

AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Poliaminok szerepe a stressztűrésben és kapcsolata más védővegyületekkel gabonanövényekben

Pál Magda

MTA ATK Mezőgazdasági Intézet

2019

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
1. BEVEZETÉS.....	6
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	8
2.1. A NÖVÉNYI STRESSZ.....	8
2.1.1. A növényi stresszfolyamatokról általában.....	8
2.1.2. Lisztharmatfertőzés.....	9
2.1.3. Szárazságstressz.....	11
2.1.4. Alacsony hőmérsékleti stressz.....	12
2.1.5. Kadmiumstressz.....	15
2.1.6. UV-B sugárzás.....	19
2.2. POLIAMINOK.....	20
2.2.1. Poliaminok a növényekben, szintézisük és általános élettani szerepük.....	20
2.2.2. Poliaminok szerepe a növényi stressztűrésben.....	22
2.2.3. A poliaminok és a stresszválaszok közötti kapcsolatot biztosító jelátviteli komponensek.....	24
2.2.4. A poliaminok kapcsolata növényi hormonokkal és más, kisméretű védővegyületekkel.....	26
3. KUTATÁSI CÉL.....	29
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	30
4.1. A NÖVÉNYNEVELÉS KÖRÜLMÉNYEI ÉS A NÖVÉNYI ANYAGOK.....	30
4.1.1. Búzanövények nevelése és lisztharmatfertőzése üvegházi körülmények között.....	30
4.1.2. Búza-, zab- és árpanövények nevelése és alacsony hőmérsékleti kezelése fitotroni körülmények között.....	31
4.1.3. Búza-, kukorica- és rizsnövények nevelése és kezelése fitotroni körülmények között tápoldatban.....	31
4.1.3.1. Kadmiumkezelés vizsgálata eltérő szalicilsav-tartalmú búza genotípusokban.....	33
4.1.3.2. UV-B sugárzás módosító hatása a PEG-indukálta ozmotikus illetve kadmiumstresszre búzanövényekben.....	33
4.1.3.3. Alacsony hőmérséklet és PEG-indukálta ozmotikus stressz hatása eltérő szalicilsav-tartalmú rizs genotípusokban.....	34
4.1.3.4. Poliamin-kezelések hatása kukorica- és búzanövényekben.....	34
4.1.3.5. Putreszcin-előkezelés hatása a PEG-indukálta ozmotikus stressz során kukorica- és búza növényekben.....	35
4.1.3.6. Putreszcin-előkezelés, illetve putreszcin-szintézist gátló szer hatása kadmiumstressz során rizsnövényekben.....	35
4.1.3.7. Abszcin-sav-kezelés hatásának vizsgálata putreszcin-kezeléssel összehasonlításban kontroll körülmények között és PEG-indukálta ozmotikus stressz során búzanövényekben.....	36
4.2. A NÖVÉNYEK FIZIOLÓGIAI ÁLLAPOTÁNAK MEGHATÁROZÁSA.....	37
4.2.1. Klorofill-a fluoreszcencia indukció mérése.....	37
4.2.2. A fotoszintetikus aktivitás mérése.....	37
4.2.3. Lipidperoxidáció meghatározása.....	37
4.2.4. Hidrogénperoxid-tartalom meghatározása.....	38
4.2.5. Antioxidáns enzimek kivonása és az aktivitások meghatározása.....	38
4.2.5.1. Kataláz (KAT) (EC 1.11.1.6).....	38
4.2.5.2. Gvajakol-peroxidáz (G-POD) (EC 1. 11.1.7).....	38
4.2.5.3. Aszkorbát-peroxidáz (APX) (EC 1.11.1.11).....	39
4.2.5.4. Glutathion-reduktáz (GR) (EC 1.6.4.2).....	39
4.2.5.5. Glutathion-S-transzferáz (GST) (EC 2.5.1.18).....	39
4.3. KADMIUMTARTALOM MEGHATÁROZÁSA.....	39
4.4. PROLINTARTALOM MEGHATÁROZÁSA.....	39
4.5. SZALICILSAV, FLAVONOID ÉS ABSZCIZINSAV-EXTRAKCIÓ ÉS MENNYISÉGI ANALÍZIS.....	40

4.6. POLIAMINOK MENNYISÉGI ANALÍZISE	41
4.7. DIAMIN-OXIDÁZ (EC 1.4.3.6.) ÉS POLIAMIN-OXIDÁZ (EC 1.5.3.3.) AKTIVITÁSOK MÉRÉSE	42
4.8. A GLUTATION-, γ -GLUTAMIL-CISZTEIN- ÉS CISZTEIN-TARTALOM MEGHATÁROZÁSA	43
4.9. FITOKELATIN-SZINTÁZ ENZIM AKTIVITÁSÁNAK MÉRÉSE ÉS FITOKELATINOK MENNYISÉGI MEGHATÁROZÁSA	44
4.10. ASZKORBÁT-TARTALOM MEGHATÁROZÁSA	45
4.11. LIPID EXTRAKCIÓ ÉS ZSÍRSAV ANALÍZIS	45
4.12. GÉNEXPRESSZIÓ VIZSGÁLATA VALÓS IDEJŰ PCR-REL	46
4.13. STATISZTIKAI ANALÍZIS	47
5. EREDMÉNYEK	48
5.1. POLIAMIN-TARTALOM VÁLTOZÁSA ÉS ANNAK MÁS VÉDŐVEGYÜLETEKKEL VALÓ KAPCSOLATA KÜLÖNBÖZŐ STRESSZHATÁSOK SORÁN	48
5.1.1. <i>Lisztharmatfertőzés vizsgálata búzanövényekben</i>	48
5.1.1.1. A poliamin-tartalom változása lisztharmatfertőzést követően búzanövényekben	48
5.1.1.2. A szalicilsav-tartalom változása lisztharmatfertőzést követően búzanövényekben	52
5.1.1.3. Az antioxidáns enzimek aktivitásainak változása lisztharmatfertőzést követően búzanövényekben	52
5.1.1.4. A vizsgált paraméterek korrelációs elemzése	54
5.1.2. <i>Alacsony hőmérséklet hatásainak vizsgálata búza-, zab- és árpanövényekben</i>	54
5.1.2.1. Alacsony hőmérséklet hatása a poliamin-tartalomra búza-, zab- és árpanövényekben	55
5.1.2.2. Alacsony hőmérséklet hatása a szalicilsav-tartalomra búza-, zab- és árpanövényekben	57
5.1.2.3. Alacsony hőmérséklet hatása az abszcizinsav-tartalomra búza-, zab- és árpanövényekben	58
5.1.2.4. Alacsony hőmérséklet hatása a flavonoid-tartalomra búza-, zab- és árpanövényekben	58
5.1.2.5. Alacsony hőmérséklet hatása az antioxidáns enzimekre búza-, zab- és árpanövényekben	59
5.1.2.6. Alacsony hőmérséklet hatása a lipid frakciók zsírsav összetételére búza-, zab- és árpanövényekben	60
5.1.2.7. Alacsony hőmérséklet hatásainak vizsgálata során mért paraméterek korreláció elemzése	63
5.1.3. <i>Kadmiumkezelés vizsgálata búzanövényekben</i>	64
5.1.3.1. Kadmiumkezelés hatása a poliamin-tartalomra	64
5.1.3.2. Kadmiumkezelés hatása a szalicilsav-tartalomra	65
5.1.3.3. Kadmiumkezelés hatása a glutation-tartalomra	66
5.1.3.4. Kadmiumkezelés hatása a fitokelatin-szintézisre	68
5.1.3.5. Kadmiumkezelés hatása az aszkorbát-tartalomra	69
5.1.3.6. Kadmiumkezelés hatásainak vizsgálata során mért paraméterek korreláció vizsgálata	70
5.1.4. <i>UV-B sugárzás módosítása hatása ozmotikus és kadmiumstressz során búzanövényekben</i>	71
5.1.4.1. UV-B sugárzás módosító hatása a poliamin-tartalomra ozmotikus illetve kadmiumstressz során	71
5.1.4.2. UV-B sugárzás módosító hatása a szalicilsav-tartalomra ozmotikus illetve kadmiumstressz során	73
5.1.4.3. Az UV-B sugárzás és/vagy ozmotikus illetve kadmiumstressz során mért paraméterek korreláció elemzése	74
5.1.5. <i>Alacsony hőmérséklet és PEG-indukálta ozmotikus stressz hatása eltérő rizsnövényekben</i>	74
5.1.5.1. Alacsony hőmérsékleti és PEG-indukálta ozmotikus stressz hatása a poliamin-tartalomra rizsnövényekben	74
5.1.5.2. Alacsony hőmérsékleti és PEG-indukálta ozmotikus stressz hatása a szalicilsav-tartalomra rizsnövényekben	76
5.1.5.3. Alacsony hőmérsékleti és PEG-indukálta ozmotikus stressz során rizsnövényekben mért paraméterek korreláció elemzése	77
5.2. POLIAMIN-METABOLIZMUS VIZSGÁLATA POLIAMIN-KEZELÉSEK ÉS KÜLÖNBÖZŐ STRESSZHATÁSOK SORÁN MÁS VÉDŐVEGYÜLETEKKEL ÖSSZEFÜGGÉSBEN	77
5.2.1. <i>Poliamin-kezelések hatása búza- és kukoricanövényekben</i>	77
5.2.1.1. A különböző poliamin-kezelések hatása a növekedési paraméterekre és a lipidperoxidációra búza- és kukoricanövényekben	77
5.2.1.2. A különböző poliamin-kezelések hatása a poliamin-tartalomra búza- és kukoricanövényekben	79
5.2.1.3. A szalicilsav-tartalom változása különböző poliamin-kezeléseket követően búza- és kukoricanövényekben	81
5.2.1.4. Korrelációanalízis a szalicilsav- és poliamin-tartalom között különböző poliamin-kezeléseket követően búza- és kukoricanövényekben	82

