hogy megőrzi annak integritását a stressz alatt (Roy et al., 2005), illetve megakadályozza a szuperoxid-generáló NADPH-oxidáz aktiválódását is (Shen et al., 2000). Az oldhatatlan kötött poliamin formák a mitokondriumok és a plazmamembránok megóvásában és stabilizálásában is szerepet játszanak (Jia et al., 2010). A poliaminok a sejt minden kompartmentjében jelen vannak, beleértve a sejtmagot is, ami egyértelműen alátámasztja a multifunkciós szerepüket az abiotikus stressztolerancia kialakításában. A poliaminok bioszintézisét az arginin dekarboxiláz (*ADC*), az ornitin dekarboxiláz (*ODC*) és a SAM dekarboxiláz (*SAMDC*) szabályozza a növényekben (Hasegawa et al., 2000). A poliaminok, különösen a spermidin (Spd), növeli a tonoplaszt H^+ -ATPáz és H^+ -PPáz (ion transzporterek) aktivitását, amelyek a citoszólikus Na^+ -t a vakuólumba pumpálják, így kialakítva az ion és pH egyensúlyt a sejtben, ezért a spermidin aktivált tonoplaszt H^+ -ATPáz és H^+ -PPáz alapvető szerepet játszik a növények sótoleranciájának kialakításában (Roy et al., 2005; Liu et al. 2006). A poliaminok nemcsak a sótolerancia megnyilvánulásában, hanem a

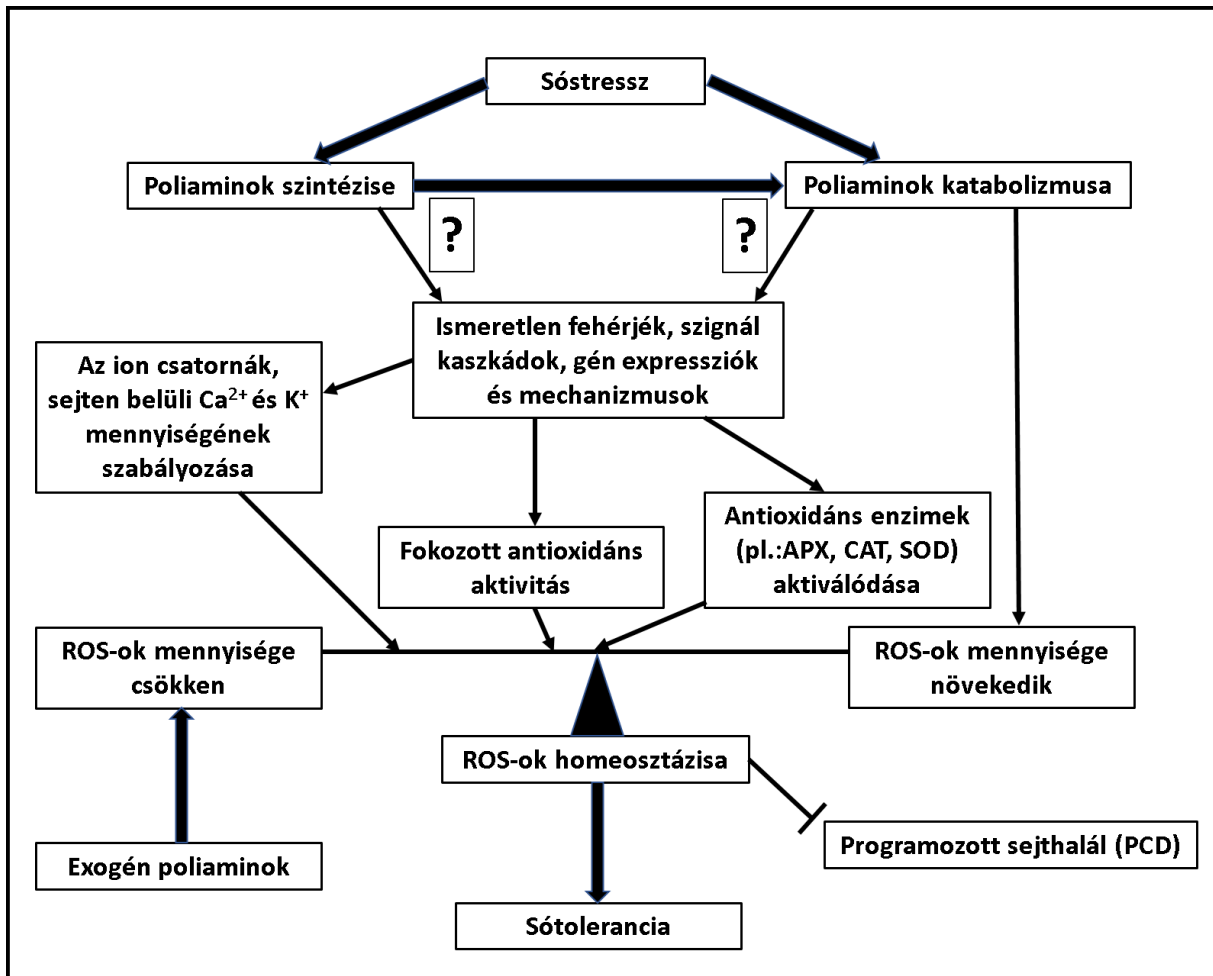
só indukálta stressz jelzésben is szerepet játszanak, mégpedig a spermidin indukálta foszforiláció révén (Gupta et al. 2012a, b).

Exogén poliaminokat már sikeresen alkalmaztak a sótolerancia biztosítására növényekben. Az exogén putreszcin csökkentette a Na^+ és a Cl^- ionok felhalmozódását a sóstresszelt nadragulya különböző szerveiben (Ali, 2000), valamint fokozta a sóstresszelt barna mustárban és csicséri borsóban az antioxidáns enzimek és a karotenoidok aktivitását (Verma és Mishra, 2005; Sheokand et al. 2008), továbbá csökkentette a lipid peroxidációt virginiai fenyőben (Tang és Newton, 2005). Az exogén putreszcin pozitívan hatott a gyökeresedésre is a 100 mM NaCl stressznek kitett uborka (*Cucumis sativus* L.) magoncok esetében azáltal, hogy csökkentette a Na^+ felvételét és fokozta kálium felhalmozódását a gyökerekben (Shi et al., 2008). A putreszcin mellett az exogén spermidin is fokozza a növények sótoleranciáját, azáltal, hogy stabilizálja a foszfolipid membránokat, megköti a szabad gyököket és fenntartja a Na^+/K^+ egyensúlyt (Saleethong et al. 2011), továbbá csökkenti a Na^+ felvételt a gyökerekben és megelőzi a K^+ veszteséget a sejtekből (Zhao és Qin, 2004; Zhao et al. 2007). Az exogén spermidin a feltételezések szerint gátolja a Na^+ transzportot a gyökerekből a levelek felé (Zhu et al., 2006). A putreszcin mellett az exogén spermin alkalmazása is növelte a sóstresszelt uborkában az antioxidáns enzimek közül a szuperoxid-dizmutáz, a peroxidáz és az aszkorbát-peroxidáz aktivitását, amik csökkentették a szuperoxid anion és malondialdehid mennyiségét (Shu et al., 2013). A poliaminok közül tehát mind a Put, mind a Spd és mind a Spm exogén alkalmazása növelte a növények sótoleranciáját, de a korábbi tanulmányok többsége szerint a Spd-nek van a legnagyobb szerepe a sótolerancia kialakításában (Shen et al., 2000; Kasukabe et al., 2004; Kasukabe et al., 2006; Hu et al., 2012).

Mind az etilén, mind a poliaminok fontos szerepet játszanak a növények biotikus és abiotikus stresszválaszaiban (Müller és Munné-Bosch, 2015; Romero et al., 2018), továbbá fokozott mennyiségben pozitív hatásuk van a növények sótoleranciájára (Jang et al., 2012; Peng et al., 2014; Shen et al., 2014). Számos tanulmány szerint azonban az etilén és a poliamin metabolizmus antagonisztikus hatású a különböző biotikus és abiotikus stresszek esetén (Li et al., 2004; Nambeesan et al., 2012; Yu et al., 2016).

A poliaminok összetett szerepét az abiotikus stressztolerancia kialakításában a **3. ábra** szemlélteti. Ezen az ábrán látható, hogy az etilénhez hasonlóan sóstressz esetén a poliaminok is fokozzák az antioxidáns rendszer enzimaktivitását és az ioncsatornák szabályozásával pedig kialakítják a Na^+/K^+ egyensúlyt, ezáltal szabályozzák a ROS-ok és Na^+/K^+ homeosztázisát. A poliaminok katabolizmusa stressz esetén növeli a H_2O_2 tartalmat, ami kis koncentrációban szignálmolekulaként játszik fontos szerepet a stresszadaptációban, de túlzott mennyiségben kiválthatja a programozott sejthalált (PCD) is (Moschou et al., 2008a, b). A poliaminoknak a sótolerancia kialakításában játszott szerepéről egyre többet tudunk, a hatásmechanizmusuk

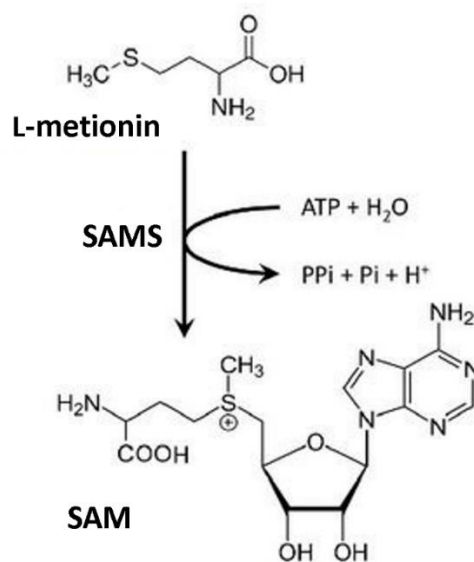
azonban még számos kérdést vet fel, amit a jövőben vélhetően feltérképeznek, mivel ezekkel a kérdésekkel világszerte sokan foglalkoznak.



3. ábra: A poliaminok szerepe a sótolerancia kialakításában (Forrás: Saha et al., 2015). A nyíl az indukciót, a \perp a gátlást jelöli.

3.3 Az etilén és a poliamin metabolizmus közös prekursorát előállító S-adenozil-L-metionin szintáz (SAMS) és a S-adenozil-L-metionin (SAM)

A S-adenozil-L-metionin szintáz szintetizálja a S-adenozil-L-metionint (AdoMet, SAM) L-metioninból és ATP-ből (**4. ábra**). A SAM a második legtöbbet használt enzim-szubsztrát az ATP után (Cantoni, 1975). A SAMS enzim 3 strukturális doménből épül fel. Az N-terminális domén eléggé konzervált a különböző fajokban, ennek az lehet az oka, hogy fontos funkciót lát el a szubsztrátban és a kation kötésben (Garrido et al., 2011). A centrális domén pontos funkciója még nincsen tisztázva, de úgy gondolják, hogy fontos a katalízisben. A C-terminális domén funkcióját már ismerjük, a citoplazmás lokalizációban tölt be fontos szerepet, amit a domén struktúrája határoz meg (Reytor et al., 2009).



4. ábra: A S-adenozil-L-metionin szintézise L-metioninből és ATP-ből. (Forrás: Vanderstraeten és Van Der Straeten, 2017).

Szerkezetüket tekintve mind a három domén 2 alfa hélixből és 4 béta szálból áll (Takusagawa et al., 1996). A rizsben a SAM szintáz poliadenilációs szignálja a stop kodontól downstream irányban 119 bp-ra található (AATAAT), a fő ORF tartalmaz egy ATP kötőhelyet, ami a GAGDQG peptidekből áll (rizsben a 121.-126. aminosavat fedi) (Van Breusegem et al., 1994). A SAM forrásként szolgálhat a metilén-, az amino-, a ribozil- és az aminopropil csoportoknak (Fontecave et al., 2004), valamint számos transzmetilációs reakcióhoz is szubsztrátként szolgál mind a prokariotákban, mind pedig az eukariotákban (Tabor és Tabor 1984; Boerjan et al. 1994). A SAM részt vesz a gének transzkripciójában, a sejtosztódásban és a másodlagos metabolitok szintézisében is (Yoon et al., 2012). A SAM-ra mind a mitokondriumban, mind a kloroplasztisban szükség van a DNS, a RNS és a fehérjék metilálásához (Montasser-Kouhsari et al., 1978; Block et al., 2002). Miután a DNS metileződik, gének kapcsolódhatnak ki, ezért a SAM-ra lehet úgy tekinteni, mint egy génexpresszió szabályozóra (Reytor et al., 2009), a SAM képes megkötni bizonyos RNS szerkezeteket (riboswitch), ezáltal szabályozni a transzkripciót vagy translációt, így mennyiségtől függően több gén expresszióját is kontrollálhatja (Loenen, 2006). A SAM fehérje aktivitásának búza embriók poszttranszkripcionális szabályozása mellett a mRNS-ekről képződő, *de novo* fehérjeszintézishez is köze van (Mathur et al., 1992). A SAM, mint kofaktor szolgál a nukleázoknak, amelyek a SAM hiányában nem hasítják a DNS-t. Becslések szerint a SAM 95%-a a metileződés során használandó fel és csak 3-5%-a dekarboxilálódik (Merali és Clarkson, 2004). Miután az aminopropil átvitel megtörténik a dekarboxilált SAM-ból a keletkezett 5-metiltioadenozin újrahasonosítódik a metioinban, ezt követően a SAM-ban, majd végül a dekarboxilált SAM-ban, ezeket a reakciókat a Yang ciklus enzimeit katalizálják (Miyazaki és Yang, 1987), ezáltal a SAM szintáz limitáló enzim

a metionin ciklusban (Markham és Pajares, 2009). A S-adenozil homocisztein (SAHcy) a metilációs reakciók során keletkezik a SAM-ból és erős gátlószere a metiltranszferázoknak (Weretilnyk et al., 2001). A SAM-on alapul a putreszcín metilációja, ami a nikotin bioszintézis egyik kulcslépése. A putreszcín-N-metiltranszferáz (PMT) egy a SAM-függő metiltranszferáz, amely katalizálja a diamín putreszcín monometilációját N-metilputreszcinné (NMP), valamint S-adenozil homociszteiné (SAHcy). A nikotin, a tropán és a nortropán alkaloidok bioszintézisében a N-metilputreszcín az első metabolit (Biastoff et al., 2009), emellett a *SAMS1* mRNS felhalmozódása és a legtöbb virágillat összetevő (pl.: metil-benzoát) mennyisége között is összefüggést figyeltek meg *Nicotiana suaveolens* virágában (Roeder et al., 2009), tehát ezeknek a másodlagos metabolitoknak a bioszintézise is a SAM-on alapul. Ugyanakkor a lignin a legfőbb metabolikus fogyasztója a SAM-nak, ennek ellenére a lignin akkumuláció csak bizonyos sejtekben és fejlődési fázisokban figyelhető meg (Hanson et al., 1994). A lignin az elsődleges és a másodlagos sejtfal között halmozódik fel. Mivel a vaszkuláris szövetek erősen lignifikáltak, ezért az *Arabidopsis*-ban már jellemzett *SAMS1* expressziós mintázata utalhat az SAM nélkülözhetetlenségére e sejtfal összetevő szintézisében, mivel a *GUS* génnel fuzionáltatott *SAMS1* 5'UTR a vaszkuláris szövetekben expresszált a leginkább (Peleman et al. 1989a, 1989b). Az *Arabidopsis thaliana mto3* mutánsban a *SAMS3*-as gén ATP-kötő doménjének egyetlen aminosavában van a pontmutáció, ami az *mto3* fenotípust okozza. A mutáció a *SAMS3* gén expressziójában és a SAMS összfehérje mennyiségében nem, de a SAMS enzimaktivitásában és a SAM össz mennyiségében, illetve a lignin tartalomban csökkenést okoz, ami a *SAMS3* lignin bioszintézisben betöltött jelentőségére utal (Shen et al., 2002). Továbbá Sánchez-Aguayo et al. (2004) arról számolnak be, hogy a sóstresszelt paradicsom növényekben a nagyobb SAM aktivitás és a sóstressz hatására a vaszkuláris szövetekben fokozott mennyiségben lerakódó lignin között összefüggés van.

A paradicsom legkevesebb 3 *SAMS* génnel rendelkezik, amelyek eltérő módon expresszálnak a különböző környezeti stresszek hatására. A NaCl, a mannit és az abszcizinsav hatására a *SAMS1* mRNS a levélben és a gyökérben, a *SAMS3* transzkriptumai csak a gyökérben halmozódtak fel, míg a *SAMS2* gyengén expresszált az összes vizsgált szövetben és nem reagált a sóstresszre (Espartero et al. 1994). A rizsben *SAMS* transzkriptumok mennyisége 2-4-szeresére emelkedett a szárazság stresszt követő 5-180 perc elteltével, ugyanakkor hasonlóan magas expressziót figyeltek meg a levél- és a gyökérfejlődés korai szakaszában is (Van Breusegem et al., 1994). A sóstressz hatására fokozódott a *SAMS* mRNS mennyisége a rózsameténgben, a búzában és a ginzegben is (Schröder et al., 1997; Pulla et al., 2009; Kamal et al., 2012), ugyanakkor a gomba elicitoros kezelések is növelték a *SAMS* transzkriptumok mennyiségét lucernában és

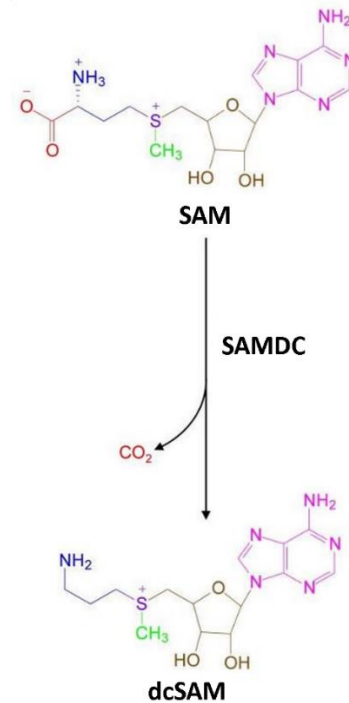
petrezselyem sejt kultúrában (Gowri et al., 1991; Kawalleck et al., 1992), ami a SAMS biotikus stressztoleranciában betöltött szerepére utal.

Transzgénikus rendszerben vizsgálva a *SAMS* túltermeltetése fokozta a dohányban a sóstressz (Qi et al., 2010), a paradicsom a NaHCO_3 (szódabikarbóna) stressz, (Gong et al., 2014), a dohányban a hideg stressz (Guo et al., 2014), és a *Arabidopsis thaliana*-ban a só- és a hideg (Kim et al., 2015), valamint a só- és az oxidatív stressz (Ma et al., 2017) esetén a transzgénikus vonalak stressztoleranciáját a vad típusához viszonyítva.

Általánosan elfogadott, hogy a SAM szintáz kizárólag a citoszolban lokalizálódik a növényekben (Schröder et al., 1997; Ravel et al., 1998; Hanson és Roje, 2001), de újabb vizsgálatok alátámasztották a SAM szintáz kettős lokalizációját, ami sejtmagi és citoplazmás jelenlétet mutatott a vizsgált patkánysejtekben (Reytor et al., 2009).

3.4 A poliamin metabolizmus prekursor molekuláját termelő S-adenozil-L-metionin dekarboxiláz (SAMDC) és a dekarboxilált SAM (dcSAM)

A SAM-ból a SAMDC állítja elő a dekarboxilált SAM-ot (dcSAM), ami aminopropil csoportot szolgáltat a magasabb rendű poliaminok (spermidin és spermin) szintéziséhez (**5. ábra**). A SAMDC egy erősen szabályozott enzim, melynek szintjét nagyban befolyásolja a sejt fejlettségi állapota és a sejten belüli poliamin szint (Stanley, 1995).



5. ábra: A SAM dekarboxilációja a magasabb rendű poliaminok (spermidin és spermin) szintéziséhez. (Forrás: Sufrin et al., 2009).

A poliamin szinttől függően a SAMDC enzim szabályozása történhet transzkripció- és poszttranszlációs szinten is (Pegg, 1986), mivel az 5'UTR-e olyan válaszelemeket tartalmaz, amelyek érzékelik a poliaminok mennyiségét és a környezeti változásokat is (Hu et al., 2005). A SAMDC proenzimként szintetizálódik, ami egy aktív oldalú piruvil csoport hatására autokatalitikus hasításon megy keresztül. Az emlősökben a SAMDC egy aktív dimer, amelyben mindegyik protomer tartalmaz egy alfa és egy béta alegységet. Számos magasabbrendű szervezetben az autokatalízist és a dekarboxilációt a putreszcin stimulálja, ezzel ellentétben a növényi SAMDC a putreszcin hiányában is teljesen aktív, az autokatalízist nem befolyásolja (Bennett et al., 2002). A SAMDC gének közül néhány az 5'UTR régiójában egy 'tiny' nyílt leolvasási keretet (ORF) tartalmaz, ami negatív hatással van a SAMDC gén fő ORF-ének kifejeződésére (Hanfrey et al., 2002, Tassoni et al., 2007). A SAMDC fő ORF-ével transzformált növények átlagban kétszeres expressziót mutattak a vad típushoz képest, viszont a 'tiny' ORF-et is tartalmazó konstrukcióval transzformált növényekben a vad típussal megegyező expressziós szintet mértek, ez is alátámasztja a SAMDC 'tiny' ORF-ének szabályozó szerepét a SAMDC gén kifejeződésében (Hu et al., 2006).

A SAMDC promóterével a GUS riportergén expressziója fokozódott a NaCl, a káliumfoszfát és az ABA stressz hatására is, valamint a rövid idejű sóstressz is növelte a SAMDC1 mRNS mennyiségét *in vitro* almában (Liu et al., 2008), ami a SAMDC abiotikus stressztolerancia kialakításában betöltött szerepét támasztja alá. A SAM dekarboxiláz a spermidin és a spermin bioszintéziséhez aminopropil csoportot biztosít (Thu-Hang et al., 2002; Kusano et al. 2008), ezáltal a magasabb rendű poliaminok szintézisében a SAMDC limitáló enzim (Peremarti et al., 2009).

Az *Arabidopsis thaliana*-ban a SAMDC egy kis géncsalád, amelynek négy nagyon homológ tagja van (Franceschetti et al., 2001). A SAMDC1 (At3g02470) fő leolvasási keretének mérete 1101 bp, intronos 'tiny' ORF-et tartalmaz és minden szervben magasan, de a becőben mutatja a legmagasabb expressziót. A SAMDC2 (At5g15950) ORF-ének mérete 1089 bp, intron nélküli 'tiny' ORF-et tartalmaz és a gyökérben, a levélben és a virágban mutat magas expressziós szintet. A SAMDC3 (At3g25570) fő leolvasási keretének mérete 1050 bp, intronos 'tiny' ORF-et tartalmaz és minden szervben alacsonyan expresszál. A SAMDC4 (At5g18930) ORF-ének mérete 1044 bp, nem tartalmaz 'tiny' ORF-et és minden szervben alacsony szintű expressziót mutat, de *Arabidopsis thaliana samdc1* hiánymutásban magasan expresszál. A BUD2 (Bushy and dwarf2=SAMDC4) és SAMDC1 dupla hiánymutásban viszont embrió letalitást figyeltek meg, ami bizonyítja a SAMDC alapvető szerepét a növényi embriógenézisben is (Ge et al., 2006). Az alma SAMDC1 enzim a gyümölcsfejlődésben és a sejtnövekedésben, míg a SAMDC2 fehérje a stresszválaszokban játszik szerepet (Hao et al., 2005).

A korábbi tanulmányokban már leírták, hogy *SAMDC* túltermeltetése fokozta a rizsben a só- (Roy és Wu, 2002), valamint az ozmozikus- és a szárazság stressz (Peremarti et al., 2009), a dohányban a só- és a szárazság stressz (Waie és Rajam, 2003), valamint a só-, az oxidatív- és a hideg stressz (Wi et al., 2006), a paradicsomban a hőstressz (Cheng et al., 2009) és az *Arabidopsis thaliana*-ban a szárazság stressz (Wi et al., 2014) hatására a transzgénikus vonalak stressztoleranciáját a vad típushoz viszonyítva. Az *Arabidopsis thaliana*-ban a *SAMDC* túlexpresszáltatása, illetve csendesítése, azt bizonyította, hogy az etilén és a poliamin bioszintézis antagonistikus hatással van egymásra (Hu et al., 2006). A *SAMDC* csendesítése a dohányban viszont fokozott sóérzékenységet okozott, ugyanakkor a dcSAM (dekarboxilált SAM) deficiencia pozitívan hatott kontroll körülmények között a transzgénikus növények biomassza produktumára és a szárnak a hosszára (Mellidou et al., 2016). A *SAMDC* gén csendesítése fokozta a sóstressz indukálta PCD-t is (programozott sejthalál) és azt feltételezik, hogy a sóstressz hatására az endogén spermidin az apoplastban indukálódik, ahol a poliamin oxidáz (PAO) katabolizálja és így H₂O₂ termelődik. A felhalmozódott H₂O₂ vagy a toleranciaválaszt, vagy a PCD-t váltja ki az intracelluláris poliamin mennyiségektől függően (Moschou et al., 2008a).

A növényekben a *SAMDC* aktivitásáról számolnak be a kloroplasztisban, a mitokondriumban és a citoszolban (Yamanoha és Cohen, 1985; Torrigiani et al., 1986), míg emlősökben citoplazmás lokalizációt figyeltek meg (Gritli-Linde et al., 1995).

3.5 Az abiotikus stresszérzékelés és -válasz a növényekben

A központi stressz-szignálútvonalban a protein kinázok fontos szerepet játszanak a növényekben is, hasonlóan, mint a gombákban a SNF1 (sucrose non-fermenting1) és az emlősökben az AMP aktivált protein kinázok (AMPK), ami arra utal, hogy a növényekben a stresszszignál érzékelése az energia érzékeléséből származik. A stresszszignál szabályozza az ion- és a víztranszport szempontjából nélkülözhetetlen fehérjéket és a metabolikus, génexpressziós újraprogramozást is, hogy stressz hatására kialakítsa az ion- és vízhomeosztázist, valamint a sejtstabilitást. A szárazság és a sóstressz szempontjából fontos az elsődleges és a másodlagos stresszszignálok megkülönböztetése. A szárazság okozta elsődleges jel a hiperozmotikus stressz, amelyet gyakran csak ozmotikus stressznek neveznek, mivel a hipoozmotikus állapot általában nem okoz problémát a növényi sejtek számára. A sóstressz mind ozmotikus stressz, mind iontoxicitású hatással van a sejtekre. A szárazság és a sóstressz másodlagos hatása az oxidatív stressz, ami a sejt-komponensek (pl.: a membránlipidek, a fehérjék és a nukleinsavak) sérülését okozza, így anyagcserezavarok léphetnek fel. Bár néhány sejtreakciót az elsődleges stresszszignálok, viszont számos sejtválaszt a másodlagos jelek generálnak, ezáltal a szárazság és a sóstressz érzékelése egyedi és átfedő jelekkel is rendelkezik. A szárazság és a sóstressz egyik

közös jellemzője, hogy a hiperozmotikus jel indukálja az abszcizinsav (ABA) felhalmozódását, ami számos adaptív válaszreakciót vált ki a növényekben (Zhu, 2002).

A növényi sejtek képesek a különböző környezeti jelek érzékelésére, ezidáig azonban csak néhány feltételezett szenzort azonosítottak. Az egyik feltételezett szenzort az *Arabidopsis*-ban fedezték fel és kimutatták, hogy a hiperozmotikus stresszérzékelésében játszik szerepet, a neve OSCA1 (reduced hyperosmolality-induced calcium increase1). Az OSCA1 egy plazmamembrán fehérjét kódol, amely a hiperozmolaritás által gátolt kalcium-áteresztő csatornát képez, nem ismert azonban, hogyan érzékeli az OSCA1 az ozmotikus stresszt, de az *Arabidopsis* OSCA1 hiánymutánsban a vad típushoz képest csökkent kalciumcsúcsot figyeltek meg szorbit és mannit kezelés (ozmotikus stressz) hatására (Yuant et al., 2014).

Számos mechano-szenzitív csatorna már jól ismert a nem-növényi rendszerekben, köztük a TRP (transient receptor potential channel), a DEG / ENaC (degenerin/epithelial sodium channels), a K2P (two-pore potassium channel), az MscS-szerű (mechanosensitive channel of small conductance-like) és a Piezo csatornák (Arnadóttir és Chalfie, 2010; Hedrich, 2012). A növényekben azonban hiányoznak a TRP és a DEG / ENaC gének, viszont a MscS-szerű fehérjék egy családját, valamint egy Piezo homológot már azonosítottak (Hedrich, 2012). A MSL8 egy MscS-szerű fehérje az *Arabidopsis*-ban, ami a pollen túléléséhez szükséges a hidratáció során fellépő hipoozmotikus sokk esetén (Hamilton et al., 2015). A növényekben viszont nagy családja van a CNGC-nek (cyclic nucleotide-gated channel), valamint a GLR-nek (glutamate receptor-like channel), amelyek feltehetően nagyon fontos szerepet játszanak a citoszólikus Ca^{2+} jelek generálásában stressz esetén (Swarbreck et al., 2013).

A másik feltételezett szenzor a COLD1, amelyet a közepesen hidegtűrő rizsben azonosítottak. A COLD1 egy transzmembrán fehérje a plazmamembránban és az endoplazmitikus retikulumban (ER), amely az egyedüli heterotrimer G fehérje alfa alegységével az RGA1-gyel lép kölcsönhatásba. Azt feltételezik, hogy a COLD1 szabályozhatja a kalciumcsatornát, vagy maga a hideg-érzékelő kalciumcsatorna (Ma et al., 2015). Mind a hideg, mind a meleg képes megváltoztatni a sejtfoszfolipid membránok fluiditását (Sangwan et al., 2002). Ezt a változást a fontosabb membránfehérjék érzékelik, beleértve a különböző transzportereket és a membránhoz-kötött receptor-szerű kinázokat (RLK-k). A hőstresszt a dajkafehérjék (chaperonok) is érzékelik, amelyek a hő hatására a denaturálódott hibás fehérjékhez kötődnek (Scharf et al., 2012), ezt a kötést a hőstressz indukálta transzkripciós faktorok feloldják, így aktiválják a hőstressz-válasz géneket. Jelenleg a H2A. Z (hiszton 2A. Z) nukleoszómákat termoszenzoros apparátusnak tekintik a növényekben és az élesztőgombákban is (Kumar és Wigge, 2010). Azt feltételezik, hogy a H2A. Z nukleoszómák a H2A nukleoszómákat zárják szorosabbra, így a magas hőmérséklet hatására a

H2A. Z nukleoszómák a RNS-polimeráz II számára teszik hozzáférhetőbbé a DNS-t, ezáltal fokozva a hősokk fehérjék (HSP-k) és más gének expresszióját.

3.6 A sóstressz-válaszban szerepet játszó ion-, ozmotikus- és abszcizinsav (ABA) stresszjelzés

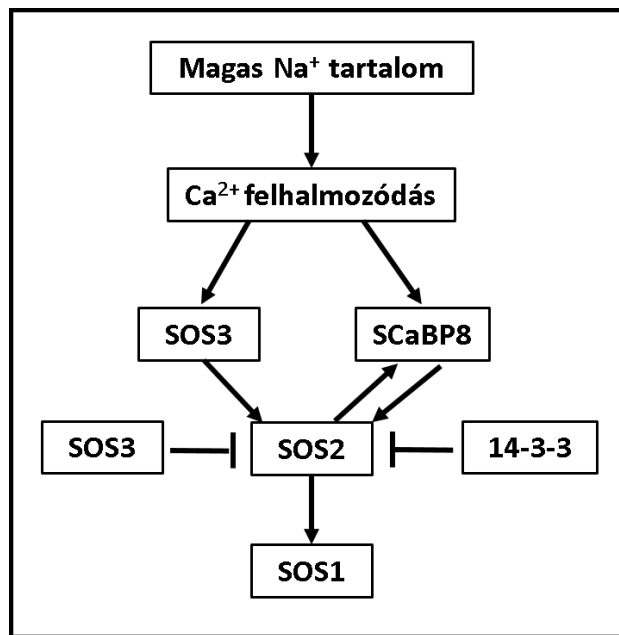
A magas sótartalom ion toxicitást (főként Na^+), hiperozmotikus stresszt és másodlagos stressztként oxidatív károkat okoz (Zhu, 2002), az nem ismert azonban hogyan érzékelik a Na^+ -t a sejtrendszer. A *Saccharomyces cerevisiae* élesztőben a kalcineurin útvonal fontos szerepet játszik a Na^+ stressz észlelésében és a tolerancia kialakításában (Thewes, 2014). A Na^+ stressz hatására a citoszólikus kalcium hozzákötődik az EF-hand kalcium-kötő kalmodulin fehérjékhez és a kalcineurin B alegységéhez (CnB). A Ca^{2+} -CnB és Ca^{2+} -kalmodulin komplexek aktiválják a kalcineurin foszfát katalitikus alegységet, a CnA-t. Az aktivált foszfatáz defoszforilálja a zink ujj (Zink-finger) transzkripció faktor a CRZ1-t (Calcineurin-responsive zinc finger transcription factor), amely a sejtmag felé mozdul, hogy aktiválja az *ENAI* (ENA P-type ATPase1) és más célgének expresszióját. Az *ENAI* kódolja a Na^+ -ATPáz, ami kiszivattyúzza a toxikus Na^+ -t a sejtekből, így helyreállítva az ionhomeosztázist.

A növényi genom nem kódol kalcineurin fehérjéket, ennek ellenére a név a kalcineurin B-like (CBL) széleskörben el van fogadva, amikor a növényi EF-hand kalcium-kötő fehérjék családjára utalnak (Yu et al., 2014). A növények ehelyett kalcium-függő protein kináz útvonalat használnak (SOS – salt overly sensitive) a sóstressz jelzésére és a Na^+ tolerancia kialakítására (Zhu, 2002). A *SOS* géneket a SOS fenotípusú mutánsok alapján azonosították (Zhu, 2000). Ezen az útvonalon az EF-hand kalcium-kötő fehérje a SOS3 érzékeli a citoszólikus kalcium jelet, amelyet a sóstressz vált ki. A SOS3 kölcsönhatásban áll és aktiválja a SOS2-t, egy szerin/treonin fehérje kinázt. A SOS3 elsődlegesen a gyökérben expresszálódik, míg a SOS3 paralog, a SCaBP8 (SOS3-like calcium binding protein8) főként a hajtásban, de hasonló szerepet tölt be, mint a SOS3 (Quan et al., 2007). Az aktivált SOS2 foszforilálja és aktiválja a SOS1-t a Na^+/H^+ antiportert a plazmamembránnál (Zhu, 2002). A SOS1 a gyökér epidermális sejtjeiben és a xilém parenchima sejtjeiben expresszálódik, így az aktivált SOS1 képes kilökní Na^+ -t a talajba és Na^+ -t tud bejutatni a xilémbe a hosszútávú levéltranszporthoz, hogy az a transzpirációs vonalon keresztül távozzon (Shi et al., 2002; Zhu et al., 2016). A hosszútávú „transzportban” a SOS1 szerepe csak részben tisztázott, mivel a SOS1 a levél xilém parenchimában is expresszálódik és feltételezések szerint a SOS1 funkciója feltehetően az, hogy kilökje Na^+ -t a xilém parenchima sejtjeiből a mezofill sejtek apoplastikus terébe.

A HKT1 (high affinity K^+ transporter1) egy másik fontos transzporter, amely fontos szerepet tölt be a Na^+ hosszútávú transzportjában (Mäser et al., 2002). A gyökerekben HKT1 kilöki Na^+ -t

a xilémből, így korlátozza a Na^+ mennyiségét a transzpirációs áramban, viszont a levelekben Na^+ -t jutatt a floémbe, hogy azt visszajutassa a gyökerekbe. Feltételezések szerint a SOS1 és a HKT1 transzporter szerepe a hosszútávú Na^+ transzportban függ a sóstressz mértékétől. Enyhe sóstressz hatására a SOS1 aktiválódik a xilém parenchima sejtekben, ezáltal több Na^+ szállítódik a levelekbe, ahol a Na^+ elraktározódik a mezofill sejtek nagy vakuólumaiban, így a későbbiekben résztvehet a sejtek ozmotikus szabályozásában és a növekedés fokozásában. Súlyosabb sóstressz esetén viszont a nagymértékű Na^+ export a meghaladja a mezofill sejtek tároló kapacitását, így a Na^+ visszacirkulálódik HKT1 által a levelekből a gyökerekbe. A sóstressz esetén a magas Na^+ citoszolikus Ca^{2+} jelet vált ki, ami aktiválja a SOS3/SCaBP8-SOS2 fehérje kinázokat, melyek foszforilálják és szabályozzák a SOS1 (Na^+/H^+ antiporter) aktivitását. Nyugalmi vagy stresszmentes állapotban a SOS2 kölcsönhatásban van a 14-3-3 fehérjékkel, ezáltal a SOS2 inaktív (Zhou et al., 2014). Ezenkívül a SOS2 egy 2C típusú fehérje foszfáttal (ABI2 – Ableson interactor2) is kölcsönhatásban van, ami szintén fontos szerepet játszik a SOS2 inaktivációjában (Ohta et al., 2003) (6. ábra).

Az SOS útvonal volt az első abiotikus stresszjelútvonal, amelyet növényekben feltérképeztek (Zhu, 2000). A központi jelet az SOS2 képviseli, ami egy nagy fehérje kináz családot alkot és a katalitikus doménje hasonló az élesztő *sucrose non-fermenting1* (SNF1) és az emlősök AMP-aktivált protein kináz (AMPK) doménjéhez. Az *Arabidopsis*-ban ezek a fehérjék a 'SNF1-related' kinázok (SnRK). A SnRK-nak *Arabidopsis*-ban 3 alcsaládjá van. Az 1. típusú alcsaládnak a SnRK1-nek 3 tagja, a 2. típusú alcsaládnak a SnRK2-nek 10 tagja, míg 3. típusú alcsaládnak a SnRK3-nak 25 tagja van (Hrabak et al., 2003). Mind a 25 SnRK3 (más néven CIPK – Calcineurin B-like interacting protein kinase, SOS2) kölcsönhatásba lép mind a 10 SOS3-szerű kalcium-kötő fehérjék egy vagy több tagjával (SCaBP, más néven CBL). A kölcsönhatás egy gyakori motívum által megy végbe, amit FISL-nek neveznek és a kináz N-terminális szabályozó régiójában található. A FISL motívum vagy az egész szabályozó régió deléciója azonban a kinázok konstitutív aktivációjához vezet (Guo et al., 2001).



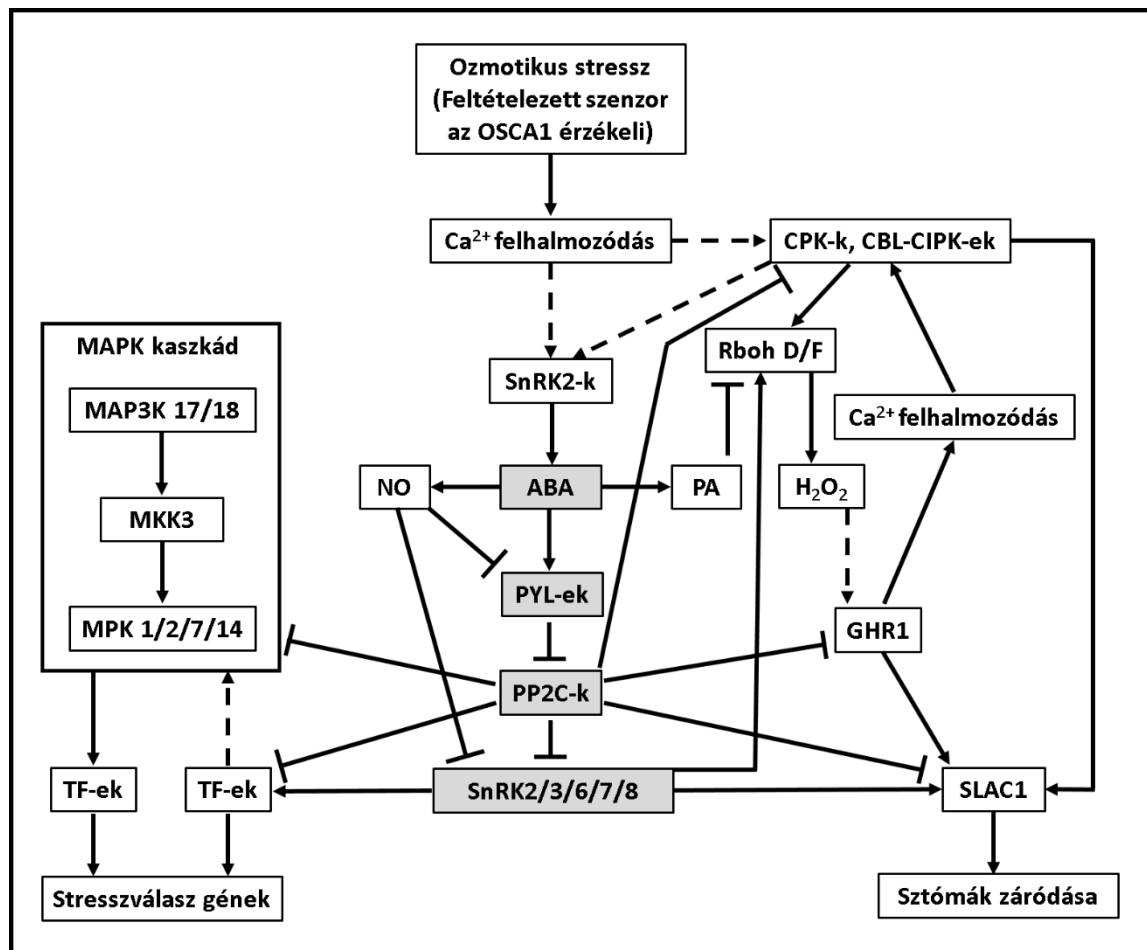
6. ábra: A sóstressz hatására a magas Na^+ indukálta jelútvonál. (Forrás: Zhu, 2016). A nyíl az indukciót, a \perp a gátlást jelöli.