5.2.2. Putreszcín-kezelés hatása polietilén-glikol indukálta ozmotikus stressz során búza- és kukoricanövényekben	82
5.2.2.1. Putreszcín-, polietilén-glikol-kezelések és ezek kombinációjának hatása a növekedési paraméterekre, a PSII kvantumhatékonyságára és a gázcsere-paraméterekre búza- és kukoricanövényekben	83
5.2.2.2. Putreszcín-, polietilén-glikol-kezelések és ezek kombinációjának hatása a poliamin- tartalomra és poliamin-katabolizmusra búza- és kukoricanövényekben	84
5.2.2.3. Putreszcín-, polietilén-glikol-kezelések és ezek kombinációjának hatása a szalicilsav-tartalomra búza- és kukoricanövényekben	86
5.2.3. Putreszcín-kezelés hatása kadmiumstressz során rizsnövényekben	87
5.2.3.1. Putreszcín-, 2-(difluorometil)ornitin- és kadmiumkezelések valamint ezek kombinációjának hatása a biomassza paraméterekre, a kadmium- és hidrogénperoxid-tartalomra, valamint az antioxidáns enzimek aktivitására rizsnövényekben	87
5.2.3.2. Putreszcín-, 2-(difluorometil)ornitin és kadmiumkezelések valamint ezek kombinációjának hatása a poliamin-metabolizmusra rizsnövényekben	89
5.2.3.3. Putreszcín-, 2-(difluorometil)ornitin- és kadmiumkezelések valamint ezek kombinációjának hatása a tioltartalomra és a fitokelatin-szintézisre rizsnövényekben	93
5.2.4. Putreszcín- és abszcizinsav-kezelések összehasonlítása kontroll és ozmotikus stresszkörülmények között búzanövényekben	95
5.2.4.1. Putreszcín- és abszcizinsav-kezelések hatása kontroll és ozmotikus körülmények között a gázcsere paraméterekre	95
5.2.4.2. Putreszcín- és abszcizinsav-kezelések hatása kontroll és ozmotikus körülmények között az abszcizinsav-tartalomra és szintézisre	96
5.2.4.3. Putreszcín- és abszcizinsav-kezelések hatása kontroll és ozmotikus körülmények között a poliamin-metabolizmusra	97
5.2.4.4. Putreszcín- és abszcizinsav-kezelések hatása kontroll és ozmotikus körülmények között a prolinszintézisre	101
5.2.4.5. Putreszcín- és abszcizinsav-kezelések hatásának vizsgálata során kontroll és ozmotikus körülmények között mért paraméterek korrelációs elemzése	103
6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	104
6.1. ENDOGÉN POLIAMIN-TARTALOM VÁLTOZÁSA BIOTIKUS ÉS ABIOTIKUS STRESSZFOLYAMATOK SORÁN	104
6.1.1. Lisztharmatfertőzés vizsgálata búzanövényeken	104
6.1.2. Alacsony hőmérséklet hatásainak vizsgálata búza-, zab- és árpanövényekben	106
6.1.3. Kadmiumkezelés vizsgálata búzanövényekben	108
6.1.4. UV-B sugárzás módosító hatása ozmotikus és kadmiumstressz során búzanövényekben	110
6.1.5. Alacsony hőmérséklet és PEG-indukálta ozmotikus stressz hatása rizsnövényekben	112
6.2. POLIAMIN-KEZELÉSEK HATÁSA KONTROLL ÉS ABIOTIKUS STRESSZ KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT	113
6.2.1. Poliamin-kezelések hatása búza- és kukoricanövényekben	113
6.2.2. Putreszcín-kezelés hatása kadmiumstressz során rizsnövényekben	118
6.2.3. Putreszcín- és abszcizinsav-kezelések összehasonlítása kontroll és ozmotikus stresszkörülmények között búzanövényekben	122
6.2.3.1. Az abszcizinsav és a poliaminok kapcsolata	122
6.2.3.2. A poliaminok és az ozmotikus-stressz	124
6.2.3.3. A poliaminok és a prolin kapcsolata	126
7. ÖSSZEFOGLALÁS	128
7.1. POLIAMIN-TARTALOM VÁLTOZÁSA ÉS ANNAK MÁS VÉDŐVEGYÜLETEKKEL VALÓ KAPCSOLATA KÜLÖNBÖZŐ STRESSZHATÁSOK SORÁN	128
7.2. POLIAMIN-KEZELÉSEK HATÁSA KONTROLL ÉS ABIOTIKUS STRESSZ KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT	130
8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	133
9. FELHASZNÁLT IRODALOM	134
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	149
FÜGGELÉK	150

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AA: aszkorbát
ABA: abszcizinsav
ABRE: abscisic acid response element (ABA válaszelem)
ACN: acetonitril
ADC: arginin-dekarboxiláz
apoPAO: apoplasztikus poliamin oxidáz
APX: aszkorbát-peroxidáz
bZIP: basic leucine zipper domain (bázikus leucin-cipzár domén)
CBF: C-repeat binding factor (C-ismétlődést kötő faktor)
Ci: intracelluláris CO₂ koncentráció
CRT/DRE: C-repeat/dehydration-responsive element (C-ismétlődés/dehidratáció válaszelem)
DAO: diamin-oxidáz
DAP: 1,3-diaminopropán
DBI: double bound index (kettőskötés index)
dcSAM: dekarboxilált S-adenozilmetionin
DFMO: 2-(difluorometil)ornitin
DGDG: digalaktozil-diacilglicerol
DHA: dehidroaszkorbát
DREB: DRE binding protein (DRE-kötő fehérje)
DTNB: 5,5'-ditio-bisz-(2-nitro-benzoészav)
E: transzspiráció intenzitása
Fm': maximális fluoreszcencia fényadaptált állapotban
Fs: steady state fluoreszcencia fényadaptált állapotban
G-POD: gvajakol-peroxidáz
GR: glutation-reduktáz
gs: sztómakonduktancia
GSH: redukált glutation
GSSG: oxidált glutation
GST: glutation-S-transzferáz
HMW: high molecular weight (nagy molekula tömegű)
HR: hiperszenzitív reakció
ICS: izokorizmat-szintáz
KAT: kataláz
LEA: late embryogenesis abundant
LHC: light harvesting complex (fénygyűjtő komplex)
LMW: low molecular weight (alacsony molekula tömegű)
MDA: malondialdehid
MeOH: metanol
MGDG: monogalaktozil-diacilglicerol
MYC/MYB: myelocitomatosis/myeloblastosis viral oncogene homolog
NADPH: β-nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát, redukált
NahG: szalicilát-hidroxiláz enzimet kódoló gén

NCED: 9-cisz-epoxikarotenoid-dioxigenáz
 o-ANI: orto-anizinsav
 OAT: ornitin aminotranszferáz
 ODC: ornitin-dekarboxiláz
 oHCA: *orto*-hidroxi-fahéjsav
 P5CS: Δ^1 -pirrolin-5-karboxilát szintáz
 PA: poliamin
 PAL: fenilalanin-ammónia-liáz
 PAO: poliamin-oxidáz
 PC: fitokelatin
 PCD: programmed cell death (programozott sejthalál)
 PCS: fitokelatin szintáz
 PE: foszfatidil-etanolamin
 PEG: polietilén-glikol
 perPAO: peroxiszómális poliamin-oxidáz
 PG: foszfatidil-glicerol
 p-HBA: *para*-hidroxi-benzoésav
 PI: foszfatidil-inozitol
 Pn: nettó fotoszintézis ráta
 PS I: első fotokémiai rendszer
 PS II: második fotokémiai rendszer
 PUT: putreszcin
 RAB: responsive to abscisic acid
 ROS: reactive oxygen species (reaktív oxigénformák)
 SA: szalicilsav
 SAM: S-adenozilmetionin
 SAMDC: S-adenozilmetionin-dekarboxiláz
 SIPK: salicylic acid-induced protein kinase (szalicilsav-indukált protein kináz)
 SPD: spermidin
 SPDS: spermidin-szintáz
 SPM: spermin
 SPMS: spermin-szintáz
 SQDG: szulfokvinovozil-diacilglicerol
*t*16:1: *transz*- Δ^3 -hexadekánsav
 TBA: tiobarbitursav
 TCA: triklór-ecetsav
 TFA: trifluor-ecetsav
 UVR8: UV RESISTANCE LOCUS 8 fehérje
 WIPK: wound-induced protein kinase (sebzés-indukált protein kináz)
 γ -EC, γ -Glu-Cys: γ -glutamil-cisztein
 16:0: palmitinsav
 18:0: sztearinsav
 18:1: olajsav
 18:2: linolsav
 18:3: linolénsav

1. BEVEZETÉS

A növények egyszerre több különböző környezeti terhelésnek vannak kitéve, amelyek csökkenthetik a várható mezőgazdasági hozamot. Világszerte minden évben nagy mennyiségű termésvesztést okoz a vízhiány, az extrém hőmérsékleti változások, a szikes talajok magas só koncentrációja, a nehézfém-szennyezés, illetve a kórokozók és kártevők hatása. Így, mind elméleti, mind gyakorlati szempontból nagy jelentősége van azon, a természetben is előforduló vegyületek vizsgálatának, melyek a gazdasági növények stresszérzékenységét csökkenteni képesek.

Az abiotikus és biotikus stresszhatásokra adott válaszok jelátviteli útvonalainak többségénél léteznek azonos elemek, amelyek a keresztthatás lehetséges csomópontjai. Az ilyen közös elemek fő kapcsolási pontként szolgálhatnak, és szerepet játszhatnak a stressztűrésben. Egyre inkább egyértelmű, hogy a poliaminok is ilyen kapcsolási pontok, és a poliamin-indukált válaszreakciók sok szinten összekapcsolódnak. A legnagyobb mennyiségben előforduló poliaminok, a putreszcin, spermidin és spermin különféle fiziológiai folyamatokat, például a fotoszintézist, az antioxidáns rendszert és az ioncsatornákat is képesek befolyásolni stresszhatás alatt, de specifikusságuk és hatékonyságuk eltérő mértékű. Felmerül a kérdés, hogy vajon az egyes poliaminok felhalmozódása elengedhetetlen-e a növények toleranciája és a stresszválaszok szempontjából. A poliamin-bioszintézisben szerepet játszó gének túltermelésére képes transzgenikus növények létrehozása ígéretes eszközt biztosít a növények stressztűrésének javításához. Ugyanakkor beszámoltak olyan eredményekről is, amikor a poliaminszintek nem korreláltak a stressztűréssel, ami megerősíti, hogy a „minél több, annál jobb” elv nem igaz minden esetben. A poliaminok felhalmozódása nem bizonyítja feltétlenül, hogy egyedi szerepük van a közvetlen stresszvédelemben.