A só-, a szárazság- és az ozmotikus stressz is aktiválja a SnRK2 protein kináz családot. Habár az már tisztázott, hogy az ABA aktiválja SnRK2-ket, azonban továbbra sem ismert hogyan aktiválja a kinázokat az ozmotikus stressz. A *decuple snrk2 Arabidopsis* mutáns növények mind a 10 SnRK2-ben sérültek és nagyon érzékenyek az ozmotikus stresszre. A kutatások bizonyították, hogy a *decuple snrk2* mutáns az ozmotikus stresszszabályozásában résztvevő ABA, prolin és a másodlagos hírvivő az inozit-trifoszfát (IP3) felhalmozódásában is sérült, de a mutáció nincs hatással az ozmotikus stressz által kiváltott reaktív oxigén fajták (ROS-ok) felhalmozódására (Fujii et al., 2011). A genetikai bizonyítékok tehát azt mutatják, hogy az ozmotikus stressztolerancia ugyancsak a SnRK2-höz van kötve.

Az ozmotikus stressz citoszólikus kalcium jelet vált ki, amit az OSCA1 kalcium csatorna (feltételezett ozmoszenzor) érzékel (Yuan et al., 2014). A Ca^{2+} jel hatására aktiválódnak a CPK-k és a CBL-CIPK-ek, amelyek közvetlenül és közvetve is (RbohD/F- H_2O_2 -GHR1 útvonalon keresztül) is foszforilálhatják a SLAC1-et. A SLAC1 (slow anion channel-associated1) anioncsatorna az SnRK2-k szubsztrátjai, ezek közvetítik az ABA által indukált sztóma záródást, így csökkentve a transzpirációs vízvesztéséget a szárazság stressz alatt (Geiger et al., 2009). Az ABA az aszály- és a sóstressz esetén központi jelátviteli szerepet játszik a növényekben (Zhu, 2002). Az elmúlt évtizedben a stressz-jelútvonalak feltérképezésének egyik legfontosabb momentuma az ABA-receptorok azonosítása és az ABA-jelátviteli folyamatok megismerése volt. A kutatások során a PYR (pyrabactin resistance) / PYL (pyrabactin resistance-like) / RCAR (regulatory component of ABA receptors) (a továbbiakban: PYL) családba tartozó ABA receptorokat és START-domén fehérjéket azonosítottak (Park et al., 2009; Ma et al., 2009). Az

ozmotikus stressz hatására az ABA kötődik a PYL-khez, amelyek ezután kölcsönhatásba lépnek és gátolják a PP2C-eket, ami a SnRK2/3/6/7/8 aktiválódását eredményezi. A PYL-ek mikromoláris mennyiségben kötődnek az ABA-hoz és a kötési affinitás közel 100-szorosára növekszik a PP2C-k (type 2C protein phosphatase) hatására, ezért a PP2C-k koreceptoroknak tekinthetők a folyamatban (Ma et al., 2009). Az ABA hiányában a PP2C-k az SnRK2 kinázokkal kapcsolódnak össze, ami a kinázokat inaktívá teszi (Soon et al., 2012). Ha az ABA a PYL fehérje központi hidrofób részébe jut, akkor létrehozza a PP2C-k kötőfelületét (Melcher et al., 2009). A kialakult komplexben a PP2C fehérjék foszfatáz aktivitását az ABA-PYL gátolja (Park et al., 2009). A PP2C-k kötődése az ABA-PYL komplexhez felszabadítja az SnRK2-eket, a felszabadult SnRK2-k autofoszforilálódással aktiválódnak (Fujii et al., 2009). Az ABA által aktivált SnRK2-k foszforilálják az effektor fehérjéket, köztük a transzkripciós faktorokat (TF), a SLAC1-et és a RbohD/F-et. A plazmamembrán NADPH oxidáz (Nicotinamid adenin dinukleotid foszfát oxidáz) RbohF/D (Respiratory burst oxidase homolog protein F/D) foszforilációja esetén O_2^- -ot generál az apoplastban, az O_2^- H_2O_2 -vé alakul, ami további Ca^{2+} jelet generál a plazmamembrán receptor kináz a GHR1 (Guard cell hydrogen peroxide-resistant1) által, így tovább fokozza az effektor fehérjék foszforilálását (Sirichandra et al., 2009; Hua et al., 2012). A SnRK2-k által foszforilált transzkripciós faktorok indukálhatják a stresszválaszban szerepet játszó gének expresszióját és a SLAC1 közvetítette sztóma záródást, ami kulcsfontosságú a növények stressz elleni védekezésében. A Ca^{2+} mellett, az ABA másodlagos jelemolekulákat is indukál, ilyen jelemolekulák a nitrogénoxid (NO) és a foszfatidinsav (PA). A NO gátolja az SnRK2-eket és a PYL-eket, míg a PA a RbohD/F fehérjéket szabályozza.

A növényekben MAP-kináz jelútvonalának elemei nagy családot alkotnak. Az *Arabidopsis*-ban több mint 60 MAP-kináz kináz kináz (MAP3K), 10 MAP-kináz kináz (MAP2K) és 20 MAP-kináz van (de Zelicourt et al., 2016). Már régóta ismert tény, hogy a MAPK-ok a biotikus és az abiotikus stresszek (a só, a szárazság, a hideg, a meleg és a sebzés) hatására is gyorsan aktiválódnak. Az azonban még nincs tisztázva, hogy a MAPK kaszkád hogyan aktiválódik az ozmotikus stressz esetén. Feltételezések szerint a só- és a szárazság stressz által kiváltott másodlagos jelek aktiválják a MAPK kaszkádot, ami a SnRK2-khöz hasonlóan a transzkripciós faktorok foszforilációja által indukálhatja a stresszválasz gének expresszióját, ezáltal növelve a növények stressztoleranciáját (7. ábra).



7. ábra: Ozmotikus-, ABA stresszérzékelés és jelzés. A központi ABA-jelátviteli útvonal elemei szürke háttérűek. A nyíl az indukciót, a szagatott nyíl a feltételezett indukciót és a \perp a gátlást jelöli. (Forrás: Zhu et al., 2016).

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. A felhasznált növényanyag és a génszekvenciák bioinformatikai elemzése

A gének izolálásához a *Fragaria vesca* L. cv. Rügen levélszövetét használtuk, mivel a *Fragaria vesca* teljes genom szekvenciája (Shulaev et al., 2011) elérhető a NCBI (National Center for Biotechnology Information) adatbázisban és BLAST (Basic Local Alignment and Search Tool) analízissel azonosítani tudtuk a *FvSAMS* és a *FvSAMDC* ORF-eket. A *FvSAMS* ORF 1182 bp (prediktált *FvSAMS5* - XM_004288294.2), míg a *FvSAMDC* ORF 1080 bp hosszú (prediktált *FvSAMDC* proenzim - XM_011464655.1). A 4 különböző érési stádiumban lévő (zöld, fehér, rózsaszín, piros) gyümölcs (receptákulum és aszmag együtt) qPCR analíziséhez a *Fragaria x ananassa* Duch. cv. Asia-t használtuk, mivel köztermesztésben lévő fajtát akartunk vizsgálni. A primereket a *Fragaria vesca* genomra terveztük és PCR-rel ellenőriztük, hogy a megfelelő méretű fragmentumok amplifikálódnak-e a *Fragaria x ananassa* Duch. cv. Asia fajta esetében is. A szekvenciák bioinformatikai elemzéséhez a NetNES 1.1 (La Cour et al., 2004), a TargetP 1.1 (Emanuelsson et al., 2007), a cNLS Mapper (Kosugi et al., 2009), a GPS-SNO 1.0 (Xue et al., 2010), a PHOSIDA (Gnad et al., 2011) és a Nucleolar localization sequence Detector (NoD) (Scott et al., 2011) alkalmazásokat használtuk.

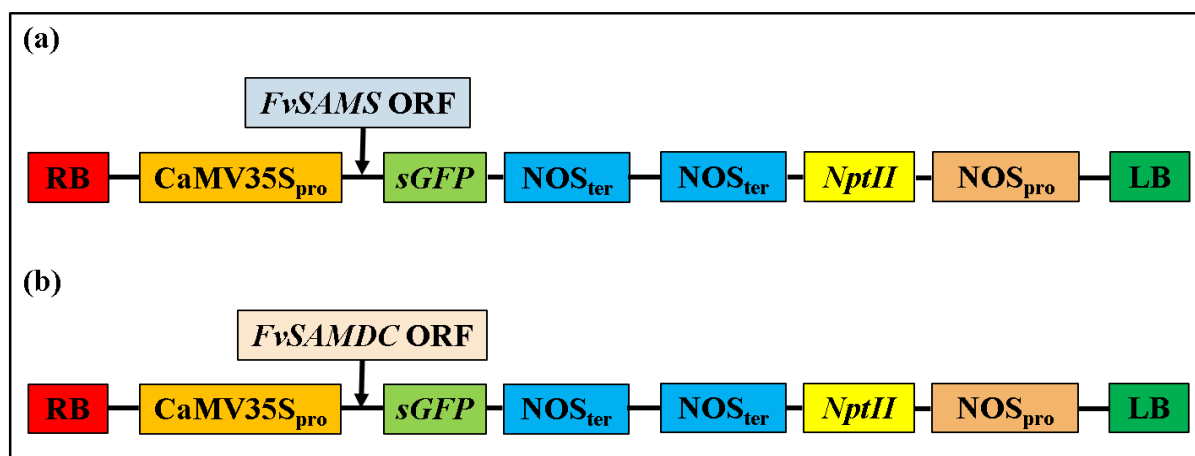
4.2. Genomi DNS-, plazmid DNS-, RNS izolálás és cDNS szintézis

A genomi DNS-t a DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) (Melléklet 10.1), a plazmid DNS-t a PureYield™ Plasmid Miniprep System Kit (Promega, Madison, USA) (Melléklet 10.2), a totál RNS-t a Total RNA Mini Kit Plant (Geneaid®, New Taipei City, Taiwan) (Melléklet 10.3) felhasználásával izoláltuk, a gyártó által előírt protokoll alapján. A totál RNS-ből cDNS-t szintetizáltunk a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) alkalmazásával, a mRNS-ek visszaírásához Oligo (dT)₁₈ primert használtunk (Melléklet 10.4). A cDNS-eket a *FvSAMS* és a *FvSAMDC* gének izolálásához és a RT qPCR vizsgálatokhoz használtuk fel a későbbiekben.

4.3. A pENTR klónozó- és a pGWB405 bináris vektorkonstrukciók

A *Fragaria vesca* L. cv. Rügen levélszövetéből RNS-t izoláltunk (Melléklet 10.3) és reverz transzkripcióval elvégeztük a cDNS-ek szintézisét (Melléklet 10.4). A fő ORF-ekre tervezett primerpárokkal elvégeztük a *FvSAMS* (5' 3' – 3' 5') és a *FvSAMDC* (5' 3' – 3' 5') szekvenciák klónozását PCR-rel (Melléklet 10.5). Az ampliconokat megfutattuk 1,2%-os agaróz gélen (1,2 g agar, 100 ml TAE puffer), majd a fragmentumokat visszatisztítottuk az agaróz gélből a Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit felhasználásával (Promega, Madison, USA) (Melléklet 10.6). A visszatisztított fragmentumokat először pENTR-D-TOPO klónozó vektorba

ligáltuk (Melléklet 10.7) és *E. coli* JM109 törzset transzformáltunk a kész plazmid konstrukciókkal (Melléklet 10.9), a kolóniákat 50 µg/ml spektinomicint tartalmazó LB táptaljra szélesztettük (Melléklet 10.11), a kinőtt kolóniákra kolónia PCR-t indítottunk (Melléklet 10.5) és a pozitív kolóniákból plazmidot izoláltunk, amelyeket PCR-rel és a szekvenciák restriktions térképe alapján kiválasztott enzimekkel végzett emésztéssel is ellenőriztünk (Melléklet 10.12, 10.14, 10.15). A restriktions emésztés paramétereinek meghatározásához a ThermoFisher Scientific DoubleDigest Calculator alkalmazását használtuk. Ezt követően LR klonáz enzim alkalmazásával pGWB405 bináris vektorba ligáltuk a szekvenciákat a gyártó által előírt protokoll alapján (Melléklet 10.8). A pGWB405 bináris vektor konstitutív CaMV35S promótert és a szekvenciák C terminális fuzionáltatására alkalmas *sGFP* riporter gént tartalmaz. A baktériumok esetében a spektinomicin, a növények esetében a kanamicin a szelekciós marker (**8. ábra**).



8. ábra: A *pGWB405::FvSAMS* (a) és a *pGWB405::FvSAMDC* (b) bináris vektorkonstrukciók. Rövidítések: RB- right border (jobb oldali határrégió); CaMV35S_{pro} – karfiol mozaik vírus 35S promóter; *sGFP* – szintetikus zöld fluoreszcens fehérje gén; NOS_{ter} – nopalinn szintáz terminátor; *NptII* – neomicin foszfortranszferáz II; NOS_{pro} – nopalinn szintáz promóter; LB – left border (bal oldali határrégió).

A rekombináns plazmidokkal elvégeztük az *E. coli* JM109 törzsének transzformációját és a transzformáció sikerességét a felnőtt kolóniákon a fentebb leírt módszer alapján ellenőriztük. A különbség a felhasznált primerekben és az alkalmazott restriktions enzimekben volt (Melléklet 10.13, 10.14, 10.15). A pozitív *pGWB405::FvSAMS* és a *pGWB405::FvSAMDC* vektorkonstrukciókkal elvégeztük az *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 törzs transzformációját (Melléklet 10.10). A transzformáció sikerességét kolónia PCR-rel ellenőriztük. A vektorépítéshez használt primerek főbb paramétereit az **1. táblázat** tartalmazza. Mind az *E. coli* JM109, mind az *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 baktériumtörzsek esetében az ellenőrzött, pozitív eredményt adó kolóniákból glicerines törzset készítettünk (750 µl steril 87%-os glicerinnel, 250 µl folyékony baktérium törzstenyészet) a hosszútávú tároláshoz.

1. táblázat: A vektorépítéshez használt primerek főbb paraméterei.

Primer neve	Szekvencia	T _m (C°)	Amplikon hossz (bp)	Génbanki azonosító
Vektor építés				
Fv SAMS_SFT	CACC ATGGAGACTTTCCTATTCCACATCTGAATC	59.1	1183	XM_004288294.2
Fv SAMS_SRT	AGACTGAGGCTTCTCCCACTT	55.2		
Fv SAMDC_SFT	CACC TTCCTTTTAGCCACAATGTCGATG	58.8	1099	XM_011464655.1
Fv SAMDC_SRT	AGAGGATTTCGTAGTCCTCATCTTC	53.7		
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	CTTGTAGTTGCCGTCGTCCT	55.1	Az inszert méretétől függ.	

4.4. A *Nicotiana benthamiana* modellnövény közvetett transzformációja és tranzien expressziós vizsgálata *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 törzs felhasználásával

A *Nicotiana benthamiana* *Agrobacterium*-közvetítette transzformációjához az *Agrobacterium tumefaciens* GV3101-es törzset használtuk, melyek tartalmazták a *pGWB405::FvSAMS* és a *pGWB405::FvSAMDC* vektorkonstrukciókat. A transzformáns kolóniákból 5 ml YEP táptalajból (Melléklet 10.11) (50 µg/ml spektinomicinnel, 100 µg/ml rifampicinnel kiegészítve) folyékony tenyészetet indítottunk és 28°C-on „overnight” inkubáltuk. A folyékony tenyészetekből másnap 2 ml-t 50 ml folyékony YEP (50 µg/ml spektinomicinnel és 100 µg/ml rifampicinnel kiegészítve) tápoldatba oltottuk és addig inkubáltuk, amíg a baktérium szuszpenzió OD₆₀₀ értéke elérte a 0,5-1-et. Ezután a tenyészetet 4300 g fordulatszámra 15 percig centrifugáltuk, a felülúszót leöntöttük és 1 ml folyékony MS (1 mg/l benzil-adeninnel /BA/ és 0,2 mg/l naftil-ecetsavval /NAA/ kiegészítve) (Melléklet 10.11) tápoldattal felszuszpendáltuk. A felszuszpendált tenyészetből 400 µl-t oltottunk 20 ml folyékony tápoldatba (MS + 1 mg/l BA; + 0,2 mg/l NAA). A dohányleveleket 0,5-1 cm²-es darabokra vágtuk, több ponton sebeztek, majd beleraktuk a folyékony tenyészetbe és 60 percig rázattuk. Az explantumokat hajtásregeneráló táptalajra helyeztük (szilárd MS + 1mg/l BA; + 0,2 mg/l NAA) és 2-5 napig sötétben együtt tenyésztettük a baktériummal (kokultiváció). A kokultiváció után a leveleket 300 µg/ml cefotaximot, 200 µg/ml timentint, 300 µg/ml karbenicilint tartalmazó steril desztillált és tiszta desztillált vízzel 3-szor átmostuk, majd 250 µg/ml cefotaximot, 200 µg/ml timentint és 50 µg/ml kanamicint tartalmazó szilárd hajtásregeneráló táptalajra helyeztük (MS +1 mg/l BA; + 0,2 mg/l NAA). A kalluszosodó explantumokat 2 hetente új hajtásregeneráló táptalajra helyeztük, váltogatva az *Agrobacterium* szelekcióra alkalmazott antibiotikumokat (cefotaxim, timentin, karbenicilin), hogy elkerüljük a rezisztens törzsek kialakulását.

Tranziens expressziós vizsgálatokhoz ugyanezekkel a konstrukciókkal infiltráltuk az *in vivo* 6-8 hetes *Nicotiana benthamiana* növényeket a Li (2011) által leírt módszer alapján. A transzformáns *Agrobacterium* kolóniákból folyékony tenyészetet indítottunk (5 ml LB+50 µg/ml spektinomycin; +100 µg/ml rifampicin) és 'overnight' rázattuk 28°C-on. Másnap az 'overnight' tenyészetből 1 ml-t átoltottunk 24 ml LB tápoldatba, amelyet előzőleg kiegészítettünk 1 µl 0,5 M acetosziringonnal (végkoncentráció: 20 µM), majd újabb egész éjszakás tenyésztés következett 28°C-on. Másnap a tenyészetet 4300 g fordulatszámra 15 percig centrifugáltuk, a felülúszót leöntöttük és a baktérium pelletet annyi steril infiltrációs oldattal (10 mM MgCl₂; 10 mM MES-K /pH 5,6/; 100 µM acetosziringon; steril bideszt víz) szuszpendáltuk, hogy az OD₆₀₀ értéke 0,4 legyen. Ezt követően legalább 2-3 órát hagytuk állni szobahőmérsékleten, majd 2 ml-es fecskendővel a levelek abaxiális oldaláról infiltráltuk a baktériumszuszpenziót a levelekbe. A tranziens expressziót 2-5 nap elteltével vizsgáltuk.

4.5. A transzformáció sikerességének bizonyítása, a T₁ generáció előállítás, előszelekciója és hasadási arányának vizsgálata

Az 50 µg/ml kanamicinnel kiegészített MS táptalajon fejlődő növényekből DNS-t izoláltunk (Melléklet 10.1) és PCR-rel (Melléklet 10.5) ellenőriztük a transzgén integrációját a növényi genomba. A DNS szinten pozitív eredményt adó növényeket *in vitro* klónoztuk és ezekből RNS-t is izoláltunk (Melléklet 10.3). A transzgénről történő transzkripciót PCR-rel vizsgáltuk a reverz transzkripcióval visszaírt cDNS-ek felhasználásával. A DNS és RNS szinten is pozitív eredményt adó vonalakat Leica TCS SP8 lézerletapogatóval is vizsgáltuk, hogy bizonyítsuk a fehérje szinten történő expressziót, mivel az inszertek C-terminálisan fúzionáltak a *sGFP* riportergénnel. A DNS, RNS és fehérje szinten is pozitív vonalakat *in vivo* (16 óra fény, 8 óra sötét, 23°C) akklimatizáltuk és konstrukciónként 6-6 független vonalról magot fogtunk. Ezt követően *in vitro* vizsgáltuk a T₁ vonalak szegregációs arányát 50 µg/ml kanamicint tartalmazó MS táptalajon. A FvSAMS vonalak esetében három független (FvSAMS-5, FvSAMS-22, FvSAMS-25), míg a FvSAMDC vonalak közül két független vonalról (FvSAMDC-73, FvSAMDC-76) kaptunk 3:1-es hasadási arányt, ami a transzgén 1 kópiás integrációját bizonyítja a növényi genomba. További vizsgálatokhoz mindkét konstrukció esetén 2-2 független vonalat jelöltünk ki (FvSAMS-22, FvSAMS-25; FvSAMDC-73, FvSAMDC-76).

4.6. A növénynevelési paraméterek a sótolerancia vizsgálatához

A 2-2 3:1-es szegregációs arányt mutató független transzgénikus vonalak előszelekcióját MS táptalajon (50 µg/ml kanamicinnel kiegészítve), a vad típusú *Nicotiana benthamiana* magok csíráztatását antibiotikum-mentes MS táptalajon végeztük. A 14. napon a csíranövényeket antibiotikum-mentes ½-es MS táptalajra, illetve antibiotikum-mentes ½-es MS kiegészítve 0,58

g/l (10 mM) NaCl táptalajra helyeztük (hosszútávú sóstressz), a 60 mM-os sóstresszhez antibiotikum-mentes ½-es MS-t kiegészítve 3,5 g/l NaCl-al használtunk. A rövidtávú sóstressz vizsgálatához 40 napos növények 9 mm átmérőjű levélexplantumait antibiotikum-mentes ½-es MS kiegészítve 17,54 g/l (300 mM) NaCl táptalajra helyeztük. A növényeket és a levélexplantumokat 16 óra fény és 8 óra sötétben, 23°C-on tartottuk. A hosszútávú sóstressz esetén a mintákat a vetést követő 85. napon gyűjtöttük.

4.7. A klorofill *a* és *b* mennyiségének mérése

A klorofill *a* és *b*, illetve az összklorofill tartalom meghatározását Porra et al. (1989) módszere alapján végeztük. 200 mg levelet porítottunk el folyékony nitrogénben, majd 2 ml 80%-os (v/v) jéghideg acetonnal szuszpendáltuk a mintákat. Ezt követően 4°C-on 12000 g fordulatszámon 20 percig centrifugáltuk a szuszpenziókat, a felülúszót újracentrifugáltuk 5 percig 4°C-on 12000 g fordulatszámon, majd 1 ml felülúszóhoz 1 ml 1 M Tris-HCl-ot (pH 8) adtunk. A klorofill *a* (Ca) és a klorofill *b* (Cb), valamint az összklorofill (Ct) tartalmat NanoDrop ND-1000 UV/Vis spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies, USA) a 645 nm-en (Abs.645) és a 663 nm-en (Abs.663) mért abszorbancia alapján határoztuk meg az alábbi képletek felhasználásával:

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

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

$$Ct=Ca+Cb.$$

4.8. A H₂O₂ és a O₂⁻ hisztokémiai detektálása

A H₂O₂-nak és az O₂⁻-nak a hisztokémiai meghatározását Kumar et al. (2014) módszere alapján határoztuk meg. A H₂O₂ hisztokémiai detektálásához 10 ml 1 mg/ml koncentrációjú 3,3'-diaminobenzidin (DAB) festőoldatba (pH 3,8), a szuperoxid anion (O₂⁻) hisztokémiai detektálásához 10 ml 0,2% (w/v) nitrokék-tetrazolium-klorid (NBT) festőoldatba (pH 7,5) helyeztük ugyanarról a levélszintekről származó leveleket, majd a mintákat sötétben 'overnight' inkubáltuk szobahőmérsékleten. Másnap 10 ml/minta abszolút etanolt mértünk a levelekre és 10 percre 90°C-os vízfürdőbe helyeztük a klorofill eltávolításához. Végül a klorofill-mentes leveleket 5 ml/minta 60%-os glicerinben fixáltuk. A képeket Fuji FinePix S6500fd géppel készítettük.

4.9. A H₂O₂ mennyiség mérése

A H₂O₂ mennyiségének meghatározását Velikova et al. (2000) által leírt módszer alapján végeztük. 200 mg levélszövetet 2 ml 0,1%-os (w/v) jéghideg triklór ecetsav (TCA) pufferben homogenizáltunk, majd a mintákat 15 percig 8000 g fordulatszámon centrifugáltuk. A felülúszó 0,5 ml-éhez 0,5 ml 10 mM kálium-foszfát puffert (pH 7) (10 mM kálium-foszfát puffer /pH 7/: 6,15 ml 1 M K₂HPO₄; 3,85 ml 1 M KH₂PO₄; feltöltve bideszt vízzel 1 literre) és 0,1 ml 1M kálium-

jodidot (KI) mértünk hozzá. A minták abszorbanciáját 390 nm-en mértük WPA Biotech Photometer 1101 (Cambridge, UK) készüléssel. A standard görbe készítéséhez 30%-os (w/w) H₂O₂-t (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) használtunk.

4.10. Az ionveszteség mérése

Az ionveszteség mérését Rizhsky et al. (2002) protokollja szerint végeztük. 50 ml-es centrifugacsövekbe (Axygene) 5 ml bidesztillált vizet mértünk és mintánként 5 darab (9 mm átmérőjű) levélkorongot helyeztünk bele. A mintákat szobahőmérsékleten 3 óráig inkubáltuk, majd megmértük a vezetőképességet (A), amihez Radelkis Conductometer TypeOK-104-es (Budapest, Hungary) készüléket használtunk. Ezt követően a mintákat 95°C-ra helyeztük 30 percre, majd szobahőmérsékleten 'overnight' inkubáltuk és újra megmértük a vezetőképességet (B). Az ionveszteségeket százalékban határoztuk meg a következő egyenlet alkalmazásával: (A/B)*100.

4.11. A prolin mennyiségének szemikvantitatív meghatározása

A prolin mennyiségének szemikvantitatív meghatározását izatinos papír módszerrel hajtottuk végre (Ábrahám et al., 2010).

Izatinos papír készítése: Whatmann 3MM-es papírt izatinos oldatba (1g izatin 100 ml etanolban és 2,5 ml jégecetben oldva) mártottuk és megszáritottuk. 200 mg növénymintát folyékony nitrogénben elporítottunk és hozzáadtunk 10 µl/mg friss tömeg mennyiségű 20%-os etanolt. A mintákat 5 percig 14000 g fordulatszámra centrifugáltuk és a felülúszóból 10 µl-eket vittünk fel az izatinos papírra, majd 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, a következő lépésben az izatinos papírt 90°C-ra helyeztük 30 percre. Az izatint 50%-os etanollal mostuk ki a papírból, a standard görbe készítéséhez L-prolint (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) használtunk. A képeket Fuji FinePix S6500fd géppel készítettük. A képek kiértékelését ImageJ 1.50b szoftverrel végeztük (Schneider et al., 2012).

4.12. A lignin tartalom mérése

A hajtások lignin mennyiségének meghatározására Moreria-Vilar et al. (2014) acetilbromidos (C₂H₃BrO) módszerét alkalmaztuk.

A fehérje-mentes sejtfal kivonat készítése: 200 mg liofilizált hajtást (vegyesen szár+levél) homogenizáltunk 5 ml 50 mM kálium-foszfát pufferben (pH 7) és 5 percig 1400 g fordulatszámra centrifugáltuk, a felülúszót leöntöttük és kétszer megismételtük a lépést. Az alulúszóhoz 5 ml 1%-os Triton-X-100-t adtunk (pH 7) és 5 percig 1400 g fordulatszámra centrifugáltuk, a felülúszót leöntöttük és kétszer megismételtük a lépést. Ezután 5ml 1 M NaCl-t (pH 7) mértünk a mintákra és 5 percig 1400 g fordulatszámra centrifugáltuk, a felülúszót leöntöttük és kétszer megismételtük

a lépést. A pelletre 5 ml bideszt vizet mértünk és 5 percig 1400 g fordulatszámon centrifugáltuk, a felülúszót leöntöttük és kétszer megismételtük ezt a lépést. Végül 5 ml acetont adtunk a mintákhoz és 3 ismétlésben 5 percig centrifugáltuk 1400 g fordulatszámon, a felülúszót leöntöttük, majd 60°C-on 'overnight' beszárítottuk a mintákat.

A lignin mennyiségének meghatározása acetil-bromiddal: a fehérje-mentes sejtfal kivonatból 20 mg-ra mértünk rá 0,5 ml 25% (v/v) acetil-bromidot (jégecetben oldva), majd 70°C-on 30 percig inkubáltuk, ezt követően jégre helyeztük. Hozzáadtunk 0,9 ml 2 M nátrium hidroxidot (NaOH), 0,1 ml 5 M hidroxilamin-hidrogén kloridot ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) és 4 ml jégecetet, majd a mintákat 5 percig 1400 g fordulatszámon centrifugáltuk. A minták abszorbanciáját 280 nm-en a WPA Biotech Photometer 1101 (Cambridge, UK) készülékkel mértük. A standard görbe készítéséhez alkáli lignint (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) használtunk.

4.13. Az etilén termelés mérése

A levéllemezek etilén kibocsátását Langebartels et al. 1991-ben leírt módszerével határoztuk meg. Mintánként 5 db 9 mm átmérőjű levélkorongot helyeztünk 1 ml 50 mM MES/NaOH (pH 5,6) és 2% (w/v) cukros oldattal átitatott Whatmann 3MM szűrőpapírra. A szűrőpapírokat összetekertük és szilikon szeptumos üvegcsőbe helyeztük, majd 1 órán keresztül 25°C-on inkubáltuk. Mintánként 1 ml gázt vittünk fel fecskendővel a Shimadzu GC-14A gáz kromatográfba (Kyoto, Japan) (vivőgázként N_2 -t használtunk, a detektor: FID, az oszlop: Porapak Q). Az etilén retenciós ideje 0,553 másodperc volt.

4.14. A poliaminok mennyiségének meghatározása HPLC-vel

A szabad poliaminok mennyiségének meghatározását Németh et al. (2002) által leírt módszer alapján végeztük. A mintaelőkészítés során 200 mg növényi mintát folyékony nitrogénben homogenizáltunk és 2 ml 0,2 M jéghideg perklórsavval (HClO_4) extraháltuk, majd 20 percre jégre helyeztük. Ezután 4°C-on 20 percig 10000 g fordulatszámon centrifugáltuk.

A szabad poliamin frakció esetében 100 μl felülúszóból danzil-kloriddal származékot képeztünk Smith és Davies (1985) alábbi módszere szerint:

A 2 ml-es Eppendorf csőben a 100 μl mintához 200 μl telített nátrium-karbonátot és 400 μl acetonban oldott danzil-kloridot (5 mg/ml) adtunk. A mintákat homogenizálás után 60°C-on 60 percig inkubáltuk sötétben, majd 100 μl 100 mg/ml koncentrációjú prolin oldatot adtunk hozzá és további 30 percig sötétben tartottuk szobahőmérsékleten. Ezután a danzil-származékokat 500 μl toluollal 30 másodpercig extraháltuk és a felső szerves fázist Pasteur-pipettával átszívtuk 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe, majd vákuum alatt bepároltuk. A danzilált poliaminokat 1 ml 100%-os metanolban oldottuk fel és 0,2 μm pórusméretű teflon membránszűrőn szűrtük át. A mintákat

WATERS W 2690 (Milford, USA) HPLC készülékkel vizsgáltuk, vivőközegként acetonitrilt használtunk.

4.15. Relatív expressziós vizsgálatok qPCR-rel

A vizsgálni kívánt gének relatív expressziójának vizsgálatához primereket terveztünk a génszekvenciákra, melyek főbb paramétereit a **2. táblázat** tartalmazza. A reakciókat Corbett RG-6000 készülékkel végeztük. A reakcióelegy összetevői (20 µl végtérfogatra): 10 µl 2xABsolute qPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientific, Waltham, USA), 1,75 µl/primer (70 nM), 1 µl cDNS (hígítás: 1/50), mintánként 4 technikai és 3 biológiai ismétlést alkalmaztunk. A relatív expressziós szintek meghatározásához a Rotor-Gene Q Series 2.3.1. szoftver 'Comparative Quantification' metódusát használtuk (Warton et al., 2004, McCurdy et al., 2008). A *Nicotiana benthamiana* esetében a GAPDH, míg a *Fragaria x ananassa* Duch. cv. Asia szamóca gyümölcsnél az actin volt a viszonyítási alapot képező referencia háztartási gén.

2. táblázat: A RT qPCR-hez használt primerek főbb paramétereit.

Primer neve	Szekvencia	T _m (C°)	Amplikon hossz (bp)	Génbanki azonosító
RT-qPCR				
Fv SAMS RT F	CAACAAACGATTCTTGAAGACAGCTG	56.4	105	XM_004288294.2
Fv SAMS SRT	AGACTGAGGCTTCTCCACTT	54.4		
Fv SAMDC RT F	TGTCATTGGATTGAAGGGATACTGT	55.2	167	XM_011464655.1
Fv SAMDC SRT	AGAGGATTCGTAGTCCCTCATCTTC	55.7		
Nic Ves SAMS RT F	TGCAAGGTYCTWGTCAACATYGAGCAG	58.2-61.3	127	LC008353.1
Nic Ves SAMS RT R	TCAGTGGCRTAGCCAAACATGTGACC	59.5-61.1		XM_004288294.2
Nic Ves SAMDC RT F	ATGTGYATGACTGGTTTGGACAGGG	57.7-59.3	155	AB304782.1
Nic Ves SAMDC RT R	CATSGAATAACCCACAGGGKTCAAACTC	58.2-59.7		XM_011464655.1
Nic be ACS RT F	CGCATAGTAATGAGTGGAGGAGC	55.6	134	CBMM010006910.1
Nic be ACS RT R	ACCAGTCTCCACCTCAAATCTCT	55.7		
Nic be SPDS RT F	CTGAGAGTATATGGCTTCACATGCACAT	57.4	150	AB304779.1
Nic be SPDS RT R	GGTCCCTCCGTAGACCAGAGCAT	59.8		
Nic be SPMS RT F	GTGAGATCGATAAAATGGTTATAGATGTCAG	57.8	164	AB304780.1
Nic be SPMS RT R	GATCTGATGAATCAACTATGATAGCATCATAC	58		
Nic be SAHH RT F	GTATGAGAAGAAGGTGTACGTCTTGCC	57.7	165	LC008356.1
Nic be SAHH RT R	TCAGTACCTGTAGTGAGCAGGCTTGT	59.6		
Nic be PMT RT F	TGACTTTGGATGGAGCAATTCAACACACA	59.7	149	EU165356.1
Nic be PMT RT R	GAAGCATTTCGAATAATGTAAAACCAATTCCTC	56.5		
Nic be CAD RTF	GTTTCATTGGCCTGAGAATTTGCCTATGG	58.9	149	EU877915.1
Nic be CAD RTR	CACAGCCATATGACCAAGACCACC	58		
sGFP RT F	CTCGTGACCACCTTCACCTA	53.8	143	AB294429
sGFP RT R	CTTGTAGTTGCCGTGCTCCT	55.1		
Fv ACTIN RTF	GGACTCTGGAGATGGTGTGTCAGTCA	57,9	173	XM_004294460.2
Fv ACTIN RTR	TCCCTGACTATTTCTCGCTCAGCAGT	59,7		
Nic be GAPDH RT F	AGGGTGGTGCCAAGAAGGTTGTGAT	60.7	150	JQ256517.1
Nic be GAPDH RT R	ACCTTAGCCAAAGGTGCAAGGCAGT	61.3		

4.16. Mikroszkópos vizsgálat

A *FvSAMS::sGFP* és a *FvSAMDC::sGFP* fúziós fehérjék detektálását Leica TCS SP8 lézerletapogatású konfokális és Leica/Leitz DMRB 301-371.010 fluoreszcens sztereó mikroszkóppal (Leica, Wetzlar, Germany) végeztük. A vizsgált levélszintek leveleiből a levéllemezek apikális részén 4*4 mm-es metszeteket készítettünk. A metszeteket natív módon fixálás nélkül vizsgáltuk a levelek adaxiális oldaláról, a fedéshez 1:1 glicerin:bideszt víz elegyet alkalmaztunk. A képek felskálázásához és szerkesztéséhez a Leica LAS AF Lite 3.3.10134.0 szoftvert használtuk.

Az endoplazmatikus retikulum jelöléséhez CellLight[™] ER-RFP, BacMam 2.0 reagenst használtunk (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). A gyártó által javasolt protokollal ellentétben, ami sejtszuspenzióra vonatkozott, mi az élő szövetbe infiltráltuk a reagenst (100 szoros hígításban) és 16 óra szobahőmérsékleten történő inkubáció után fixáltuk a szöveteket (Fixáló oldat: 4%-os paraformaldehid; 0,1% Tween 20; 0,1% Triton X-100; 0,15 M NaCl; 10 mM nátrium-foszfát puffer pH 7,5). A sGFP relatív fluoreszcenciájának meghatározását ImageJ 1.50b szoftverrel végeztük (Schneider et al., 2012).

A mikroszkóp analízishez használt *FvSPDS::sGFP* konstrukciót mi építettük, ugyancsak pGWB405 vektort alkalmazva, az inszert a *Fragaria vesca* L. cv. Rügen-ből izolált *spermidin szintáz* gént kódolja. A *FvSPDS::sGFP* fúziós fehérje csak citoplazmás lokalizációt mutatott és citoplazmás kontrollként alkalmaztuk.

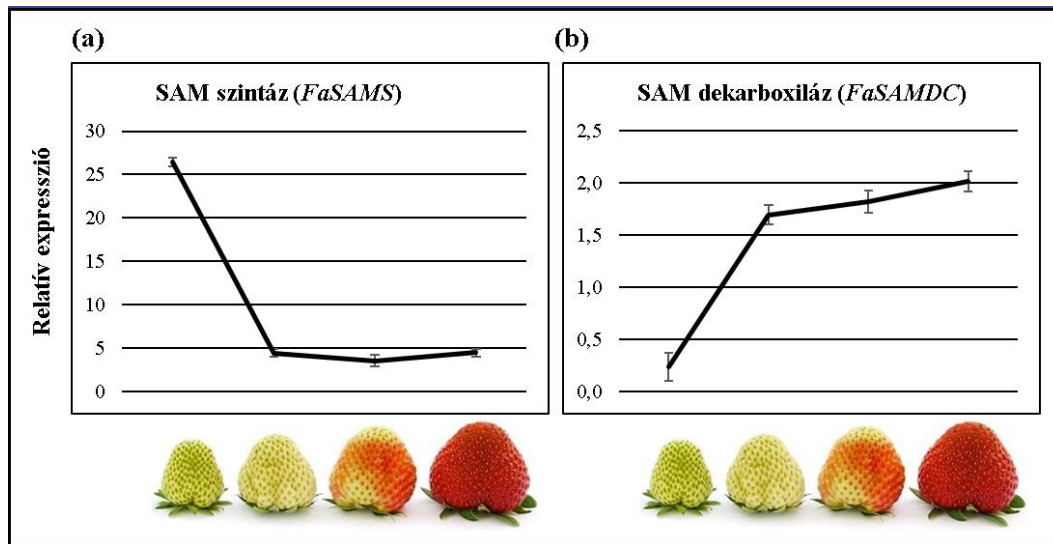
4.17. Statisztikai analízis

Az eredmények legalább 3-5 mérésből származnak Statisztikailag a standard szórás és az ANOVA módszerek alkalmazásával elemeztük az adatokat. A kiértékeléshez a Microsoft Excel alkalmazást használtuk.