Ideje, hogy a poliaminokra ne csak direkt védőmolekulaként tekintsünk, hanem olyan sokoldalú vegyületként, amely meghatározó szerepet játszik a stressztűrés szabályozásában, közvetlen kölcsönhatásba kerül más anyagcsere-útvonalakkal és hormonális keresztthatásokkal, illetve aktiválja a stresszre válaszreakciót adó gének expresszióját.

A poliaminok metabolizmusa dinamikus. Az abszorbeált exogén poliaminok vagy a megnövekedett mennyiségű endogén poliaminok gyorsan átalakulhatnak egymásba a poliamin-ciklus során. A poliaminok metabolizmusa ráadásul kapcsolódik a növényi hormonok és más jelátviteli molekulák szintéziséhez is. A bioszintézisében és katabolizmusában részt vevő enzimekre is hatással lehet a poliaminkezelés. Így a valós helyzetet csak rendkívül összetett kísérleti körülmények között lehetne felderíteni, ahol az egyes poliaminszinteket közvetlenül befolyásolják. További nehézséget jelent, hogy a kezelés hatása genotípus-függő lehet.

Mindezek alapján jelen munkában egyrészt az endogén poliamin-tartalom és a stressztolerancia mértéke közötti összefüggést kerestük, másrészt a külsőleg adagolt poliaminok által kiváltott változásokat tanulmányoztuk különböző stresszhatások során, különös tekintettel arra, hogy mindeközben az endogén poliaminok szintje milyen kapcsolatban van más védővegyületekkel. Az eredményektől azt reméljük, hogy a poliamin-metabolizmus szabályozásának megismerése új lehetőségeket mutat a gabonafélék környezeti változásokkal szembeni védelmében. A gyakorlati hasznosíthatóságát elsősorban abban látjuk, hogy alapot szolgáltathatnak jobb stresszellenállóságú haszonnövények előállításához, illetve ezen vegyületeknek, mint stressztolerancia-serkentőknek, széleskörű, mezőgazdasági módszerként történő alkalmazásának kidolgozásához.

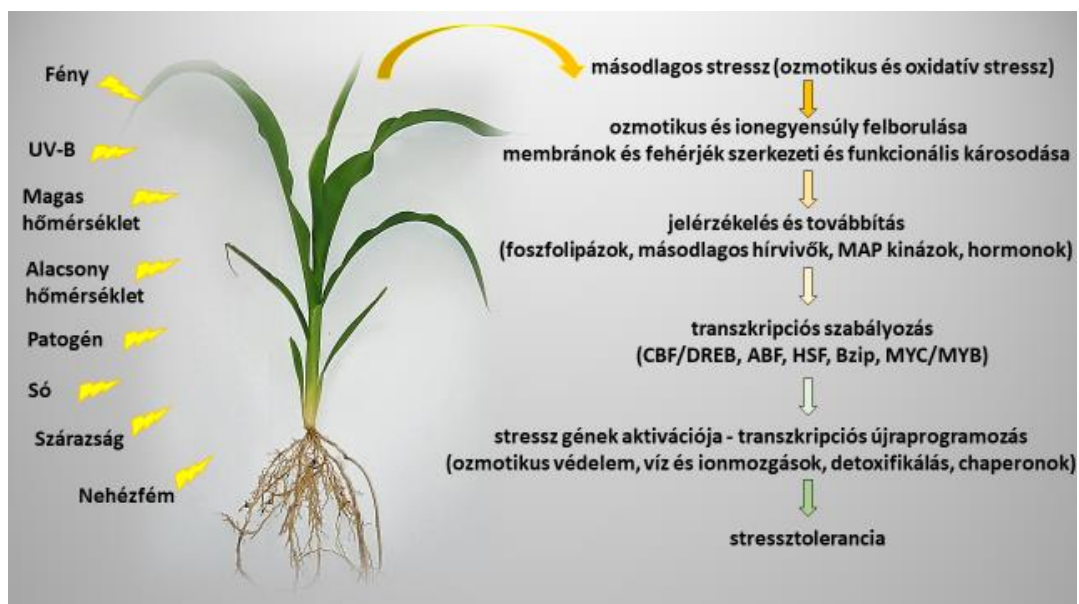
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A növényi stressz

2.1.1. A növényi stresszfolyamatokról általában

A növényekben a helyhez kötött életmód bonyolult védelmi mechanizmusok kialakulásához vezetett a különböző környezeti kihívások melletti fennmaradás érdekében. A stressztolerancia kialakításában egy - a stressz érzékelést a tényleges növényi válasz megjelenésével összekötő - komplex, számos helyen elágazó, majd konvergáló jelátviteli útvonal aktiválása segít a növényeknek (Sewelam és *mtsai.* 2016).

Számos szenzor létezik, melyek egy része elsődleges illetve specifikus, míg mások többféle stressz tényező esetén is aktiválódnak. Például a hőmérséklet változás jól ismert hatása a membránok fluiditásának megváltoztatása (Königshofer és *mtsai.* 2008), de ez nem feltétlenül az egyetlen jel, hiszen az intracelluláris fehérjék konformációjának változása szintén részt vehet az érzékelésben. A szenzorok felől a kezdeti jel, a már nem specifikus másodlagos jelekre (Ca^{2+} vagy növényi hormonok) továbbadva indítja el azt a kaszkád mechanizmust, melynek adott szintjein a különböző szignál molekulák egymással oda-visszaható kapcsolatban jelátviteli hálózatot alakítanak ki (Xiong és *mtsai.* 2002) (1. ábra).



1. ábra Növényi stresszválaszok. (Wang és *mtsai.* 2003 nyomán)

Nyilvánvaló, hogy nincs minden egyes stresszre specifikus lineáris jelátviteli útvonal, hanem olyan összekapcsolt hálózatok vannak, amelyek közös elágazásokat tartalmaznak, melyeken

keresztül a különböző utak „áthallása” (crosstalk) valósulhat meg. Az egyik legtöbbet kutatott közös elágazási pontot képviselik a reaktív oxigénformák (ROS), melyek mind biotikus, mind abiotikus stresszek esetén megjelennek (You és Chan 2015). Központi jelátviteli szerepük abból is adódik, hogy az „upstream” és a „downstream” irányban is bizonyítottan kapcsolatban állnak olyan más jelátviteli molekulákkal, mint a membránok, a NADPH-oxidázok, a G-proteinek, a Ca^{2+} , a redox homeosztázis, a mitogén aktivált protein kinázok (MAPK-ok), a növényi hormonok, a transzkripció faktorok (TF-ok) és a poliaminok (PA-ok).

Tekintettel arra, hogy jelen munka biotikus és abiotikus stresszfactorok hatását is vizsgálja, a következőkben az ezekkel kapcsolatos legfontosabb ismereteket tekintjük át.

2.1.2. *Lisztharmatfertőzés*

A lisztharmatok az *Erysiphales* rendbe tartozó externális, biotróf aszkuszos gombák, melyek a gazdasági növények egyik legközönségesebb és leggyorsabban módosuló kórokozói. A világ valamennyi mérsékelt övi növénytermesztő régiójában előfordulnak. Az időjárástól függően az általuk okozott fertőzés kisebb-nagyobb mértékben minden évben megjelenik, és mind maga a fertőzés, mind a fertőzés elleni vegyszeres védekezés komoly gazdasági, utóbbi környezeti és egészségügyi károkat is okozhat.

A biotróf gombák a megtámadott növényi sejteket nem azonnal pusztítják el, hanem hausztóriumait finoman a sejtbe bocsátva azokból nyerik a számukra szükséges tápanyagokat. Tehát a biotróf gomba érdeke, hogy a gazdanövény minél tovább életben maradjon, és fokozott anyagcseréje révén táplálja a gombát. Minden gabonafajt a saját specifikus lisztharmat patogénje károsít, amely más növényfajt nem képes megtámadni. A betegség már a hosszú meleg ősz folyamán megjelenhet, ennek következtében a növény növekedése és fejlődése csökken, áttelelési esélyei romlanak. Idővel a micéliumbevonat piszkos fehérré majd sárgává, barnássá válik, és még az aratás előtt megjelenik a gomba termőteste, mely segítségével a kórokozó képes áttelni. Tavasszal az elsődleges fertőzést a kazmotéciumból kiszabaduló aszkospórák indítják meg. A felnőttkori fertőzés csökkenti a gabonafélék szemtermésének mennyiségét és minőségét, különösen akkor, ha a zászlós leveleket a kalászos és szemtelítődés időszakában támadta meg a lisztharmat. A búzalisztharmat (*Blumeria graminis* (DC.) Speer f.sp. *tritici* Ém. Marchal) erős fertőzéskor, fogékony búzafajtán akár 35%-os termésvesztést is okozhat (Komáromi és *mtsai*. 2015). Éppen ezért a búzanemesítési programokban még mindig jelentős szelekciós feltétel a lisztharmattal szembeni ellenállóság. A rezisztens fajták sikeres létrehozásához nélkülözhetetlen a növények védekező és szabályozási folyamatainak alapos ismerete.

A fertőzött növény természetesen próbál a kórokozóval szemben védekezni. Hagyományosan a növényi válasz jellegétől függően kétféle típusú védekezési mechanizmust különböztetnek meg a

kórokozó–növény interakciókban. A legáltalánosabb védekezési forma a non-host (nem-gazda típusú) rezisztencia vagy alaprezisztencia, mely több gén által meghatározott mennyiségi tulajdonság, nem rasszspecifikus, és hosszú időn keresztül tartós hatású, illetve a host (gazdanövény) rezisztencia, amelyre a gén-génnel szembeni kapcsolat a jellemző. A lisztharmatgomba–növény kapcsolatokban, mind a non-host, mind a host rezisztencia esetében megfigyelhetők ugyanazok a növényi válaszok, pl. a papillaképződés a behatolási pontoknál, vagy a hausztóriumképződést követő hiperszenzitív reakció (HR), és az abból következő a programozott sejthalál (PCD), melyek együttesen korlátozzák a gomba fejlődését (Király 2004).

A növények legismertebb védekezési reakciója a HR. A reakciót követően létrejövő elhalások általában a ROS-felhalmozódás káros hatásának következményei. Azonban az elhalt foltokban és annak környékén nemcsak a reaktív gyökök halmozódnak fel, hanem jelentősen megnő az endogén szalicilsav (SA) és nitrogénformák szintje is (de Pinto és *mtsai.* 2012). A HR jelátviteli rendszerének tagjaként a SA fontos szerepet tölt be a patogéntámadással szembeni védekező folyamatokban (Kumar és *mtsai.* 2015). A növényekben a SA legnagyobb mennyiségben hőtermelő növények virágzásakor, illetve patogén fertőzés után mutatható ki. Általában néhány $\mu\text{g/g}$ friss tömeg mennyiségben szabad, glikozilált, metilált, glükóz-észter, valamint aminosav konjugátum formában is előfordulhat (Horváth és *mtsai.* 2007). A SA bioszintézise a sikiminsav-fenilpropanoid útvonalból indul ki. A fenilalanin először fahéjsavvá alakul a fenilalanin-ammonia-liáz (PAL) katalizálta reakcióban. Majd a fahéjsavból az aromás gyűrű hidroxilációs és az oldallánc oxidációs reakciójának sorrendjétől függően orto-hidroxi-fahéjsavon (oHCA) vagy benzoesavon, mint köztes terméken keresztül szintetizálódik a SA (Métraux 2002). Először baktériumokban mutatták ki a SA szintézis egy másik módját, majd *Arabidopsis* kloroplasztisban is azonosították a szintézisért felelős izokorizmat-szintáz (ICS) kódoló gént. Az is bizonyítást nyert, az ICS által szintetizált SA szükséges a szisztémikus szerzett rezisztencia kialakulásához (Wildermuth és *mtsai.* 2001).

Nemcsak a SA hatására nő meg a ROS mennyisége a sejtben, hanem a ROS-felhalmozódás is SA-szintézist vált ki. Ez a megfigyelés vezetett egy öngerjesztő SA- H_2O_2 ciklus hipotéziséhez, amely ciklus a ROS-felhalmozódást és a sejt halálát eredményezi (Van Camp és *mtsai.* 1998). Az SA-indukált jelátvitel kezdeti szakaszán egy oxidatív fázist figyelhetünk meg, amelyet a ROS-szintek átmeneti növekedése, valamint a glutation (GSH) redukált arányának csökkenése jellemez. Az oxidatív fázis során az SA-függő elsődleges válaszgének, így a különböző antioxidáns enzimek expressziója figyelhető meg (Han és *mtsai.* 2013). Az oxidatív szakaszt egy későbbi, redukzív szakasz követ, amely redox szabályozás alatt áll (Herrera-Vásquez és *mtsai.* 2015).

Mivel a HR egyik kulcslépése a H_2O_2 koncentrációjának emelkedése, feltételezhető, hogy a PA molekulák, melyek jelentős szerepet játszanak a növényi nitrogén molekulák forgalmában, lebontásuk révén szintén hozzájárulnak a H_2O_2 mennyiségének emelkedéséhez (Jiménez-Bremont és *mtsai.* 2014; Pál és Janda 2017) (részletesebben a 2.2. fejezetben). A fertőzött, beteg növényben

képződő ROS, nemcsak a kórokozó ellen hathat, de a gazdanövényt is károsíthatja. Ezen stressz helyzetben a szervezet kibillen eredeti egyensúlyi állapotából és alkalmazkodásra kényszerül ellenállóképessége határain belül. Ebből kifolyólag a nagyobb antioxidáns kapacitással rendelkező növények rezisztensebbek lehetnek többféle stressz okozta betegségtünettel szemben. A növényi védelem szerves részét képezik az antioxidáns rendszer tagjai, valamint más védővegyületek is, mint pl. a PA-ok. Feltételezhető, hogy a PA-ok bioszintézisének és katabolizmusának együttes emelkedése és/vagy egyensúlya fontos szerepet játszik biotikus stressz során (Prabhavathi és Rajam 2007; Pál és Janda 2017).

2.1.3. Szárazságstressz

A környezetből felvehető víz mennyiségének csökkenése a növényi szervezetben vízhiányt okoz. Amennyiben a vízhiány a növény korai növekedési periódusában enyhe formában és lassan alakul ki, a növények az akklimatizációs folyamat részeként, a metabolizmusuk, fiziológiai folyamataik és morfológiájuk megváltoztatásával reagálhatnak. A stressz befolyásolhatja a növények növekedését, a levelek expanzióját, befolyásolja a gyökérnövekedést, is, így a hajtás-gyökér arányt. Ha a stresszhatás a növényi növekedés befejeződése után vagy hirtelen lép fel, a növény gyors és hatékony válaszreakcióra kényszerül. Az egyik legelső, legáltalánosabban tanulmányozott válaszreakció a sztómazáródás, ami a relatív víztartalom csökkenés elkerülését eredményezi. Ennek a folyamatnak a szabályozásának a legfontosabb komponense az abszcizinsav (ABA) (Vishwakarma és mtsai. 2017). Az ABA-bioszintézis kiindulási vegyülete a zeaxantin a kloroplasztisban. Az utolsó plasztidban történő lépesként pedig a transz-violaxantin és transz-neoxantin hasítása az első elkötelezett és egyben sebesség korlátozó reakció, melyet a 9-cisz-epoxikarotinoid-dioxigenáz (NCED) katalizál és a létrejövő xantoxinból a citoplazmában szintetizálódik az ABA (Finkelstein 2013). A korábbi tanulmányok szerint az ABA a gyökérben szintetizálódik a vízpotenciál csökkenését követően, majd a gyökérből a xilémen keresztül jut el a hajtás különböző részeibe, mint egy hosszútávú stresszjelként (Hartung és mtsai. 2002). Azonban egyre világosabbá vált, hogy a hajtás vízhiányra adott válaszreakcióit nem befolyásolja a gyökér ABA szintetizáló kapacitása, sokkal inkább a hajtásban történő ABA-szintézis és jelátvitel indukálja (Christmann és mtsai. 2007)

A szárazság során aktiválódó géneket két csoportra oszthatjuk, ABA-függő és ABA-független gének. Az ABA indukálta, szárazságra aktiválódó gének promoterében egy konzervatív ACGT magot tartalmazó ún. ABA válaszelem (abscisic acid response Element: ABRE) található. Így ezen gének expressziója döntően a bázikus leucin-cipzárt tartalmazó transzkripciós faktorok (bZIP) közé tartozó ABRE-kötő proteinek vagy ABRE-kötő faktorok révén aktiválódik. Egy másik csoport a MYC/MYB transzkripciós faktorok által bekapcsolt szekunder válaszgének, melyek promóterében nincsenek ABRE-elemek (Tari és mtsai. 2003; Liu és mtsai. 2018). Az ABA-független gének

szabályozása a C-ismétlődés és a dehidrációra válaszoló cisz-ható elemek (C-repeat/dehydration-responsive element: CRT/DRE), valamint a C-repeat kötő faktorok (CBF) és a DRE-kötő fehérjék (DREB) együttműködése révén valósul meg (Liu és *mtsai*. 2018). A DREB1 és homológjai a hidegkezelésre, míg a DREB2 az ozmotikus stresszre specifikusak. Bizonyos esetekben azonban a CRT/DRE motívumok ABA-függő jelátvitel során való aktiválódását is leírták (Lata és Prasad 2011).

Maga a szárazság, mint stressz nem jár egyedül, ozmotikus és oxidatív stressz-szeel együtt jelentkezik, és ezek együttes hatása a növényi szervezetet számos szinten befolyásolja. Az indukálódott gének hatására számos olyan funkcionális vegyület és fehérje jelenik meg, melyek védenek a deszikkációtól pl.: LEA (late embryogenesis abundant), RAB (responsive to abscisic acid), prolin, és dehidrin, illetve a ROS detoxifikálásban szerepet játszó antioxidáns enzimek, valamint a növényi hormonok szintézisben résztvevő enzimek (Wang és *mtsai*. 2016).

A kompatibilis ozmolitok fontos szerepet játszanak a makromolekulák konformációjának fenntartásában az ozmotikus potenciál megváltozása során. A prolin a leggyakrabban előforduló ozmolit (Szabados & Saviouré 2010). A prolin glutaminsavból és ornitinből is képződhet. Az előbbi esetben a glutaminsav foszforilálódik és glutamil-szemialdehiddé redukálódik, mely reakciót a Δ^1 -pirrolin-5-karboxilát szintetáz (P5CS) katalizál. Majd a glutamil-szemialdehid spontán módon Δ^1 -pirrolin-5-karboxiláttá alakul, melyet a Δ^1 -pirrolin-5-karboxilát-reduktáz prolinná alakít. Az ornitinből kétféleképpen szintetizálódik a prolin. Az ornitin α -aminocsoportjának transzaminálódásával először α -keto- δ -aminovajsav keletkezik, mely ciklizálódás és redukció után alakul prolinná, vagy a δ -aminocsoport transzaminálódása során glutamil-szemialdehid az ornitin- δ -aminotranszferáz (OAT) katalizálta reakcióban és a fent leírt módon keletkezik prolin (Majumdar és *mtsai*. 2016). Nemrég kimutatták, hogy a kationos tulajdonsága révén szintén ozmolitként is viselkedő putreszcin (PUT) külsőleg adagolva, megemelte a prolinszintet, így védelmet nyújtott szárazságstressz esetén (Kotakis és *mtsai*. 2014). A prolin és a PUT kapcsolatát szintézis útjuk összekapcsolódása teszi érdekessé (lásd 2.2.1. pontban 2. ábra).