5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

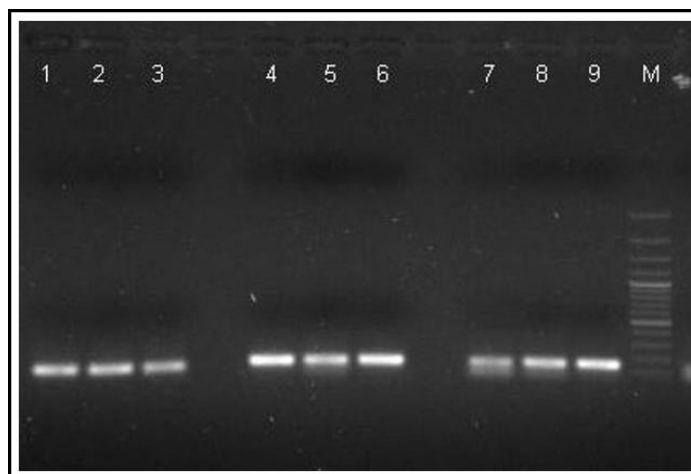
5.1 A kutatás előzményei és a *FaSAMS*, *FaSAMD*C expressziós mintázata a szamóca gyümölcs érése során

A Genetikai, Mikrobiológiai és Biotechnológiai Intézet korábbi kutatásai során BALOGH et al. (2005) szamócában (*Fragaria x ananassa* Duch. cv. Elsanta) a receptákulum és az aszmag szövetek RNS-ujjlenyomatának tanulmányozásakor az érésben expressziós változást mutató géneket azonosítottak cDNS-AFLP módszerrel a gyümölcserés zöld, fehér, rózsaszín és piros szakaszaiban. 130 transzkriptum eredetű fragmentumot (TDF-et), részleges cDNS-t izoláltak és szekvenáltattak meg. A szekvenált transzkriptumok között volt a poliamin metabolizmusban résztvevő spermidin szintáz (DQ074728.1) és egy SAM függő metiltranszferáz is (AY873806). Mind az etilén, mind a poliaminok fontos szerepet játszanak a gyümölcsök érésében, ezért mi is vizsgáltuk az endogén *FaSAMS* és a *FaSAMD*C gének relatív expresszióját qPCR-rel a *Fragaria x ananassa* D. cv. Asia négy különböző érési stádiumú (zöld, fehér, rózsaszín, piros) gyümölcsében (receptákulum és aszmag együtt) a Fv_SAMS_RT_F - Fv_SAMS_SRT és a Fv_SAMD_C_RT_F - Fv_SAMD_C_SRT primerpárok felhasználásával (**9. ábra**), mivel 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 és cDNS-ével is (**10. ábra**). A *FaSAMS* gén esetében ~6-7-szer nagyobb relatív expressziót mértünk a zöld érési stádiumban lévő gyümölcsben, mint a későbbi három fázisban. A *FaSAMS*-hez viszonyítva fordított expressziós mintázatot kaptunk a *FaSAMD*C gén esetében, a zöld gyümölcsben ~7-8,5-ször alacsonyabb relatív expressziót detektáltunk, mint a fehér-, a rózsaszín- és a piros érési stádiumokban. Korábbi tanulmányban a *Nicotiana tabacum* különböző korú leveleinek SAM szintáz enzimaktivitás vizsgálata során, a vad típusban ~20-szor, míg a transzgenikus vonalakban ~40-szer nagyobb aktivitást mértek a fiatalabb levelekben, mint az öregebbekben (Boerjan et al., 1994). Hasonlóan magas *SAMS* expressziót figyeltek meg rizsben a levél- és a gyökérfejlődés korai szakaszában (Van Breusegem et al., 1994) és a szőlő gyümölcscsel végzett qPCR vizsgálat során a VvSAMS és a VvSAMD_C gének is hasonló expressziós mintázatot mutattak a különböző érési stádiumban lévő gyümölcsökben, mint az általunk mért értékek (Agudelo-Romero et al., 2014). Mad Arif et al. (1994) a burgonya *SAMD*C gén esetében a fiatal és aktívan osztódó szövetekben magas, míg az öreg és nem osztódó szövetekben alacsony *SAMD*C expressziót detektáltak, mind a vegetatív, mind a generatív szervekben. Mivel a gyümölcsfejlődés kezdeti stádiumában történik a sejtosztódás, a fejlődés későbbi szakaszában már sejtmegnyúlás van, ezért a mi eredményeink ellentétesek Mad Arif et al. (1994) eredményeivel.



9. ábra: A *FaSAMS* (a) és a *FaSAMDC* (b) gének relatív expressziója a szamóca gyümölcs négy különböző érési stádiumában. SD±, n=4 (P<0,001).

A SAM az O-, a N- és a C-metiltranszferázok számára biztosítja a metil csoportot, amelyek olyan másodlagos metabolitok termelődésében vesznek részt, mint pl.: az antociánok, a különböző íz és illatanyagok (Roje, 2006). Ezek a másodlagos metabolitok mind a klimaktérikus, mind a nem-klimaktérikus növényfajok termésében felhalmozódnak az érés előrehaladtával. A *SAMS* érésben betöltött szerepét támasztja alá, hogy a *FaSAMS1*-RNAi konstrukcióval infiltrált szamócagyümölcsök az infiltrálás helyén fehérek maradtak, de etefon (etilén analóg) kezelés hatására az antocián tartalom az infiltrált szövetekben jelentősen növekedett (Sun et al., 2013), továbbá fokozott SAMDC enzimaktivitást és expressziót figyeltek meg a szamóca érése során, ami egybeesett néhány fiziológiai paraméter változásával, beleértve az antocián-, a cukor-, a poliamin-, az auxin-, az abszcizinsav- és etilén tartalmat (Guo et al., 2018).



10. ábra: A *Fragaria vesca* genomra tervezett primerek tesztelése PCR-rel a *Fragaria x ananassa* Duch. cv. Asia fajta genom DNS-ével és cDNS-ével.

1-3: Fv_SAMS_RT_F - Fv_SAMS_SRT primerpárral kapott fragmentum a *Fragaria x ananassa* Duch. cv. Asia fajta genom DNS-ével (1) és cDNS-ével (2), valamint a *Fragaria vesca* cv. Rügen genom DNS-ével (a várt méret 105 bp);

4-6: Fv_SAMDC_RT_F - Fv_SAMDC_SRT primerpárral kapott fragmentum a *Fragaria x ananassa* Duch. cv. Asia fajta genomi DNS-ével (4) és cDNS-ével (5), valamint a *Fragaria vesca* cv. Rügen genomi DNS-ével (6) (a várt méret 167 bp);

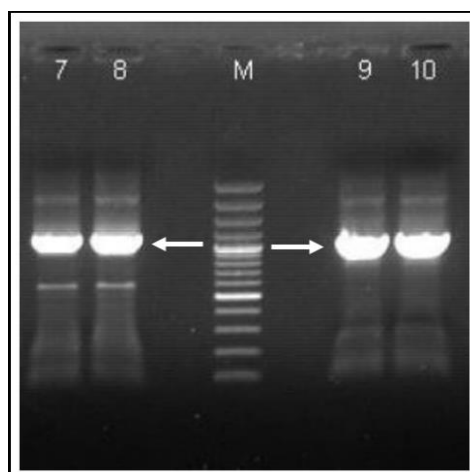
7-9: Fv_ACTIN_RTTF - Fv_ACTIN_RTR primerpárral kapott fragmentum a *Fragaria x ananassa* Duch. cv. Asia fajta genomi DNS-ével (7) és cDNS-ével (8), valamint a *Fragaria vesca* cv. Rügen genomi DNS-ével (9) (a várt méret 173 bp).

M: Molekulatömeg marker, Fermentas DNA Ladder 100 bp Plus, a fragmentumok nagysága: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp;

5.2 A *FvSAMS* és a *FvSAMDC* ORF-ek pENTR™/SD/D-TOPO klónozó vektorba ligálása

A vektorkonstrukciók megépítéséhez első lépésben RNS-t izoláltunk a *Fragaria vesca* L. cv Rügen fiatal leveleiből. A totál RNS-ből cDNS-t szintetizáltunk Oligo (dT)₁₈ primer felhasználásával. A cDNS könyvtárból amplifikáltuk a *FvSAMS* és *FvSAMDC* géneket a Fv_SAMS_SFT - FvSAMS_SRT és a Fv_SAMDC_SFT - FvSAMDC_SRT primerpárok alkalmazásával (**1. táblázat**). A megfelelő méretű fragmentumokat fehér nyíllal jelöltük (**11. ábra**).

A *FvSAMS* fő ORF-je 394 aminosavat kódol és 95%-os hasonlóságot mutat az AtSAMS1-gyel (NP_171751.1), 93%-osat az AtSAMS2-vel (NP_192094.1), és 90%-osat az AtSAMS3-mal (NP_181225.1). A *FvSAMDC* fő ORF-je 360 aminosavból áll és 64%-os hasonlóságot mutat az AtSAMDC1-gyel (NP_001154585.1), 66%-osat az AtSAMDC2-vel (NP_197099.1), 68%-osat az AtSAMDC3-mal (NP_001189972.1) és 43%-osat az AtSAMDC4-gyel (NP_197394.1). A *FvSAMS* és a *FvSAMDC* fő ORF-jét kódoló régiók nem tartalmazzak intront a korábban már más fajokban jellemzett *SAMS* és *SAMDC* szekvenciákhoz hasonlóan, ezért a genomi DNS-t is használhattuk volna a gének klónozásához.



11. ábra: A *FvSAMS* és a *FvSAMDC* klónozott cDNS ORF-ek.

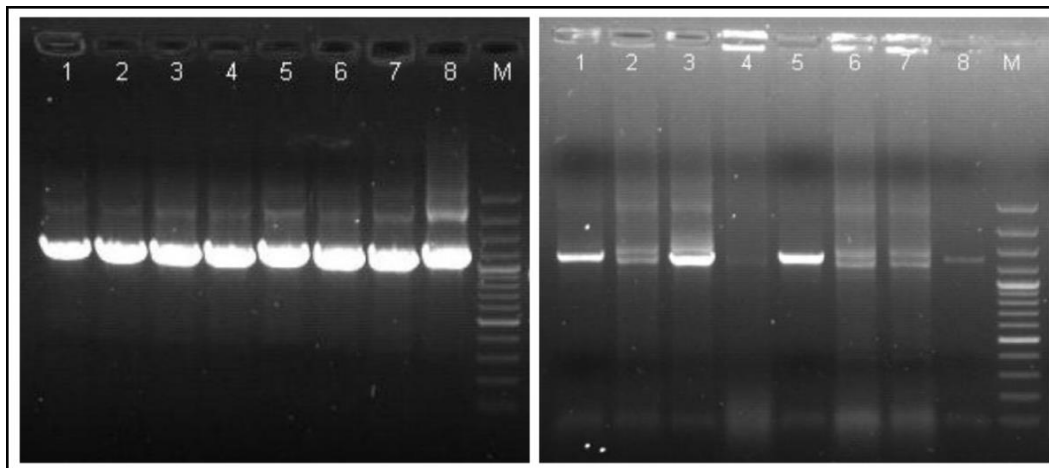
7-8: *FvSAMS* cDNS ORF (a várt méret: 1183 bp);

9-10: *FvSAMDC* cDNS ORF (a várt méret: 1099 bp);

M: Molekulatömeg marker, Fermentas DNA Ladder 100 bp Plus, a fragmentumok nagysága: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp;

A megfelelő méretű fragmentumokat visszatisztítottuk agaróz gélből. A vektorkonstrukciók megépítéshez a Gateway® rendszert (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) használtuk. A gyártó által előírt protokoll alapján a *FvSAMS* és a *FvSAMDC* szekvenciákat először pENTR™/SD/D-TOPO klónozó vektorba ligáltuk. A forward primerek tartalmazták a gyártó által előírt CACC szekvenciát, a reverz primerrel pedig elimináltuk a kódoló régiók stop kodonját, hogy a pGWB405 bináris vektorban lévő *sGFP* riportergénnel C terminálisan fuzionáltathassuk a cDNS ORF-eket.

A ligálást követően az *E. coli* JM109 törzset transzformáltunk a konstrukciókkal, majd a spektinomicint (50 µg/ml) tartalmazó szelektív LB táptalajon felnövő kolóniákra kolónia PCR-t indítottunk a M13_F - FvSAMS_SRT és a M13_F - FvSAMDC_SRT primerpárok felhasználásával. A pozitív eredményt adó kolóniák közül a *pENTR::FvSAMS* esetében az első és negyedik, míg a *pENTR::FvSAMDC* esetében az első és ötödik 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 (**1. táblázat**) PCR-t indítottunk, amellyel a fragmentumok orientációját is ellenőriztük (**12. ábra**).



12. ábra: A *pENTR::FvSAMS* és a *pENTR::FvSAMDC* kompetens *E. coli* JM109 törzs transzformációját követően a kolóniákkal indított kolónia PCR eredménye.

Bal oldali gélfotó:

1-8: *pENTR::FvSAMS* + *E. coli* JM109 1-8. kolónia;

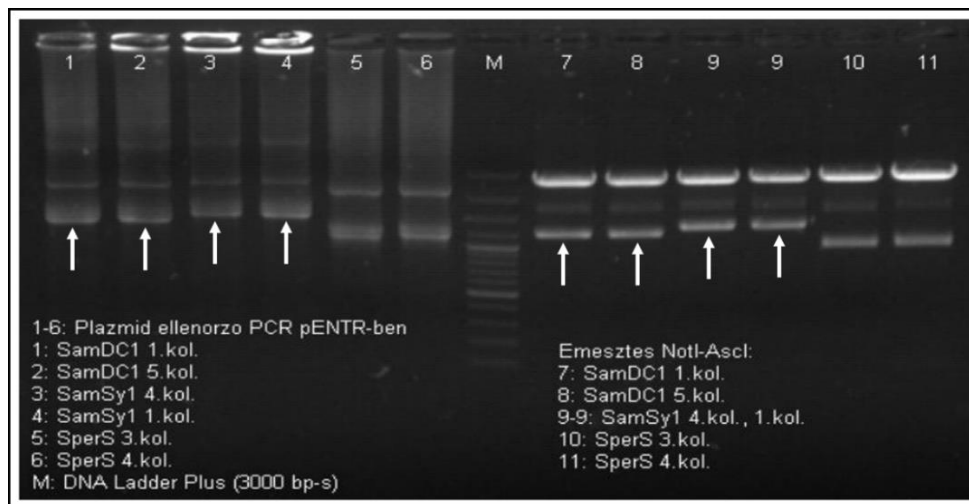
M: Molekulatömeg marker, Fermentas DNA Ladder 100 bp Plus, a fragmentumok nagysága: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp;

Jobb oldali gélfotó:

1-8: *pENTR::FvSAMDC* + *E. coli* JM109 1-8. kolónia;

M: Molekulatömeg marker, Fermentas DNA Ladder 100 bp Plus, a fragmentumok nagysága: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp;

Ezzel párhuzamosan elvégeztük a restrikciós térképek felhasználásával (Melléklet 10.12, 10.14, 10.15) kiválasztott NotI - AscI enzimekkel a plazmidok emésztését. A **13. ábrán** látható, hogy a *pENTR::FvSAMS* és a *pENTR::FvSAMDC* esetében is mindkét plazmidból a megfelelő méretű fragmentum amplifikálódott a PCR során és emésztődött ki (fehér nyilakkal jelöltük).



13. ábra: A *pENTR::FvSAMS* és a *pENTR::FvSAMDC* plazmidok ellenőrzése PCR-rel és restrikciós emésztéssel.

1-2: *pENTR::FvSAMDC* 1. és 5. kolóniákból izolált plazmidokkal indított PCR;

3-4: *pENTR::FvSAMS* 1. és 4. kolóniákból izolált plazmidokkal indított PCR;

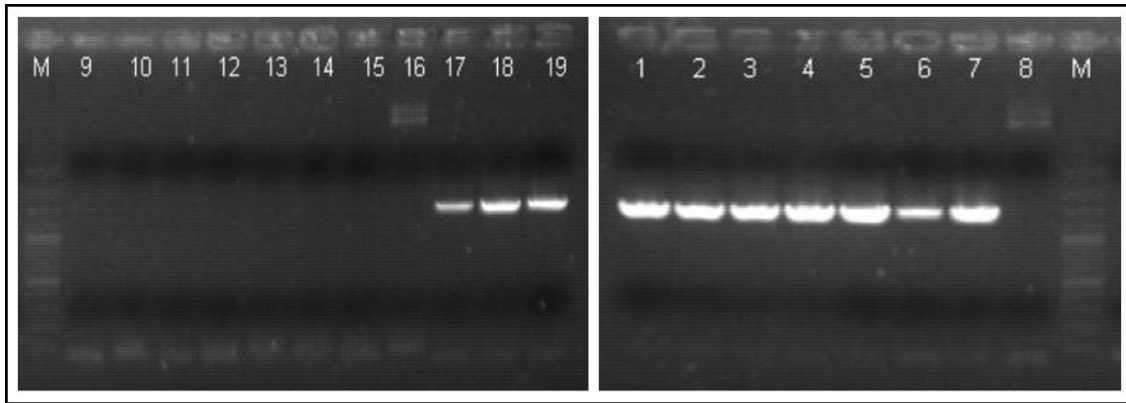
7-8: *pENTR::FvSAMDC* 1. és 5. kolóniákból izolált plazmidokkal indított restrikciós emésztés;

9-10: *pENTR::FvSAMS* 1. és 4. kolóniákból izolált plazmidokkal indított restrikciós emésztés;

M: Molekulatömeg marker, Fermentas DNA Ladder 100 bp Plus, a fragmentumok nagysága: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp;

5.3 A *pGWB405::FvSAMS* és a *pGWB405::FvSAMDC* bináris vektorkonstrukciók előállítás

A következő lépésben a *pENTR::FvSAMS* és *pENTR::FvSAMDC* konstrukciókat a *pGWB405* bináris vektorba ligáltuk. A ligálást követően *E. coli* JM109 törzset transzformáltunk a konstrukciókkal, majd a spektinomycin (50 µg/ml) tartalmazó szelektív LB táptalajon felnövő kolóniákra kolónia PCR-t indítottunk *pBI121_35S_F - FvSAMS_SRT* és *pBI121_35S_F - FvSAMDC_SRT* primerpárok felhasználásával (**14. ábra**).



14. ábra: A *pGWB405::FvSAMS* és a *pGWB405::FvSAMDC* kolóniákkal indított kolónia PCR eredménye.

Bal oldali gélfotó:

16: üres *pGWB405* (negatív kontroll);

17-19: *pGWB405::FvSAMS* 1-3. kolóniák;

M: Molekulatömeg marker, Fermentas DNA Ladder 100 bp Plus, a fragmentumok nagysága: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp;

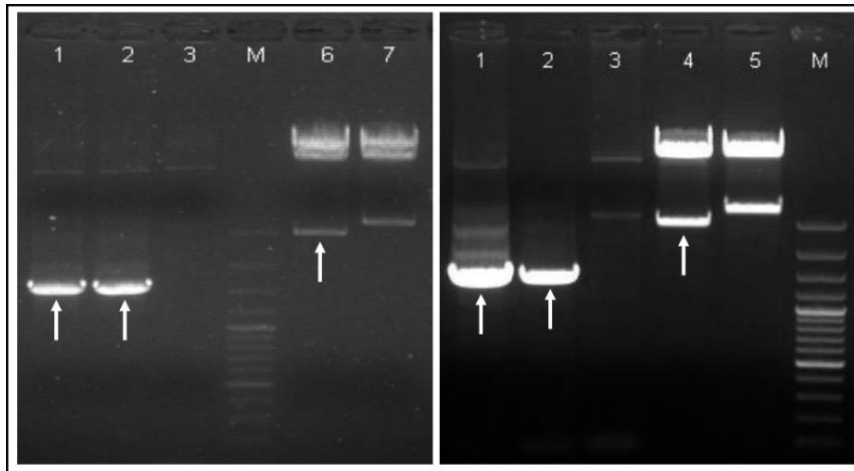
Jobb oldali gélfotó:

1-7: *pGWB405::FvSAMDC* 1-7. kolóniák;

8: üres *pGWB405* (negatív kontroll);

M: Molekulatömeg marker, Fermentas DNA Ladder 100 bp Plus, a fragmentumok nagysága: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp;

A pozitív eredményt adó kolóniák közül a *pGWB405::FvSAMS* és a *pGWB405::FvSAMDC* esetében is a második és a harmadik kolóniákból izoláltunk plazmidot. Az izolált plazmidok felhasználásával a pBI121_35S_F - FvSAMS_SRT, FvSAMS_SFT - sGFP_RT_R és a pBI121_35S_F - FvSAMDC_SRT, FvSAMDC_SFT - sGFP_RT_R primerpárokkal (**1. táblázat**) PCR-t indítottunk, amellyel a fragmentumok orientációját is ellenőriztük. A gélfotón látható, hogy a *pGWB405::FvSAMS* és a *pGWB405::FvSAMDC* esetében is mindkét kolóniából izolált plazmid pozitívnak bizonyult. Ezzel párhuzamosan elvégeztük a restriktions térképek felhasználásával (Melléklet 10.13, 10.14, 10.15) kiválasztott a *pGWB405::FvSAMS* esetében a SdaI - SacI, míg a *pGWB405::FvSAMDC* esetében a HindIII - SacI restriktions enzimekkel a plazmidok emésztését. A **15. ábrán** látható, hogy a *pGWB405::FvSAMS* és a *pGWB405::FvSAMDC* esetében is mindkét plazmidból a megfelelő méretű fragmentum emésztődött ki és amplifikálódott fel a PCR során (fehér nyilakkal jelöltük).



15. ábra: A *pGWB405::FvSAMS* és a *pGWB405::FvSAMDC* plazmidok ellenőrzése PCR-rel és restrikciós emésztéssel.

Bal oldali gélfotó:

1-2: *pGWB405::FvSAMS+E. coli* JM109 2-3. kolóniákból izolált plazmidokkal indított PCR;

3: üres *pGWB405* (negatív kontroll);

6: *pGWB405::FvSAMS+E. coli* JM109 2. kolóniából izolált plazmidok restrikciós emésztése;

7: üres *pGWB405* plazmid restrikciós emésztése;

M: Molekulatömeg marker, Fermentas DNA Ladder 100 bp Plus, a fragmentumok nagysága: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp;

Jobb oldali gélfotó:

1-2: *pGWB405::FvSAMDC+E. coli* JM109 2-3. kolóniákból izolált plazmidokkal indított PCR;

3: üres *pGWB405* (negatív kontroll);

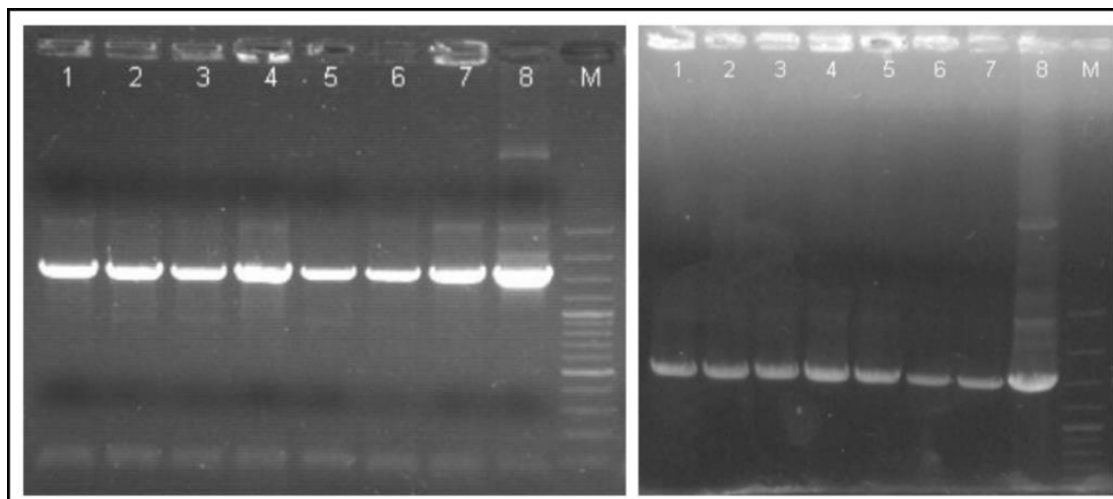
4: *pGWB405::FvSAMDC+E. coli* JM109 2. kolóniából izolált plazmidok restrikciós emésztése;

5: üres *pGWB405* plazmid restrikciós emésztése;

M: Molekulatömeg marker, Fermentas DNA Ladder 100 bp Plus, a fragmentumok nagysága: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp;

5.4 Az *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 törzs transzformációja a *pGWB405::FvSAMS* és a *pGWB405::FvSAMDC* vektorkonstrukciókkal

A *pGWB405::FvSAMS* és a *pGWB405::FvSAMDC* 2. kolóniájából izolált plazmidokkal elvégeztük az *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 törzs transzformációját. A spektinomicint tartalmazó (50 µg/ml) táptalajon felnövő baktériumkolóniákra kolónia PCR-t indítottunk (**16. ábra**). Mindkét konstrukció esetén az első és a második kolóniákból glicerines törzset készítettünk, a későbbiekben ezeket a kolóniákat használtuk a stabil transzformáns növények előállításához és a tranziens expressziós vizsgálatokhoz.



16. ábra: A *pGWB405::FvSAMS* és a *pGWB405::FvSAMDC* plazmiddal transzformált *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 törzs kolóniáira indított kolónia PCR eredménye.

Bal oldali gélfotó:

1-7: *pGWB405::FvSAMS+Agrobacterium tumefaciens* GV3101 1-7. kolóniák;

8: *pGWB405::FvSAMS* plazmid (pozitív kontroll);

M: Molekulatömeg marker, Fermentas DNA Ladder 100 bp Plus, a fragmentumok nagysága: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp;

Jobb oldali gélfotó:

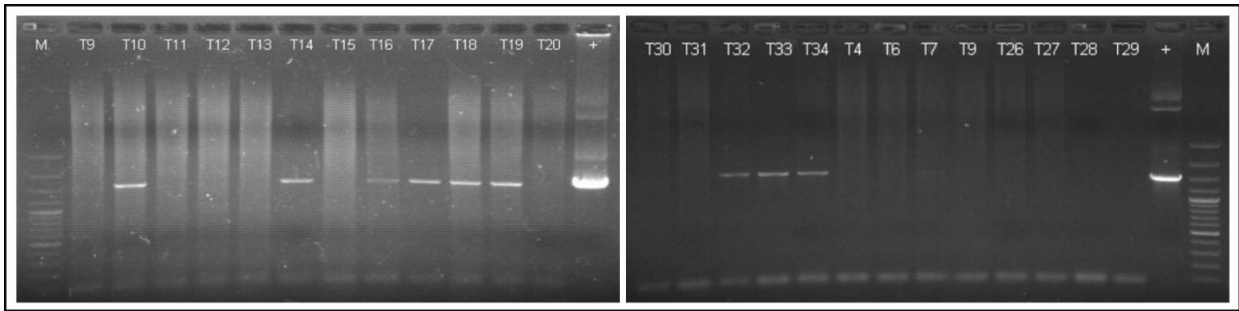
1-7: *pGWB405::FvSAMDC+Agrobacterium tumefaciens* GV3101 1-7. kolóniák;

8: *pGWB405::FvSAMDC* plazmid (pozitív kontroll);

M: Molekulatömeg marker, Fermentas DNA Ladder 100 bp Plus, a fragmentumok nagysága: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp;

5.5 A *Nicotiana benthamiana* modellnövény *Agrobacterium* közvetítette transzformációja és a T₀ vonalak előszelekciója

Következő lépésben elvégeztük *in vitro Nicotiana benthamiana* levélexplantumok *Agrobacterium* közvetítette transzformációját. A transzformációt követően a kanamicint tartalmazó (50 µg/ml) MS táptalajon regenerálódó növényeket (mivel növények esetében a kanamicin volt a szelekciós marker) elkülönítettük és genomi DNS-t izoláltunk belőlük. A pBI121_35S_F - FvSAMS_SRT és a pBI121_35S_F - FvSAMDC_SRT primerpárok felhasználásával PCR-rel ellenőriztük a vektorkonstrukciók integrációját a növények genomi DNS-ébe (**17. ábra**). A DNS szinten pozitív eredményt adó vonalakat *in vitro* klónoztuk, későbbiekben ezekről az *in vivo* akklimatizált vonalokról fogtunk magot.



17. ábra: A *pGWB405::FvSAMS* és a *pGWB405::FvSAMDC* vektorkonstrukciókat tartalmazó regenerált T₀ vonalak DNS szintű tesztelése.

Bal oldali gélfotó:

pGWB405::FvSAMS vektorkonstrukciót tartalmazó T₀ 9-, 10-, 11-, 12-, 13-, 14-, 15-, 16-, 17-, 18-, 19-, 20-as vonalaktól izolált DNS;

+: *pGWB405::FvSAMS* plazmid (pozitív kontroll);

M: Molekulatömeg marker, Fermentas DNA Ladder 100 bp Plus, a fragmentumok nagysága: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp;

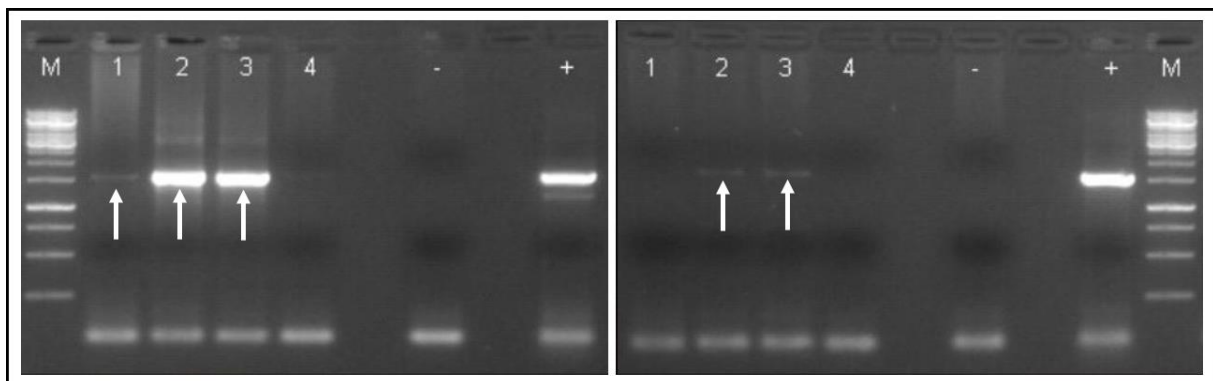
Jobb oldali gélfotó:

pGWB405::FvSAMDC vektorkonstrukciót tartalmazó T₀ 4-, 6-, 7-, 26-, 27-, 28-, 29-, 30-, 31-, 32-, 33-, 34-es vonalaktól izolált DNS;

+: *pGWB405::FvSAMDC* plazmid (pozitív kontroll);

M: Molekulatömeg marker, Fermentas DNA Ladder 100 bp Plus, a fragmentumok nagysága: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp;

A T₀ vonalakat RNS szinten is ellenőriztük, hogy a konstrukciókról történik-e transzkripció. A DNS szinten pozitív eredményt adó mintákból totál RNS-t izoláltunk és reverz transzkripcióval cDNS-t szintetizáltunk Oligo (dT)₁₈ primer felhasználásával. A cDNS-ekre FvSAMS_SFT - sGFP_RT_R és FvSAMDC_SFT - sGFP_RT_R primerpárokkal PCR-t indítottunk. A vizsgált 4-4 vonalból a FvSAMS vonalak esetében 3 vonal, míg a FvSAMDC vonalak esetében 2 vonal bizonyult pozitívnak a RNS szintű ellenőrzés során (**18. ábra**).



18. ábra: A *pGWB405::FvSAMS* és a *pGWB405::FvSAMDC* vektorkonstrukciókat tartalmazó regenerált T₀ vonalak RNS szintű tesztelése.

Bal oldali gélfotó:

1-4: *pGWB405::FvSAMS* vektorkonstrukciót tartalmazó T₀ 10-, 22-, 25-, 32-es vonalaktól izolált RNS-ből visszaírt cDNS;

-: WT *Nicotiana benthamiana* növényből izolált RNS-ből visszaírt cDNS (negatív kontroll);
 +: *pGWB405::FvSAMDC* plazmid (pozitív kontroll);
 M: Molekulatömeg marker, Solis BioDyne – 1 kb DNA Ladder, a fragmentumok nagysága: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 700, 500, 300 bp;

Jobb oldali gélfotó:

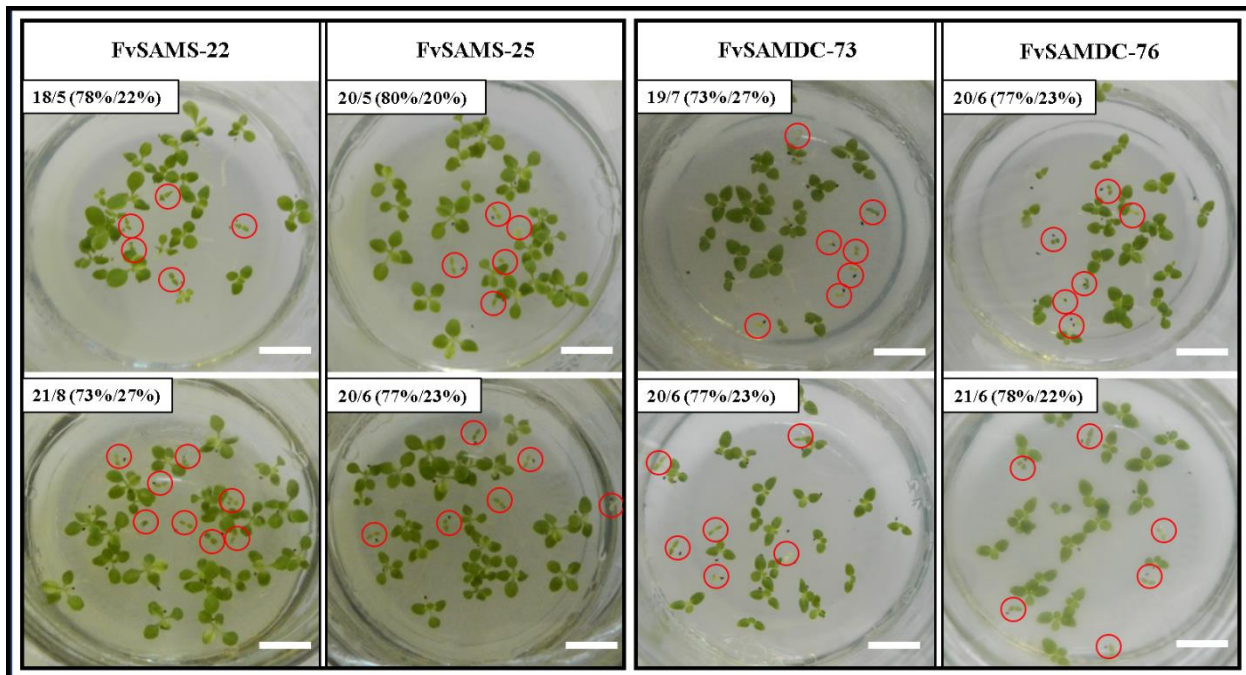
1-4: *pGWB405::FvSAMDC* vektorkonstrukciót tartalmazó T₀ 38-, 73-, 76-, 84-es vonalaktól izolált RNS-ből visszaírt cDNS;

-: WT *Nicotiana benthamiana* növényből izolált RNS-ből visszaírt cDNS (negatív kontroll);

+: *pGWB405::FvSAMDC* plazmid (pozitív kontroll);

M: Molekulatömeg marker, Solis BioDyne – 1 kb DNA Ladder, a fragmentumok nagysága: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 700, 500, 300 bp;

Az inszertek DNS szintű integrációjának bizonyítását és a RNS szintű ellenőrzését követően az *in vivo* akklimatizált T₀ vonalaktól magot fogtunk. Ezt követően a T₁ generáció hasadási arányát határoztuk meg 50 µg/ml kanamicint tartalmazó ½ MS táptalajon. Konstrukciónként 6-6 vonalat vizsgáltunk. A *FvSAMS*-t túltermelő vonalaktól három (*FvSAMS*-5, *FvSAMS*-22, *FvSAMS*-25), míg a *FvSAMDC*-t overexpresszáló vonalaktól kettő (*FvSAMDC*-73, *FvSAMDC*-76) mutatta az inszert 1 kópiás integrációját bizonyító 3:1-es szegregációs arányt (19. ábra).



19. ábra: A T₁ vonalak hasadási arányának meghatározása. A vonal 1 cm-t jelöl.

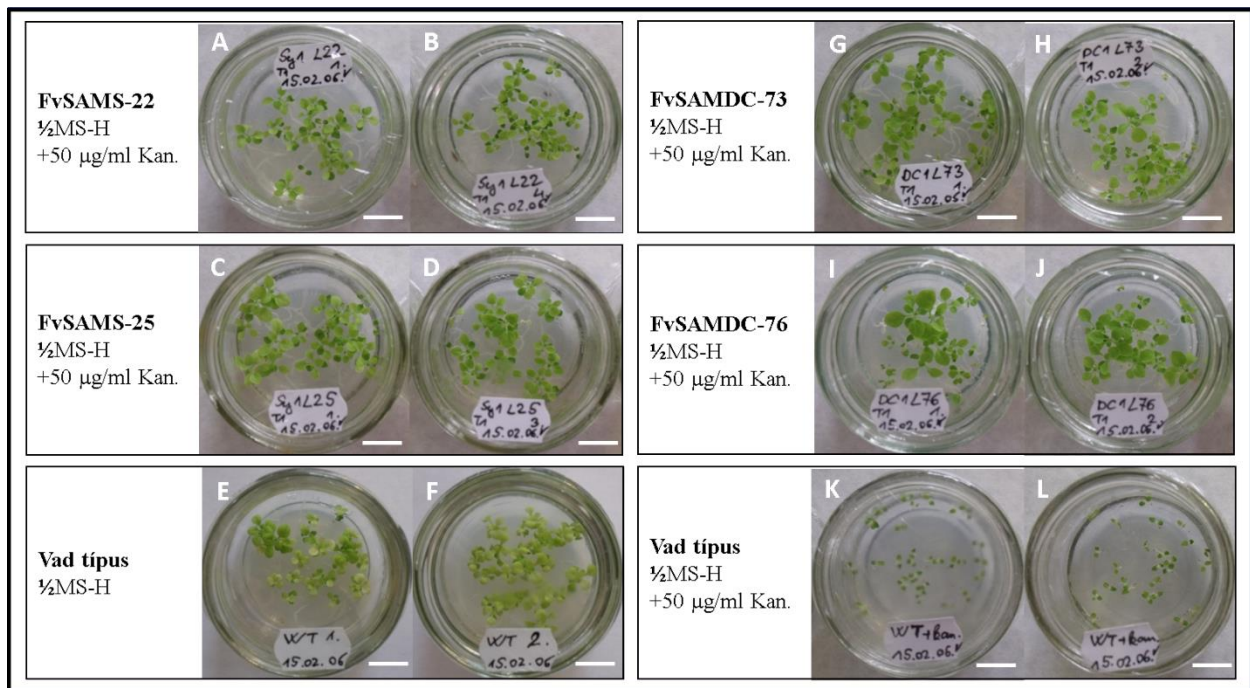
A későbbi sótoleranciát vizsgáló kísérletbe konstrukciónként 2-2 vonalat állítottunk be (*FvSAMS*-22, *FvSAMS*-25; *FvSAMDC*-73, *FvSAMDC*-76). A *FvSAMS*-22 és *FvSAMS*-25, valamint a *FvSAMDC*-73 és a *FvSAMDC*-76 vonalakat a későbbiekben *FvSAMS* és *FvSAMDC* vonal gyűjtőnéven nevezzük.

5.6 A hosszútávú sóstressz hatásának vizsgálata a FvSAMS-t, FvSAMDC-t túltermelő és a vad típusú *Nicotiana benthamiana* növények élettani paramétereire

5.6.1 A biomassza produktum

A 2-2 3:1-es szegregációs arányt mutató független transzgenikus vonal előszelekciónak MS táptalajon (50 µg/ml kanamicinnel kiegészítve), a vad típusú *Nicotiana benthamiana* magok csíráztatását antibiotikum-mentes MS táptalajon végeztük. A 14. napon a csíranövényeket antibiotikum-mentes ½-es MS táptalajra, illetve antibiotikum-mentes ½-es MS kiegészítve 0,58 g/l (10 mM) NaCl táptalajra helyeztük (20. ábra). A mintákat a vetést követő 85. napon gyűjtöttük.

A növények sóstresszre adott válaszát az élőtömeg visszatükrözi, így a biomassza vizsgálatával egy skálát lehet képezni a tolerancia szintjének meghatározásához (Sairam et al., 2002), ezért vizsgáltuk, hogy a hosszútávú sóstressz miként befolyásolja a FvSAMS, FvSAMDC vonalak és a vad típusú növények biomassza produktumát és a hajtások hosszát.