2.1.4. Alacsony hőmérsékleti stressz

A hidegstressz az anyagcsere valamennyi működését befolyásolja, hiszen minden biokémiai folyamat sebessége hőmérsékletfüggő. Egyes anyagcsere folyamatok esetében az alacsony hőmérséklet hatása csak a hidegstressz alatt jelentkezik, majd miután a növény visszakerül optimális hőmérsékletre, a funkció helyreáll. Ezzel szemben más folyamatok tartósan károsodhatnak a hideghatás megszűnése után is. A trópusi, szubtrópusi eredetű fajok jelentős hidegérzékenységgel bírnak, míg a mérsékeltövi növények nagy részében akklimatizációs (edződési) folyamatok mennek végbe a hideg hatására, melyek biztosítják a növény ellenállóságát az alacsony hőmérséklettel szemben. A télálló növényeknél ez a folyamat még a fagypont alatti hőmérséklet túlélésére is képessé

teszi a növényt. Egyes növényfajoknál pedig nemcsak a fagyállóság, hanem a virágzás indukciójához (vernalizáció) is szükséges a hideghatás.

A különböző eredetű növényfajok az alacsony, fagypont feletti hőmérsékletre eltérő érzékenységet mutatnak. A hideg károsító hatásával elsősorban a növény fejlődésének kezdeti szakaszában kell számolni, melyek jól látható jelei pl. a hervadás, a növekedés csökkenés, szöveti elhalás. Azonban az anyagcsere zavara és a fotoszintetikus rendszer károsodása már azelőtt jelentkezik, hogy a növényen a látható tünetek megjelentek volna. Tekintettel arra, hogy az anyagcserefolyamatok jelentős része membránhoz kötött, a membránok állapotának megváltozása kiemelkedő szerepet játszik a hidegstressz, illetve az alacsony hőmérséklethez való alkalmazkodás során (Baumann 2017).

A plazmamembrán lipidekből és fehérjékből épül fel. A lipidek pedig telítetlen és telített zsírsavakat tartalmaznak. Ez utóbbiak viszonylagos aránya meghatározza a membrán fluiditását. A hidegérzékeny növények plazmamembránjában általában nagyobb arányban vannak a telített zsírsavak, ebből adódóan, magasabb fázisátmeneti hőmérsékletet mutatnak. Ez alapján érthető módon a membránösszetétel különbségei részben megmagyarázhatják a hidegérzékenységben tapasztalt eltéréseket. Azok a növények, melyek képesek a hideg akklimatizációra, többszörösen telítetlen zsírsavakat halmoznak fel hidegstressz során. Irodalmi adatok szerint a kloroplasztisz membrán telített foszfatidil-glicerín (PG) tartalma összefüggésben lehet a fázisátalakulási hőmérséklettel, és ezáltal a növények alacsony hőmérsékletű alkalmazkodóképességével (Iba 2002). Hideg ellenálló növények esetében a telített zsírsavakat (palmitinsav: 16:0; sztearinsav: 18:0) tartalmazó PG mennyisége kevesebb, mint 20%, de hidegérzékeny növények esetében ez 40% vagy ennél is több (Murata és *mtsai.* 1992). A többszörösen telítetlen zsírsavak szintjének fenntartása szükséges az alacsony hőmérsékleti stressz túléléséhez és a kloroplasztisz membránok normál szerveződéshez hidegstressz során (Upchurch 2008). Kimutatták, hogy növényi levél lipidextraktumának PG frakciójában a *transz*- Δ^3 -hexadekánsav (t16:1) mennyisége fordított arányban van a fagyállósággal búzában (Szalai és *mtsai.* 2001). A megemelkedett fluiditás hátterében egyrészt a telítetlen lipidek arányának növekedése áll, bár feltételezik, hogy tilakoid membránok esetében - ahol a telítetlen lipidek aránya általában eleve magasabb - a fluiditásváltozás a lipid/fehérje arány megváltozásának az eredménye (Chapman és *mtsai.* 1983).

Hideghatás szempontjából a fotoszintetikus apparátus a növény egyik legérzékenyebb pontja. Hidegstressz hatására a leveleken klorotikus foltok jelennek meg, melynek oka, hogy alacsony hőmérsékleten gátolt a klorofill molekulák bioszintézise, az etioplasztiszok és kloroplasztiszok fejlődése (Böddi és *mtsai.* 1997). A fénygátlás (fotoinhibíció) jelensége, melynek során a magas fényintenzitásnak kitett növény fotoszintetizáló képessége károsodik, alacsony hőmérséklet hatására már viszonylag alacsony fényintenzitáson is, pár óra elteltével felléphet (Szalai és *mtsai.* 2018). Kimutatták továbbá, hogy az alacsony hőmérséklet által indukált fotoinhibíció nemcsak a

fotoszintetikus folyamatok, hanem egyéb stresszmarkerek, úgymint szabad aminosavak és PA-ok szintjén is megnyilvánul (Szalai és *mtsai.* 1997). PA-ok polikationos tulajdonságuk révén, erősen tudnak kötődni negatív töltésű makromolekulákhoz, pl. fehérjékhez, lipidekhez, így képesek stabilizálni a foszfolipid-kettősréteget, valamint a tilakoidok molekuláris komplexeit. A PA-ok és a fotoszintézis közötti kapcsolatot számos eredmény bizonyítja. A PA-szintézis fény által szabályozott és az ATP szintjével korrelál (Hamdani, Yaakoubi, és Carpentier 2011), de a PA-ok is képesek befolyásolni a fotoszintézist. Putrescinnel (PUT) történt kezelés megemelte a fotoszintetikus pigment tartalmat (Mahgoub, Abd El Azis, és Mazhar 2011), lipid-felhalmozódást okozott és növelte a plasztoglobulusok számát a kloroplasztiszokban (Shu, Guo, és Yuan 2012). A PUT képes fotoszintetikus komplexekhez is kötődni pl. növelve az LHCII antenna komplex méretét, vagy a PSI és PSII magproteineihez kötődve azok stabilitását (Navakoudis és *mtsai.* 2007). A PA-ok fotoszintetikus komplexekhez és fehérjékhez kötődését a transzglutamináz enzim katalizálja, melynek aktivitása megemelkedik magasabb Ca^{2+} illetve fény hatására (Hamdani és *mtsai.* 2011).

Az alacsony hőmérsékletre való akklimatizáció kialakulása hormonális szabályozás alatt áll. A növényekben hideg hatására megnőtt az ABA szintje (Miura és Furumoto 2013), mely a leggyakrabban vizsgált növényi hormon a stresszfiziológiában. Különböző kukorica genotípusokban azt is kimutatták, hogy szoros összefüggés van a hidegtolerancia és az ABA-akkumuláció között (Janowiak és *mtsai.* 2002). Ezek alapján feltételezhető, hogy a hideg-toleranciának feltétele, hogy a növény gyorsan és hatékonyan tudjon ABA-t szintetizálni. Továbbá, az ABA-kezelés képes csökkenteni a hideg okozta károsodásokat (Bakht és *mtsai.* 2006). Mindezek ellenére, habár az ABA-függő jelátvitel és transzkripció szabályozás szükséges, de önmagában nem elégséges a sikeres hideg akklimatizációhoz, mivel nem valamennyi hideg-indukálta gén aktiválható ABA-val (Theocharis, Clément, és Barka 2012; Li és *mtsai.* 2014). Arról is megoszlanak a vélemények, hogy az ABA-akkumuláció közvetlenül a hideg hatásának köszönhető, vagy pedig az alacsony hőmérsékleten fellépő vízhiány okozza.

Az alacsony hőmérséklet indukálta endogén SA-szint, különösen kötött formájának változásait számos növényfaj esetén leírták (Pál és *mtsai.* 2013). A SA-szintézisben, vagy a SA-nak a kloroplasztiszba történő transzportjában deficiens mutánsok, illetve a SA felhalmozásra képtelen transzgenikus *Arabidopsis* növényekkel (*NahG*) folytatott kísérletekben bizonyították, hogy habár ezen genotípusokban a SA mennyisége alacsonyabb, mint a vad típusban, de hidegkezelés hatására a kötött SA szintje ezekben is megemelkedik, és szoros, negatív kapcsolat mutatható ki a SA-szint és az alacsony hőmérsékleten fenttartott növekedés között (Majláth és *mtsai.* 2011). Ezzel szemben a megfelelő koncentrációban, külsőleg adagolt SA számos esetben védelmet nyújtott a hideg okozta károsodással szemben (Janda és *mtsai.* 1999; Horváth és *mtsai.* 2007).

A hideg akklimatizáció a lipid és hormonális szinten történő változások mellett komplex metabolikus folyamatokat foglal magában, így olyan stressz-reszponzív vegyületek felhalmozódását

is, mint az oldható cukrok, aminosavak és PA-ok, illetve az antioxidáns védekező rendszer aktiválódását (Yadav 2010; Chen és mtsai. 2014). Tekintettel arra, hogy az alacsony hőmérséklet károsító hatásának is egyik fő oka a ROS-felhalmozódás, az antioxidáns rendszer válasza különleges fontosságú a hidegstressz elleni védelemben is. Különböző gabonafélék összehasonlítása során az antioxidáns enzimek közül legszorosabb korrelációt a fagytoleranciával a gvajakol-peroxidáz (G-POD) és az aszkorbát peroxidáz (APX) enzimek mutatták (Shu és mtsai. 2012). Rizs növényekben alacsony hőmérséklet hatására szintén gyors növekedést tapasztaltak az APX és a G-POD aktivitásában (Oidaira és mtsai. 2000). A PA-ok direkt antioxidáns tulajdonságuk mellett, képesek aktiválni az antioxidáns enzimeket, sőt azok génjeinek expressziós szintjét is megemelni (Kuznetsov és Shevyakova 2007). Kimutatták továbbá, hogy a PA szintézisgénnek magasabb génexpressziója miatt, nagyobb mértékű PA-halmozódást mutató transzgenikus *Arabidopsis* növények magasabb fagytolerancia szinttel rendelkeztek (Kuznetsov és Shevyakova 2007). Ezzel szemben, olyan mutáns *Arabidopsis* növényekben, melyek nem tudtak PUT-t szintetizálni, csökkent a hidegtűrés, de ez külsőleg adagolt PUT-nel vagy ABA-val kivédhető volt. Érdekes módon azoknál a mutánsoknál, melyek nem tudtak ABA-t szintetizálni, a külsőleg adagolt PUT nem védett a hideg ellen, csak ha a növény ABA-t is kapott. Ebből arra következtettek, hogy az ABA-szintézis a PUT szabályozása alatt áll (Cuevas és mtsai. 2008).