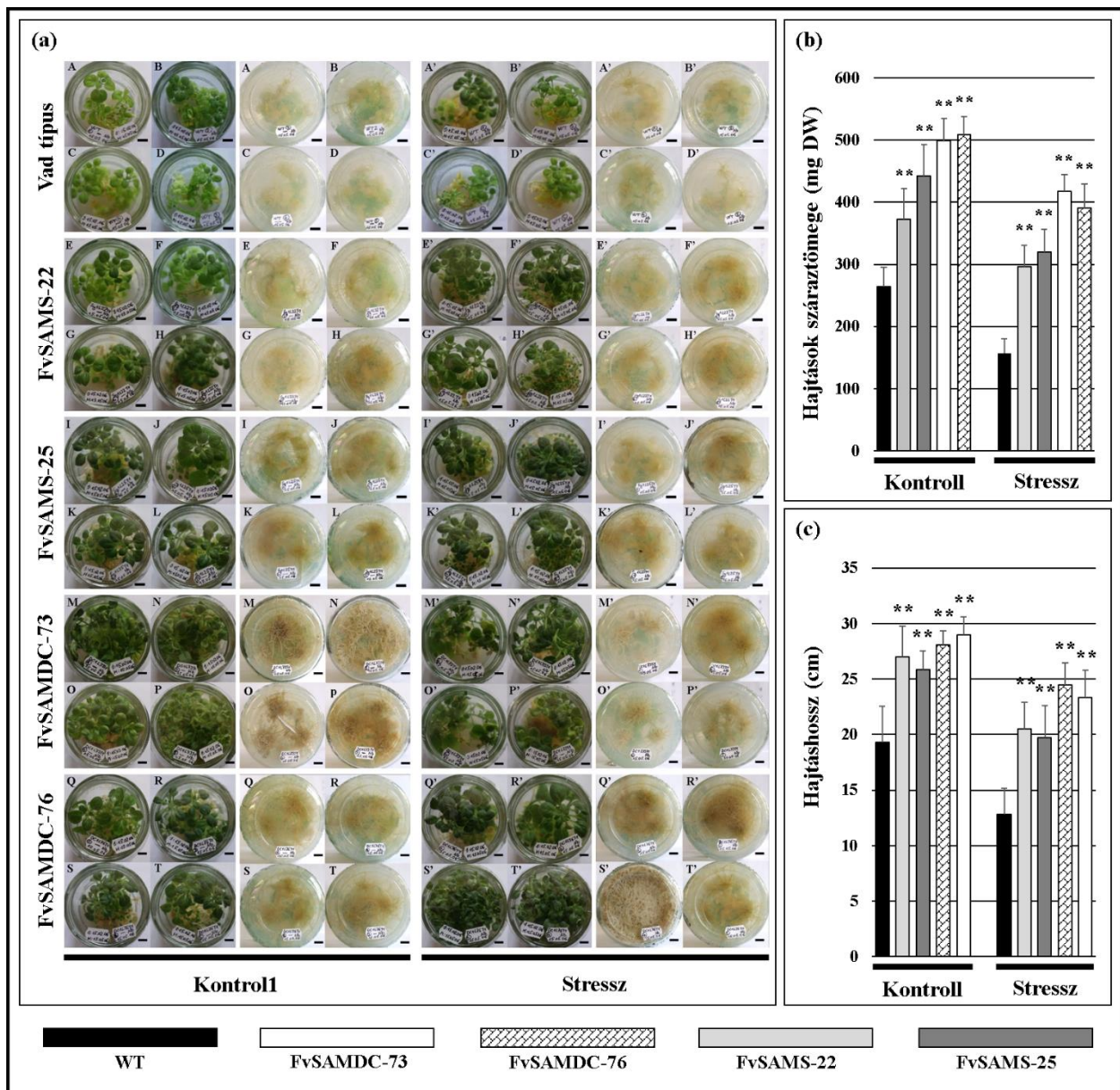


20. ábra: A FvSAMS (A-D) és a FvSAMDC (G-J) T₁ vonalak előszelekcója. A vonal 1 cm-t jelöl.

A kísérletbe állított transzgenikus *Nicotiana benthamiana* T₁ vonalak fokozottabb hajtás-, gyökértömeget és hajtáshosszt produkáltak, mind kontroll, mind 10 mM NaCl stressznek kitett körülmények között a vad típushoz viszonyítva. A FvSAMS vonalak kontroll feltételek között ~1,5-ször nagyobb biomasszát és ~1,4-szer nagyobb szárhosszt, míg sóstressz hatására ~kétszer nagyobb hajtástömeget és ~1,6-szor nagyobb hajtáshosszt produkáltak a vad típushoz képest. Ezek az értékek a FvSAMDC vonalak esetében kontroll körülmények között ~1,9-szer nagyobb biomasszában és ~1,5-ször nagyobb hajtáshosszban, míg sóstressz esetén ~2,6-szor nagyobb

hajtástömeg produktumban és ~1,9-szer nagyobb hajtáshosszban realizálódtak a vad típushoz viszonyítva (**21. ábra / a, b, c**).

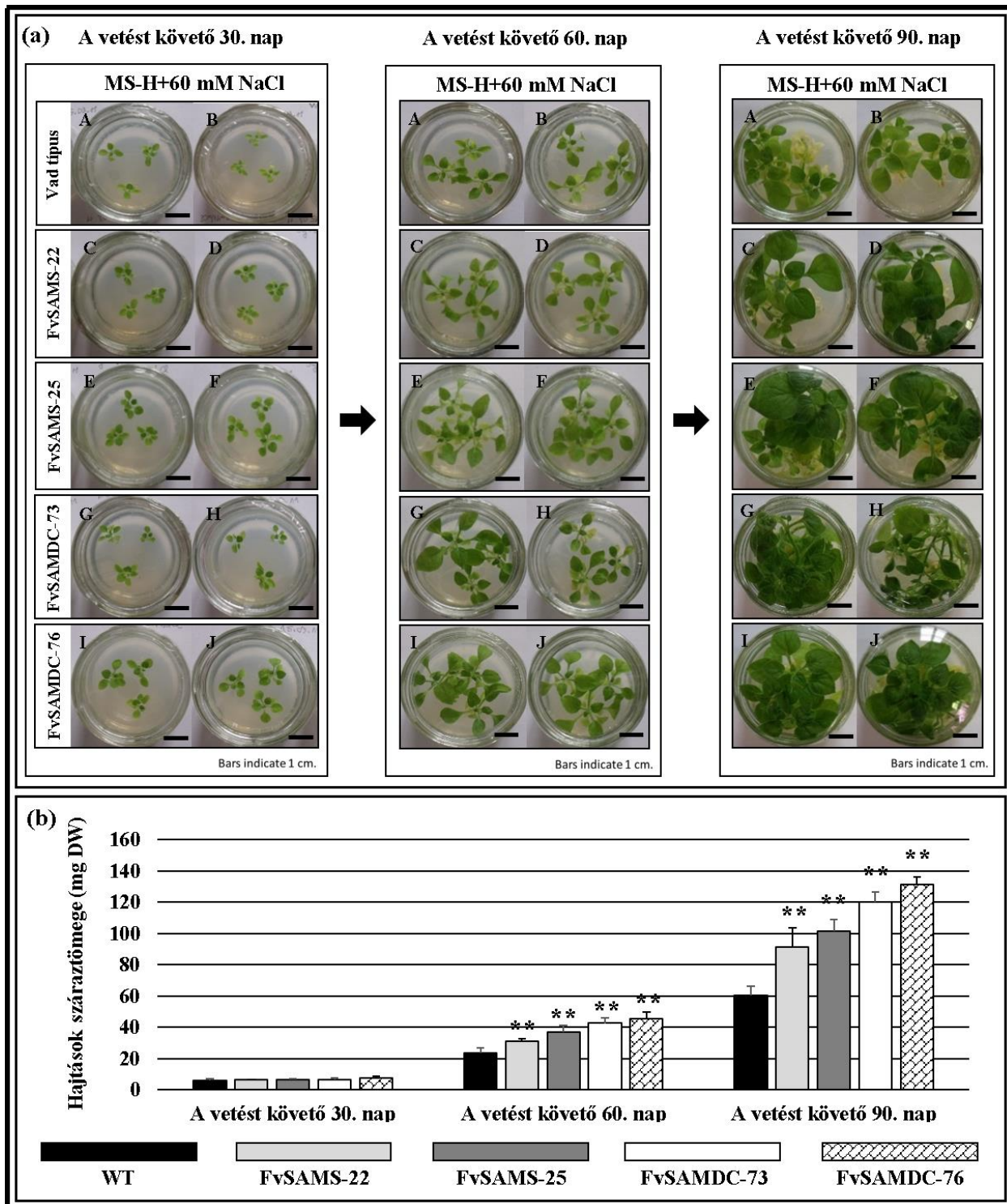
Gong et al. (2014), Kim et al. (2015) kutatásaiban a *SAMS*-t és Roy és Wu (2002) publikációjában a *SAMDC*-t túltermelő transzgénikus növények esetében is fokozottabb biomassza termelést figyeltek meg stressz hatására. Ugyanakkor az antiszensz *SAMDC* konstrukciót tartalmazó transzgénikus levéllemezek gyökeresedési erélye jelentősen csökkent a vad típushoz képest (Torrighiani et al., 2005) és a *SAMDC* csendesítése dohányban fokozott sóérzékenységet okozott, de érdekes módon a csendesített *SAMDC*, ezáltal a dcSAM deficiencia pozitívan hatott a kontroll körülmények között a transzgénikus növények biomassza mennyiségére és a szárhosszra (Mellidou et al., 2016). A korábbi tanulmányokban a különbségek a transzgénikus és a vad típusú növények esetében főképp stressz hatására jelentkeztek, míg az eredményeink alapján már kontroll körülmények között is nagyobb biomassza mennyiséget mértünk a FvSAMS és FvSAMDC vonalakban, mint a vad típusban.



21. ábra: A kísérletbe állított transzgénikus vonalak és a vad típusú növények hajtás és gyökér produktuma kontroll körülmények között (A-T) és 10 mM NaCl stressz hatására (A'-T'). A képek a csírázást követő 85. napon készültek. A vonalak 1 cm-t jelölnek (a). A hajtások száraztömege (b) és a hossza (c), $SD \pm$, $n=6$ ($P < 0,001$), a ** a kontrollhoz viszonyítva.

5.6.1.1 A növekedési erély 60 mM NaCl hatására

Ahhoz, hogy meggyőződjünk arról, hogy a nagyobb biomassza produktum és a fokozott növekedési erély nemcsak alacsony dózisu sóstressz (10 mM NaCl) esetében jelentkezik, nagyobb dózisu 60 mM NaCl stressznek is kitéttük a transzgénikus vonalakat és a vad típust. Mind a *FvSAMS*, mind a *FvSAMDC* túltermeltetése is fokozta a transzgénikus vonalak növekedési erélyét 60 mM NaCl stressz hatására, ami a nagyobb biomassza produktumban nyilvánult meg. (22. ábra / a, b).



22. ábra: A transzgenikus vonalak és a vad típus növekedési erélye 60 mM NaCl-t tartalmazó MS táptalajon (A-J). A képek a csírázást követő 30., 60. és 90. napon készültek. A vonalak 1cm-t jelölnek (a). A hajtások száraztömege a csírázást követő 30.-, 60.- és 90. napon (b), SD±, n=6 (P<0,001), a ** a kontrollhoz viszonyítva.

A sóstresszt követő 30. napon a biomasszában mért különbségek még nem voltak szignifikánsan nagyobbak a transzgenikus vonalakban, de a sóstresszt követő 60. napon a FVSAMS vonalakban ~1,4-szer, míg a FvSAMDC vonalakban ~1,9-szer nagyobb száraztömeget mértünk, mint a vad típusban. A sóstresszt követő 90. napon a FvSAMS vonalak esetében ~1,6-

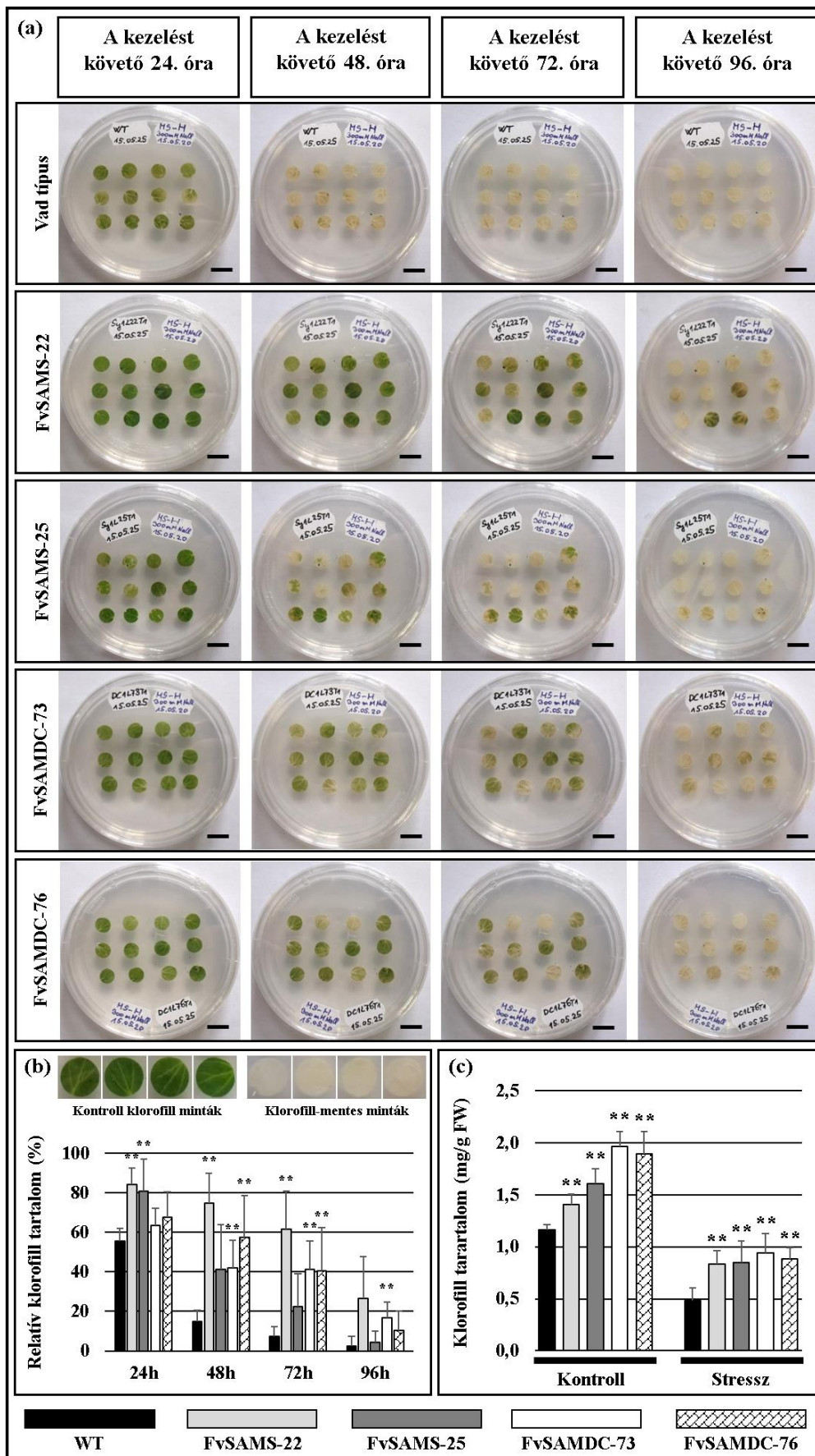
szor, míg a FvSAMDC vonalakban ~2,1-szer nagyobb biomassza produktumot mértünk a vad típushoz viszonyítva. A vizsgálat alapján látható, hogy nemcsak a kisebb- 10 mM NaCl, hanem a nagyobb dózisu 60 mM NaCl stressz esetén is fokozottabb biomasszát produkáltak a transzgenikus vonalak a vad típushoz viszonyítva.

5.6.2 A 300 mM NaCl hatása a transzgenikus és a vad típusú levélkorongokra

Vizsgáltuk a FvSAMS, a FvSAMDC vonalak és a vad típusú *Nicotiana benthamiana* levélkorongjainak rövid idejű, nagy dózisu sóstresszre (300 mM NaCl) adott válaszreakcióját (**23. ábra / a**).

A vad típusú levélkorongok sejtjei a kezelést követő 48 óra elteltével már szinte teljesen elpusztultak, míg a FvSAMS és a FvSAMDC levélkorongok sejtjeinél hasonló mértékű elhalás a kezelést követő 96 órával következett be. Megfigyeléseinkhez hasonlóan, a szegfű *SAMDC*-túltermelő *Nicotiana tabacum* levélkorongok is ellenállóbbak voltak 250 mM H₂O₂ stressz hatására (oxidatív stressz), mint a vad típusú explantumok (Wi et al., 2006).

A **23. / a ábrán** látható levélkorongok relatív klorofill tartalmát a **23. / b** diagrammon ábrázoltuk. A levélszövetek relatív klorofill tartalmának meghatározásához az ImageJ 1.51j8 szoftvert használtuk. A 300 mM NaCl stresszt követő 24 óra elteltével a klorofill degradáció a vad típusban ~44,2%-os, a FvSAMS vonalakban ~16,4%-os, míg a FvSAMDC vonalakban ~34,4%-os volt. A kezelést követő 48 óra elteltével a klorofill tartalom csökkenése a vad típusban ~85,2%-os, a FvSAMS vonalakban ~42%-os és a FvSAMDC vonalakban ~51%-os volt. 72 óra elteltével a klorofill degradáció a vad típusban ~93%-os, a FvSAMS vonalakban ~57,9%-os, míg a FvSAMDC vonalakban ~59,1%-os volt. Végül a kezelést követő 96 órával a klorofill csökkenés a vad típusban ~97,6%-os, a FvSAMS vonalakban ~84,5%-os és a FvSAMDC vonalakban ~86,4%-os volt. Megfigyelhető, hogy a kezelést követő 24 óra elteltével a FvSAMDC vonalak levélkorongjaiban a klorofill degradáció jóval nagyobb volt, mint a FvSAMS vonalak esetében, de a kezelést követő 48-, 72- és 96 óra elteltével már hasonló mennyiségű klorofill tartalmat mértünk mindkét transzgenikus vonal explantumaiban.



23. ábra: A vad típusú és transzgenikus levélkorongok nagy dózisu (300 mM NaCl) sótoleranciájának vizsgálata. A vonal 1cm-t jelöl. (a). A levéllemezek relatív klorofill tartalma a 300 mM NaCl stresszt követő 24.-, 48.-, 72.- és 96. órában, SD±, n=12 (P<0,001), a ** a WT-hez

viszonyítva **(b)**. A hosszútávú 10 mM NaCl stressznek kitett transzgenikus vonalak és a vad típus klorofill *a* és *b* mennyiségének meghatározása, $SD \pm$, $n=3$ ($P < 0,05$), a ** a kontrollhoz viszonyítva **(c)**.

5.6.3 A klorofill *a* és *b* tartalom

A klorofill tartalom információt ad a növények fiziológiai állapotáról, ezért vizsgáltuk a hosszútávú 10 mM NaCl stressz hatását a transzgenikus vonalak és a vad típus összklorofill tartalmára **(23. ábra / c)**.

Kontroll körülmények között mind a FvSAMS vonalak, mind a FvSAMDC vonalak klorofill *a* és *b* tartalma szignifikánsan magasabb volt, mint a vad típusban. A FvSAMS vonalak klorofill tartalma ~1,3-szor, míg a FvSAMDC vonalak ~1,6-szor volt magasabb, mint a vad típusban a kontroll körülmények között mért mennyiség. A sóstressz esetén a transzgenikus vonalakban és a vad típusban is csökkent a klorofill tartalom, a FvSAMS vonalak esetében ~1,7-szer, míg a FvSAMDC vonalakban ~1,9-szer nagyobb klorofill tartalmat mértünk, mint a vad típusban. A *SAMS* túltermelése a paradicsomban és az *Arabidopsis*-ban is fokozta az összklorofill tartalmat stressz hatására (Gong et al., 2014; Ma et al., 2017).

5.6.4 A H_2O_2 és O_2^- hisztokémiai detektálása, a H_2O_2 relatív mennyisége és a levélkorongok ionvesztése

A ROS-ok (a szuperoxid anion $/O_2^-/$, a hidrogénperoxid $/H_2O_2/$, a hidroxil gyök $(\cdot OH)$ és a szinglet oxigén $/^1O_2/$) termelődésének az egyik fő helyszíne a kloroplastisz (Mignolet-Spruyt, 2016). A ROS-ok homeosztázisa megváltozik a stresszek hatására, míg nagy koncentrációban károsítják a sejtet, addig kis koncentrációban szignál molekulaként viselkednek a stresszek felismerésében és a stresszválaszokban. A ROS-ok, mint a H_2O_2 és az O_2^- felhalmozódása a szövetekben egyenes arányban áll a sejtek stresszeltségi fokával, ezért hisztokémiai festéssel vizsgáltuk a szövetek H_2O_2 és O_2^- tartalmát.

A **24. / a ábrán** bal oldalt látható a levelek megfestett H_2O_2 tartalma kontroll és sóstressz esetén. Kontroll körülmények között alig volt detektálható a H_2O_2 , mind a transzgenikus vonalakban (FvSAMS, FvSAMDC), mind pedig a vad típusban. A sóstressz hatására viszont a vad típusú levelek már nagyobb mértékű elszíneződést, ezáltal nagyobb H_2O_2 tartalmat mutattak a transzgenikus vonalokhoz (FvSAMS, FvSAMDC) képest. A vad típusban a H_2O_2 eloszlása viszonylag homogén volt, míg a FvSAMDC vonalak esetében a levélnyel körüli részekre, addig a FvSAMS vonalakban a levél peremére koncentrált H_2O_2 .

A **24. / a ábrán** jobb oldalt látható a levelek O_2^- hisztokémiai festése kontroll és sóstressz hatására. A H_2O_2 tartalommal ellentétben az O_2^- tartalmat már kontroll körülmények között is detektáltunk körben a levelek széleinél, mind a vad típusban, mind a transzgenikus vonalakban (FvSAMS, FvSAMDC). A sóstressz hatására hasonlóan a H_2O_2 -nál kapott eredményekhez, itt is

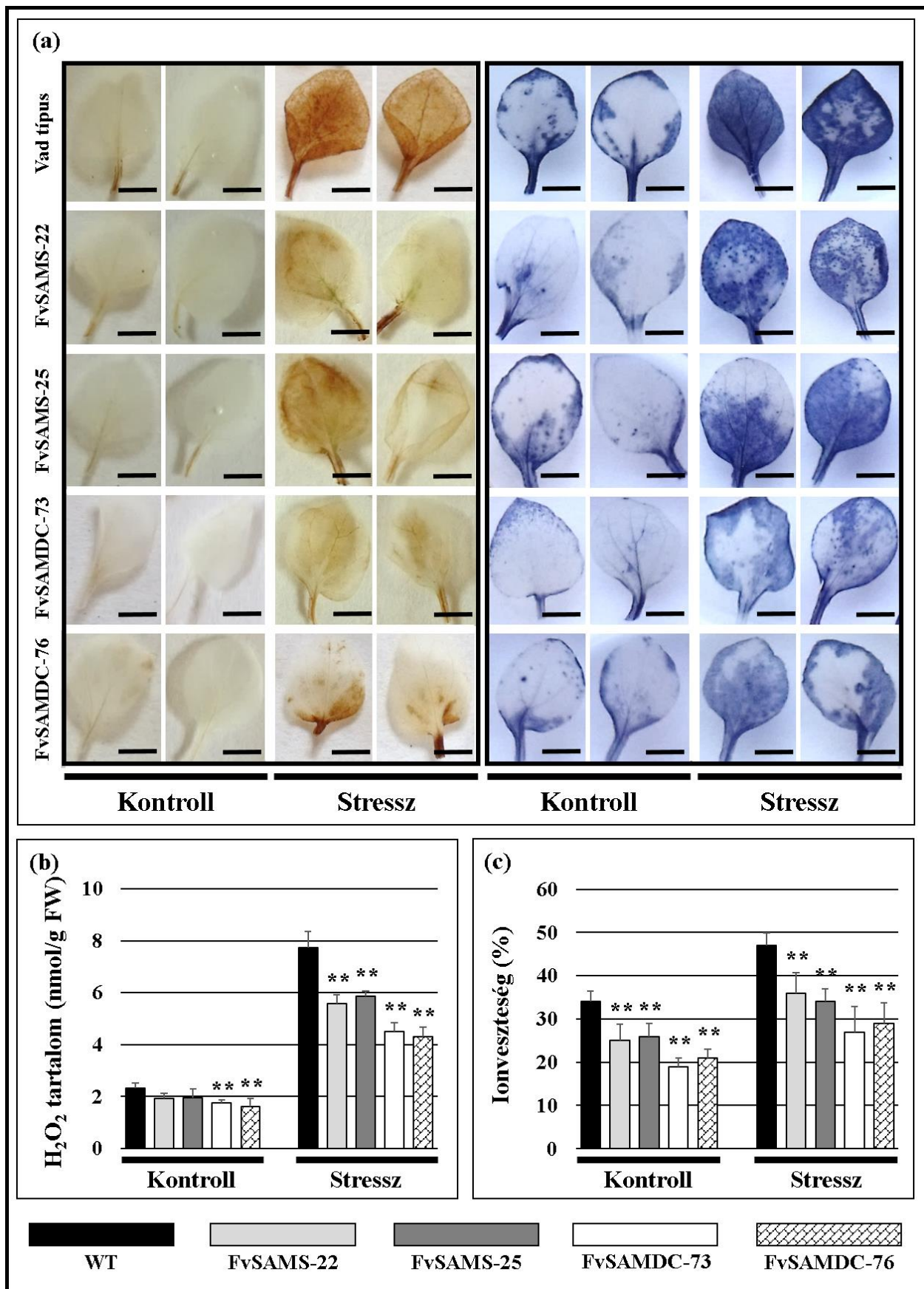
a vad típus levelei színeződtek jobban, tehát nagyobb volt az O_2^- tartalmuk a transzgenikus vonalakhoz (FvSAMS, FvSAMDC) viszonyítva. A transzgenikus vonalakban az O_2^- eloszlásában nem volt megfigyelhető hasonló eltérés, mint a H_2O_2 esetében.

A levelek H_2O_2 és a O_2^- hisztokémiai festéssel történő meghatározását követően megmértük a transzgenikus vonalak (FvSAMS, FvSAMDC) és a vad típus leveleinek H_2O_2 mennyiségét kontroll körülmények és sóstressz hatására (**24. / b ábra**).

A FvSAMS vonalakban kontroll körülmények között ~1,2-szer kevesebb H_2O_2 -t mértünk, de a különbség nem volt szignifikáns, míg sóstressz esetén ~1,4-szer kevesebb H_2O_2 -t detektáltunk szignifikáns különbséggel. A FvSAMDC vonalakban mind kontroll körülmények között (~1,4-szer), mind a sóstressz hatására (~1,8-szor) szignifikánsan kevesebb H_2O_2 mennyiségeket mértünk, mint a vad típusban. A korábban leírt publikációkban a *CaSAMDC*-t túltermelő *Arabidopsis*-ban szignifikánsan alacsonyabb ROS felhalmozódást figyeltek meg, mint a vad típusban. Hasonlóképpen a *SISAMS* és a *BvMI4-SAMS2* túltermeltetése is csökkentette H_2O_2 és a O_2^- mennyiségét stressz esetén (Gong et al., 2014; Ma et al., 2017).

A túlzott ROS felhalmozódás oxidatív stresszt vált ki, ami lipidperoxidációt és a membránok sérülését, végül sejthalált okoz (Biswas és Mano, 2015), ezért a következő lépésben vizsgáltuk a levélkorongok ionvesztését kontroll körülmények és hosszútávú sóstressz esetén.

Az alacsonyabb ROS szinteket támasztják alá a mérések, mivel mind a FvSAMS, mind a FvSAMDC vonalakban alacsonyabb ionvesztés mértünk kontroll és sóstressz hatására is, mint a vad típusban. Kontroll körülmények között a FvSAMS vonalakban ~1,3-szor míg a FvSAMDC vonalakban ~1,8-szor alacsonyabb ionvesztés mértünk a vad típushoz viszonyítva. Ezek az értékek nőttek sóstressz hatására, a FvSAMS vonalakban ~1,4-szer, míg a FvSAMDC vonalakban ~1,9-szer volt kisebb az ionvesztés, mint a vad típusban (**24. / c ábra**). Hasonló eredményekről számolnak be a hőstresszelt *ySAMDC*-t (*y*: yeast) túltermelő paradicsomban is (Cheng et al., 2009). A *SISAMS*-t túltermelő paradicsomban $NaHCO_3$ (szódabikarbóna) stressz, míg *MfSAMS1*-et túltermelő *Nicotiana tabacum*-ban hideg stressz hatására detektáltak szignifikánsan alacsonyabb ionvesztés mértékét, mint a vad típusban (Gong et al., 2014; Guo et al., 2014).



24. ábra: A H₂O₂ (bal panel) és az O₂⁻ (jobb panel) immunolokalizációjának és relatív mennyiségének meghatározása. A vonal 1 cm-t jelöl (a). A transzgénikus vonalak és a vad típus H₂O₂ mennyiségének meghatározása, SD±, n=3 (P<0,05), a ** a kontrollhoz viszonyítva (b). A

transzgenikus vonalak és a vad típusú levélkorongok ionveszteségének meghatározása, $SD \pm$, $n=3$ ($P < 0,001$), a ** a kontrollhoz viszonyítva (c).

Számos korábbi tanulmány számol be arról, hogy mind a *SAMS*, mind a *SAMDC* túltermeltetése fokozza az antioxidáns rendszer enzimeinek aktivitását a fokozott poliamin bioszintézisen keresztül (Wi et al., 2006; Gong et al., 2014; Guo et al., 2014; Wi et al., 2014; Ma et al., 2017). A poliaminok kétféle módon kontrollálhatják a ROS-ok homeosztázisát. Az egyik útvonal, hogy gátolhatják a fémek auto-oxidációját, ami a ROS-ok generálódásához szükséges elektron mennyiséget csökkenti (Shi et al., 2010). A másik útvonal közvetlenül fokozza az antioxidáns rendszer enzimeinek aktivitását (Shi et al., 2010; Mostofa et al., 2014). Feltételezések szerint a poliaminok és a ROS-ok közötti kölcsönhatás a plazmamembránon megy végbe, ahol a poliaminok a pozitív töltésük miatt blokkolni tudják a kationcsatornákat (Williams, 1997; Dobrovinskaya et al., 1999; Zepeda-Jazo et al., 2008; Bose et al., 2011; Zepeda-Jazo et al., 2011).

Összefoglalva feltételezhető, hogy a csökkent H_2O_2 és a O_2^- mennyiséget, ezáltal a fokozott membránstabilitást a nagyobb mennyiségű poliaminok okozzák közvetve a *FvSAMS*-t és a *FvSAMDC*-t túltermelő vonalakban.

5.6.5 A prolin mennyiség

A ROS-ok mellett a sejtekben felhalmozódó prolin mennyisége is információt ad a növények stresszeltségi fokáról. A prolint egy stresszeltségi állapotot jelző aminosavnak tekintenek, mivel számos növényfajban halmozódik fel környezeti stresszek hatására (Szabados és Saviouré, 2010), ezért vizsgáltuk a kontroll és a sóstresszelt transzgenikus és a vad típus leveleinek prolin tartalmát.

A *FvSAMS* vonalakban kontroll körülmények között enyhén emelkedett, illetve megközelítőleg azonos prolin mennyiségeket mértünk, mint a vad típusban, míg sóstressz hatására prolin többlet volt kimutatható a transzgenikus vonalakban (~1,2-szeres), de a különbség nem volt szignifikáns a vad típushoz viszonyítva, míg egy korábbi tanulmányban a *BvMI4-SAMS2*-t overexpresszáló *Arabidopsis*-ban fokozott prolin mennyiséget detektáltak sóstressz hatására a vad típushoz képest (Ma et al., 2017). A *FvSAMDC* vonalak esetében kontroll körülmények között enyhe prolin többletet mértünk, míg sóstressz hatására a prolin mennyisége ~4,3-szorosára emelkedett a vad típusú növényekben mért értékekhez képest, amelyekben a stressz hatására csak enyhén nőtt a prolin mennyisége. A fokozott prolin mennyiségnek számos pozitív hatása van az abiotikus stressztoleranciára és a prolin felhalmozódás egyenes arányban áll a nagyobb összpoliamin szintekkel még akkor is, ha közös prekursoron, a glutaminsavon (Glu) osztoznak (Simon-Sarkadi et al., 2006; Wen et al., 2011; Cvikrová et al., 2012). Eredményeink alapján a *FvSAMS* enyhén, míg a *FvSAMDC* túltermeltetése jelentős mértékben fokozta a prolin tartalmat

sóstressz esetén, ami összhangban van a FvSAMDC vonalaknál mért nagyobb össz szabad poliamin tartalommal, viszont a FvSAMS vonalaknál mért nagyobb össz szabad poliamin tartalom sóstressz hatására nem mutatott pozitív korrelációt a detektált prolin tartalommal (**25. / a ábra**).

5.6.6 A lignin tartalom

A SAM-nak a lignin a legfőbb metabolikus fogyasztója, ezért vizsgáltuk, hogy a ‘SAM hiány’ és a ‘SAM többlet’ hogyan befolyásolja a növények lignin tartalmát kontroll és sóstressz hatására (**25. / b ábra**).

A lignin a növények egyedfejlődése során az elsődleges és a másodlagos sejtfal között halmozódik fel és növeli annak szilárdságát, a nagyobb szilárdság pedig fokozza a növények biotikus és abiotikus stresszekkel szembeni toleranciáját. Kontroll körülmények között a transzgenikus vonalakban szignifikánsan magasabb lignin tartalmat detektáltunk a vad típushoz viszonyítva (a FvSAMS vonalakban ~2,8-szor, míg a FvSAMDC vonalak esetében ~1,8-szor volt magasabb). A sóstressz hatására a vad típusban és a FvSAMS vonalakban is növekedett a lignin mennyisége, míg a FvSAMDC vonalakban a kontroll körülményekhez képest is csökkent a lignin tartalom. A FvSAMS vonalak esetében ~1,7-szer több, míg FvSAMDC vonalakban ~1,5-ször kevesebb lignint detektáltunk, mint a vad típusú hajtásokban sóstressz hatására. Korábbi tanulmányokban fokozott lignifikációt figyeltek meg a vízhiányos cirok és a sóstresszelt kukorica növényekben, valamint a sóstresszelt szója növények gyökereiben (Azaizeh és Steudle, 1991; Cruz et al., 1992; Neves et al., 2010). Sánchez-Aguayo et al. (2004) eredményei szerint a só stresszelt paradicsomban a nagyobb SAM aktivitás összefüggésben volt a sóstressz hatására a vaszkuláris szövetekben felhalmozódó fokozott mennyiségű ligninnel.

Méréseink alapján kontroll körülmények között mind a ‘SAM hiány’, mind a ‘SAM többlet’ fokozta a lignifikációt a transzgenikus vonalakban, azonban sóstressz hatására a ‘SAM hiány’ jelentős mértékben csökkentette, míg a ‘SAM többlet’ jelentősen növelte a lignin felhalmozódását, ami közvetlen módon fokozhatta a FvSAMS vonalak sóstressz elleni toleranciáját.

5.6.7 Az etilén és a poliaminok mennyisége

Mivel a SAM közvetlen prekursor molekulája az etilén bioszintézisnek és az etilén számos stresszválaszban játszik szerepet, ezért vizsgáltuk, hogy a FvSAMS és a FvSAMDC túltermeltetése, hogyan befolyásolja az etilén mennyiségét kontroll és sóstressz hatására (**25. / c ábra**).

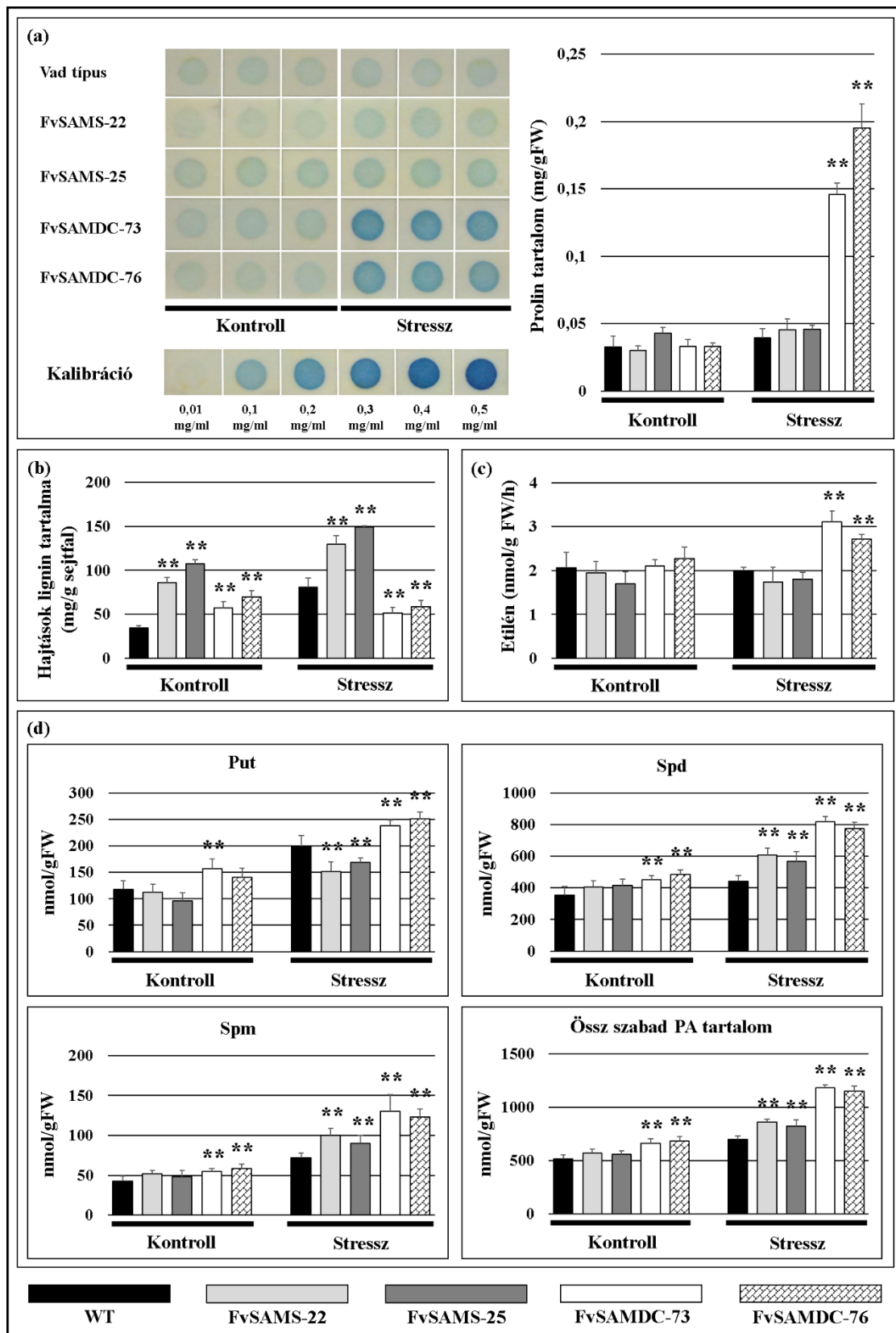
Mind az etilén, mind a poliaminok fontos szabályozó szerepet játszanak a növények biotikus és abiotikus stresszválaszaiban (Müller és Munné-Bosch, 2015; Romero et al., 2018), számos korábbi tanulmány számol be azonban az etilén és a poliamin metabolizmus antagonisztikus hatásáról különböző biotikus és abiotikus stresszek hatására (Li et al., 2004;

Nambeesan et al., 2012; Yu et al., 2016). Eredményeink alapján a FvSAMS vonalakban mind a kontroll, mind a sóstresszelt növényekben enyhén alacsonyabb etilén mennyiségeket mértünk a vad típushoz viszonyítva (mindkét esetben ~1,1-szer alacsonyabbat), hasonlóképpen a *MfSAMS1* túltermeltetése *Nicotiana tabacum*-ban sem okozott szignifikáns változást az etilén mennyiségében (Guo et al., 2014), de a *SAMS* túltermeltetése stressz hatására fokozta az etilén mennyiségét a paradicsomban és az *Arabidopsis*-ban is (Gong et al., 2014; Kim et al., 2015). Kontroll körülmények között a FvSAMDC enzimet túltermelő vonalakban enyhén több etilént mértünk, mint a vad típusban (~1,1-szer többet), de a különbség nem volt szignifikáns, míg sóstressz hatására az etilén mennyisége ~1,5-ször volt nagyobb, mint a vad típusban, amelyekben a sóstressz hatására enyhe csökkenés volt megfigyelhető a kontroll körülmények között mért értékekhez képest. A *SAMDC* antiszensz gátlása dohányban nem okozott szignifikáns változást az etiléntermelésben (Torrighiani et al., 2005), de az *AtSAMDC* túltermeltetése *Arabidopsis*-ban csökkentette az etilén mennyiségét (Hu et al., 2006).

A poliaminok szerepet játszanak az ozmotikus szabályozásban, a membránstabilitásban, a szabad gyökök eltávolításában és a sztómák mozgásának szabályozásában az abiotikus stresszek alatt (Liu et al., 2007), ezért vizsgáltuk, hogy a *FvSAMS* és a *FvSAMDC* túltermeltetése hogyan befolyásolja az etilén mellett a poliamin mennyiségeket kontroll és hosszútávú sóstressz esetén (**25. / d ábra**).

A putreszcin (Put) mennyisége csak a FvSAMDC vonalakban volt szignifikánsan nagyobb kontroll körülmények között és a sóstressz hatására is. A *SAMDC* túltermeltetése fokozta a Put felhalmozódását a rizsben és a dohányban is (Roy és Wu, 2002; Waie és Rajam, 2003), azonban más tanulmányokban *SAMDC*-t túltermelő transzgenikus növényekben a Put mennyisége nem változott szignifikánsan a stressz hatására, a spermidin (Spd) és a spermin (Spm) tartalom viszont fokozódott (Wi et al., 2006; Cheng et al., 2009; Peremarti et al., 2009; Zhao et al., 2010; Wi et al., 2014). A FvSAMS vonalak esetében stressz hatására szignifikánsan alacsonyabb Put mennyiségeket detektáltunk, míg a korábbi tanulmányokban arról számolnak be, hogy a *SAMS* túltermeltetése már kontroll körülmények között is csökkent Put felhalmozódást okozott (Gong et al., 2014; Ma et al., 2017). A Spd mennyisége mind a FvSAMS, mind a FvSAMDC vonalak esetében szignifikánsan nagyobb volt kontroll és sóstressz hatására is, de nagyobb mértékben a FvSAMDC vonalakban növekedett. A Spm mennyisége csak a FvSAMDC vonalakban volt szignifikánsan magasabb kontroll és sóstressz esetén is, míg a FvSAMS vonalak esetében csak sóstressz hatására detektáltunk szignifikánsan nagyobb Spm mennyiségeket. A korábbi tanulmányokban a *SAMS* és a *SAMDC* túltermeltetése is fokozta mind a Spd, mind a Spm mennyiségét (Roy és Wu, 2002; Waie és Rajam, 2003; Wi et al., 2006; Cheng et al., 2009; Peremarti et al., 2009; Gong et al., 2014; Wi et al., 2014; Ma et al., 2017). Az össz szabad poliamin

(PA) tartalom mind a FvSAMS, mind a FvSAMDC vonalakban szignifikánsan magasabb volt kontroll körülmények között és sóstressz hatására is, de a *FvSAMDC* túltermeltetése jelentősebb mértékben fokozta az össz szabad poliamin szintet, míg a “SAM többlet” a FvSAMS vonalak esetében kisebb mértékű felhalmozódást okozott. A korábbi tanulmányok alapján az etilén mennyisége pozitívan korrelál a spermidin és a spermin mennyiségekkel, míg a putreszcinnel negatív korrelációban áll (Handa és Mattoo, 2010), a FvSAMDC vonalakban mért nagyobb spermidin és spermin mennyiségek és a fokozott etilén produktum a sóstressz hatására összhangban van a korábbi irodalmi adatokkal, ugyanakkor a FvSAMS vonalakban mért nagyobb spermidin és spermin mennyiségek mellett csökkent etilén termelődést detektáltunk sóstressz esetén. A FvSAMDC vonalakban mért adatok alapján úgy tűnik, hogy a szabad poliamin szintek és a prolin tartalom, valamint az etilén mennyisége között pozitív-, míg a szabad poliamin szintek és lignin tartalom között negatív korreláció van sóstressz hatására. Méréseink alapján a számos korábbi tanulmánnyal ellentétben az etilén és a poliamin bioszintézis nem volt antagonistá hatással egymásra az általunk vizsgált kísérleti rendszerben.



25. ábra: A transzgénikus vonalak és a vad típus prolin tartalmának meghatározása, $SD\pm$, $n=3$ ($P<0,1$) (a). A transzgénikus vonalak és a vad típusú hajtások lignin tartalmának meghatározása, $SD\pm$, $n=3$ ($P<0,001$) (b). A transzgénikus vonalak és a vad típusú levélkorongok etilén termelésének meghatározása, $SD\pm$, $n=3$ ($P<0,5$) (c). A transzgénikus vonalak és a vad típusú növények szabad poliamin tartalmának meghatározása, $SD\pm$, $n=3$ ($P<0,5$) (d). A ** a kontrollhoz viszonyítva

5.6.8 Az etilén, a poliamin, a nikotin és a lignin metabolizmusában résztvevő gének relatív expressziója

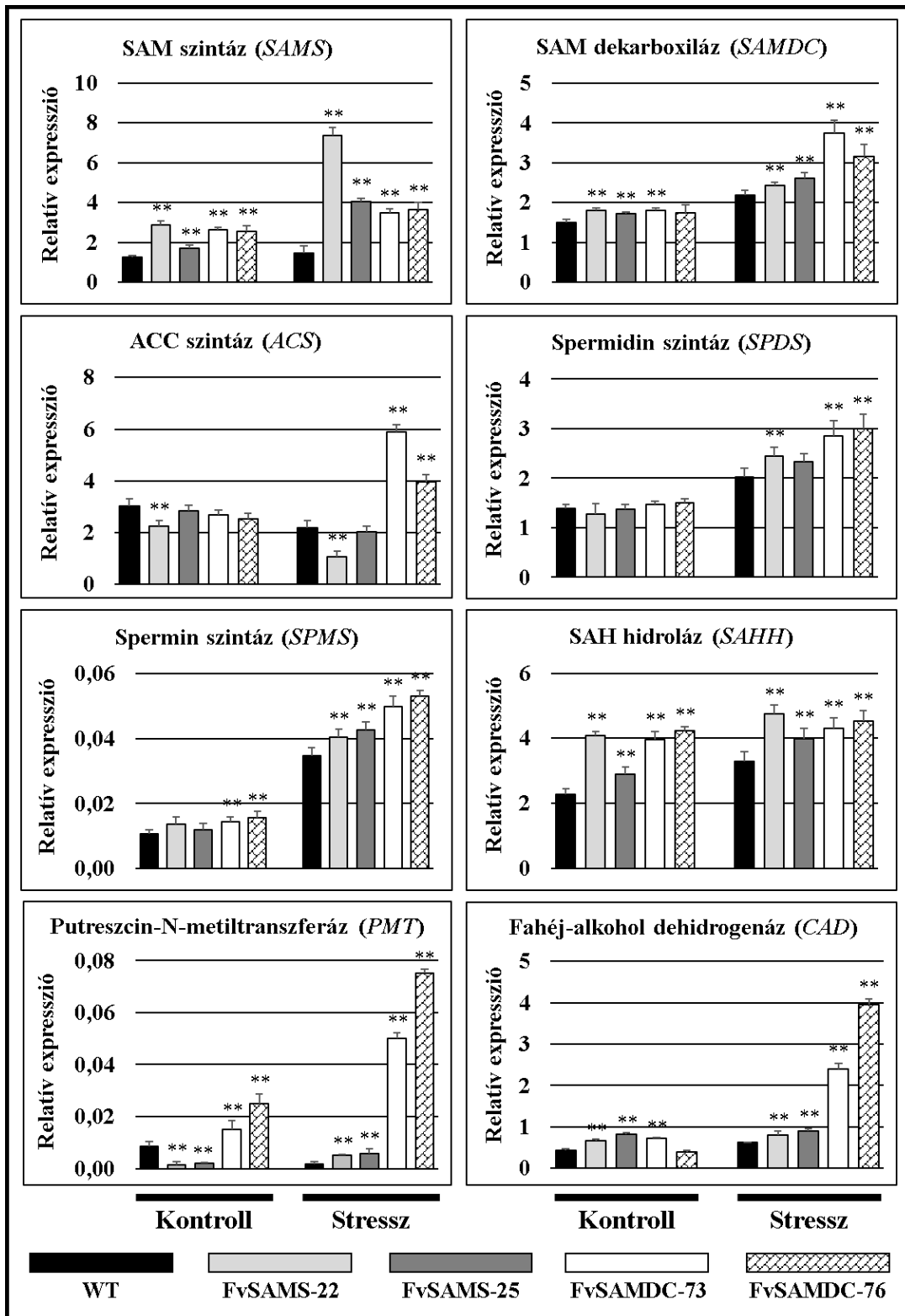
Vizsgáltuk az etilén metabolizmusban [SAM szintáz (*SAMS*); ACC szintáz (*ACS*)], a poliamin metabolizmusban [SAM szintáz (*SAMS*); SAM dekarboxiláz (*SAMDC*); spermidin szintáz (*SPDS*); spermin szintáz (*SPMS*)], a SAM reciklizációjában [SAH hidroláz (*SAHH*)] és két másodlagos metabolit, a nikotin [putreszcin N-metiltranszferáz (*PMT*)] és a lignin [fahéjalkohol dehidrogenáz (*CAD*)] bioszintézisében résztvevő gének relatív expresszióját, mivel ezek a gének olyan metabolizmusokban játszanak szerepet, amelyek számára a SAM szolgál szubsztrátként. (26. ábra).

Mind a FvSAMS, mind a FvSAMDC vonalakban a *SAMS*-nak, a *SAMDC*-nak, a *SPMS*-nak, a *SAHH*-nak és a *CAD*-nak szignifikánsan nagyobb volt az expressziója kontroll és sóstressz hatására is a vad típushoz viszonyítva. Az *ACS* relatív expressziója kontroll körülmények között a FvSAMS és FvSAMDC vonalakban is alacsonyabb szintet mutatott. A sóstressz hatására a vad típusban és a FvSAMS vonalakban a kontroll körülmények között mért értékekhez képest alacsonyabb *ACS* expressziót mértünk (a FvSAMS vonalak esetében a vad típushoz viszonyítva is alacsonyabbat), míg a FvSAMDC vonalakban szignifikánsan magasabb *ACS* expressziót figyeltünk meg, mint a vad típusban. A *SPDS* gén esetében kontroll körülmények között a FvSAMS vonalakban alacsonyabb expressziót, míg a FvSAMDC vonalak esetében enyhén magasabb expressziót mértünk, mint a vad típusban, de a különbség nem volt szignifikáns. A *SPDS* relatív expressziója sóstressz hatására a vad típusban és a FvSAMS, FvSAMDC transzgenikus vonalakban is növekedett, de a FvSAMS és a FvSAMDC vonalak esetében szignifikánsan magasabb értékeket mértünk a vad típushoz viszonyítva, a FvSAMS-25 kivételével, ahol a különbség nem volt szignifikáns. A *PMT* szintetizálja a N-metilputreszoint, ami a kiindulási szubsztrátként szolgál a nikotin bioszintézisében (Sato et al., 2001). A *PMT* relatív expressziója kontroll körülmények között a FvSAMS vonalakban szignifikánsan alacsonyabb, míg a FvSAMDC vonalak esetében szignifikánsan nagyobb volt a vad típushoz viszonyítva, de sóstressz hatására a FvSAMS és a FvSAMDC vonalakban is szignifikánsan magasabb értékeket mértünk, mint a vad típusban (a FvSAMDC vonalak esetében a *PMT* relatív expressziója ~34,9-szer volt nagyobb). A lignin bioszintézisben résztvevő fahéj-alkohol dehidrogenáz (*CAD*) relatív expressziója a transzgenikus vonalakban kontroll körülmények között a FvSAMDC-76-os vonal kivételével szignifikánsan magasabb volt a vad típushoz viszonyítva, míg sóstressz esetén enyhe növekedés volt megfigyelhető a *CAD* relatív expressziójában a vad típusban és a FvSAMS vonalakban is. A FvSAMDC vonalak esetében a *PMT*-hez hasonlóan jelentősen növekedett a *CAD* relatív expressziója is, ~5,1-szer volt nagyobb, mint a vad típusban mért érték, de a FvSAMDC

vonalakban a *CAD* magas relatív expressziója sóstressz esetén nem állt pozitív korrelációban a mért lignin mennyiségekkel.

A korábbi irodalmi adatok alapján a *SAMS* túltermeltetése a paradicsomban, a dohányban és az *Arabidopsis*-ban fokozta a *SAMS*, a *SAMDC*, az *ACS*, a *SPDS* és a *SPMS* gének relatív expresszióját (Gong et al., 2014; Guo et al., 2014; Kim et al., 2015), míg a *FvSAMS* túltermeltetése hasonlóképpen növelte a *SAMS*, a *SAMDC*, a *SPDS*, a *SPMS*, a *SAHH* és a *CAD* gének relatív expresszióját, azonban az *ACS* expressziója csökkent értéket mutatott, amit a mért etilén mennyiségek is igazoltak.

A *SAMDC* túltermeltetése a dohányban és az *Arabidopsis*-ban fokozta a *SAMDC* és csökkentette az *ACS* relatív expresszióját (Wi et al., 2006; Wi et al., 2014), míg nem transzgénikus rendszerben vizsgálva a rövid idejű sóstressz az almában és az *Arabidopsis*-ban is fokozta a *SAMDC1*, a *SPDS1* és a *SPMS* mRNS mennyiségét (Urano et al., 2003; Liu et al., 2008). A *FvSAMDC* túltermeltetése viszont növelte a *SAMS*, a *SAMDC*, az *ACS*, a *SPDS*, a *SPMS*, a *SAHH*, a *PMT* és a *CAD* relatív expresszióját is.



26. ábra: Relatív expressziós mérések, SD±, n=4 (P<0,01), a ** a WT-hez viszonyítva.

5.6.9 A hosszútávú sóstressz hatásának összesítése a transzgenikus vonalak és a vad típusú növények élettani paramétereire

A kontroll körülmények között és a 10 mM NaCl stresszelt FvSAMS-22, FvSAMS-25, FvSAMDC-73, FvSAMDC-76 transzgenikus vonalakban és a vad típusban mért növényélettani

paraméterek összesítését a **3. táblázatban** foglaltuk össze. A változás mértékét a vad típushoz viszonyítva adtuk meg.

3. táblázat: A FvSAMS és a FvSAMDC vonalakban mért növényélettani paraméterek összesítő táblázata a vad típushoz (WT) viszonyítva. A ↑ nyíl a növekedést, a ↓ nyíl az értékek csökkenését mutatja. A számok a 'szoros' változást jelzik.

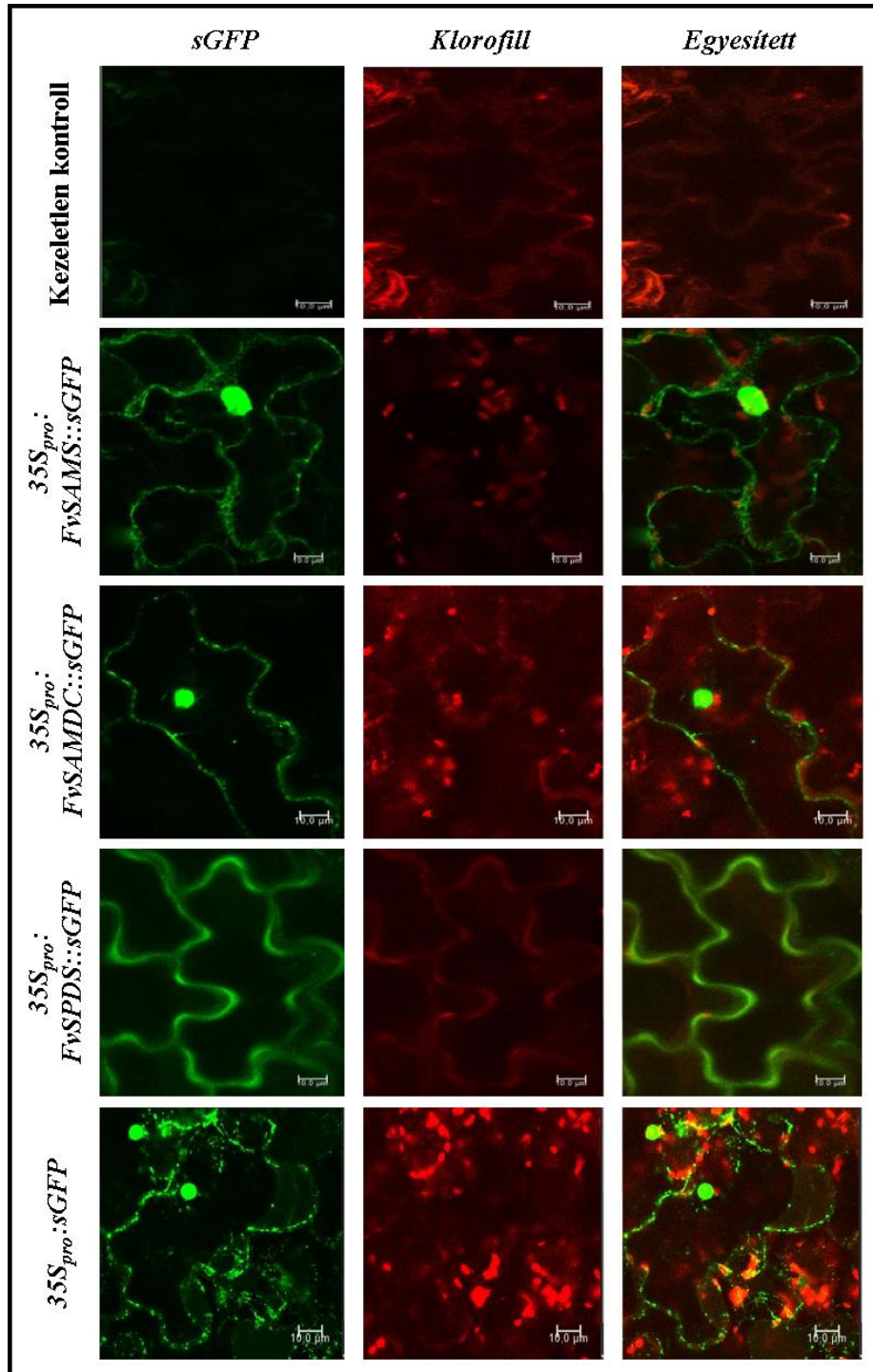
	FvSAMS	FvSAMDC	FvSAMS	FvSAMDC
	Kontroll körülmények (* -os változás)		10 mM NaCl stressz (* -os változás)	
Biomassza produktum/WT	~ 1,5 (↑)	~ 1,9 (↑)	~ 2 (↑)	~ 2,6 (↑)
Hajtáshossz/WT	~ 1,4 (↑)	~ 1,5 (↑)	~ 1,6 (↑)	~ 1,9 (↑)
Klorofill <i>a</i> és <i>b</i> tartalom/WT	~ 1,3 (↑)	~ 1,6 (↑)	~ 1,7 (↑)	~ 1,9 (↑)
H ₂ O ₂ mennyiség/WT	~ 1,2 (↓)	~ 1,4 (↓)	~ 1,3 (↓)	~ 1,8 (↓)
Ionvesztés/WT	~ 1,3 (↓)	~ 1,8 (↓)	~ 1,4 (↓)	~ 1,9 (↓)
Prolin tartalom/WT	~ 1,1 (↑)	~ 1	~ 1,2 (↑)	~ 4,3 (↑)
Lignin tartalom/WT	~ 2,8 (↑)	~ 1,8 (↑)	~ 1,7 (↑)	~ 1,5 (↓)
Etilén termelés/WT	~ 1,1 (↓)	~ 1,1 (↑)	~ 1,1 (↓)	~ 1,5 (↑)
Szabad poliamin tartalom				
Put/WT	~ 1,1 (↓)	~ 1,3 (↑)	~ 1,2 (↓)	~ 1,2 (↑)
Spd/WT	~ 1,2 (↑)	~ 1,3 (↑)	~ 1,3 (↑)	~ 1,8 (↑)
Spm/WT	~ 1,2 (↑)	~ 1,3 (↑)	~ 1,3 (↑)	~ 1,8 (↑)
Össz szabad poliamin/WT	~ 1,1 (↑)	~ 1,3 (↑)	~ 1,2 (↑)	~ 1,7 (↑)
Relatív expressziós mérések				
SAMS/WT	~ 1,8 (↑)	~ 2,0 (↑)	~ 3,9 (↑)	~ 2,4 (↑)
SAMDC/WT	~ 1,2 (↑)	~ 1,2 (↑)	~ 1,2 (↑)	~ 1,6 (↑)
ACS/WT	~ 1,2 (↓)	~ 1,1 (↓)	~ 1,4 (↓)	~ 2,2 (↑)
SPDS/WT	~ 1	~ 1,1 (↑)	~ 1,2 (↑)	~ 1,4 (↑)
SPMS/WT	~ 1,2 (↑)	~ 1,4 (↑)	~ 1,2 (↑)	~ 1,5 (↑)
SAHH/WT	~ 1,5 (↑)	~ 1,8 (↑)	~ 1,3 (↑)	~ 1,3 (↑)
PMT/WT	~ 4,8 (↓)	~ 2,4 (↑)	~ 3,0 (↑)	~ 34,9 (↑)
CAD/WT	~ 1,7 (↑)	~ 1,3 (↑)	~ 1,4 (↑)	~ 5,1 (↑)

A mérések alapján az a következtetés vonható le, hogy a kontroll körülmények között mért prolin-, valamint a kontroll és a sóstressz hatására mért lignin tartalom kivételével a *FvSAMDC* túltermeltetése kedvezőbben befolyásolta a transzgenikus vonalak növényélettani paramétereit mind kontroll körülmények, mind 10 mM NaCl stressz hatására, mint a FvSAMS overexpressziója.

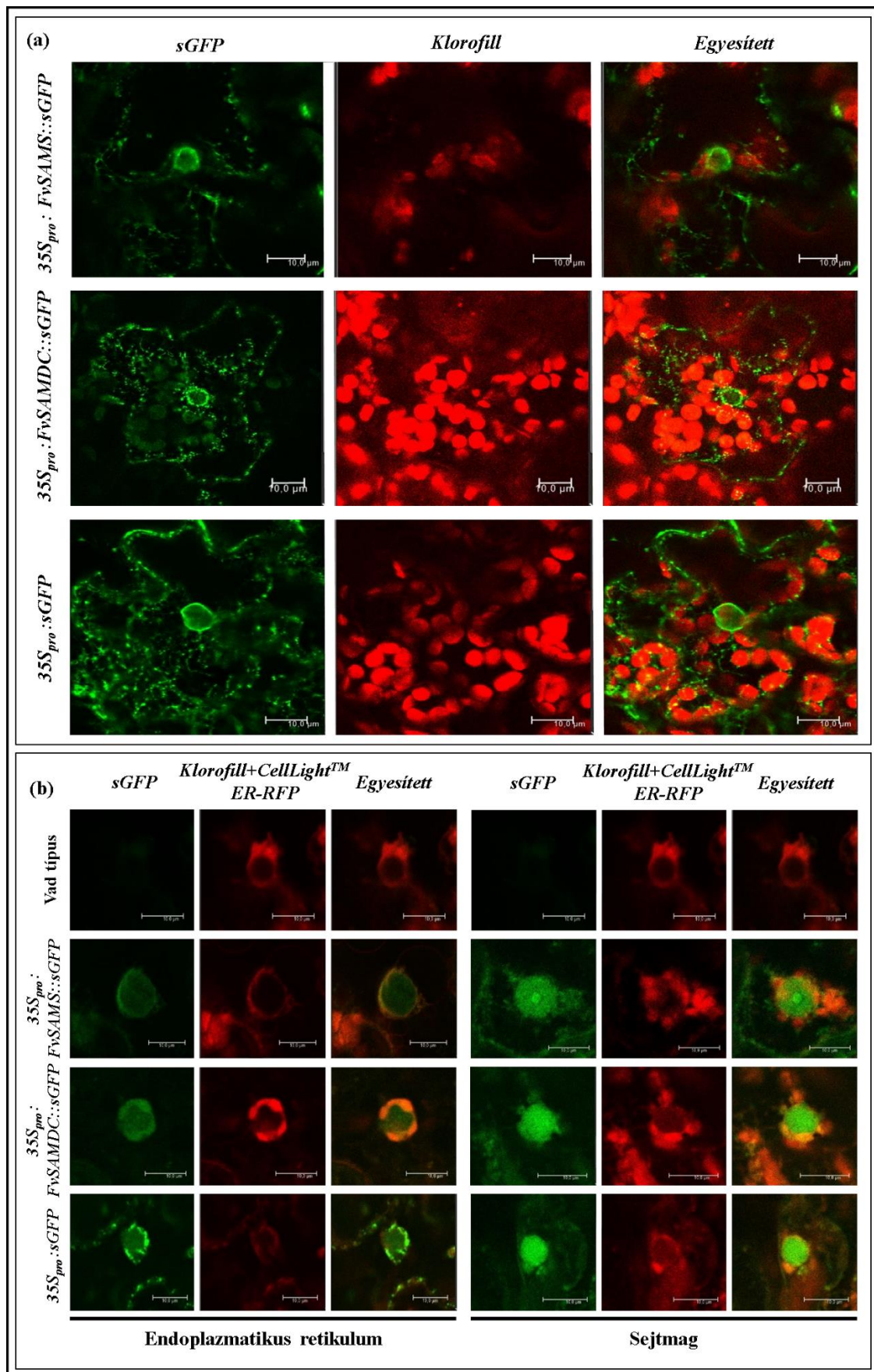
5.7 A *FvSAMS::sGFP* és a *FvSAMDC::sGFP* fúziós fehérjék szubcelluláris lokalizációjának meghatározása és az aminosav szekvenciák bioinformatikai elemzése

Első lépésben tranziens expresszióval vizsgáltuk a *FvSAMS::sGFP*, a *FvSAMDC::sGFP*, a *FvSPDS::sGFP* (nem publikált, saját konstrukció) és a *35S_{pro}::sGFP* (nem publikált, saját konstrukció) fúziós fehérjék sejten belüli lokalizációját (**27. ábra**). A *FvSAMS::sGFP*, a *FvSAMDC::sGFP* és a *35S_{pro}::sGFP* konstrukció tranziens expressziós vizsgálata során sejtmagi és citoplazmás lokalizációt, míg a korábbi megfigyelések alapján már detektált *FvSPDS::sGFP* fúziós fehérje esetében csak citoplazmás lokalizációt tapasztaltunk a *Nicotiana benthamiana* levelek epidermális sejtjeiben. A tranziens expresszió során felfigyeltünk arra, hogy mindhárom (a *FvSAMS::sGFP*, a *FvSAMDC::sGFP* és a *35S_{pro}::sGFP*) vektorkonstrukció mutatott endoplazmatikus retikulum jelet (**28. / a ábra**), ezért endoplazmatikus retikulum (ER) jelölést használtunk a CellLight™ ER-RFP alkalmazásával (**28. / b ábra**). A *FvSAMS::sGFP* és a *FvSAMDC::sGFP* fúziós konstrukció esetén gyengébb endoplazmatikus retikulum jelet detektáltunk, mint a kontroll *35S_{pro}::sGFP* konstrukcióval. A stabil *FvSAMS* és a *FvSAMDC* transzformánsok esetében nem tapasztaltunk hasonló jelenséget, ezért azt feltételezzük, hogy az infiltráció okozta mechanikus és biotikus stresszre adott választ figyeltük meg, mivel mind a biotikus, mind az abiotikus stresszek a kigombolyodott fehérjék felhalmozódását okozzák, amit az endoplazmatikus retikulum membránjának specifikus szenzor fehérjéi érzékelnek. Ezek a szenzor fehérjék a hősokk- (chaperonok) és más fontos fehérjéket kódoló gének expresszióját váltják ki, amelyek fokozhatják a fehérjék gombolyítási kapacitását, illetve ER-hez kapcsolt degradációját (ERAD). A kigombolyodott fehérjékre adott válasz egy konzervált stresszreakció az eukariótákban, a jelenséget UPR-nek (UPR – Unfolded Protein Response) nevezik, és feltehetően a kigombolyodott fehérjék ER-hez kötött degradációját (ER associated degradation - ERAD) figyeltük meg (Walter és Ron, 2011). Az ER-jelöléshez a levélszöveteket fixáltuk, ami a sGFP jel gyengülését okozta, így vehettük észre a *FvSAMS::sGFP* esetében a külön sejtmagi és a sejtmagvacska jelet, amit a stabil transzformánsok esetében is láttunk a sejtmagokról készült 3 dimenziós képeken. A SAMS sejtmagvacska lokalizációját korábban még nem publikálták (**29. ábra**). A **29. ábra a** paneljében a *FvSAMS::sGFP* fúziós fehérje tranziens expresszió során detektált, míg a **29. / b ábrán** a stabil transzformánsokban megfigyelt sejtmagvacska lokalizáció látható. A növényekben a sejtmagvacska három komponensből épül fel: a fibrilláris centerből (FC - Fibrillar Center), a sűrű fibrilláris komponensből (DFC - Dense Fibrillar Component) és a granuláris komponensből (GC - Granular Component). A **29. / a ábra B1** képen megfigyelhető, hogy a fibrilláris center kivételével vagy a sűrű fibrilláris komponensben vagy a granuláris komponensben vagy mindkettőben lokalizálódik a *FvSAMS::sGFP*. Mindkét sejtmagvacska komponens a riboszómák biogenezisében vesz részt, a DFC tartalmazza a fibrillarin fehérjét (Sirri

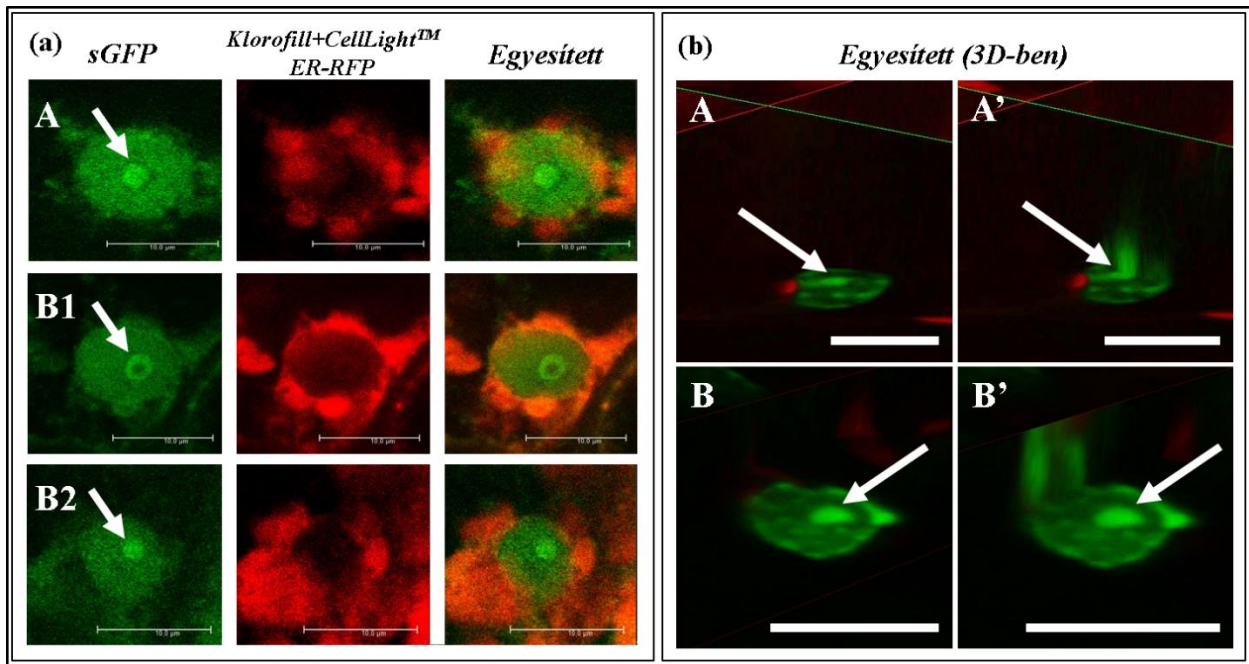
et al., 2008), ami a riboszómális RNS-ek (rRNS) érésében játszik szerepet. A *Nicotiana benthamiana* Fibrillarín2 (*NbFib2*) fehérjén már azonosítottak egy MTáz (AdoMet függő metiltransferáz) régiót, ami SAM-kötő motívumokat tartalmaz és sejtmagvacska lokalizációval rendelkezik (Zheng et al., 2016), tehát a *FvSAMS::sGFP* sejtmagvacska lokalizációja a riboszóma szintézisben való szerepére utalhat azáltal, hogy *in situ* állítja elő a legfőbb metil-csoport donort, a SAM-ot.



27. ábra: A *FvSAMS::sGFP*, a *FvSAMDC::sGFP*, a *FvSPDS::sGFP* és a $35S_{pro}::sGFP$ tranziens expressziós mintázata az epidermális sejtekben. A vonal 10 μm -t jelöl.



28. ábra: A *FvSAMS::sGFP*, a *FvSAMDC::sGFP* és a $35S_{pro}::sGFP$ specifikus tranziens expressziós mintázata az epidermális sejtekben **(a)**. Cellight ER-RFP BacMam 2.0 reagenssel jelölt endoplazmatikus retikulum (bal panel) és sejtmagi sGFP jel (jobb panel) **(b)**. A vonal 10 μm -t jelöl.



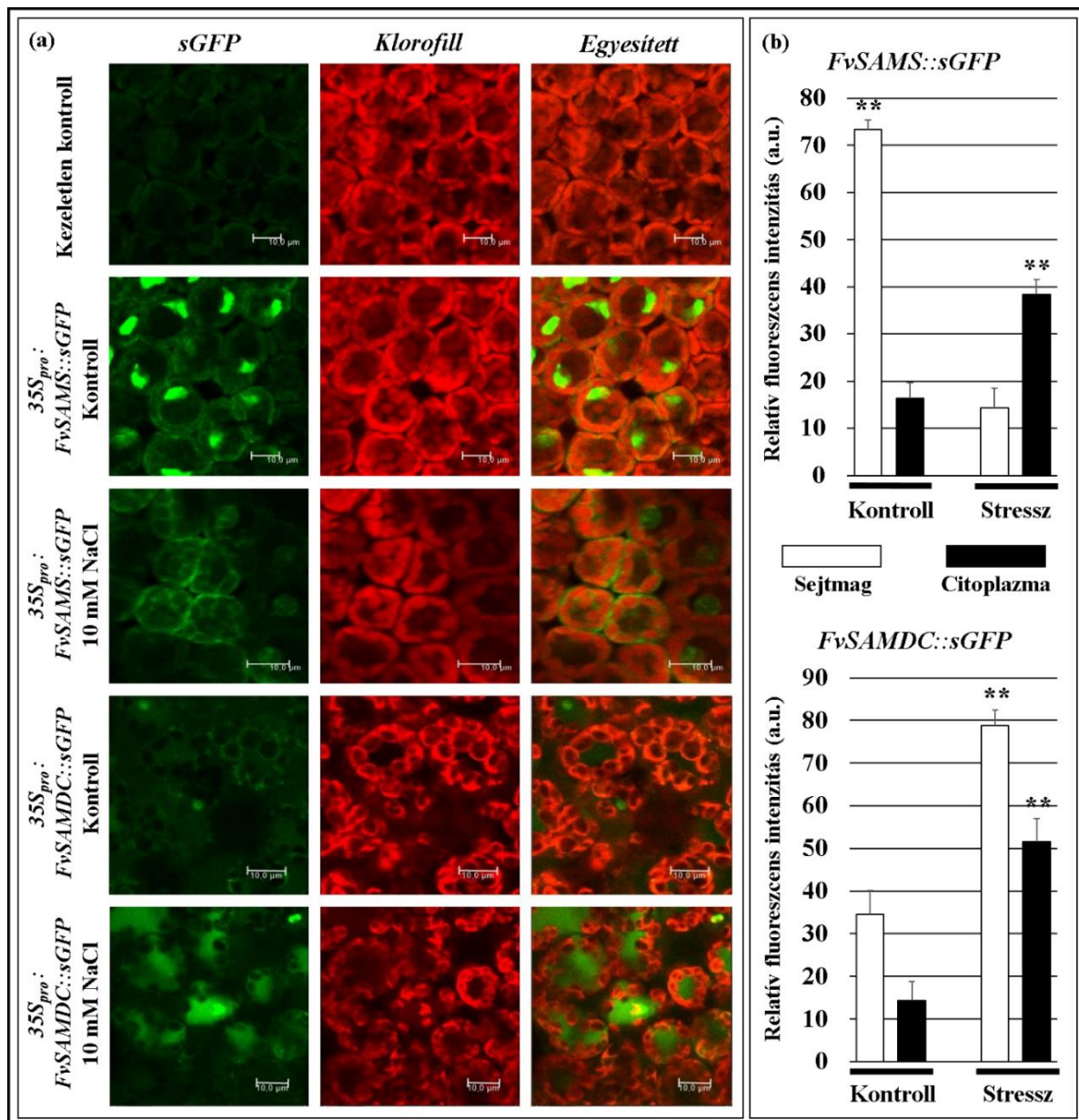
29. ábra: A *FvSAMS::sGFP* jel az epidermális sejtek sejtmagvacskájában tranziens expresszióval vizsgálva (a). A *FvSAMS::sGFP* sejtmagvacska lokalizációja a stabil transzformánsok oszlopos parenchima sejtjeiben 3 dimenzióban (3D) szemléltetve. Az A-A' és a B-B' képek ugyanarról a sejtmagról készültek (b). Az ábrán fehér nyilakkal jelöltük a *FvSAMS::sGFP* sejtmagvacska lokalizációját. A vonal 10 μm-t jelöl.

A stabil transzformánsokban is vizsgáltuk a *FvSAMS::sGFP* és a *FvSAMDC::sGFP* fúziós fehérjék lokalizációját kontroll körülmények között és sóstressz hatására (30. / a ábra). A tranziens expressziós vizsgálatokhoz hasonlóan a *FvSAMS::sGFP* sejtmagi, sejtmagvacska és nem homogén citoplazmás, míg a *FvSAMDC::sGFP* sejtmagi és homogén citoplazmás lokalizációt mutatott. A SAMS-t citoplazmás lokalizációjú enzimeként jellemzik a növényekben (Schröder et al., 1997; Ravanel et al., 1998; Hanson és Roje, 2001), de újabb kutatások szerint a patkány esetében, már sejtmagi és citoplazmás lokalizációról számolnak be (Reytor et al., 2009). A vizsgált metionin adenzil transferáz (MAT=SAMS) I/III izoenzimek a legtöbb patkányszövetben mind sejtmagi, mind citoplazmás lokalizációt mutattak. A sejtmagi lokalizációt főként a májon kívüli szövetekben figyelték meg és bizonyították, hogy a fehérje C terminális doménjének struktúrája határozza meg mind a sejtmagi, mind a citoplazmás lokalizációt. Reytor et al. (2009) azt is leírják, hogy az MAT1 sejtmagi felhalmozódása pozitív korrelációt mutatott a hiszton H3K27 trimetiléződésével, ami a véleményük szerint gátolhatja a transzkripciót.

A 30. /a ábrán látható, hogy a kontroll körülmények között és a sóstressz esetén is a *FvSAMDC::sGFP* gyenge sejtmagi és homogén citoplazmás eloszlást mutat. A korábbi tanulmányokban a SAMDC enzim kloroplasztisz, mitokondriális és citoplazmás aktivitásról számolnak be növényekben (Yamanoha és Cohen, 1985; Torrigiani et al., 1986) és citoplazmás lokalizációról emlősökben (Gritli-Linde et al., 1995). Mivel nem detektáltunk sem kloroplasztisz,

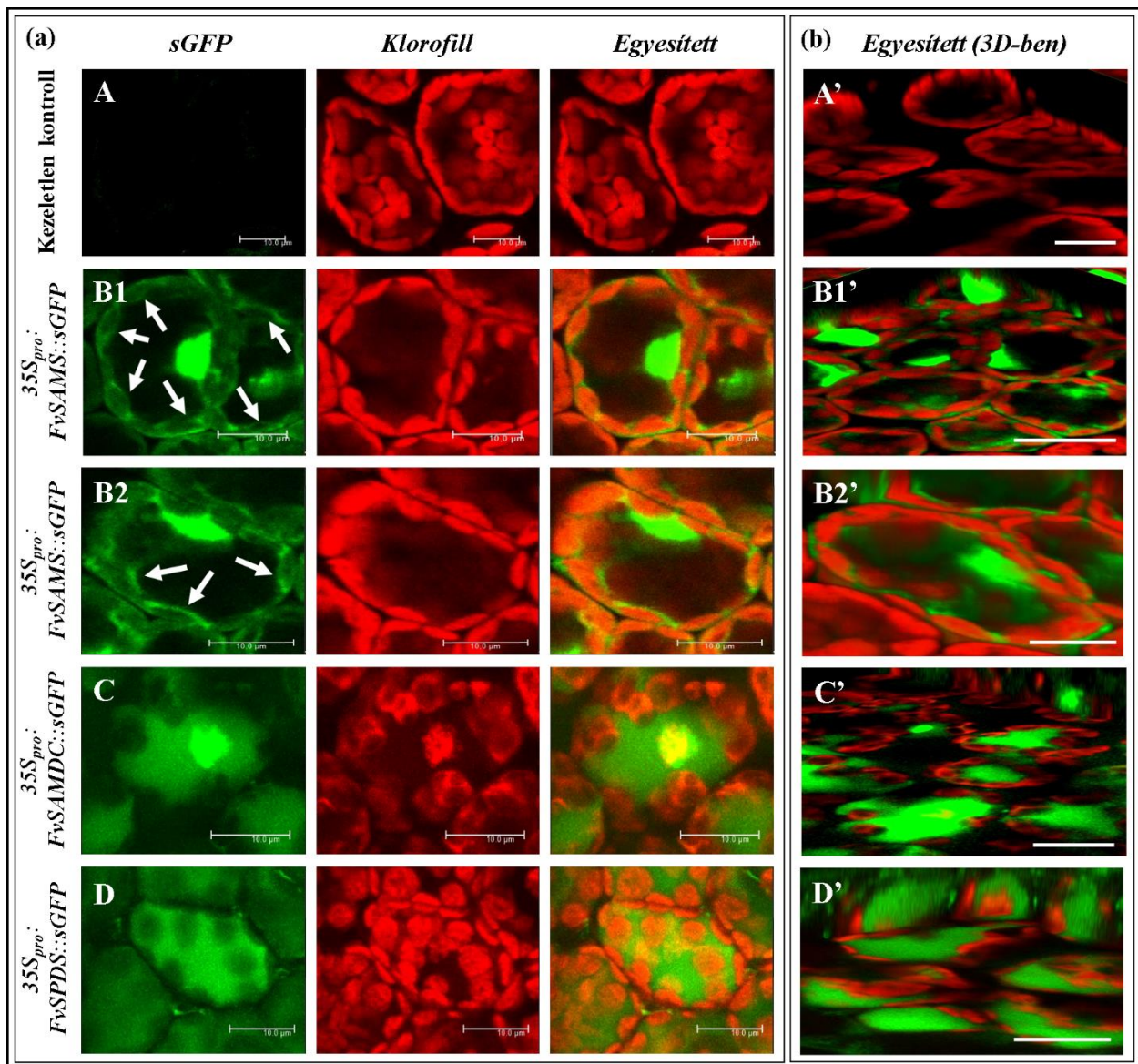
sem mitokondriális sGFP jelet, ezért a FvSAMDC aminosav szekvenciát TargetP 1.1 alkalmazással vizsgáltuk. A szoftver prediktálása alapján 7% valószínűséggel kloroplasztisz, 9%-kal mitokondriális és 80%, hogy 'egyéb' lokalizációjú. Mivel SAMDC inaktív proenzimként szintetizálódik és autokatalízissal aktiválódik, továbbá a *FvSAMDC::sGFP* fúziós fehérjét random módon több tucat preparátumból is csak néhány alkalommal sikerült megfigyelnünk, ezért azt feltételezzük, hogy ezt a jelenséget a fehérje rövid félélet ideje (Pegg et al., 1986), illetve az enzim szigorú transzlációs és/vagy poszttranszlációs szabályozása okozhatja. Korábbi kutatások már bizonyították, hogy a SAMDC szigorúan szabályozott már transzkripciós és poszttranszkripciós szinten is (Hu et al., 2005).