Azon vegyületek jelentős része, melyekről kiderült, hogy a hideghatásra adott válaszban bizonyos gének expressziójának regulációjában szerepet töltenek be, az ún. CBF (C-repeat binding factor) transzkripció faktorok voltak. A számos hidegstressz-szel kapcsolatos jelátviteli útvonal közül a legjobban tanulmányozott a CBF/DREB1-függő útvonal. Azonban az alacsony hőmérséklet által befolyásolt gének jelentős részének szabályozásában Ca^{2+} , ABA, ROS-függő, illetve MAPK (mitogén aktivált protein kináz) aktivált jelátviteli utak is részt vesznek (Miura és Furumoto 2013).

2.1.5. **Kadmiumstressz**

A kadmium (Cd) legnagyobb mennyiségben az erőművek, kohók, üzemek tevékenysége révén, a szennyvíziszappal és egyéb hulladékokkal kerül a környezetbe, de nagy forgalmú utak mentén is nagyobb mennyiségben kerül a talajba, a levegőbe (Kacholi és Sahu 2018). A nem szennyezett talajokban a Cd koncentrációja átlagosan 0,04–0,32 μM , mérsékelten szennyezett talajokban 0,32–1 μM körüli. Azonban az ettől nagyobb mennyiségű Cd-ot tartalmazó talajokon már csak a Cd-ot tolerálni, illetve hiperakkumulálni képes fajok, például egyes disznóparéjfélék (*Amaranthus retroflexus* L.), pillangósvirágúak (*Phaseolus acutifolius* A. Gray), keresztesvirágúak (*Thlaspi caerulescens*, *Arabidopsis halleri*) és fűzfafélék (*Salix viminalis* L.) élnek meg (Cosio és mtsai. 2004; Schmidt 2003).

A Cd, mint kétértékű fémion képes más, szintén kétértékű fémionokat helyettesíteni, például az esszenciális elemek közé tartozó cinket és vasat, ezért már kis koncentrációban is nagyon mérgező a növények, az állatok és az emberek számára egyaránt. Mivel a Cd-ot a növények képesek felhalmozni a szervezetükben, az a táplálékláncon keresztül bekerülhet az állatokba és az emberekbe, ahol többek között károsítja a mitokondriumokat és apoptózis vagy nekrosis általi sejthalált indukál, ami később szövetgyulladásához és fibrózishoz vezethet, ezen kívül a máj, a vesék, a csontok, az ivarszervek, az idegrendszer kóros elváltozását okozza (Rahimzadeh és *mtsai*. 2017).

A Cd bejutva a növényi sejtbe, a citoszólban és a sejtorganelumokban számos növényi anyagcsere folyamatot befolyásol. Kölcsönhatásba léphet fehérjékkel, így csökkentve az enzimek aktivitását (Sanità Di Toppi és Gabbrielli 1999). Gátló hatását kifejtheti azáltal, hogy a fehérjék szulfhidril csoportjaihoz kötődik, vagy a metalloproteinek esszenciális fémionjait (Zn^{2+} , Ca^{2+}) helyettesíti, ugyanakkor konformáció-változást indukálva is csökkentheti az enzimek hatékonyságát (Van Assche és Clijsters 1990).

A Cd gátolja az egyik legfontosabb metabolikus folyamatot, a fotoszintézist. Károsítja a kloroplasztiszokat, döntően a gránumtilakoidokat érintő membrán dezorganizáció révén (Souza és Rauser 2003). Gátolja a klorofill bioszintézisét, és csökkenti a teljes klorofill- és karotinoid-tartalmat. A PSII körüli elektrontranszportot a tilakoid membrán és polipeptid-összetétel megváltoztatásával, és zsírsavak felszabadításával gátolhatja, de a vízbontó komplex működését is gátolja (Parmar és *mtsai*. 2013). A fotoszintézis hatékonyságát a Calvin-ciklus kulcsenzimeinek gátlásával is csökkentik a nehézfémionok. Kimutatták, hogy a Cd gátolja a foszfoenolpiruvát-karboxiláz (Vojtechov és Lebllov 1991), a ribulóz-1,5-bifoszfát-karboxiláz (Kranterev és *mtsai*. 2006), a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz, izocitrát-dehidrogenáz és malát enzim aktivitását is (Lagriffoul és *mtsai*. 1998). Mivel a Cd a Calvin-ciklus enzimeit gátolja, csökken a NADPH felhasználás és a PSI redukáló oldalán az oxigén molekulák egy elektronos redukciója következik be, így hatását itt indirekt módon fejt ki.

Számos abiotikus stressz, így a nehézfémstressz során is megnő a ROS-koncentráció a sejtekben (Kohli és *mtsai*. 2017). A Cd^{2+} kation más fémekkel (Cu, Fe) ellentétben nem képes részt venni a Fenton-reakcióban, ennek ellenére oxidatív stresszt és lipidperoxidációt indukál (Shah és *mtsai*. 2001). Nehézfémstressz során az antioxidáns enzim-aktivitásoknak mind indukcióját, mind gátlását számos növényfajban, különböző szövetekben leírták, így bizonyított, hogy az antioxidáns rendszer a nehézfémstressz érzékeny szenzora (Iannelli és *mtsai*. 2002; Pál és *mtsai*. 2005; Kranterev és *mtsai*. 2006; Mishra és *mtsai*. 2006; Hasan és *mtsai*. 2015; Cheng és *mtsai*. 2016).

A SA egyik legfontosabb szerepe a növényi stresszválaszok szabályozásában az antioxidáns kapacitás növelése (Ghanta és *mtsai*. 2014). A SA szerepét a nehézfém-toleranciában mind a Cd-indukálta SA-felhalmozódás (Pál és *mtsai*. 2005; Kranterev és *mtsai*. 2008; Chao és *mtsai*. 2010), mind a SA-kezelés Cd-stressz-szel szembeni védőhatása bizonyítja (Pál és *mtsai*. 2002; Metwally és *mtsai*. 2003).

Az antioxidáns védekező rendszer, az aszkorbát-glutation ciklus nem enzimatisz elemének, a GSH-nak központi feladata van a sejt megfelelő redox állapotának fenntartásában, így stressz körülmények között szerepe megnő. A GSH bioszintézise során az első lépésben ciszteiből és glutaminsavból a γ -glutamil-cisztein szintetáz enzim katalizált reakcióban γ -glutamil-cisztein (γ -EC) szintetizálódik, majd GSH szintetáz egy γ -EC és glicin ligálásával hozza létre a GSH-t. Eltérő irodalmi adatok vannak arra vonatkozóan, hogyan befolyásolja a Cd-kezelés a cisztein, a γ -EC és a GSH szintjét kukoricában. Az irodalmi adatok eltérőek lehetnek az alkalmazott Cd-koncentráció, a kezelés idejének függvényében, illetve a növény kora is befolyásolja (Drażkiewicz és mtsai. 2003; Souza és Rauser 2003; Mendoza-Cózatl és mtsai. 2005; Pál és mtsai. 2006; López-Climent és mtsai. 2014; Tarhan és Kavakcioglu 2016). Cd-stressz során a GSH-szintézis két limitáló reakcióját katalizáló enzim a γ -EC szintetáz és GSH szintetáz aktiválódását (Szalai és mtsai. 2002), valamint a GSH védő hatását írták le a növekedési paraméterekre és a klorofill molekulákra (Drażkiewicz és mtsai. 2003).

A Cd-stresszre adott válaszreakció során a növényi sejt számos védelmi rendszert vehet igénybe. Az általános stresszelmélet analógiájára a nehézfém-toleranciát eredményező mechanizmusok egyik csoportját az elkerülési-stratégiát, a másikat a tolerancia-stratégiát alkalmazó növények alkotják (Hall 2002). Az elkerülési mechanizmust a nehézfém felvételének korlátozásával – így azok kizárásával a szövetekből – valósítják meg a növények. A tolerancia mechanizmust alkalmazók a nehézfémek aminosavak, fehérjék, peptidek általi lekötésével képesek a nehézfémeket akkumulálni, tárolni és immobilizálni.

A GSH SH-csoportja révén maga is képes a nehézfémek megkötésére, de az aktiválódott bioszintézise a Cd-stressz során tapasztalt megnövekedett fitokelatin (PC) produkció során is fontosává válik. A fitokelatinokat növényekben először Grill és mtsai. (1985) izolálták *Silene cucubalis* sejtszuspenziós kultúrából. A fitokelatinok struktúrája: $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, ahol az n a $\gamma\text{-Glu-Cys}$ egységek ismétlődésének a száma, mely általában 2-11. Elsődleges struktúrájukat: $[\text{Cd}_3(\text{PC}_3)_4]$, amely különálló $\text{Cd}(\text{SCys})_4$ egységeket tartalmaz, Strasdeit és mtsai. (1991) határozták meg. A peptid SH: Cd molarány 3,78, amely a komplex Cd-mal való telítése után 1,01-re csökken (Rauser és Meuwly 1995). Ez utóbbi arányt írták le kukoricagyökérben is, ami azt jelenti, hogy minimális SH mennyiséggel, maximális Cd-megkötésre képes a gyökérben képződött PC, míg kukoricalevélben ez az arány 3,41 – 4,73, ami a fitokelatinok túltermelésére utal (Drażkiewicz és mtsai. 2003). A szintézisükért felelős enzim a γ -EC dipeptidil transzpeptidáz (fitokelatin szintáz: PCS), melynek szubsztrátja a GSH. A PC-szintézis első lépése, a γ -EC dipeptid létrehozása a GSH-ból fémion jelenlététől független, míg a második lépés fémion-függő transzpeptidáció. Az enzim nehézfémstressztől függetlenül expresszálódik, de elsődlegesen a nehézfém jelenléte aktiválja (Cobbett 2000).

A PC-ok kis molekulatömegű komplexeket (LMW) képeznek a Cd-mal, majd ATP-függő ABC-transzporterek juttatják az LMW PC-Cd komplexeket a vakuólumokba (Brunetti és mtsai. 2015). Ezek a komplexek savlabilis kénnel (S^{2-}) és további Cd megkötésével hozzák létre a nagy molekulatömegű (HMW) komplexeket, melyek stabilabbak, nagyobb az affinitásuk a Cd-ra és többnyire hosszabb peptidekből állnak (Rauser 2003). A vakuólumban savas pH uralkodik, így a HMW komplexek disszociálnak. A Cd vakuoláris szerves savakkal (citrát, oxálsav, malát), és valószínűleg aminosavakkal képez komplexet, míg az apo-PC-ok vagy hidrolázok által lebontódnak, vagy visszajutnak a citoszólba (Sanità Di Toppi és Gabbrielli 1999).

Már egészen alacsony Cd-koncentráció (0,05 μM), 24 óra elteltével elegendőnek bizonyult a PC-szintézis serkentéséhez, magasabb koncentrációk esetében pedig pár óra elteltével megjelennek a 2-4 tagszámú PC-ok (Tukendorf és Rauser 1990). A Cd jelentős része a gyökérben akkumulálódik, és a PC-ok jelentőségét mutatja, hogy a gyökér Cd-tartalom 88–89%-a LMW és HMW komplexekben fordul elő. A hajtásba áttátaban kevesebb Cd transzportálódik és annak is csak 27%-a van jelen PC-nal kötött formában. Ugyanakkor a hajtás nagyobb koncentrációban tartalmaz PC-okat, mint a gyökér (Souza és Rauser 2003).

Kimutattuk, hogy Cd-kezelés hatására a kukorica levelében az *in vivo* PC₂-szint nem változott, de az *in vitro* PCS-aktivitás megemelkedett. Ellenben a gyökérben az *in vivo* PC₂-szint megemelkedett, és ez a megemelkedett PC-szint felelős lehet a Cd hatékony detoxifikálásáért és vakuoláris kompartmentalizációjáért. A gyökérben tapasztalt *in vitro* PCS-aktivitás csökkenés a kontrollhoz képest, a PC-ok gyors akkumulációjával magyarázható. Eredményeink megerősítették azt a feltételezést, hogy míg a gyökérben a PCS enzim jelenléte konstans, addig a levélben a Cd jelenléte szükséges a szintézisének indukciójához (Pál és mtsai. 2006).

Napjainkig ellentmondások tapasztalhatók az irodalomban a nehézfém-tolerancia és a PC-szintézis közötti kapcsolatot illetően (Yadav 2010; Pál és mtsai. 2018a). Továbbá mivel a PC-ok GSH-ból szintetizálódnak, a PC-szintézissel párhuzamosan a GSH-szint csökkenhet, így PC-ok szintézise energiaigényes folyamat, mivel sejteknek helyre kell állítaniuk a GSH-szintet. A PC-szintézis „költsége” akár a gyökérnövekedés csökkenése is lehet (Meuwly és Rauser 1992).

A PC-ok szintézise összefüggésben van a PA-ok szintézisével (lásd a 2.2.1. pontban 2. ábra). A lehetséges antagonista viszony mellett pedig a PA-ok is rendelkeznek nehézfém megkötő képességgel (Lomozik és mtsai. 2005). A PA-ok nehézfém stressztoleranciában betöltött szerepét bizonyítja, hogy a szintézisük aktiválódik nehézfém kitettség során, illetve hogy a külsőleg adagolt PA-ok védelmet nyújthatnak a nehézfém kiváltotta oxidatív stressz során döntően az antioxidáns rendszer serkentése révén (Groppa és mtsai. 2001; 2007; Tang és mtsai. 2005; Zhao és Yang 2008).

2.1.6. UV-B sugárzás

Az ultraibolya (UV) sugárzás a fény hullámhosszától függően négy tartományra osztható: UV-A-ra (315-425 nm), UV-B-re (280-315 nm), UV-C-re (185-280 nm) és UV-V-re (100-185 nm). A sztratoszférikus ózonréteg elnyeli az UV-V és UV-C egészét, valamint az UV-B sugárzás alacsonyabb hullámhosszú részét, de az elvékonyodása, valamint az ózonlyukak miatt jelentős mennyiségű, az élő szervezetre káros hatású UV sugárzás éri a földfelszínt (Herndon és *mtsai.* 2018).

Bár az UV-B változatos módon befolyásolja a magasabbrendű növényeket, legáltalános hatása, hogy csökkenti a növekedést (Zuk-Golaszewska 2003). Az elmúlt évtizedekben számos tanulmány mutatta be az UV-B sugárzás hatását a növényi sejten belül, úgymint a genomot, a fotoszintetikus apparátust, a membránokat érintő károsodások (Fedina és Velitchkova 2009; Zlatev és *mtsai.* 2012; Fu és Shen 2017). Azonban a természetben is előforduló, valós UV-B dózis hatásainak vizsgálatakor arról számoltak be, hogy a szárazföldi növények növekedésére nincs negatív hatással (Ballaré és *mtsai.* 2011). Kisebb dózisban az UV-B sugárzás számos jelátviteli folyamatot képes szabályozni károsítás nélkül. Ezek a folyamatok leginkább növekedéssel kapcsolatos válaszok, valamint a fénystressz elleni akklimáció, vagy hosszabb távon adaptációs folyamatok részei. Az UV-B sugárzás által elindított jelátviteli folyamatokban kulcsszerepet játszik az UV RESISTANCE LOCUS 8 (UVR8) fehérje, amit UV-B specifikus fotoreceptorként azonosítottak (Rizzini és *mtsai.* 2011). Bizonyított, hogy az alacsony dózisú UV-B sugárzás indukálja az antioxidáns rendszer enzimatisz elemait (Majer és *mtsai.* 2014; Czégény és *mtsai.* 2016), de a szintén antioxidáns tulajdonságú flavonoidok felhalmozódását is (Gondor és *mtsai.* 2014). Azonban úgy tűnik, hogy nem az alacsony UV-B dózis hatására módosuló antioxidáns metabolizmus képezi a hidat a génexpressziós változások felé, hanem az UVR8 által vezérelt jelátviteli hálózat (Hideg és *mtsai.* 2013).

Az UV-B hatásai a természetben más stresszekkel, például szárazsággal, extrém hőmérséklettel, más hullámhosszú és/vagy dózisú fénnel, antropogén hatásokkal együtt jelentkeznek. Mivel az alacsonyabb dózisú UV-B sugárzás, mint eustressz morfológiai, anyagcsere és génexpressziós változásokat okoz, pl. az antioxidáns rendszer stimulálásán is keresztül, ami a növények általános akklimációjához vezet, védelmet nyújthatva másodlagos stresszekkel szemben (Hideg és *mtsai.* 2013).

UV-B-válaszok kialakulásához az UVR8 jelátviteli hálózat mellett nagyban hozzájárul a hormonális rendszer is. Összességében elmondható, hogy a növekedésre ható hormonok működését az UV-B sugárzás gátolja, míg a stresszválaszokhoz kapcsolt hormonok működését elősegíti (Vanhaelewyn és *mtsai.* 2016). Az egyik legfrissebb tanulmány szerint például a szalicilsav- és a jázmonsav-kezelések hasonló génregulációs folyamatokat indítanak el, mint az UV-B sugárzás (Vandenbussche és *mtsai.* 2018). Emellett az UV-B sugárzás SA-felhalmozódást kiváltó hatása

(Bandurska és Cieślak 2013), valamint a SA-kezelés UV-B stressz csökkentő hatása is ismert (Martel és Qaderi 2016).

A szabad és kötött PA-tartalmat is befolyásolja az UV-B sugárzás különböző növényekben (Mapelli és *mtsai.* 2008). Direkt védőhatásukat kifejtethetik mind a DNS, mind a fotoszintetikus komplexek stabilizálása által UV-B stressz során (Sfichi és *mtsai.* 2004; Esmer és *mtsai.* 2017).

2.2. Poliaminok

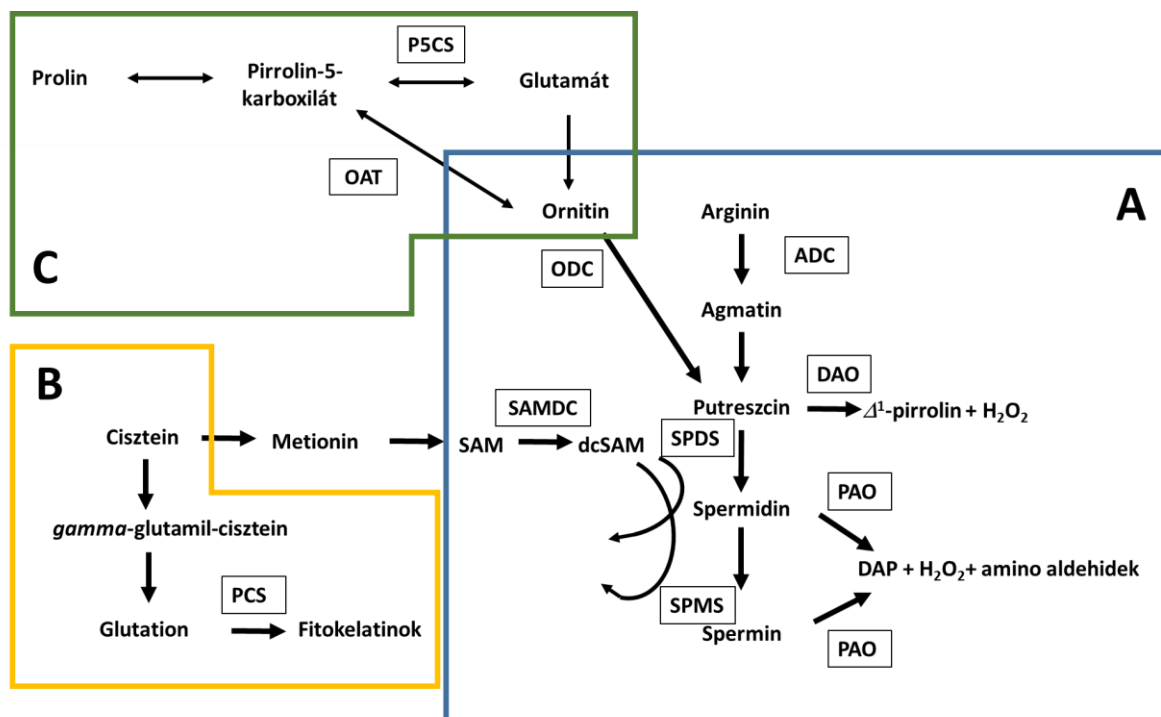
2.2.1. Poliaminok a növényekben, szintézisük és általános élettani szerepük