A stabil transzformánsokban megfigyeltük, hogy a *FvSAMS::sGFP* sejtmagi szubcelluláris lokalizációja a citoplazma irányába tolódik el sóstressz hatására, míg a *FvSAMDC::sGFP* fehérje mennyisége sóstressz esetén egyenes arányban nő mindkét (sejtmag, citoplazma) sejtkompartimentben, ezért meghatároztuk a sGFP relatív fluoreszcens intenzitását (**30. / b ábra**). Ezen az ábrán számszerűsítve látható, hogy a *FvSAMS::sGFP* kontroll körülmények között intenzívebb sejtmagi és sóstressz hatására erősebb citoplazmás jelet generál, míg a *FvSAMDC::sGFP* intenzitása sóstressz esetén egyenes arányban fokozódik mind a sejtmagban, mind a citoplazmában a kontroll körülmények között mért intenzitáshoz képest.



30. ábra: A *FvSAMS::sGFP* és a *FvSAMDC::sGFP* expressziós mintázata a stabil transzformánsok oszlopos parenchima sejtjeiben kontroll körülmények között és 10 mM NaCl stressz hatására. A vonal 10 μ m-t jelöl (a). A *FvSAMS::sGFP* és a *FvSAMDC::sGFP* fúziós fehérjék relatív fluoreszcens intenzitása a sejtmagban és a citoplazmában kontroll körülmények között és sóstressz hatására. $SD \pm$, $n=10$ ($P < 0,001$), a ** a kontrollhoz viszonyítva (b).

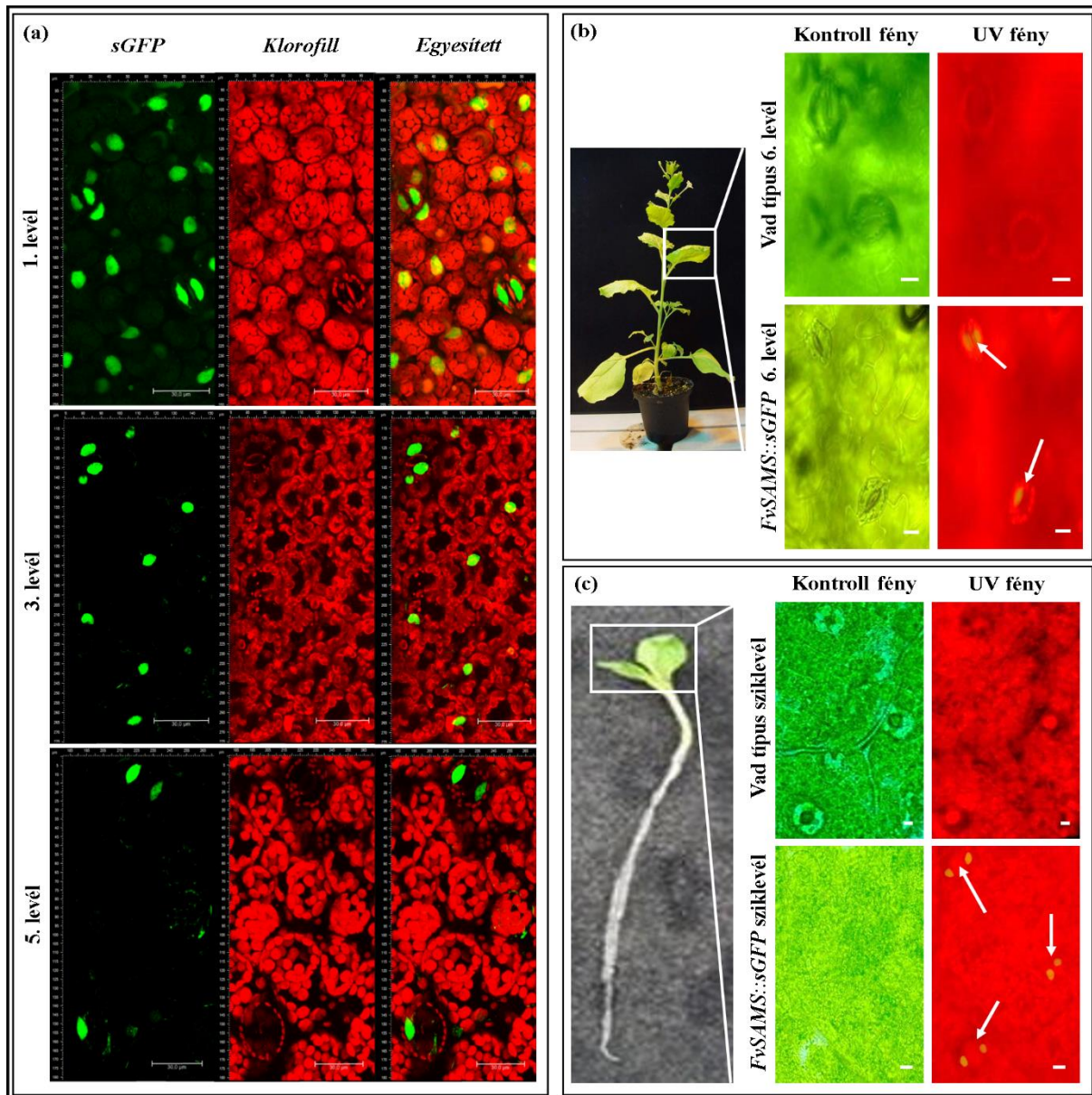
Korábban már említettük, hogy a *FvSAMS::sGFP* a *FvSAMDC::sGFP*-vel ellentétben nem homogén citoplazmás eloszlást mutat, hanem a citoplazma legkülsőbb régiójában a plazmalemma és a kloroplaszt plazmamembrán környékén lokalizálódik. Ezt jól szemlélteti a **31. / a ábra**, amely a *FvSAMS::sGFP* és a *FvSAMDC::sGFP* valamint *FvSPDS::sGFP* (csak citoplazmás lokalizációjú, nem publikált saját adat) fúziós fehérjék közötti lokalizációbeli különbségeket szemlélteti. A **31. / b ábrán** a **31. / a ábra** 2 dimenziós képei láthatóak 3 dimenzióban, ezáltal a *sGFP* lokalizációbeli különbsége még jobban megfigyelhető.



31. ábra: A *FvSAMS::sGFP*, a *FvSAMDC::sGFP* és a *FvSPDS::sGFP* különböző citoplazmás lokalizációja az oszlopos parenchyma sejtekben (A-D). A vonal 10 µm-t jelöl (a). A *FvSAMS::sGFP*, a *FvSAMDC::sGFP* és a *FvSPDS::sGFP* citoplazmás lokalizációja és a vad típusú oszlopos parenchyma sejtek 3D-ben (A'-D'). A vonal 20 µm-t jelöl (b). Az ábrán fehér nyilakkal jelöltük a *FvSAMS::sGFP* citoplazma plazmalemma környéki és kloroplaszt plazmamembrán lokalizációját.

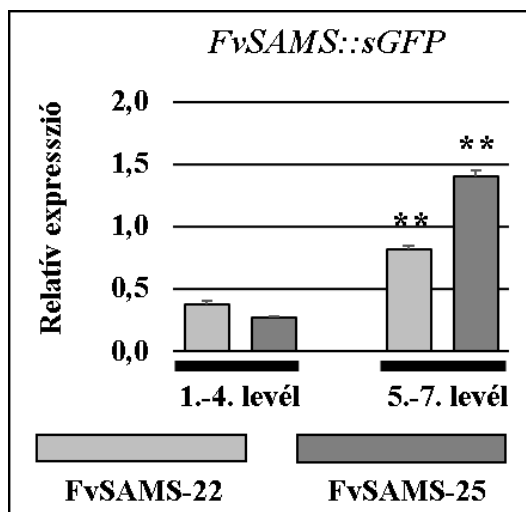
A *FvSAMS* vonalak esetében, arra a jelenségre is figyelmesek lettünk, hogy a *FvSAMS::sGFP* fúziós fehérjének a detektálható mennyisége változott a különböző levélszinteken. Felülről a legfelső levél szinte minden sejtjében észleltük a *FvSAMS::sGFP* fehérjét, lefelé haladva a levélszinteken egyre kevesebb sejtben láttuk a *FvSAMS::sGFP* kifejeződését, míg végül már csak a sztómák zárósejtjeiben kaptunk jelet (**32. / a ábra**). Emellett a *FvSAMS::sGFP* fúziós fehérjét nemcsak az idősebb levelek, hanem a magoncok szikleveleiben is csak a sztómák zárósejtjeiben detektáltuk (**32. / b, c ábra**), ezért azt feltételezzük, hogy a sztóma apparátus szabályozásában, azaz a sejtlégzésben, a fotoszintetikus gázcserében és a

párologtatásban is fontos szerepet tölt be a SAMS enzim. Hasonló jelenséget a FvSAMDC vonalak esetében nem figyeltünk meg.



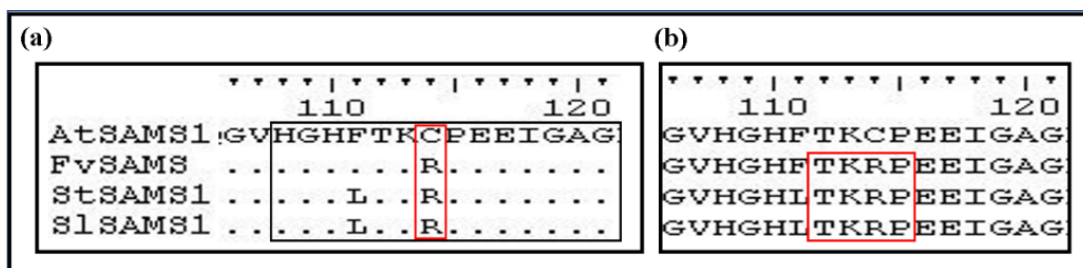
32. ábra: A *FvSAMS::sGFP* fehérje eltérő expressziója a különböző levélszinteken. A vonal 30 μm-t jelöl (a). A *FvSAMS* stabil transzformációkban a *FvSAMS::sGFP* kifejeződése az öregebb levél (b), illetve a csíranövény sztómák zárósejtjeiben (c). Az ábrán fehér nyilakkal jelöltük a *FvSAMS::sGFP* sejtmagi lokalizációját a sztómák zárósejtjeiben. A vonal 10 μm-t jelöl.

Az idősebb levelekben a csökkent *FvSAMS::sGFP* fúziós fehérje jel megértéséhez vizsgáltuk a *FvSAMS* transzgénikus vonalak felülről az 1.-4. és az 5.-7. levélszintek *FvSAMS::sGFP* mRNS mennyiségét. Annak ellenére, hogy a felsőbb levélszinteken több sejtben detektáltuk a *FvSAMS::sGFP*-t, mint az alsóbb levélszinteken, a mRNS mennyiségben fordított eredményt kaptunk, vagyis az alsóbb levélszinteken ~2-5-ször nagyobb mennyiségű mRNS-t detektáltunk (33. ábra).



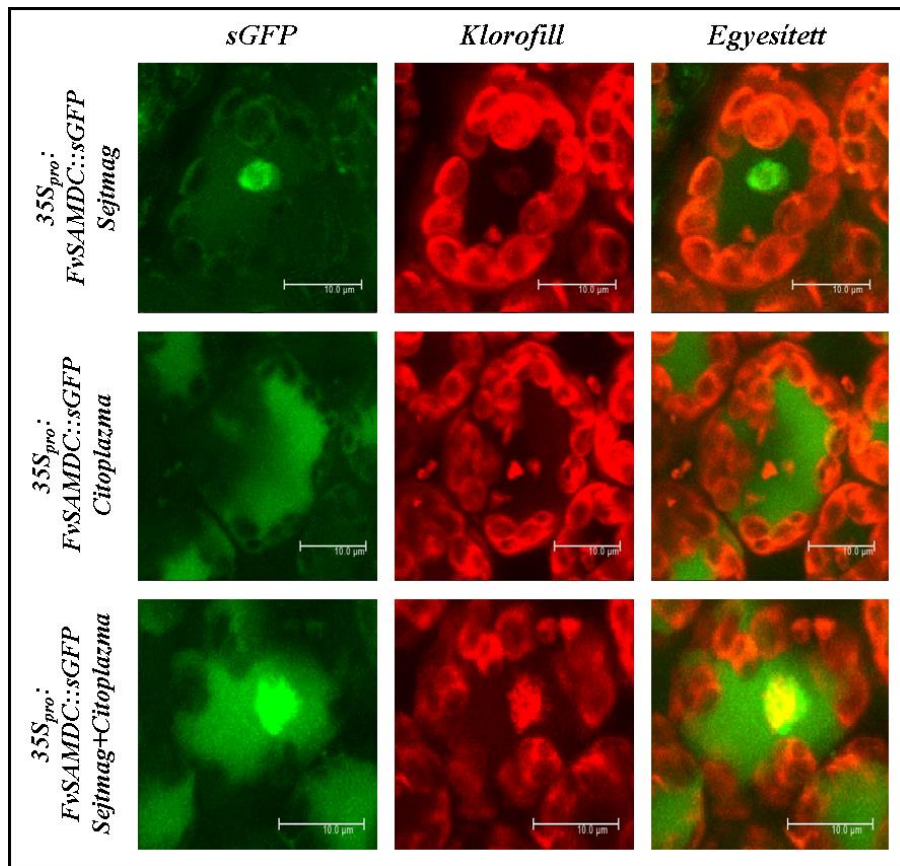
33. ábra: A *FvSAMS::sGFP* relatív expresziója az 1.-4. és az 5.-7. levélszinteken. $SD\pm$, $n=4$ ($P<0,001$), a ** az 1.-4. levelekhez viszonyítva.

Hasonló jelenséget figyeltek meg *AtSAMS1*-et túltermelő transzgenikus *Nicotiana tabacum* növényekben Boerjan et al. (1994), ugyanis a levélszinteken felülről lefelé haladva növekedett az *AtSAMS1* mRNS mennyisége, de az *AtSAMS1* enzimaktivitása fordított korrelációban állt a mért mRNS mennyiségekkel. Később bizonyították, hogy az *AtSAMS1* mRNS mennyisége és az enzimaktivitása közötti fordított korrelációhoz az *AtSAMS1* nitrogénoxid (NO) indukált gátlásának van köze, amit cisztein-114 (Cys-114) aminosav S-nitrolizációjával magyaráztak. Ez a cisztein hiányzik az *AtSAMS2*-ben és az *AtSAMS3*-ban. Az *AtSAMS1* bioinformatikai elemzése azt mutatta, hogy a Cys-114-et a S-nitrozilációt elősegítő aminosavak határolják és a S-nitrozoglutation (GSNO) gátló hatása drasztikusan csökkent, amikor a *AtSAMS1* Cys-114-et argininnel (R) helyettesítették. Mivel a SAMS katalizálja az etilén prekursor S-adenozil-L-metionin szintézisét, ezért a NO csökkentheti az etilén termelődését a növényekben, így ez az enzim jelentheti a kapcsolatot az etilén és a NO jelátviteli útvonalak között (Lindermayr et al., 2006). Mivel a korábbi tanulmányokban (Gong et al., 2014; Kim et al., 2015) és az általunk vizsgált *FvSAMS* aminosav szekvenciáján a Cys-114 helyén arginin (R) van (**34. / a ábra**), ezért feltételezésünk szerint a S-nitrolizáción kívül más translzációs és/vagy poszttranszlációs modifikáció is szerepet játszik a SAMS enzim gátlásában. Egy másik publikáció viszont a SAMS treonin-342 (Thr-342) Protein kináz C (PKC) általi foszforilációról számol be, ami gátolja a SAMS enzimaktivitást (Pajares et al., 1994), a *FvSAMS* esetében a prediktált foszforilálható treonin és szerin a Thr-112 és a Ser-271 (**34. / b ábra**, **36. / a ábra**), ami megfelel a PKC által preferált S/TXK/R (Woodgett et al., 1986) és a TXRX (Pajares et al., 1994) (*FvSAMS* esetében TKRP és SGK) felismerő szekvenciáknak, ezért lehetséges, hogy a Thr-112 és a Ser-271 foszforilációjának szerepe van a *FvSAMS* enzimaktivitásának PKC általi gátlásában.



34. ábra: Az *AtSAMS1* (NP_171751.1), a *FvSAMS* (XP_004288342.1), a *StSAMS1* (NP_001275609.1), a *SlSAMS1* (NP_001234425.1) S-nitrolizációs régiója (fekete téglalap) (Lindermayr et al., 2006 alapján) és az S-nitrolizációhoz szükséges ciszten hiánya az általunk vizsgált *FvSAMS*-ben, a Gong et al. (2014) által publikált *SlSAMS1*-ben, a Kim et al. (2015) által publikált *StSAMS1*-ben (piros téglalap). A pontok az *AtSAMS1* szekvenciával való egyezést jelölik (a). A prediktált Thr-112 foszforilációs hely és a protein kináz C lehetséges felismerő szekvenciája (piros téglalap) (b).

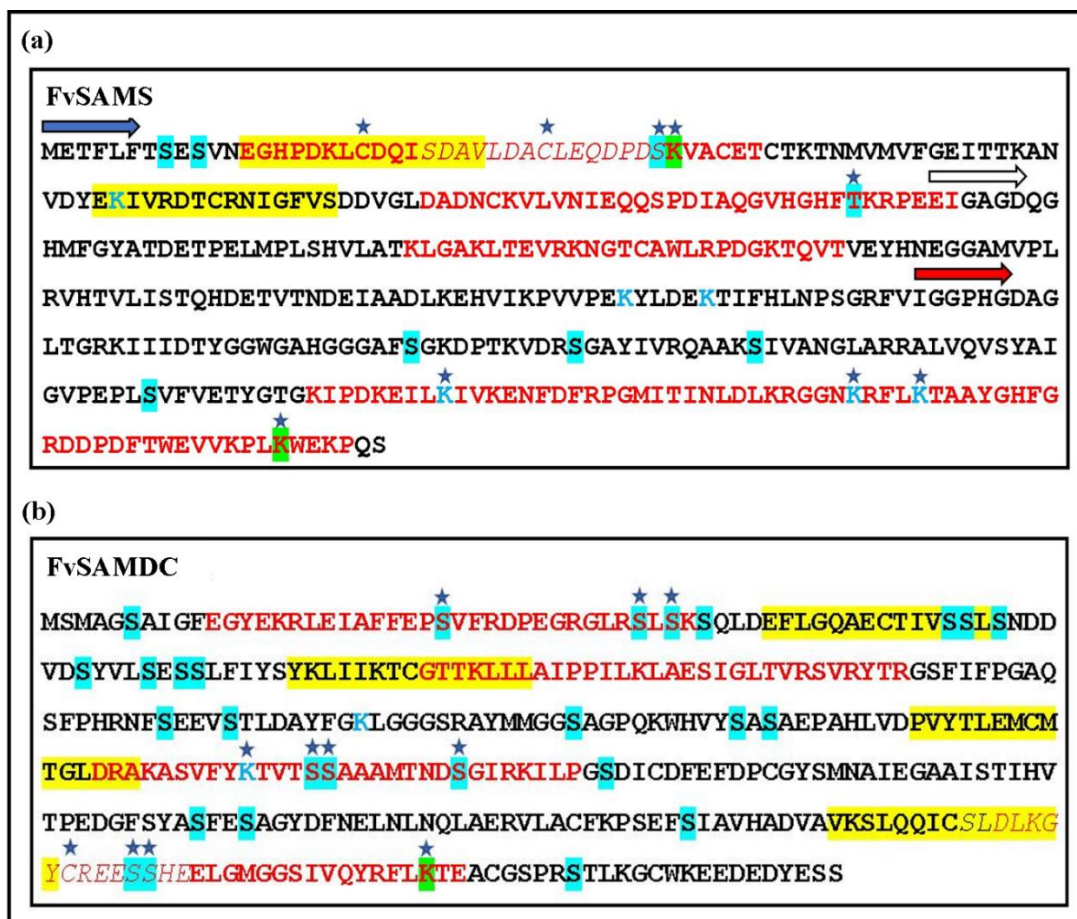
A *FvSAMDC::sGFP* esetében felfigyeltünk arra is, hogy egyidejűleg mutatott külön sejtmagi, külön citoplazmás és külön sejtmagi-citoplazmás lokalizációt (**35. ábra**). Mivel a *FvSAMDC::sGFP* külön-külön és együtt is adott sejtmagi és citoplazmás jelet, ezért feltételezésünk szerint ez jelentheti a SAMDC proenzim eltérő autokatalitikus aktiválódását a különböző sejtkompartmentekben, illetve feltételezheti az enzim egyirányú mozgását is, azonban ennek a mozgásnak az irányát citoplazma→sejtmag vagy sejtmag→citoplazma nem sikerült azonosítani. A *FvSAMDC::sGFP* duális lokalizációját támaszthatja alá Belda-Palazón et al. (2012) tanulmánya is, amelyben leírják, hogy a spermidin szintáz sejtmagi és citoplazmás, míg a spermin szintáz citoplazmás lokalizációt mutatott. Belda-Palazón et al. (2012) megfigyelték azt is, hogy exogén spermidin szintáz jelenlétében a spermin szintáz citoplazmás lokalizációja a sejtmag felé tolódik, ami a spermidin és a spermin szintézisének bonyolult és komplex folyamatára utal. Mivel a SAMDC termeli a dcSAM-ot, ami mind a spermidin szintáz, mind a spermin szintáz számára szubsztrátként szolgál, azaz biztosítja az aminopropil csoportot, így a SAMDC inaktív formában történő szintézise, a szigorú transzkripciós és transzlációs szabályozása, valamint a rövid félélet ideje magyarázatot adhat a duális lokalizációra a folyamat komplexitása miatt.



35. ábra: A *FvSAMDC::sGFP* különböző sejt-kompartmentbeli lokalizációja az oszlopos parenchyma sejtekben. A vonal 10 µm-t jelöl.

A detektált *FvSAMS::sGFP* sejtmagi, sejtmagvacska, citoplazma plazmalemma környéki és kloroplaszt plazmamembrán, valamint a *FvSAMDC::sGFP* sejtmagi és citoplazmás lokalizációjának aminosav szintű igazolásához vizsgáltuk a szekvenciákat különböző bioinformatikai alkalmazásokkal. A bioinformatikai elemzést a TargetP 1.1 (tranzit peptid meghatározása) a cNLS Mapper 1.0 (nukleáris lokalizációs szignálok /NLS/ azonosítása), a NetNES 1.1 (nukleáris export szignálok /NES/ azonosítása), a PHOSIDA (foszforilációs-, acetilációs- és SUMOilációs helyek azonosítása), GPS-SNO 1.0 (S-nitrolizációs helyek azonosítása) és a NOD (Nukleoláris lokalizációs szekvenciák azonosítása) alkalmazásokkal végeztük (**36. ábra**). A TargetP 1.1 eredményét a Melléklet 10.16, a cNLS Mapper 1.0 eredményét a Melléklet 10.17, a NetNES 1.1 eredményét a Melléklet 10.18, a NOD eredményét Melléklet 10.19 és a GPS-SNO 1.0 eredményét a Melléklet 10.20 mutatja. Számos sejtmagi fehérje tartalmaz, mind NLS-eket, mind NES-eket, ezek a szignálok koordinálják a sejtmag-citoplazma közötti transzportot, mivel a *FvSAMS* és a *FvSAMDC* szekvenciák is tartalmaznak bipartit (kétrétű) nukleáris lokalizációs- és nukleáris export szignálokat, ezért a prediktált adatok alátámasztják mindkét enzim sejtmagi és citoplazmás lokalizációját. Reytor et al. (2009) szerint a *SAMS* enzim szubcelluláris lokalizációját C-terminális doménjének struktúrája határozza meg, ennek alapján a *FvSAMS* enzim esetében a Lys-335, 360, 364 acetilációja és a Lys-387

SZUMOilációja szabályozhatja az enzim szubcelluláris lokalizációját. Ezt a hipotézist korábbi tanulmányok is alátámaszthatják, mivel a humán SAE (SUMO Activating Enzyme Subunit 1) enzim NLS-ének SZUMOilációja az enzim sejtmagi- (Truong et al., 2012), míg a humán RhoA GEF Net1A (RhoA guanine nucleotide exchange factor neuroepithelial transforming1A) NLS-ének acetilációja a citoplazmás felhalmozódást fokozza (Song et al., 2015). A SAMDC fehérje esetében nem áll rendelkezésünkre adat az enzim szubcelluláris lokalizációját meghatározó poszttranszlációs módosításról, ezért a prediktált adatok alapján a Ser-25, 37, 39, 203, 204, 212, 316, 317 foszforilációja, a Lys-199 acetilációja, a Cys-312 S-nitrozilációja és a Lys-334 SZUMOilációja jöhet számításba a poszttranszlációs módosítások közül, mivel már számos korábbi tanulmány számolt be arról, hogy a NLS-ek foszforilációja, acetilációja, S-nitrozilációja, SZUMOilációja szabályozhatja az enzimek szubcelluláris lokalizációját (Harreman et al., 2004; Hara et al., 2005; Truong et al., 2012; Song et al., 2015).



36. ábra: A FvSAMS (a) és a FvSAMDC (b) aminosav szekvenciák bioinformatikai elemzése a cNLS Mapper 1.0, a NetNES 1.1, a NOD, a PHOSIDA és a GPS-SNO 1.0 alkalmazások felhasználásával. Jelölések: a prediktált bipartit NLS (piros betű), a prediktált S-nitrozilációs hely (sárga kiemelés, ahol átfedés van dőlt, nem félkövér betű), a prediktált foszforilációs hely (türkizzel kiemelve), a prediktált acetilációs hely (kék betű), a prediktált SZUMOilációs hely (zölddel kiemelve), a prediktált NLS-ek és a poszttranszlációs módosító helyek egybeesése (csillag). A FvSAMS esetében a N-terminális domént (kék nyíl), Centrális domént (fehér nyíl) és a C-terminális domént (piros nyíl) jelöli az UniProtKB - Q96551 alapján.

5.8 Új tudományos eredmények

1. Bizonyítottuk, hogy a *FaSAMS* és a *FaSAMDC* változó expressziót mutat a *Fragaria x annanassa* Duch. cv. Asia szamóca gyümölcs érése során.
2. Bizonyítottuk, hogy a *FvSAMS* és a *FvSAMDC* túltermeltetése fokozta a transzgénikus *Nicotiana benthamiana* vonalak sótoleranciáját a vad típushoz képest.
3. A *FvSAMDC* vonalakban mért adatok alapján megállapítottuk, hogy a szabad poliamin szintek és a prolin tartalom, valamint az etilén mennyisége között pozitív-, míg a szabad poliamin szintek és a lignin tartalom között negatív korreláció van sóstressz hatására.
4. Az egy kísérleti rendszerben történő vizsgálat alapján mi írjuk le először, hogy a kontroll körülmények között mért prolin-, valamint a kontroll és sóstressz hatására mért lignin tartalom kivételével a *FvSAMDC* túltermeltetése kedvezőbben befolyásolta a transzgénikus vonalak növényélettani paramétereit kontroll körülmények és 10 mM NaCl stressz hatására is, mint a *FvSAMS* overexpressziója.
5. Növényekben mi írjuk le először, hogy a *FvSAMS::sGFP* sejtmagi, sejtmagvacskacitoplazma plazmalemma környéki és kloroplaszt plazmamembrán szubcelluláris lokalizációt mutat, ami arra utal, hogy a SAM számos bioszintézishez *in situ* termelődik (pl.: a genomi DNS, RNS, fehérjék metilálásához; a kloroplaszt DNS, RNS, RUBISCO enzim metilálásához; a lignin bioszintézishez és a riboszómák bioszintéziséhez).
6. Mi írjuk le először a *FvSAMDC::sGFP* sejtmagi lokalizációját.

6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Bizonyítottuk, hogy a *FaSAMS* és a *FaSAMD*C változó expressziót mutatott a számoça gyümölcs érése során, ami az érésben betöltött szerepét támasztja alá, továbbá a *FvSAMS* és a *FvSAMD*C túltermeltetése fokozta a transzgenikus vonalak sótoleranciáját is a vad típushoz képest, ami a sótolerancia kialakításában betöltött funkcióját bizonyítja. Feltehetően mind a *FvSAMS*, mind a *FvSAMD*C túltermeltetése csökkenti a Na⁺ toxicitását és fokozza a membránok stabilitását, mivel korábbi publikációkban leírják, hogy a poliaminok a pozitív töltésük miatt blokkolni tudják a kationcsatornákat. Feltehetően a csökkent H₂O₂ és O₂⁻ mennyiséget is a nagyobb mennyiségű poliaminok okozhatták közvetve a *FvSAMS* és a *FvSAMD*C túltermelő vonalakban, mivel korábbi irodalmi adatok alapján a poliaminok fokozzák az antioxidáns rendszer enzimeinek aktivitását. A *FvSAMD*C vonalakban mért adatok alapján úgy tűnik, hogy a szabad poliamin szintek és a prolin tartalom, valamint az etilén mennyisége között pozitív-, míg a szabad poliamin szintek és a lignin tartalom között negatív korreláció van sóstressz hatására. A méréseink alapján kontroll körülmények között mind a ‘SAM hiány’, mind a ‘SAM többlet’ fokozta a lignifikációt a transzgenikus vonalakban, azonban sóstressz hatására a ‘SAM hiány’ jelentős mértékben redukálta, míg a ‘SAM többlet’ jelentősen fokozta a lignin felhalmozódását, ami közvetlen módon növelhette a *FvSAMS* vonalak sóstressz elleni toleranciáját. Számos korábbi tanulmánnyal ellentétben az etilén és a poliamin bioszintézis nem volt antagonistá hatással egymásra az általunk vizsgált kísérleti rendszerben. Feltételezésünk szerint a nagyobb mértékű sótoleranciát a *FvSAMS* vonalakban az emelkedett össz szabad poliamin tartalom és a fokozott mennyiségű lignin, míg a *FvSAMD*C vonalak esetében a jelentős mértékben emelkedett össz szabad poliamin és a nagyobb etilén tartalom okozta. Ezt támaszthatja alá a 300 mM NaCl stressznek kitett levélkorongok esetében kapott relatív klorofill tartalom is, ugyanis a stresszt követő 24 óra elteltével a *FvSAMS* vonalakban a klorofill degradáció fele akkor volt, mint a *FvSAMD*C vonalakban, amit feltételezésünk szerint a *FvSAMS* vonalak fokozott lignin tartalmának mechanikai védelme okozta. Ezek az értékek a kezelést követő 48-, 72- és 96 óra elteltével kiegyenlítődtek, ami a *FvSAMD*C vonalak esetében feltételezésünk szerint a fokozott poliamin tartalommal volt összefüggésben. Összeségében megállapítható, hogy a kontroll körülmények között mért prolin és a kontroll és sóstressz hatására mért lignin tartalom kivételével, a *FvSAMD*C túltermeltetése kedvezőbben befolyásolta a transzgenikus vonalak élettani paramétereit a kontroll körülmények között és a sóstressz hatására is, mint a *FvSAMS* overexpressziója.

A *FvSAMS::sGFP* sejtmagi, sejtmagvacska, citoplazma plazmalemma környéki és kloroplaszt plazmamembrán szubcelluláris lokalizációja arra utal, hogy a SAM számos bioszintézishez *in situ* termelődik (pl.: a genomi DNS, RNS, fehérjék metilálásához; a kloroplaszt

DNS, RNS, RUBISCO enzim metilálásához; a lignin bioszintézishez és a riboszómák bioszintéziséhez).

A megfigyeléseink alapján csökkent a detektálható *FvSAMS::sGFP* mennyisége az alsóbb levélszinteken, ugyanakkor a *FvSAMS* mRNS mennyisége ~2-5-ször nagyobb volt az alsóbb levelekben, ezért bioinformatikai módszerekkel vizsgáltuk a FvSAMS poszttranszlációs módosításában szerepet játszó aminosav származékokat. Egy korábbi tanulmányban a SAMS enzim S-nitrolizáció általi gátlásáról számolnak be, de a FvSAMS aminosav szekvenciáján hiányzott a S-nitrolizációhoz szükséges cisztein-114, ezért feltételezésünk szerint a S-nitrolizáción kívül más transzlációs és/vagy poszttranszlációs modifikáció is szerepet játszik a SAMS enzim gátlásában. Egy másik publikáció alapján, a Thr-342 Protein kináz C (PKC) általi foszforilációja gátolja a SAMS enzimaktivitását, a FvSAMS esetében a prediktált foszforilálható treonin és szerin a Thr-112 és a Ser-271, ami megfelel a PKC által preferált S/TXK/R és a TXRX (FvSAMS esetében TKRP és SGK) felismerő szekvenciáknak, ezért feltételezésünk szerint a Thr-112 és a Ser-271 foszforilációjának szerepe lehet a FvSAMS enzimaktivitásának PKC általi gátlásában. Ennek bizonyításához olyan deléciós vektorkonstrukciókat kellene létrehozni, amik pontmutációt tartalmaznak a Thr-112 és a Ser-271 aminosav helyén, ezáltal aminosav váltást okoznak. Ezek specifikus primerek tervezésével megoldhatók, így protoplaszt rendszerben tranziens expresszióval és a foszforiláció indukálásával vizsgálható lenne, hogy valóban ezek az aminosav származékok játszanak-e szerepet a FvSAMS enzim poszttranszlációs gátlásában.

A *FvSAMS::sGFP* fúziós fehérjét az idősebb levelekben és a magoncok szikleveleiben is csak a sztómák zárósejtjeiben detektáltuk, ezért azt feltételezzük, hogy a SAMS enzim fontos szerepet tölt be a sztóma apparátus szabályozásában, azaz a sejtlégzésben, a fotoszintetikus gázcserében és a párologtatásban.

Korábbi tanulmányok alapján a SAMS enzim szubcelluláris lokalizációját C-terminális doménjének struktúrája határozza meg, a bioinformatikai elemzés alapján a FvSAMS enzim esetében a Lys-335, 360, 364 acetilációja és a Lys-387 SZUMOilációja játszhat szerepet az enzim szubcelluláris lokalizációjában. Ennek bizonyításához hasonló deléciós vektorkonstrukciókat kellene előállítani, mint a FvSAMS enzim gátlásában szerepet játszó aminosav származékok esetében, így vizsgálható lenne, hogy valóban ezek az aminosavak felelősek-e a FvSAMS enzim szubcelluláris lokalizációjában.

A *FvSAMDC::sGFP* esetében felfigyeltünk, hogy egyidejűleg mutatott külön sejtmagi, külön citoplazmás, külön sejtmagi és citoplazmás lokalizációt egyszerre. Mivel a *FvSAMDC::sGFP* külön-külön és együtt is mutatott sejtmagi és citoplazmás lokalizációt, ami jelentheti a SAMDC proenzim eltérő autokatalitikus aktiválódását a különböző sejtkompartmentekben, illetve az enzim egyirányú mozgását is feltételezheti, azonban ennek a

mozgásnak az irányát citoplazma→sejtmag vagy sejtmag→citoplazma nem sikerült azonosítani. A *FvSAMDC::sGFP* duális lokalizációját támaszthatja alá egy korábbi tanulmány is, amelyben leírják, hogy a spermidin szintáz sejtmagi és citoplazmás lokalizációt, míg a spermin szintáz citoplazmás lokalizációt mutatott. Ebben a tanulmányban azt is megfigyelték, hogy az exogén spermidin szintáz jelenlétében a spermin szintáz citoplazmás lokalizációja a sejtmag felé tolódott, ami a spermidin és a spermin szintézisének bonyolult és komplex folyamatára utal. Mivel a SAMDC termeli a dcSAM-ot, ami mind a spermidin szintáz, mind a spermin szintáz számára szubsztrátként szolgál, azaz biztosítja az aminopropil csoportot, így a SAMDC inaktív formában történő szintézise, a szigorú transzkripciós és translációs szabályozása, valamint a rövid félélet ideje magyarázatot adhat a duális lokalizációra a folyamat komplexitása miatt. Ennek a vizsgálata történhet protoplaszt rendszerben tranziens expresszióval, exogén spermidin és spermin adagolásával, ami magyarázatot adhat a *FvSAMDC* duális lokalizációjára, illetve indukálhatóságára vagy gátlására.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a *FaSAMS* és a *FaSAMDC* változó expressziót mutatott a számoça gyümölcs érése során és a *FvSAMS*, *FvSAMDC* enzimek túltermeltetése növelte a transzgénikus *Nicotiana benthamiana* vonalak sótoleranciáját a vad típushoz képest. Mind a *FvSAMS*, mind a *FvSAMDC* fokozta kontroll körülmények között és a sóstressz hatására is a transzgénikus vonalak biomassza produktumát, a növekedési erélyét és szárhosszát. Mindkét konstrukció fokozta a nagy dózisú sóstressznek kitett levélkorongok sejtjeinek ellenállóképességét, a sejt membránok integritását, amely az alacsonyabb ionvesztésben nyilvánult meg mind kontroll, mind sóstressz hatására. A *FvSAMS* és a *FvSAMDC* túltermeltetése is növelte a klorofill *a* és *b* tartalmat, redukálta a ROS-ok közül a H_2O_2 és a O_2^- mennyiségét sóstressz hatására. Nagyobb prolin felhalmozódás volt megfigyelhető sóstressz hatására mindkét konstrukció esetében, de a *FvSAMDC* vonalakban a különbség szignifikánsan nagyobb volt. Fokozott lignin tartalmat detektáltunk kontroll körülmények között mind a *FvSAMS*, mind a *FvSAMDC* vonalak esetében, míg sóstressz hatására már csak a *FvSAMS* vonalakban volt megfigyelhető nagyobb lignin felhalmozódás. Megállapítottuk, hogy sem a *FvSAMS*, sem a *FvSAMDC* túltermeltetése nem okozott kontroll körülmények között jelentős eltérést az etilén mennyiségében, de sóstressz hatásra a *FvSAMDC* vonalakban szignifikánsan nagyobb etilén mennyiségeket detektáltunk, míg a *FvSAMS* vonalak esetében a vad típusal megegyező mennyiségeket mértünk. Meghatároztuk a transzgénikus vonalak és a vad típus szabad poliamin tartalmát. Az össz szabad poliamin (PA) tartalom mind a *FvSAMS*, mind a *FvSAMDC* vonalak esetében szignifikánsan magasabb volt kontroll és sóstressz hatására is, de a *FvSAMDC* túltermeltetése jelentősebb mértékben növelte az össz szabad poliamin szintet, míg a “SAM többlet” a *FvSAMS* vonalakban kisebb mértékű felhalmozódást okozott. A *FvSAMS* túltermeltetése fokozta a *SAMS*, a *SAMDC*, a *SPDS*, *SPMS*, *SAHH*, *PMT* és a *CAD* gének relatív expresszióját, azonban a *ACS* expressziója csökkent értéket mutatott, míg a *FvSAMDC* túltermeltetése növelte a *SAMS*, *SAMDC*, *ACS*, *SPDS*, *SPMS*, *SAHH*, *PMT* és a *CAD* expresszióját sóstressz hatására.

A lézerletapogatású konfokális mikroszkóppal meghatároztuk a *FvSAMS::sGFP* és a *FvSAMDC::sGFP* lokalizációját tranziens expresszióval vizsgálva és a stabil transzformánsokban is. A *FvSAMS::sGFP* esetében sejtmagi, sejtmagvacska, citoplazma (plazmalemma környéki) és kloroplaszt plazmamembrán, míg a *FvSAMDC::sGFP* esetében sejtmagi és homogén citoplazmás eloszlást detektáltunk. Korábbi tanulmányokban a *SAMS* enzimet citoplazmás, míg a *SAMDC* enzimet mitokondriális-, kloroplasztisz- és citoplazmás lokalizációjuként írták le növényekben.

Megfigyeltük, hogy a *FvSAMDC::sGFP* esetében mind a sejtmagi, mind a citoplazmás jel arányosan fokozódott, míg a *FvSAMS::sGFP*-nél fordított arányban tolódott el a sejtmagi jel a citoplazma irányába sóstressz esetén.

A *FvSAMS::sGFP* sejtmagi, sejtmagvacska, citoplazma (plazmalemma környéki) és kloroplaszt plazmamembrán lokalizációja alapján azt feltételezzük, hogy a SAM számos biokémiai reakcióhoz *in situ* termelődik (például: a riboszóma és a lignin bioszintézishez; a DNS, a RNS és a fehérjék metilációjához a sejtmagban és a plasztidokban).

Megfigyeltük azt is a *FvSAMS::sGFP* esetében, hogy a fiatal aktívan osztódó sejtekben intenzívebb fehérje expressziót mutatott, míg a szenescencia előrehaladtával ez az expresszió csökkent, és végül már csak a sztómák zárósejtjeiben detektáltuk a sGFP jelet, ami feltételezésünk szerint a SAMS enzim sztóma apparátus szabályozásában betöltött szerepére utalhat. Korábbi tanulmányokhoz hasonlóan nagyobb *FvSAMS* expressziót detektáltunk az idősebb levelekben a csökkent fehérje expresszió ellenére, azonban a *FvSAMS* enzim aminosavszekvenciája nem tartalmazta a korábban leírt S-nitrolizációhoz szükséges ciszteint, ami fontos szerepet játszik a SAMS enzim gátlásában, ugyanakkor más tanulmány alapján a Thr-112 és a Ser-271 foszforilációja szerepet játszhat a SAMS enzim aktivitásának PKC általi gátlásában.

Korábbi tanulmány alapján a *FvSAMS::sGFP* enzim szubcelluláris lokalizációjában feltételezésünk szerint a C-terminális domén Lys-335, 360, 364 acetilációja és a Lys-387 SZUMOilációja játszhat szerepet. A SAMDC enzim szubcelluláris lokalizációját és regulációját meghatározó poszttranszlációs módosulásokról nem áll rendelkezésünkre adat, de a prediktált adatok alapján a szubcelluláris lokalizációjában a Ser-25, 37, 39, 203, 204, 212, 316, 317 foszforilációja, a Lys-199 acetilációja, a Cys-312 S-nitrozilációja és a Lys-334 SZUMOilációja is szerepet játszhat.

8. SUMMARY

In summary, it can be concluded that *FaSAMS* and *FaSAMDC* showed a various expression in the strawberry fruit ripening and the overproduction of *FvSAMS* and *FvSAMDC* increased the salt tolerance of transgenic *Nicotiana benthamiana* plants, which manifested itself in a higher than average stem length, growth vigour, biomass production as well as elevated levels of chlorophyll *a* and *b* contents, smaller amount of H₂O₂, O₂⁻ and lower rates of electrolyte leakage. Higher levels of proline accumulation could be observed in both transgenic lines particularly in the case of *FvSAMDC* lines grown in a medium supplemented with salt. The overexpression of *FvSAMS* and *FvSAMDC* resulted in increased lignification, but only the lignin content of *FvSAMS* lines rose significantly as a consequence of salinity stress. The ethylene release of *FvSAMS* and *FvSAMDC* lines was found to be similar in the control environment, but showed increased amounts in the salt stressed *FvSAMDC* in contrast to *FvSAMS* lines. The overexpression of *FvSAMDC* resulted in elevated levels of total polyamines, whereas the “SAM surplus” produced lower rates of polyamine accumulation in *FvSAMS*. It can be concluded that *FvSAMS* overproduction does not influence ethylene release but increases polyamine levels, while *FvSAMDC* overexpression up-regulates both ethylene and polyamine production under stress conditions. It follows therefore, that in contrast to several earlier studies no antagonistic effect between ethylene and polyamine biosynthesis was observed in our experimental system. Based on the data measured in the *FvSAMDC* lines there appears to be a positive correlation between the free polyamine levels and the proline content as well as the amount of ethylene, while there is a negative correlation between the free polyamine levels and the lignin content when the plants are exposed to salt stress. The overproduction of *FvSAMS* increased the relative expression rates of genes *SAMS*, *SAMDC*, *SPDS*, *SPMS*, *SAHH*, *PMT* and *CAD* and decreased those of *ACS* under stress condition. Furthermore, the overexpression of *FvSAMDC* increased the rate of expression of genes *SAMS*, *SAMDC*, *ACS*, *SPDS*, *SPMS*, *SAHH*, *PMT* and *CAD* in response to stress. The prolonged survival and increased salt tolerance of the *FvSAMDC* lines can be explained by the higher level of polyamines produced, while in the *FvSAMS* lines elevated lignin contents and high level of polyamines were among the contributing factors.

We determined the subcellular localization of *FvSAMS::sGFP* and *FvSAMDC::sGFP* fusion proteins. In the case of *FvSAMS::sGFP* nuclear, nucleolar, cytoplasmic (near to the plasmalemma) and plastid membrane, whereas in *FvSAMDC::sGFP* nuclear and homogeneous cytoplasmic localization of the two enzymes was detected. Therefore, SAM is assumed to be produced *in situ* for numerous biochemical reactions (e.g. ribosome biosynthesis, methylation of

DNA, RNA, proteins in nucleus and plastid; lignin biosynthesis). In addition, the nucleolar localization of the *FvSAMS::sGFP* was also observed, which was not reported in earlier studies.

Our results showed that in the stable transformants the subcellular localization of *FvSAMS::sGFP* protein was displaced from nucleus in the direction of the cytoplasm, while the quantity of *FvSAMDC::sGFP* protein showed a parallel increase in both cellular compartments (nucleus, cytoplasm) in response to salt stress.

High rates of *FvSAMS::sGFP* protein production could be observed in the young dividing cells followed by a gradual decrease in their numbers as senescence progressed until finally the signal could only be detected in the guard cells of stomata, which may highlight the role of SAMS enzyme in the regulation of stomata, respiratory and photosynthetic gas exchange as well as evaporation. Similarly to earlier studies, higher *FvSAMS* transcription rates were measured in the older leaves in spite of the lower levels of detectable *FvSAMS::sGFP* protein, although the amino acid sequence of the enzyme examined contained no cysteine residue required for S-nitrosylation, which plays a crucial role in the inhibition of SAMS enzyme. However, according to other studies the phosphorylation of Thr-112 and Ser-271 can possibly play a role in the inhibition of the enzyme SAMS through PKC.

We assume that the subcellular localization of the enzyme FvSAMS can be regulated by the acetylation of Lys-335, 360, 364 and the SUMOylation of the Lys-387 in the C-terminal domain. No data is available concerning the post-translational modifications determining the subcellular localization of the SAMDC. However, the possible post-translational modifications based on the predicted data include the phosphorylation of Ser-25, 37, 39, 203, 204, 212, 316, 317, the acetylation of Lys-199, the S-nitrosylation of Cys-312 and the SUMOylation of Lys-334.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- ABELES F. B., MORGAN P. W. AND SALTVEIT M. E. JR. (1992). Ethylene in Plant Biology. San Diego, CA: Academic Press.
- ÁBRAHÁM E., HOURTON-CABASSA C., ERDEI L. AND SZABADOS L. (2010). Methods for determination of proline plants. R. Sunkar (ed.), Plant Stress Tolerance, Methods in Molecular Biology, 639: 317-331.
- 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.
- 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.
- 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. Environ Exp Bot Environmental and Experimental Botany, 66:409–417.
- ALBACETE A., MARTINEZ-ANDUJAR C., GHANEM M. E., ACOSTA M., SANCHEZ-BRAVO J., ASINS M. J., CUARTERO J., LUTTS S., DODD I. C. AND PÉREZ-ALFOCEA F. (2009). Rootstock-mediated changes in xylem ionic and hormonal status are correlated with delayed leaf senescence, and increased leaf area and crop productivity in salinized tomato. Plant Cell and Environment, 32: 928–938.
- ALCÁZAR R., ALTABELLA T., MARCO F., BORTOLOTTI C., REYMOND M., KONCZ C., CARRASCO P. AND TIBURCIO A. F. (2010). Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. Planta, 231 (6): 1237-1249.
- 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.
- ARNADÓTTIR J. AND CHALFIE M. (2010). Eukaryotic mechanosensitive channels. Annual Review Biophysics, 39: 111–137.
- AZAIZEH H. AND STEUDLE E. (1991). Effects of salinity on water transport of excised maize (*Zea mays* L.) roots. Plant Physiology, 97: 1136-1145.

- BAGNI N. AND PISTOCCHI R. (1991). In: SLOCUM R. D., FLORES H. E., Eds. Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants: Uptake and transport of polyamine metabolism in plants. CRC Press, Boca Raton., pp: 105-118.
- 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.
- 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.
- 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.
- BENNETT E. M., EKSTROM J. L., PEGG A. E. AND EALICK S. E. (2002). Monomeric S-Adenosylmethionine decarboxylase from plants provides an alternative to putrescine stimulation. Biochemistry, 41: 14509-14517.
- BIASTOFF S., BRANDT W. AND DRÄGER B. (2009). Putrescine N-methyltransferase – The start for alkaloids. Phytochemistry, 70: 1708-1718.
- BISWAS M. S. AND MANO J. (2015). Lipid peroxide-derived short-chain carbonyls mediate H₂O₂-induced and NaCl-induced programmed cell death in plants. Plant Physiology, 168: 885–898.
- 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.
- BOSE J., BABOURINA O. AND RENGEL Z. (2011). Role of magnesium in alleviation of aluminium toxicity in plants. Journal of Experimental Botany, 62: 2251–2264.
- BOUCHEREAU A., AZIZ A., LARHER F. AND MARTIN-TANGUY J. (1999). Polyamines and environmental challenges: recent development, Plant Science, 140: 103-125.
- 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.
- 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.
- CANTONI G. L. (1975). Biological methylation: selected aspects. *Annual Review of Biochemistry*, 44: 435–451.
- CAO W. H., LIU J., HE X. J., MU R. L., ZHOU H. L., CHEN S. Y. AND ZHANG J. S. (2007). Modulation of ethylene responses affects plant salt-stress responses. *Plant Physiology*, 143: 707–719.
- CAO Y. R., CHEN H. W., LI Z. G., TAO J. J., MA B., ZHANG W. K., CHEN S. Y. AND ZHANG J. S. (2015). Tobacco ankyrin protein NEIP2 interacts with ethylene receptor NTHK1 and regulates plant growth and stress responses. *Plant and Cell Physiology*, 56: 803–818.
- 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.
- 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.
- CHENG L., ZOU Y., DING S., ZHANG J., YU X., CAO J. AND LU G. (2009). Polyamine accumulation in transgenic tomato enhances the tolerance to high temperature stress. *Journal of Integrative Plant Biology*, 51 (5): 489-499.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- DE ZELICOURT A., COLCOMBET J. AND HIRT H. (2016). The role of MAPK modules and ABA during abiotic stress signaling. *Trends in Plant Science*, 21: 677–685.
- 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.
- DOBROVINSKAYA O., MUÑIZ J. AND POTTOSIN I. (1999). Inhibition of vacuolar ion channels by polyamines. *The Journal of Membrane Biology*, 167: 127–140.
- ELLOUZI H., HAMED K. B., HERNANDEZ I., CELA J., MULLER M., MAGNE C., ABDELLY C. AND MUNNÉ-BOSCH S. (2014). A comparative study of the early osmotic, ionic, redox and hormonal signaling response in leaves and roots of two halophytes and a glycophyte to salinity. *Planta*, 240: 1299–1317.
- EMANUELSSON O., BRUNAK S., GUNNAR VON HEIJNE AND NIELSEN H. (2007). Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. *Nature Protocols*, 2: 953-971.
- ESPARTERO J., PINTOR-TORO J. A. AND PARDO J. M. (1994). Differential accumulation of S-adenosylmethionine synthetase transcripts in response to salt stress. *Plant Molecular Biology*, 25: 217–227.
- 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., HANFREY C., SCARAMAGLI S., TORRIGIANI P., BAGNI N., BURTIN D. AND MICHAEL A. J. (2001). Characterization of monocot and dicot plant S-adenosyl-l-methionine decarboxylase gene families including identification in the mRNA of a highly conserved pair of upstream overlapping open reading frames. *Biochemical Journal*, 353: 403-409.

- FUJII H. AND ZHU J. K. (2009). *Arabidopsis* mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 8380–8385.
- FUJII H., VERSLUES P. E. AND ZHU J. K. (2011). *Arabidopsis* decuple mutant reveals the importance of SnRK2 kinases in osmotic stress responses in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108: 1717–1722.
- GARRIDO F., ESTRELA S., ALVES C., SÁNCHEZ-PÉREZ G. F., SILLERO A. AND PAJARES M. A. (2011). Refolding and characterization of methionine adenosyltransferase from *Euglena gracilis*. *Protein Expression and Purification*, 79 (1): 128–136.
- GE C., CUI X., WANG Y., HU Y., FU Z., ZHANG D., CHENG Z. AND LI J. (2006). BUD2, encoding an S-adenosylmethionine decarboxylase, is required for *Arabidopsis* growth and development. *Cell Research*, 16: 446–456.
- GEIGER D., SCHERZER S., MUMM P., STANGE A., MARTEN I., BAUER H., ACHE P., MATSCHI S., LIESE A., AL-RASHEID K. A., ROMEIS T. AND HEDRICH R. (2009). Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 21425–21430.
- GHANEM M. E., ALBACETE A., MARTÍNEZ-ANDÚJAR C., ACOSTA M., ROMERO-ARANDA R., DODD I. C., LUTTS S. AND PÉREZ-ALFOCEA F. (2008). Hormonal changes during salinity-induced leaf senescence in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Experimental Botany*, 59: 3039–3050.
- 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.
- GONG B., XIU L., VANDENLANGENBERG K. M., DAN W., SHASHA S., MIN W., YAN L., FENGUJAN 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.
- GOWRI G., BUGOS R. C., CAMPBELL W. H., MAXWELL C. A. AND DIXON R. A. (1991). Stress responses in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). Molecular cloning and expression of S-

adenosyl-L-methionine: caffeic acid 3-O-methyltransferase, a key enzyme in lignin biosynthesis. *Plant Physiology*, 97: 7-14.

GRITLI-LINDE A., HOLM I. AND LINDE A. (1995). Localization of S-adenosylmethionine decarboxylase in murine tissues by immunohistochemistry. *European Journal of Oral Sciences*, 103: 133–140.

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.

GUO Y., HALFTER U., ISHITANI M. AND ZHU J. K. (2001). Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell*, 13: 1383–1400.

GUO Z., TAN J., ZHUO C., WANG C., XIANG B. AND WANG Z. (2014). Abscisic acid, H₂O₂ 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.

GUPTA B., GUPTA K., 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.

HAMILTON E. S., JENSEN G. S., MAKSAEV G., KATIMS A., SHERP A. M. AND HASWELL E. S. (2015). Mechanosensitive channel MSL8 regulates osmotic forces during pollen hydration and germination. *Science*, 350: 438–441.

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., FRANCESCHETTI M., MAYER M. J., ILLINGWORTH C. AND MICHAEL A. J. (2002). Abrogation of upstream open reading frame-mediated translational control of a plant S-adenosylmethionine decarboxylase results in polyamine disruption and growth perturbations. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 44131–44139.

HANSON A. D. AND ROJE S. (2001). One-carbon metabolism in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52: 119–137.

HANSON A. D., RIVOAL J., BURNET M. AND RATHINASABAPATHI B. (1994). Biosynthesis of quaternary ammonium and tertiary sulphonium compounds in response to

- water deficit. In: Smirnov N (ed) Environment and plant metabolism. Bios, Oxford, 189–198.
- HAO Y. J., ZHANG Z., KITASHIBA H., HONDA C., UBI B., KITA M. AND MORIGUCHI T. (2005). Molecular cloning and functional characterization of two apple S-adenosylmethionine decarboxylase genes and their different expression in fruit development, cell growth and stress responses. *Gene*, 350: 41–50.
- HARA M. R., AGRAWAL N., KIM S. F., CASCIO M. B., FUJIMURO M., OZEKI Y., TAKAHASHI M., CHEAH J. H., TANKOU S. K., HESTER L. D., FERRIS C. D., HAYWARD S. D., SNYDER S. H. AND SAWA A. (2005). S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nature Cell Biology*, 7: 665-674.
- HARREMAN M. T., KLINE T. M., MILFORD H. G., HARBEN M. B., HODE A. E. AND CORBETT A. H. (2004). Regulation of nuclear import by phosphorylation adjacent to nuclear localization signals. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 20613–20621.
- 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.
- HEDRICH R. (2012). Ion channels in plants. *Physiological Reviews*, 92: 1777–1811.
- HOBBS C. A., CLEVES M. A., MELNYK S., ZHAO W. AND JILL JAMES S. (2005). Congenital heart defects and abnormal maternal biomarkers of methionine and homocysteine metabolism. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1): 147-153
- HRABAK E. M., CHAN W. M., GRIBSKOV M., HARPER J. F., CHOI J. H., HALFORD N., KUDLA J., LUAN S., NIMMO H. G., SUSSMAN M. R., THOMAS M., WALKER-SIMMONS K., ZHU J. K. AND HARMON A. C. (2003). The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiology*, 132 (2): 666–680.
- HU W. W., GONG H. AND PUA E. C. (2005). The pivotal roles of plant S-adenosylmethionine decarboxylase 5' untranslated leader sequence in regulation of gene expression at the transcriptional and post-transcriptional levels. *Plant Physiology*, 138: 276–286.
- 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.

- HUA D., WANG C., HE J., LIAO H., DUAN Y., ZHU Z., GUO Y., CHEN Z. AND GONG Z. (2012). A plasma membrane receptor kinase, GHR1, mediates abscisic acid- and hydrogen peroxide-regulated stomatal movement in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 24: 2546–2561.
- 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.
- 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 sativa* lysine decarboxylase-like protein 1. *Molecules and Cells*, 34: 251-262.
- 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.
- 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.
- JIANG C., BELFIELD E. J., CAO Y., SMITH J. A. AND HARBERD N. P. (2013). An *Arabidopsis* soil-salinity-tolerance mutation confers ethylene-mediated enhancement of sodium/potassium homeostasis. *Plant Cell*, 25: 3535–3552.
- KAMAL A. H., CHO K., KIM D. E., UOZUMI N., CHUNG K. Y., LEE S. Y., CHOI J. S., CHO S. W., SHIN C. S. AND WOO S. H. (2012). Changes in physiology and protein abundance in salt-stressed wheat chloroplasts. *Molecular Biology Reports*, 39: 9059-9074.
- KAMIYOSHIHARA Y., IWATA M., FUKAYA T., TATSUKI M. AND MORI H. (2010). Turnover of LeACS2, a wound-inducible 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase in tomato, is regulated by phosphorylation/dephosphorylation. *Plant Journal*, 64: 140–150.
- KASUKABE Y., HE L. X., NADA K., MISAWA S., IHARA I. AND TACHIBANA S. (2006). Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and upregulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*, 45: 712-22.
- 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.

- KAVI KISHORE P. B., HONG Z., MIAO G. H., HU C. A. A. AND VERMA D. P. S. (1995). Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology*, 108 (4): 1387-1394.
- KAWALLECK P., PLESCH G., HAHLBROCK K. AND SOMSSICH I. (1992). Induction by fungal elicitor of S-adenosyl-L-methionine synthetase and S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase mRNAs in cultured cells and leaves of *Petroselinum crispum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 4713-4717.
- 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.
- KIM S. H., KIM S. H., PALANIYANDI S. A., YANG S. H. AND SUH J. W. (2015). Expression of potato S-adenosyl-L-methionine synthase (*SbSAMS*) gene altered developmental characteristics and stress responses in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 87: 84-91.
- 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.
- KUKREJA S., NANDWAL A., KUMAR N., SHARMA S., UNVI V. AND SHARMA P. (2005). Plant water status, H₂O₂ scavenging enzymes, ethylene evolution and membrane integrity of *Cicer arietinum* roots as affected by salinity. *Biologia Plantarum*, 49: 305–308.
- KUMAR D., YUSUF M. A., SINGH P., SARDAR M. AND SARIN N. B. (2014). Histochemical detection of superoxide and H₂O₂ accumulation in *Brassica juncea* seedlings. *Bio-protocol*, 4: 1108.
- KUMAR S. V. AND WIGGE P. A. (2010). H2A.Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in *Arabidopsis*. *Cell*, 140: 136–147.
- KUSANO T., BERBERICH T., TATEDA C AND TAKAHASHI Y. (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*, 228: 367–381.
- 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.
- LANGEBARTELS C., KERNER K., LEONARDI S., SCHRAUDNER M., TROST M., HELLER W. AND SANDERMANN H. JR. (1991). Biochemical plant responses to ozone: I.

- Differential induction of polyamine and ethylene biosynthesis of tobacco. *Plant Physiology*, 95: 882-889.
- LEGOCKA J. AND SOBIESZCZUK-NOWICKA E. (2012). Sorbitol and NaCl stresses affect free, microsomes-associated and thylakoid-associated polyamine content in *Zea mays* and *Phaseolus vulgaris*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34: 1145–1151.
- 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 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 X. (2011). Infiltration of *Nicotiana benthamiana* protocol for transient expression via *Agrobacterium*. *Bio-protocol*, 101: e95.
- LI Z. G., CHEN H. W., LI Q. T., TAO J. J., BIAN X. H., MA, B., ZHANG W. K., CHEN S. Y. AND ZHANG J. S. (2015). Three SAUR proteins SAUR76, SAUR77 and SAUR78 promote plant growth in *Arabidopsis*. *Scientific Reports*, 5: 12477.
- LINDERMAYR C., SAALBACH G., BAHNWEIG G. AND DURNER J. (2006). Differential inhibition of *Arabidopsis* methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. *Journal of Biological Chemistry*, 281: 4285–4291.
- 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. 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., YU B. J. AND LIU Y. L. (2006). Effects of spermidine and spermine levels on salt tolerance associated with tonoplast H⁺-ATPase and H⁺-PPase activities in barley roots. *Plant Growth Regulation*, 49: 119–126.
- LIU Y., AND ZHANG S. (2004). Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16: 3386–3399.
- LOENEN W. A. M. (2006). S-Adenosylmethionine: jack of all trades and master of everything? *Biochemical Society Transactions*, 34: 2.

- MA C., WANG Y., GUM D., NAN J., CHEN S. AND LI, H. (2017). Overexpression of S-Adenosyl-L-Methionine synthetase 2 from sugar beet M14 increased *Arabidopsis* tolerance to salt and oxidative stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 18: 847.
- MA H., SONG L., SHU Y., WANG S., NIU J., WANG Z., YU T., GU W. AND MA H. (2012). Comparative proteomic analysis of seedling leaves of different salt tolerant soybean genotypes. *Journal of Proteomics*, 75: 1529–1546.
- MA Y., DAI X., XU Y., LUO W., ZHENG X., ZENG D., PAN Y., LIN X., LIU H., ZHANG D., XIAO J., GUO X., XU S., NIU Y. JIN J., ZHANG H., XU X., LI L., WANG W., QIAN Q., GE S. AND CHONG K. (2015). COLD1 confers chilling tolerance in rice. *Cell*, 160: 1209–1221.
- MA Y., SZOSTKIEWICZ I., KORTE A., MOES D., YANG Y., CHRISTMANN A. AND GRILL E. (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science*, 324: 1064–1068.
- MAD ARIF S. A., TAYLOR M. A., GEORGE L. A., BUTLER A. R., BURCH L. R., DAVIES H. V., STARK M. J. R. AND KUMAR A. (1994). Characterisation of the S-adenosylmethionine decarboxylase (*SAMDC*) gene of potato. *Plant Molecular Biology*, 26: 327-338.
- MAHAJAN S. AND TUTEJA N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444: 139-158.
- 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.
- MARKHAM G. D. AND PAJARES M. A. (2009). Structure-function relationships in methionine-adenosyl-transferases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66 (4): 636–648.
- MARTIN-TANGUY J. (2001). Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Regulation*, 34: 135-48.
- MÄSER P., ECKELMAN B., VAIDYANATHAN R., HORIE T., FAIRBAIRN D.J., KUBO M., YAMAGAMI M., YAMAGUCHI K., NISHIMURA M., UOZUMI N., ROBERTSON W., SUSSMAN M. R. AND SCHROEDER J. I. (2002). Altered shoot/root Na⁺ distribution and bifurcating salt sensitivity in *Arabidopsis* by genetic disruption of the Na⁺ transporter AtHKT1. *FEBS Letters*, 531: 157–161.
- MATHUR M., SATPATHY M AND SACHAR R.C. (1992) Phytohormonal regulation of S-adenosylmethionine synthetase by gibberellic acid in wheat aleurones. *Biochimica et Biophysica*, 137: 338-348

- 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.
- 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.
- MELCHER K., NG L. M., ZHOU X. E., SOON F. F., XU Y., SUINO-POWELL K. M., PARK S. Y., WEINER J. J., FUJII H., CHINNUSAMY V., KOVACH A., LI J., WANG Y., Li J., PETERSON F. C., JENSEN D. R., YONG E. L., VOLKMAN B. F., CUTLER S. R., ZHU J. K. AND XU H. E. (2009). A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature*, 462: 602–608.
- MELLIDOU I., MOSCHOU P. N., IOANNIDIS N. E., PANKOU C., GÈMES K., VALASSAKIS C., ANDRONIS E. A., BERIS D., HARALAMPIDIS K., ROUSSIS A., KARAMANOLI A., MATSI T., KOTZABASIS K., CONSTANTINIDOU H. I. AND ROUBELAKIS-ANGELAKIS K. A. (2016). Silencing S-adenosyl-L-methionine decarboxylase (*SAMDC*) in *Nicotiana tabacum* points at a polyamine-dependent trade-off between growth and tolerance responses. *Frontiers of Plant Science*, 7: 379.
- MERALI S. AND CLARKSON A. B. JR. (2004). S-adenosylmethionine and *Pneumocystis*. *FEMS Microbiology Letters*, 237: 179–186.
- MIGNOLET-SPRUYT L., XU E., IDÄNHEIMO N., HOEBERICHTS F.A., MÜHLENBOCK P., BROSCHE M., VAN BREUSEGEM F. AND KANGASJÄRVI J. (2016). Spreading thenews: subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. *Journal of Experimental Botany*, 67: 3831–3844.
- MINOCHA R. , MAJUMDAR R. AND MINOCHA S. C. (2014). Polyamines and abiotic stress in plants: A complex relationship. *Frontiers in Plant Science*, 5: 175.
- 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.
- MIYAZAKI J. H. AND YANG S.F. (1987). The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine biosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 69 (2): 366-370.
- MONTASSER-KOUHSARI S., KEITH G. AND WEIL G. H. (1978). Methylation of yeast tRNA^{Phe} 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.
- MOSCHOU P. N., PASCHALIDIS K. A., DELIS I. D., ANDRIOPOULOU A. H., LAGIOTIS G. D., YAKOUMAKIS D. I. AND ROUBELAKIS-ANGELAKIS K. A. (2008b). Spermidine exodus and oxidation in the apoplast induced by abiotic stress is responsible for H₂O₂ 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. (2008a). Transgenic tobacco plants overexpressing polyamine oxidase are not able to cope with oxidative burst generated by abiotic factors. *Physiologia Plantarum*, 133: 140–156
- MOSTOFA M. G., YOSHIDA N. AND FUJITA M. (2014). Spermidine pretreatment enhances heat tolerance in rice seedlings through modulating antioxidative and glyoxalase systems. *Plant Growth Regulation*, 73: 31–44.
- MÜLLER M. AND MUNNÉ-BOSCH S. (2015). Ethylene response factors: a key regulatory hub in hormone and stress signaling. *Plant Physiology*, 169: 32-41.
- 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.
- NAMBEESAN S., MATTOO A. K. AND HANDA A. K. (2008). Polyamines and regulation of ripening and senescence. In *postharvest biology and technology of fruits, vegetables, and flowers* (Paliyath G., Murr D. P., Handa A. K., Lurie S. eds). USA: Wiley-Blackwell, pp. 319–340.
- 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: 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.
- OHTA M., GUO Y., HALFTER U. AND ZHU J. K. (2003). A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 11771–11776.

- PAJARES M. A., DURAN C., CORRALES F. AND MATO J. M. (1994). Protein kinase C phosphorylation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase: dissociation and production of an active monomer. *Biochemistry Journal*, 303: 949-955.
- PARK S.Y., FUNG P., NISHIMURA N., JENSEN D.R., FUJII H., ZHAO Y., LUMBA S., SANTIAGO J., RODRIGUES A., CHOW T.F., ALFRED S. E., BONETTA D., FINKELSTEIN R., PROVART N. J., DESVEAUX D., RODRIGUEZ P. L., McCOURT P., ZHU J. K., SCHROEDER J. I., VOLKMAN B. F. AND CUTLER S. R. (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science*, 324: 1068–1071.
- PEGG A.E. (1986). Recent advances in the biochemistry of polyamines of eukaryotes. *Biochemical Journal*, 234: 249–262.
- PELEMAN J., BOERJAN W., ENGLER G., SEURINCK J., BOTTERMAN J., ALLIOTTE T., VAN MONTAGU M. AND INZÉ D. (1989a). Strong cellular preference in the expression of a housekeeping gene of *Arabidopsis thaliana* encoding S-adenosylmethionine synthetase. *Plant Cell*, 1: 81–93.
- PELEMAN J., SAITO K., COTTYN B., ENGLER G., SEURINCK J, VAN MONTAGU M AND INZÉ D. (1989b). Structure and expression analyses of the S-adenosylmethionine gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 84: 359–369.
- 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: 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.
- 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.
- 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.

- PULLA R. K., KIM Y. J., PARVIN S., SHIM J. S., LEE J. H., KIM Y. J., IN J. G., SENTHIL K. S. AND YANG D. C. (2009). Isolation of S-adenosyl-L-methionine synthetase gene from *Panax ginseng* C.A. Meyer and analysis of its response to abiotic stresses. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 15: 267-275.
- QI Y. C., WANG F. F., ZHANG H. AND LIU W. Q. (2010). Overexpression of *Suaeda salsa* S-adenosylmethionine synthetase gene promotes salt tolerance in transgenic tobacco. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32: 263–269.
- QUAN R., LIN H., MENDOZA I., ZHANG Y., CAO W., YANG Y., SHANG M., CHEN S., PARDO J.M. AND GUO Y. (2007). SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect *Arabidopsis* shoots from salt stress. *Plant Cell*, 19: 1415–1431.
- RAI M. I., WANG X., THIBAUT D. M., KIM H. J., BOMBYK M. M., BINDER B. M., SHAKEEL S. N. AND SCHALLER G. E. (2015). The ARGOS gene family functions in a negative feedback loop to desensitize plants to ethylene. *BMC Plant Biology*, 15:157.
- 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.
- REYTOR E., PÉREZ-MIGUELSANZ J., ALVAREZ L., PÉREZ-SALA D. AND PAJARES M. A. (2009). Conformational signals in the C-terminal domain of methionine adenosyltransferase I/III determine its nucleocytoplasmic distribution. *FASEB Journal*, 23: 3347–3360.
- RIZHISKY L., HALLAK-HERR E., VAN BREUSEGEM F., RACHMILEVICH S., BARR J. E., RODERMEL S., INZÉ D. AND MITTLER R. (2002). Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. *Plant Journal*, 32: 329-342.
- 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: *Polyamines: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology (Alcazar, R. and Tiburcio, A. F. eds.), 1694, pp. 37-49. Springer Science+Business Media, LLC 2018.

- ROY M. AND WU R. (2002). Overexpression of S-adenosylmethionine decarboxylase gene in rice increases polyamine level and enhances sodium chloride-stress tolerance. *Plant Science*, 163: 987-992.
- 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⁺-ATPase in salt-tolerant and salt-sensitive rice cultivars. *Plant Science*, 168: 583-591.
- 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.
- SAIRAM R. K., VEERABHADRA K. R. AND SRIVASTAVA G.C. (2002). Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science*, 163: 1037-1046.
- SALEETHONG P., SANITCHON J., KNOG-NGERN K. AND THEERAKULPISUT P. (2011). Pretreatment with spermidine reverse inhibitory effects of salt stress in two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in their tolerance. *Asian 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.
- SANGWAN V., ORVAR B. L., BEYERLY J., HIRT H. AND DHINDSA R. S. (2002). Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *Plant Journal*, 31: 629–638.
- SATO F., HASHIMOTO T., HACHIYA A., TAMURA K., CHOI K., MORISHIGE T., FUJIMOTO H. AND YAMADA Y. (2001). Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 367–372.
- SCHARF K. D., BERBERICH T., EBERSBERGER I. AND NOVER L. (2012). The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: structure, function and evolution. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819: 104–119.
- SCHNEIDER C.A., RASBAND W.S. AND ELICEIRI K.W. (2012). "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis". *Nature Methods*, 9: 671-675.
- SCHRÖDER G., EICHEL J., BREINING S. AND SCHRÖDER J. (1997). Three differentially expressed S-adenosylmethionine synthetase from *Catharantus roseus*: molecular and functional characterization. *Plant Molecular Biology*, 33:211–222.

- 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.
- 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 W., KAZUYOSHI N. AND SHOJI T. (2000). Involvement of polyamines in the chilling tolerance of cucumber cultivars. *Plant Physiology*, 124 (1): 431–440.
- SHEN X., WANG Z., SONG X., XU J., JIANG C., ZHAO Y., MA C. AND ZHANG H. (2014). Transcriptomic profiling revealed an important role of cell wall remodeling and ethylene signaling pathway during salt acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 86: 303–317.
- SHEN Y. Y. AND ROSE J. K. C. (2014). ABA metabolism and signaling in fleshy fruits. In: *abscisic acid: metabolism, transport and signaling* (Zhang D. P., ed), pp. 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 (Na₂CO₃) stresses on *Puccinellia tenuiflora* (Griseb.) Scribn et Merr. plants. *Acta Botanica Sinica*, 3: 144–149.
- SHI H., QUINTERO F. J., PARDO J. M. AND ZHU J. K. (2002). The putative plasma membrane Na⁽⁺⁾ / H⁽⁺⁾ antiporter SOS1 controls long-distance Na⁽⁺⁾ transport in plants. *Plant Cell*, 14: 465–477.
- SHI J., FU X. Z., PENG T., HUANG X. S., FAN Q. J. AND LIU J. H. (2010). Spermine pretreatment confers dehydration tolerance of citrus in vitro plants via modulation of antioxidative capacity and stomatal response. *Tree Physiology*, 30: 914–922.
- 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.
- 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.
- SHIBLI R. A., KUSHAD M., YOUSEF G. G. AND LILA M. A. (2007). Physiological and biochemical responses of tomato microshoots to induced salinity stress with associated ethylene accumulation. *Plant Growth Regulation*, 51: 159–169.

- 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.
- 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. et al (2011) The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nature Genetics*, 43:109-116
- SICHHART Y. 1. AND DRÄGER B. (2013). Immunolocalisation of spermidine synthase in *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry*, 91:117-121.
- SIMON-SARKADIL., KOCSY G., VÁRHEGYI Á., GALIBA G. AND DE RONDE J. A. (2006). Effect of drought stress at supraoptimal temperature on polyamine concentrations in transgenic soybean with increased proline levels. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 61: 833-839.
- 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.
- SIRICHANDRA C., GU D., HU H. C., DAVANTUR M., LEE S., DJAOUI M., VALOT B., ZIVY M., LEUNG J., MERLOT S. AND KWAK, J. M. (2009). Phosphorylation of the *Arabidopsis* AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. *FEBS Letters*, 583: 2982–2986.
- SIRRI V., URCUQUI-INCHIMA S., ROUSSEL P. AND HERNANDEZ-VERDUN D. (2008). Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochemistry and Cell Biology* 129: 13–31.
- 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.
- SONG E. H., OH W., ULU A., CARR H. S., ZUO Y. AND FROST J. A. (2015). Acetylation of the RhoA GEF Net1A controls its subcellular localization and activity. *Journal of Cell Science*. 128: 913–922.
- SOON F. F., NG L. M., ZHOU X. E., WEST G. M., KOVACH A., TAN M. H., SUINOPOWELL K. M., HE Y., XU Y., CHALMERS M. J., BRUNZELLE J. S., ZHANG H., YANG H., JIANG H., LI J., YONG E. L., CUTLER S., ZHU J. K., GRIFFIN P. R., MELCHER K. AND XU H. E. (2012). Molecular mimicry regulates ABA signaling by SnRK2 kinases and PP2C phosphatases. *Science*, 335: 85–88.
- STANLEY B. A. (1995). Mammalian S-adenosylmethionine decarboxylase regulation and processing. In Casero R. ed., *Polyamines: Regulation and Molecular Interaction*, 3: 27–75.

- SUFRIN J. R., FINCKBEINER S. AND OLIVER C. M. (2009). Marine-derived metabolites of S-adenosylmethionine as templates for new anti-infectives. *Marine Drugs*, 7: 401-434.
- 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.
- SWARBRECK S. M., COLAC O, R. AND DAVIES J. M. (2013). Plant calcium-permeable channels. *Plant Physiology*, 163: 514–522.
- SZABADOS L. AND SAVOURÉ A. (2010). Proline: A multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15: 89–97.
- TABOR C. W. AND TABOR H. (1984). Methionine adenosyl transferase (Sadenosylmethioninesynthetase) and S-adenosylmethionine decarboxylase. *Advances in Enzymology*, 56:251–282.
- TAKUSAGAWA F., KAMITORI S., MISAKI S. AND MARKHAM G. D. (1996). Crystal structure of S-adenosylmethionine synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, 271 (1): 136–147.
- 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.
- TAO J. J., CHEN H. W., MA B., ZHANG W. K., CHEN S. Y. AND ZHANG J. S. (2015). The role of ethylene in plants under salinity stress. *Frontiers in Plant Science*, 6: 1-12.
- 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., FRACESCHETTI M., TASCIO G., CASADIO R. AND BAGNI N. (2007). Cloning, functional identification and structural modelling of *Vitis vinifera* S-adenosylmethionine decarboxylase. *Journal of Plant Physiology*, 164: 1208-1219.
- TATSUKI M. AND MORI H. (2001). Phosphorylation of tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, LE-ACS2, at the C-terminal region. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 28051–28057.
- THEWES S. (2014). Calcineurin-Crz1 signaling in lower eukaryotes. *Eukaryotic Cell*, 13: 694–705.
- THU-HANG P. L., BASSIE G., SAFWAT P., TRUNG-NIGHIA P., CHRISTOU P. AND CAPELL T. (2002). Expression of a heterologous S-adenosylmethionine decarboxylase cDNA in plants demonstrates that changes in S-adenosylmethionine decarboxylase activity determine levels of higher polyamines spermidine and spermine. *Plant Physiology*, 129: 1744-1754.

- TILAK P. AND RAYMOND M. A. (1996). Polyamines in normal and auxin-induced strawberry fruit development. *Physiologia Plantarum*, 98: 447-454.
- 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., SCARAMAGLI S. M. AND BIONDI S. (2005). Expression of an antisense *Datura stramonium* S-adenosylmethionine decarboxylase cDNA in tobacco: changes in enzyme activity, putrescine-spermidine ratio, rhizogenic potential, and response to methyl jasmonate. *Journal of Plant Physiology*, 162: 559-571.
- 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.
- TRAINOTTI L., SPINELLO R., PIOVAN A., SPOLAORE S. AND CASADORO G. (2001). β -Galactosidases with a lectin-like domain are expressed in strawberry. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1635–1645.
- TRUONG K., LEE T. D., LI B. AND CHEN Y. (2012). Sumoylation of SAE2 C terminus regulates SAE nuclear localization. *Journal of Biological Chemistry*, 287: 42611–42619.
- 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.
- VAN BREUSEGEM F., DEKEYSER R, GIELEN J, VAN MONTAGU M AND CAPLAN A. (1994). Characterization of a S-adenosylmethionine synthetase gene in rice. *Plant physiology*, 105 (4): 1463-1464.
- 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.
- VANDERSTRAETEN L. AND VAN DER STRAETEN D. (2017). Accumulation and transport of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: Current status, considerations for future research and agronomic applications. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1-18.

- VELIKOVA V., YORDANOV I. AND EDREVA A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant system in acid rain treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151: 59-66.
- 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.
- WAIE B. AND RAJAM M. V. (2003). Effect of increased polyamine biosynthesis on stress responses in transgenic tobacco by introduction of human S-adenosylmethionine gene. *Plant Science*, 164: 727–734.
- WALTER P. AND RON D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334: 1081–1086.
- 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.
- WEN X. P., BAN Y., OSHINOUE H., MATSUDA N., KITA M. AND MORIGUCHI T. (2011). Antisense inhibition of a spermidine synthase gene highlights the role of polyamine for stress alleviation in pear shoots subjected to salinity and cadmium. *Environmental and Experimental Botany*, 72: 157-166.
- WERETILNYK E. A., ALEXANDER K. J., DREBENSTEDT M., SNIDER J. D., SUMMERS P. S. AND MOFFATT B. A. (2001). Maintaining methylation activities during salt stress: the involvement of adenosine kinase. *Plant Physiology*, 125:856–865.
- WI S. J., KIM S. J., KIM W. T. AND PARK K. Y. (2014). Constitutive S-adenosylmethionine decarboxylase gene expression increases drought tolerance through inhibition of reactive oxygen species accumulation in *Arabidopsis*. *Planta*, 30: 30.
- WI S. J., KIM W. T. AND PARK K. Y. (2006). Overexpression of carnation S-adenosylmethionine decarboxylase gene generates a broadspectrum tolerance to abiotic stresses in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Report*, 25:1111–1121.
- WILLIAMS K. (1997). Interactions of polyamines with ion channels. *Biochemical Journal*, 325: 289–297.
- WOODGETT J. R., GOULD K. L. AND HUNTER T. (1986). Substrate specificity of protein kinase C. *European Journal of Biochemistry*, 161: 177-184.
- WOODSON W. R., PARK K. Y., DRORY A., LARSEN P. B. AND WANG H. (1992). Expression of ethylene biosynthetic pathway transcripts in senescing carnation flowers. *Plant Physiology*, 99: 526-532.

- 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.
- 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.
- YAMANOHA B. AND COHEN S. S. (1985). S-adenosylmethionine decarboxylase and spermidine synthase from Chinese cabbage. *Plant Physiology*, 78: 784-790.
- 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 S. F. AND HOFFMAN N. E. (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 35:155-189.
- YOON S., LEE W., KIM M., KIM T. D. AND RYU Y. (2012). Structural and functional characterization of S-adenosylmethionine (SAM) synthetase from *Pichia ciferrii*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*,35 (1-2): 173–181.
- YU Q., AN L. AND LI W. (2014). The CBL-CIPK network mediates different signaling pathways in plants. *Plant Cell Reports*, 33: 203–214.
- 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-stressevoked Ca²⁺ increases vital for osmosensing in *Arabidopsis*. *Nature*, 514: 367–371.
- ZAPATA P. J., SERRANO M., PRETEL M. T., AMOROS A. AND BOTELLA M. A. (2003). Changes in ethylene evolution and polyamine pro fi les 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.
- ZEPEDA-JAZO I., VELARDE-BUENDÍA A. M., DOBROVINSKAYA O. R., MUÑIZ J. AND POTTOSIN I. I. (2008). Polyamines as regulators of ionic transport in plants. *Current Topics in Plant Biology*, 9: 87–99.

- ZEPEDA-JAZO I., VELARDE-BUENDÍA A. M., ENRÍQUEZ-FIGUEROA R., JAYAKUMAR B., SHABALA S., MUÑIZ J., BOSE J, SHABALA S AND POTTOSIN I. I. (2011). Polyamines interact with hydroxyl radicals in activating Ca^{2+} and K^{+} transport across the root epidermal plasma membranes. *Plant Physiology*, 157: 2167–2180.
- 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 $\text{K}^{+}/\text{Na}^{+}$ homeostasis in barley seedlings by regulating root ion channel activities. *Plant Physiology*, 145: 1061–1072.
- ZHAO Y., DU H., WANG Z. AND HUANG B. (2010). Identification of proteins associated with water-deficit tolerance in C4 perennial grass species, *Cynodon dactylon* × *Cynodon transvaalensis* and *Cynodon dactylon*. *Physiologia Plantarum*, 141: 40–55.
- ZHENG L., YAO J., GAO F., CHEN L., ZHANG C., LIAN L., XIE L., WU Z. AND XIE L. (2016). The subcellular localization and functional analysis of Fibrillar2, a nucleolar protein in *Nicotiana benthamiana*. *Biomed Research International*, 2016: 2831287.
- ZHOU H., LIN H., CHEN S., BECKER K., YANG Y., ZHAO J., KUDLA J., SCHUMAKER K. S. AND GUO Y. (2014). Inhibition of the *Arabidopsis* salt overly sensitive pathway by 14-3-3 proteins. *Plant Cell*, 26: 1166–1182.
- 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.
- ZHU J. K. (2000). Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 124: 941–948.
- ZHU J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Biology*, 53: 247–273.
- ZHU J. K. (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 167: 313–324.
- ZHU M., SHABALA L., CUIN T. A., HUANG X., ZHOU M., MUNNS R. AND SHABALA S. (2016). Nax loci affect SOS1-like $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ exchanger expression and activity in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 67: 835–844.
- http1: http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_help.cgi
- http2: <http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-nod/index.jsp>
- http3: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>

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 fordulatszámom 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 fordulatszámom centrifugáljuk, az alulúszót kiöntjük.
- Következő lépésben hozzáadunk 500 µl AW2 puffert és 1 percig 6000 g fordulatszámom 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 fordulatszámom 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 fordulatszámom 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 helyezzük, 500 µl RB puffert és 5 µl β-merkaptoetanolt adunk hozzá (lízis), majd VORTEX-szel homogenizáljuk.
- A mintákat 60°C-on 5 percig inkubáljuk, majd a gyűjtőcsőbe helyezett szűrős kolumnába (Filter Column) pipetázunk és 1 percig 1000 g fordulatszámon centrifugáljuk.
- Az alulúszóhoz, az alulúszóhoz mérten fél mennyiségű abszolút etanolt adunk, összerázzuk, majd ezt egy másik szűrővel ellátott oszlopra (RB Column) átpipetázunk 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 helyezzük, 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) ellenőrizük.
- 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 összemérjük 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) ₁₈ 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)₁₈ 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 MgCl₂ (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 percre inkubáljuk.
- Ezután a mintákat 1 percre 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 percre centrifugáljuk, majd az alulúszót öntsük ki.
- Ismételjük meg az előző lépést 500 µl membránmosó oldattal és 16000 g fordulatszámon 5 percre centrifugáljuk.
- Öntsük ki az alulúszót, majd nyitott tetővel 16000 g fordulatszámon 1 percre 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 nukleázmentes vizet, szobahőmérsékleten 1 percre inkubáljuk, majd 16000 g fordulatszámon 1 percre 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 percre 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 inaktíváljuk a reakciót.

10.9 A kompetens *Escherichia coli* sejtek transzformálása

- Kompetens *E. coli* JM109-es törzsből kimérünk 50 µl-eket, majd a bejuttatni 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 rázó gépbe 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 baktériumoszuszpenzióból 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 fogvájonyit 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-erekre és a 4°C-ra hűtött centrifugában 5 percig 5000 g fordulatszámon centrifugáljuk.
- A felülúszót leöntjük, a baktériumokat összeszuszpendáljuk 10 ml jég hideg 20 mM-os CaCl₂-dal és az előző pontban leírt kondíciókkal újracentrifugáljuk.

- A felülúszót ismét leöntjük és a baktériumokat újraszuszpendáljuk 1 ml jéghideg CaCl_2 -dal, ezután jégen dolgozva 150 μl -eket pipetázunk Eppendorf csövekbe (attól függően, hogy mennyi plazmival akarunk transzformálni).
- A 150 μl mennyiségekre szétporciózott baktérium-szuszpenzióhoz hozzáadunk 5-10 μl (0,5-1 μg) 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-szuszpenziót.

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 KNO_3 ; 1650 mg/l NH_4NO_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 KH_2PO_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 H_3BO_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 MgCl₂;
- 1,2 g MgSO₄;
- 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'n_nn_	5	336, 562, 1719, 1856, 2075
BciVI	GTATCCnnnn_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	CTTGAGnnnnnnnnnnnnnnnnn_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	ACnnnnnCTCnccccnnnnn_nnn'	1	157
BsaXI	GGAGnnnnnGTnnnnnnnnn_nnn'	1	127
BseMII	CTCAGnnnnnnnnn_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'nnnnn_	2	883, 1416
BsmBI	CGTCTCn'nnnnn_	1	1416
BsmFI	GGGACnnnnnnnnnnn'nnnnn_	1	1851
Bsp1286I	G_dGCh'C	3	568, 1055, 2265
BspCNI	CTCAGnnnnnnnnn_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'nnnnn_	3	112, 244, 1213
EciI	GGCGGAnnnnnnnnnn_nn'	3	399, 2373, 2519
Eco57I	CTGAAGnnnnnnnnnnnnnnn_nn'	1	2033
Eco57MI	CTGrAGnnnnnnnnnnnnnnn_nn'	1	2033
EcoNI	CCTnn'n_nnAGG	1	1312
EcoO109I	rG'GnC_Cy	1	565
EcoRV	GAT'ATC	1	818
FalI	AAGnnnnnCTTnnnnnnnnn_nnnnnn'	2	732, 764
FauI	CCCGCnnnnn'nnn_	4	155, 197, 317, 344
HaeII	r_GCGC'y	2	125, 2335
HgaI	GACGCnnnnnn'nnnnnnn_	4	317, 1870, 1885, 2463
Hin4I	GAynnnnnnvTCnnnnnnnnn_nnnnnn'	5	536, 568, 1073, 1105, 1615
Hin4I	GAbnnnnnrTCnnnnnnnnn_nnnnnn'	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	GAGTCnnnnn'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'nnnnn_	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	GACCGAnnnnnnnnnn_nn'	2	99, 1654
TatI	w'GTAC_w	2	652, 718

TspGWI ACGGAnnnnnnnnn_nn' 3 268, 1209, 1221

10.13 A pGWB 405 restrikciós térképe:

Enzyme	Recognition	frequency	Positions
AccI	GT'mk_AC	4	764, 2172, 2767, 8393
AclI	AA'CG_TT	3	1725, 5752, 10452
AflII	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_T	3	3645, 4465, 5037
BbeI	G_GCGC'C	2	5399, 8593
BbsI	GAAGACnn'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_T	2	5649, 9378
BplI	GAGnnnnnCTCnnnnnnnn_nnnnn'	2	4715, 4747
Bpu10I	CC'TnA_GC	5	1411, 2363, 3516, 3534, 4480
BsaI	GGTCTCn'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'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_nnn'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	TCCrACnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn_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	GAACnnnnnCTCnnnnnnnn_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'nnnn_	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	GAAAnn'nnTTC	4	730, 1025, 3916, 3928

10.14 A *FvSAMS* ORF restrikiós térképe:

Enzyme	Recognition	frequency	Positions
AflII	C'TTAA_G	1	629
AflIII	A'CryG_T	1	375
AlwI	GGATCnnnn'n_n	3	976, 991, 1065
ApaI	G_GGCC'C	1	907
BanII	G_rGCy'C	4	302, 793, 907, 945
BbsI	GAAGACnn'n_nnnn_	2	686, 1097
BbvI	GCAGCnnnnnnnn'n_nnnn_	4	304, 607, 853, 1084
BcgI	CGAnnnnnnTGcnnnnnnnnnn_nn'	1	889
BcgI	GCAnnnnnnTCGnnnnnnnnnn_nn'	1	923
BclI	T'GATC_A	1	1041
BglIII	A'GATC_T	1	66
Bme1580I	G_kGCm'C	1	907
BpmI	CTGGAGnnnnnnnnnnnnnnnn_nn'	1	116
Bpu10I	CC'TnA_GC	3	312, 419, 939
BpuEI	CTTGAGnnnnnnnnnnnnnnnn_nn'	2	1046, 1142
BsaI	GGTCTCn'n_nnnn_	3	487, 922, 956
BsaBI	GATnn'nnATC	1	1046
BseMII	CTCAGnnnnnnnn_nn'	5	326, 396, 482, 651, 930
BseRI	GAGGAGnnnnnnnn_nn'	1	362
BseYI	C'CCAG_C	1	585
BsgI	GTGCAGnnnnnnnnnnnnnnnn_nn'	1	932
BsmAI	GTCTCn'n_nnnn_	5	122, 487, 590, 922, 956
BsmFI	GGGACnnnnnnnnnn'n_nnnn_	3	54, 641, 920
Bsp1286I	G_dGCh'C	4	302, 793, 907, 945
BspCNI	CTCAGnnnnnnnn_nn'	5	325, 397, 483, 652, 931
BspMI	ACCTGCnnnn'n_nnnn_	2	731, 904
BsrI	ACTG_Gn'	2	754, 979
BssSI	C'ACGA_G	1	908
BstEII	G'GTnAC_C	1	362
BstF5I	GGATG_nn'	2	679, 1126
BstXI	CCAn_nnnn'nTGG	2	800, 1054
BstYI	r'GATC_y	4	66, 981, 996, 1057
BtgI	C'CryG_G	2	322, 793
Cac8I	GcN'nGC	3	91, 864, 898
DraIII	CAC_nnn'GTG	1	560



Eco57I	CTGAAGnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn_nn'	2	480, 1012
Eco57MI	CTGrAGnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn_nn'	3	116, 480, 1012
EcoNI	CCTnn'n_nnAGG	2	98, 911
EcoO109I	rG'GnC_Cy	5	103, 274, 820, 903, 904
FokI	GGATGnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn_	2	686, 1133
FspI	TGC'GCA	1	484
HaeII	r_GCGC'y	1	343
HgaI	GACGCnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn_	2	83, 762
Hin4I	GAynnnnnnnvTCnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn'	4	85, 744, 776, 932
Hin4I	GAbnnnnnnnrTCnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn'	4	53, 744, 776, 964
HincII	GTy'rAC	2	34, 283
HindIII	A'AGCT_T	1	440
Hpy8I	GTn'nAC	4	34, 283, 565, 835
Hpy188III	TC'nn_GA	5	254, 466, 813, 1063, 1087
HpyF10VI	GCn_nnnnnn'nGC	1	903
MboII	GAAGAnnnnnnnnnnnnnnnnnnn_n'	4	211, 481, 691, 1102
MslI	CAynn'nnrTG	3	152, 735, 798
MspAlI	CmG'CKG	1	1097
MwoI	GCnn_nnn'nnGC	1	902
NcoI	C'CATG_G	2	322, 793
NlaIV	GGn'nCC	5	105, 552, 790, 822, 905
NspI	r_CATG'y	4	135, 219, 379, 641
PciI	A'CATG_T	1	375
PpuMI	rG'GwC_Cy	3	103, 274, 820
PshAI	GACnn'nnGTC	1	369
PspOMI	G'GGCC_C	1	903
PvuII	CAG'CTG	1	1097
ScaI	AGT'ACT	2	81, 668
SfaNI	GCATCnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn_	4	76, 247, 402, 727
SmlI	C'TyrA_G	3	629, 1061, 1157
StyI	C'Cww_G_G	5	177, 322, 367, 793, 828
TaqII	GACCGAnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn_nn'	1	940
TaqII	CACCCAnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn_nn'	2	60, 599
TatI	w'GTAC_w	2	79, 666
TspDTI	ATGAAnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn_nn'	2	411, 549
TspGWI	ACGGAnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn_nn'	1	197
TspRI	_nnCAsTGnn'	3	397, 463, 574
XbaI	T'CTAG_A	1	253
XcmI	CCAnnnnn_n'nnnnTGG	1	145

10.15 A *FvSAMDC* ORF restrikiós térképe:

Enzyme	Recognition	frequency	Positions
AccI	GT'mk_AC	1	537
AlwI	GGATCnnnn'n_	3	80, 524, 643
AlwNI	CAG_nnn'CTG	2	617, 662
ApaLI	G'TGCA_C	1	154
ApoI	r'AAT_T_y	1	906
AvaI	C'yCGr_G	1	434
BaeI	ACnnnnGTAYCnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn'	2	328, 922
BaeI	GrTACnnnnGTnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn'	2	361, 955
BbsI	GAAGACnn'nnnn_	2	95, 759
BbvI	GCAGCnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn_	4	456, 604, 626, 960
BcgI	CGAnnnnnnnTGCnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn'	1	284
BcgI	GCAnnnnnnnTCGnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn'	1	250
BciVI	GTATCCnnnnnn_n'	2	29, 923
BglII	A'GATC_T	1	326
BlpI	GC'TnA_GC	1	610
BmeI580I	G_kGcm^C	1	158
BplI	GAGnnnnnnCTCnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn'	2	325, 357
BpmI	CTGGAGnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn'	2	384, 884
BpuEI	CTTGAGnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn'	1	983
BsaI	GGTCTCn'nnnn_	1	320
BsaJI	C'CnnG_G	4	361, 543, 576, 655
BseMII	CTCAGnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn'	4	494, 624, 816, 996
BseRI	GAGGAGnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn'	1	971
BseYI	C'CCAG_C	1	123
BsiHKAI	G_wGCw^C	2	158, 370
BslI	CCnn_nnn'nnGG	1	755

BsmI	GAATG_Cn'	2	59, 712
BsmAI	GTCTCn'nnnn_	2	169, 320
BsmFI	GGGACnnnnnnnnnn'nnnn_	1	271
Bsp1286I	G_dGCh'C	2	158, 370
BspCNI	CTCAGnnnnnnnn_nn'	4	493, 623, 817, 997
BsrI	ACTG_Gn'	2	565, 817
BsrBI	CCG'CTC	1	722
BsrDI	GCAATG_nn'	1	627
BssSI	C'ACGA_G	2	342, 953
BstF5I	GGATG_nn'	2	136, 639
BstYI	r'GATC_y	2	326, 648
BstZ17I	GTA'TAC	1	538
EarI	CTCTTCn'nnn_	3	172, 224, 936
Eco57I	CTGAAGnnnnnnnnnnnnnn_nn'	2	111, 314
Eco57MI	CTGrAGnnnnnnnnnnnnnn_nn'	4	111, 314, 384, 884
FauI	CCCGCnnnn'nn_	1	4
FokI	GGATGnnnnnnnnnn'nnnn_	2	143, 626
HgaI	GACGCnnnnn'nnnnn_	1	425
Hin4I	GAynnnnnvTCnnnnnnnn_nn'nnnn'	3	208, 1049, 1055
Hin4I	GAbnnnnnrTCnnnnnnnn_nn'nnnn'	3	176, 1017, 1055
HincII	GTy'rAC	1	190
HphI	GGTGAnnnnnnn_n'	1	310
Hpy8I	GTn'nAC	4	156, 190, 339, 538
Hpy188III	TC'nn_GA	5	83, 89, 292, 938, 1000
HpyF10VI	GCn_nnnnn'nGC	4	18, 516, 876, 885
MlyI	GAGTCnnnnn'	2	185, 218
MmeI	TCCrACnnnnnnnnnnnnnnnnnn_nn'	1	1025
MslI	CAYnn'nnrTG	1	879
MspAII	CmG'CkG	2	127, 617
MwoI	GCnn_nnn'nnGC	4	17, 515, 875, 884
NlaIV	GGn'nCC	2	976, 995
NspI	r_CATG'y	1	494
PleI	GAGTCnnnn'n_	2	185, 217
PvuII	CAG'CTG	2	127, 617
SfaNI	GCATCnnnnn'nnnn_	2	512, 648
SmlI	C'TyrA_G	1	998
StuI	AGG'CCT	1	1010
StyI	C'CwwG_G	1	576
TaqII	CACCCAnnnnnnnnn_nn'	2	452, 959
TatI	w'GTAC_w	1	987
TspDTI	ATGAAnnnnnnnnn_nn'	4	211, 343, 719, 903
XcmI	CCAnnnn_n'nnnnTGG	2	124, 959

10.16 TargetP 1.1 Server alkalmazással végzett tranzit peptidek prediktálása a FvSAMS és q FvSAMDC aminosav szekvenciákon

FvSAMS		FvSAMDC																																																	
 TargetP 1.1 Server - prediction results Technical University of Denmark		 TargetP 1.1 Server - prediction results Technical University of Denmark																																																	
### targetp v1.1 prediction results ##### Number of query sequences: 1 Cleavage site predictions not included. Using PLANT networks.		### targetp v1.1 prediction results ##### Number of query sequences: 1 Cleavage site predictions not included. Using PLANT networks.																																																	
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Name</th> <th>Len</th> <th>cTP</th> <th>mTP</th> <th>SP</th> <th>other</th> <th>Loc</th> <th>RC</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sequence</td> <td>393</td> <td>0.128</td> <td>0.113</td> <td>0.149</td> <td>0.869</td> <td>-</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>cutoff</td> <td></td> <td>0.000</td> <td>0.000</td> <td>0.000</td> <td>0.000</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC	Sequence	393	0.128	0.113	0.149	0.869	-	2	cutoff		0.000	0.000	0.000	0.000				<table border="1"> <thead> <tr> <th>Name</th> <th>Len</th> <th>cTP</th> <th>mTP</th> <th>SP</th> <th>other</th> <th>Loc</th> <th>RC</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sequence</td> <td>359</td> <td>0.070</td> <td>0.093</td> <td>0.141</td> <td>0.804</td> <td>-</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>cutoff</td> <td></td> <td>0.000</td> <td>0.000</td> <td>0.000</td> <td>0.000</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC	Sequence	359	0.070	0.093	0.141	0.804	-	2	cutoff		0.000	0.000	0.000	0.000			
Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC																																												
Sequence	393	0.128	0.113	0.149	0.869	-	2																																												
cutoff		0.000	0.000	0.000	0.000																																														
Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC																																												
Sequence	359	0.070	0.093	0.141	0.804	-	2																																												
cutoff		0.000	0.000	0.000	0.000																																														
Explain the output. Go back .		Explain the output. Go back .																																																	

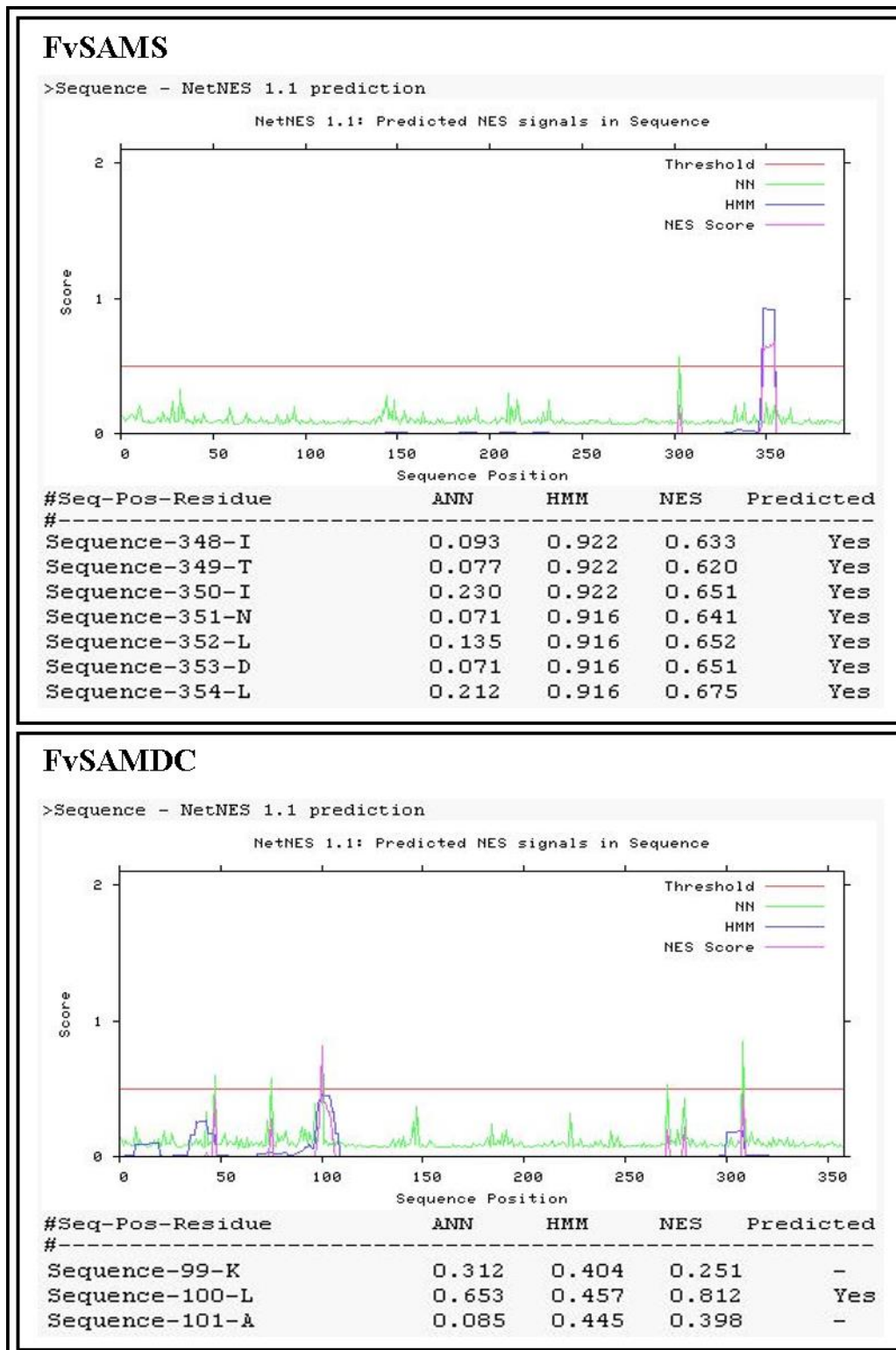
TargetP 1.1 szekvenciaanalízis eredménye: Len: length (hossz); cTP: chloroplast transit peptide (kloroplasztisz tranzit peptid); mTP: mitochondrial targeting peptide (mitokondriális target peptid); SP: secretory pathway signal peptide (apoplaszt szignál peptid); Loc: localization (lokalizáció); RC: Reliability class (a prediktálás megbízhatósága) (1-5 pontoz, az 1 jelöli a megbízható prediktálást). Lokalizáció: FvSAMS (0.869 other-egyébb lokalizáció, RC: 2); FvSAMDC (0.804 other- egyébb lokalizáció, RC: 2).

10.17 cNLS Mapper alkalmazással prediktált Nukleáris Lokalizációs Szignálok (NLS)

FvSAMS		FvSAMDC																																																	
cNLS Mapper Result		cNLS Mapper Result																																																	
Predicted NLSs in query sequence		Predicted NLSs in query sequence																																																	
<pre> HETFLF TSEVH EGHDPDKL CDQISDAVLDACLEQDDPSKVCETCTKTNM 50 VMVFGEITTKAHVDYEKIVRDCRNIGFVSDVGLDADHCKVLVNIQQS 100 PDIAQGVHGHF TKRPEEIGAQQGHMF GYATDETPELMPLSHVLA TKLGA 150 KLTEVRKNGTCAWLRPDGKTQVTV EYHNEGGAMVPLRVHTVLISTQHDET 200 VTNDEIAADLKEHVIKPVVPEKYLDEKTFIHLNPSGRFVIGGPHGDAGLT 250 GRKIIDTYGGWGAHGGGAFSGKDP TKVDRSGAYIVRQAAKSIVANGLAR 300 RALVQVSYAIGVPEPLSVFVETYGTKIPDKEILKIVKENFDFRPGMITI 350 NLDLKRGGNKRFLKTAAYGHFGRDDPDFTWEVVKPLKWEK PQS 393 </pre>		<pre> MSMAGSAIGFEGYEKRLEIAFFEPSVFRDPEGRGLRSLSKS QLDEFLGQA 50 ECTIVSSLNDDVDVSYLSESLFIYSYKLI IKTCTGTTKLLAIPPILKL 100 AESIGLTVRSVRYTRGSFIFPGAQSFPHRNFSEEVSTLDAYFKLGGGSR 150 AZHMGGSAGPQKWHVYSASAEPANLVPVYVYTLNCHTGLDRAKASVYK 200 VTSAAAAMTHDSGIRKILPGSDICDFEFPDCYGSMAIEGAAISTIHVTP 250 EDGFSYASFESAGYDFNELNLNQLAERVLA CFKPFSEF SIAVHADVAVKS 300 QQICSLDLKGYCREESSHEELGMGGSIVQYRFLKTEACGSPRSTLKG CWK 350 EDEDYEYS 359 </pre>																																																	
Predicted monopartite NLS		Predicted monopartite NLS																																																	
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Pos.</th> <th>Sequence</th> <th>Score</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr> </tbody> </table>		Pos.	Sequence	Score							<table border="1"> <thead> <tr> <th>Pos.</th> <th>Sequence</th> <th>Score</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr> </tbody> </table>		Pos.	Sequence	Score																																				
Pos.	Sequence	Score																																																	
Pos.	Sequence	Score																																																	
Predicted bipartite NLS		Predicted bipartite NLS																																																	
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Pos.</th> <th>Sequence</th> <th>Score</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>13</td> <td>EGHDPDKLCDQISDAVLDACLEQDDPSKVCET</td> <td>2.6</td> </tr> <tr> <td>86</td> <td>DADNCKVLVNIQQSPDIAQGVHGHFTKRPEEI</td> <td>4.2</td> </tr> <tr> <td>147</td> <td>KLGAKLTEVRKNGTCAWLRPDGKTQVT</td> <td>2.7</td> </tr> <tr> <td>327</td> <td>KIPDKEILKIVKENFDFRPGMITINLDLKRGGNKRFLKT</td> <td>2.3</td> </tr> <tr> <td>335</td> <td>KIVKENFDFRPGMITINLDLKRGGNKRFLKT</td> <td>3.8</td> </tr> <tr> <td>356</td> <td>RGGNKRFLKTAAYGHFGRDDPDFTWEVVKPLK</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>356</td> <td>RGGNKRFLKTAAYGHFGRDDPDFTWEVVKPLK</td> <td>3.6</td> </tr> <tr> <td>356</td> <td>RGGNKRFLKTAAYGHFGRDDPDFTWEVVKPLKWE</td> <td>4.5</td> </tr> <tr> <td>356</td> <td>RGGNKRFLKTAAYGHFGRDDPDFTWEVVKPLKWEK</td> <td>2.7</td> </tr> <tr> <td>356</td> <td>RGGNKRFLKTAAYGHFGRDDPDFTWEVVKPLKWEK</td> <td>3.6</td> </tr> </tbody> </table>		Pos.	Sequence	Score	13	EGHDPDKLCDQISDAVLDACLEQDDPSKVCET	2.6	86	DADNCKVLVNIQQSPDIAQGVHGHFTKRPEEI	4.2	147	KLGAKLTEVRKNGTCAWLRPDGKTQVT	2.7	327	KIPDKEILKIVKENFDFRPGMITINLDLKRGGNKRFLKT	2.3	335	KIVKENFDFRPGMITINLDLKRGGNKRFLKT	3.8	356	RGGNKRFLKTAAYGHFGRDDPDFTWEVVKPLK	3	356	RGGNKRFLKTAAYGHFGRDDPDFTWEVVKPLK	3.6	356	RGGNKRFLKTAAYGHFGRDDPDFTWEVVKPLKWE	4.5	356	RGGNKRFLKTAAYGHFGRDDPDFTWEVVKPLKWEK	2.7	356	RGGNKRFLKTAAYGHFGRDDPDFTWEVVKPLKWEK	3.6	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Pos.</th> <th>Sequence</th> <th>Score</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>11</td> <td>EGYEKRLEIAFFEPSVFRDPEGRGLRSLSK</td> <td>2.5</td> </tr> <tr> <td>86</td> <td>GTTKLLAIPPILKLAESIGLTVRSVRYTR</td> <td>3.2</td> </tr> <tr> <td>190</td> <td>DRAKASVYKTVTSSAAAMTNSGIRKILP</td> <td>2.7</td> </tr> <tr> <td>307</td> <td>DLKGYCREESSHEELGMGGSIVQYRFLKTE</td> <td>3.4</td> </tr> </tbody> </table>		Pos.	Sequence	Score	11	EGYEKRLEIAFFEPSVFRDPEGRGLRSLSK	2.5	86	GTTKLLAIPPILKLAESIGLTVRSVRYTR	3.2	190	DRAKASVYKTVTSSAAAMTNSGIRKILP	2.7	307	DLKGYCREESSHEELGMGGSIVQYRFLKTE	3.4
Pos.	Sequence	Score																																																	
13	EGHDPDKLCDQISDAVLDACLEQDDPSKVCET	2.6																																																	
86	DADNCKVLVNIQQSPDIAQGVHGHFTKRPEEI	4.2																																																	
147	KLGAKLTEVRKNGTCAWLRPDGKTQVT	2.7																																																	
327	KIPDKEILKIVKENFDFRPGMITINLDLKRGGNKRFLKT	2.3																																																	
335	KIVKENFDFRPGMITINLDLKRGGNKRFLKT	3.8																																																	
356	RGGNKRFLKTAAYGHFGRDDPDFTWEVVKPLK	3																																																	
356	RGGNKRFLKTAAYGHFGRDDPDFTWEVVKPLK	3.6																																																	
356	RGGNKRFLKTAAYGHFGRDDPDFTWEVVKPLKWE	4.5																																																	
356	RGGNKRFLKTAAYGHFGRDDPDFTWEVVKPLKWEK	2.7																																																	
356	RGGNKRFLKTAAYGHFGRDDPDFTWEVVKPLKWEK	3.6																																																	
Pos.	Sequence	Score																																																	
11	EGYEKRLEIAFFEPSVFRDPEGRGLRSLSK	2.5																																																	
86	GTTKLLAIPPILKLAESIGLTVRSVRYTR	3.2																																																	
190	DRAKASVYKTVTSSAAAMTNSGIRKILP	2.7																																																	
307	DLKGYCREESSHEELGMGGSIVQYRFLKTE	3.4																																																	

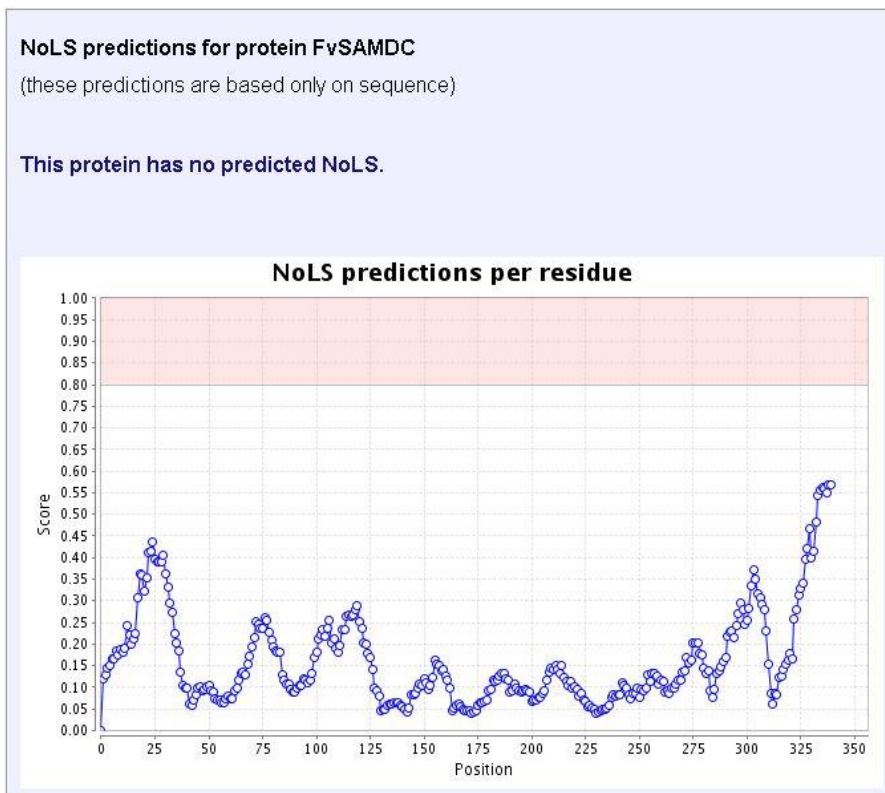
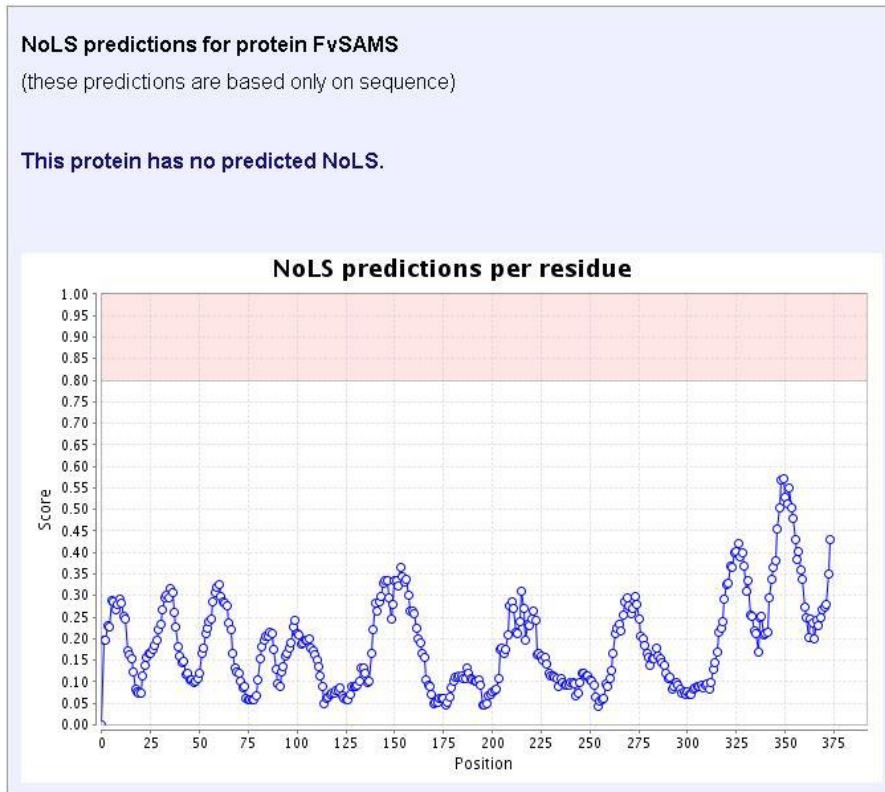
„Cut-off” pont: A magasabb pontok a nagyobb NLS aktivitást jelölik. A 8, 9, 10 pontos NLS-ek kizárólag a sejtmagban, a 7, 8 pontosak részben a sejtmagban, a 3, 4, 5 pontos NLS-ek a sejtmagban és a citoplazmában is lokalizálódnak, míg a 1, 2 pontosok csak a citoplazmában lokalizálódnak. Forrás: http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_help.cgi

10.18 Prediktált Nukleáris export szignálok (NES) a FvSAMS és a FvSAMDC aminosav szekvenciákon



Forrás: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>

10.19 Nucleolar Localization Sequence Detector (NoD) alkalmazással prediktált Nukleoláris Lokalizációs Szignálok (NoLSs) hiánya a FvSAMS és a FvSAMDC aminosav szekvenciáján



Forrás: <http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-nod/index.jsp>

10.20 GPS-SNO 1.0 alkalmazással prediktált S-nitrozációs helyek

FvSAMS:

Predicted Sites				
Position	Peptide	Score	Cutoff	Cluster
>FvSAMS (XP_004288342.1)				
20	EGHPDKLCDQISDAV	1,634	0,797	Cluster A
31	SDAVLDACLEQDPDS	1,246	0,797	Cluster A
73	EKIVRDTCRNIGFVS	1,044	0,797	Cluster A
>AtSAMS1 (NP_171751.1)				
20	EGHPDKLCDQISDAV	1,634	0,797	Cluster A
31	SDAVLDACLEQDPDS	1,246	0,797	Cluster A
73	EKIVRDTCAIGFVS	0,995	0,797	Cluster A
114	VHGHFTKCPPEIGAG	4,962	2,443	Cluster B
>SISAMS1 (NP_001234425.1)				
20	EGHPDKLCDQISDAV	1,634	0,797	Cluster A
31	SDAVLDACLEQDPES	1,432	0,797	Cluster A
73	EKIVRDTCRNIGFVS	0,978	0,797	Cluster A
>StSAMS1 (NP_001275609.1)				
20	EGHPDKLCDQISDAV	1,634	0,797	Cluster A
31	SDAVLDACLEQDPES	1,432	0,797	Cluster A
73	EKIVRDTCRNIGFVS	0,978	0,797	Cluster A

FvSAMDC:

Predicted Sites				
Position	Peptide	Score	Cutoff	Cluster
>FvSAMDC (XM_011464655.1)				
52	EFLGQAECTIVSSLS	22,058	20,743	Cluster C
85	YKLIKTCGTTKLLL	1,339	0,797	Cluster A
185	PVYTEMCMTGLDRA	2,978	2,443	Cluster B
304	VKSLQQICSLDLKGY	20,971	20,743	Cluster C
312	SLDLKGYCREESSHE	0,82	0,797	Cluster A
>AtSAMDC1 (NP_001154585.1)				
50	EILTPAACTIVSSLS	21,993	20,743	Cluster C
83	YKVIKTCGTTKLLL	1,12	0,797	Cluster A
174	SAQSSNCNNVYTL	3,723	2,443	Cluster B
>SISAMDC (NP_001234699.1)				
54	EILGPAECTIVDNLS	20,92	20,743	Cluster C
87	YKIIKTCGTTKLLL	1,448	0,797	Cluster A
187	PVYTEMCMTGLNRE	2,924	2,443	Cluster B
283	LVERVLACFEPAEFS	2,734	2,443	Cluster B
306	TKLLEHVCSVDVKGY	21,796	20,743	Cluster C
350	PKSVLKGCKWKEEKE	0,989	0,797	Cluster A
>StSAMDC (AAB32507.1)				
54	EILGPAECTIVDNLS	20,92	20,743	Cluster C
87	YKIIKTCGTTKLLL	1,448	0,797	Cluster A
187	PVYTEMCMTGLDRE	3,446	2,443	Cluster B
283	LVERVLACFEPAEFS	2,973	2,443	Cluster B
306	TKLLERTCSVDVKGY	22,854	20,743	Cluster C
350	PKSVLKGCKWKEEKE	0,913	0,797	Cluster A

M2: KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Kiss Erzsébetnek, hogy munkámat nagyfokú odafigyeléssel, türelemmel irányította és hasznos szakmai tanácsokkal látott el.

Köszönöm Dr. Heszky Lászlónak, Dr. Kiss Erzsébetnek és Dr. Toldi Ottónak a Genetikai, Mikrobiológiai és Biotechnológiai Intézet korábbi Intézetigazgatóinak és a jelenlegi Intézetigazgatójának, Dr. Varga Lászlónak, hogy munkámat a Genetikai, Mikrobiológiai és Biotechnológiai Intézetben végezhettem.

Külön köszönöm Ádám Zoltánnénak (Stefi néni) a munkám gyakorlati kivitelezésében nyújtott önzetlen és fáradhatatlan segítségét, valamint Dr. Tisza Viktóriának, hogy a kezdő PhD éveim alatt hasznos gyakorlati tanácsokkal látott el.

Köszönetemet fejezem ki Mendel Ákos predoktorandusznak, Tóth Szabolcs és Szentgyörgyi Anna volt MSc hallgatóknak a kutatás gyakorlati kivitelezésében nyújtott fáradhatatlan, lelkes és precíz segítségükért.

Köszönöm Dr. Gócza Elennek és Iski Gergelynek a konfokális mikroszkóp használatában nyújtott elméleti és gyakorlati segítségüket.

Köszönöm továbbá a Genetikai, Mikrobiológiai és Biotechnológiai 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.