A PA-ok minden élő sejtben előforduló alifás aminok. A növényekben a legelterjedtebb PA-ok a viszonylag nagy mennyiségben megtalálható PUT, spermidin (SPD) és spermin (SPM). Azonban a kevésbé gyakori PA-ok, például az agmatin, a kadaverin (KAD) és a termospermin esetében is kimutatták különböző specifikus szerepüket. A természetben a PA-ok általában szabad formában fordulnak elő, de összekapcsolódhatnak kis molekulákkal, például fenolsavakkal konjugált formát vagy különböző makromolekulákkal kötött formát alkotva. A növényi hormonoknál jóval nagyobb mennyiségben előforduló PA-ok szintje jelentős eltérést mutat a növényfaj, a szerv és a fejlődési szakasz függvényében.

A PA-ok metabolizmusának bioszintetikus útjáról és főbb enzimjeiről átfogó adatokkal rendelkezünk (Tiburcio és *mtsai.* 2014). Röviden, a PUT létrejöhet az ornitin dekarboxilezésével, az ornitin-dekarboxiláz (ODC) katalizálta reakcióban, vagy közvetetten az agmatinon keresztül, az arginin dekarboxilezésével, az arginin-dekarboxiláz (ADC) hatására. A magasabbrendű PA-ok (SPD és SPM) a PUT-ből keletkeznek aminopropil-csoportok sorozatos kapcsolódásával, a spermidin-szintáz (SPDS), valamint a spermin-szintáz enzimekkel (SPMS) katalizált reakciókban. A PA-ok lebontását a diamin-oxidáz (DAO) és a poliamin-oxidázok (PAO) katalizálják az apoplasztban. Előbbiek a PUT-re és - a lizinből szintetizálódó - KAD-re, utóbbiak pedig a SPD-re és SPM-re specifikusak és a reakció során 1,3-diaminopropán (DAP) képződik. A PA készlet időben dinamikusán változik, és a PA-ok egymás közti átalakulása gyorsan végbemegy a PA-ciklus során. A SPD és SPM végső lebontását katalizáló oxidázok (DAO és PAO) mellett az *Arabidopsis*-ban öt, a rizsben három olyan PAO enzimet mutattak ki, amelyek részt vesznek a SPM SPD-né, és a SPD PUT-né történő részleges és/vagy teljes visszaalakításában a peroxisómákban (Takahashi és *mtsai.* 2010; Liu és *mtsai.* 2014) (2. A ábra).

A PA-ok szintézisük révén számos más védővegyület metabolizmusával kapcsolatban állnak. A magasabbrendű PA-ok (SPD és SPM) szintéziséhez szükséges amino-propil csoport a dekarboxilált S-adenozilmetioninből származik (dcSAM), melyet az S-adenozilmetionin-dekarboxiláz enzim (SAMDC) SAM-ból képez, mely utóbbi pedig metioninből szintetizálódik. Mivel mind a metionin, mind a GSH prekursora a cisztein, a PA-ok szintézis nem csak a GSH, de a PC-ok

szintézisével is kapcsolt (2. B ábra). A prolin és a PUT szintézise szintén közös prekúzzorral rendelkezik, mivel mindkettő a glutamátból indul ki (2. C ábra).



2. ábra A poliamin-metabolizmus (A) a fitokelatin-szintézissel (B) illetve a prolinszintézissel (C) összefüggésben. ADC: arginin-dekarboxiláz; PAO: poliamin oxidáz; DAO: diamin-oxidáz; DAP: 1,3-diaminopropán; dcSAM: dekarboxilált S-adenozilmetionin; OAT: ornitin aminoszintézis; ODC: ornitin-dekarboxiláz; P5CS: Δ^1 -pirrolin-5-karboxilát szintáz; PCS: fitokelatin szintáz; SAM: S-adenozilmetionin; SAMDC: S-adenozilmetionin-dekarboxiláz; SPDS: spermidin-szintáz; SPMS: spermin-szintáz.

A PA-oknak korábban egyszerű védő hatást tulajdonítottak. A fiziológiás pH-tartományban mutatott kationos jellegük miatt képesek reverzibilis kölcsönhatásba lépni a negatív töltésű makromolekulákkal, ezáltal stabilizálják szerkezetüket, különösen stresszhatás alatt. Képesek kötődni a membránok foszfolipid fejcsoportjához, így befolyásolva azok permeabilitását. Különböző fehérjékhez is kötődhettek nem specifikus úton, és a szerkezetükben így beállt változás révén módosul működésük. Szabályozzák az iontranszportot, részben közvetlen módon az ioncsatornához kötődésük révén (Pottosin és Shabala 2014). Szintén direkt kötődésnek köszönhetően képesek az antioxidáns enzimeket is serkenteni (Liu és mtsai. 2015). A PA-ok és a fotoszintézis közötti kapcsolatra szintén számos bizonyíték létezik, pl. a PA-ok, a transzglutamináz hatására, fotoszintetikus komplexekhez kapcsolódnak (Hamdani és mtsai. 2011), aminek eredményeként stresszhatás alatt fokozódik a fotoszintézis (Ioannidis és mtsai. 2012). Ha kromatinhoz kötődnek,

megváltozik a genom adott pontjainak érzékenysége a DNS- vagy RNS-polimerázokkal szemben, ami módosult DNS- és RNS-szintézishez vezet (Lightfoot és Hall 2014). Közvetlen védő szerepük mellett a PA-ok jelátviteli molekulaként is részt vesznek a különféle alapvető sejt folyamatok szabályozásában, úgymint sejtosztódás, differenciálódás, proliferáció, sejthalál, DNS- és protein-szintézis, valamint génexpresszió (Alcázar és mtsai. 2010).

2.2.2. *Poliaminok szerepe a növényi stressztűrésben*

Számos tanulmány (Liu és mtsai. 2014; Fariduddin és mtsai. 2013; Minocha és mtsai. 2014) vizsgálta már a kapcsolatot a stressztűrés és a PA-ok stresszhatás alatti fokozott szintézisének képessége között. A PA-ok szintézisében szerepet játszó egyes gének (*ADC*, *SPDS*, *SPMS*, *SAMDC*) promóter régiójában stressz válaszreakciót adó elemeket is azonosítottak, igazolva a stressz hatására gyorsan beinduló PA-bioszintézis pozitív szerepét (Parvaiz és mtsai. 2012; Pottosin és Shabala 2014). Azokban a növényekben, amelyekben a PA-ok bioszintézisében részt vevő enzimeket kódoló gének túlexpresszáldtak, nagyobb mértékű volt a PA-ok akkumulációja és ellenállóbbnak bizonyultak a különféle stresszhatásokkal szemben (Kasukabe és mtsai. 2004; Ye és mtsai. 1997; Pillai és Akiyama 2004). Ez arra utalhat, hogy a PA-ok erőteljesebb szintézise mindenféle stresszhatással szemben hatékony. Az eddig elvégzett vizsgálatok többsége a PA-ok jótékony hatásaira összpontosított, és a stressztűrés valamint a megnövekedett PA-tartalom közötti összefüggést hangsúlyozta. Azonban a valós helyzet ennél bonyolultabb. Míg egyes növényeknél stresszhelyzetben a PA-ok felhalmozódása figyelhető meg, addig másoknál az endogén PA-tartalom állandó marad, vagy éppen csökken, és az egyes növényfajok is eltérő válaszreakciókat mutatnak az egyes PA-ok szintjének tekintetében is. A 1. táblázat a teljesség igénye nélkül mutatja be néhány növényfaj esetén - egyes esetekben a stressztolerancia mértéke is fel van tüntetve – a három legáltalánosabban tanulmányozott PA (PUT, SPD és SPM) mennyiségében tapasztalt változásokat adott stressz körülmények között.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy nehéz közvetlen összefüggést kimutatni a PA-ok, különösen az egyes PA-ok magasabb szintje és a stressztűrés között. A sótűrés rizsben a SPD-szinttel pozitív, a SPM-szinttel viszont negatív korrelációt mutatott (Do és mtsai. 2014). Csicsereiborsónál a szárazságra érzékeny termesztett változatnál stresszhelyzetben nagyobb volt a PUT, SPD és SPM kezdeti akkumulációja, mint az aszálytűrő vad fajban (Nayyar és mtsai. 2005). Hidegedzés során a PUT-tartalom az őszi búzában jelentősen növekedett, míg a tavaszi búzában csökkent, a SPD-tartalom ugyanakkor mindkét növényben növekedett, a SPM-szint viszont csak a tavaszi búzafajtákban növekedett (Szalai és mtsai. 2009). Az alacsony hőmérséklet a hidegérzékeny fajokban, például a kukoricában is növekedést eredményezett a PUT-szintben (Szalai és mtsai. 1997). Ugyanakkor, bár a *Thellungiella* esetében a jobb fagyűrés összefüggésbe hozták az alacsonyabb

SPM-szinttel, addig a vele rokon *Arabidopsis* esetében ez nem volt megfigyelhető (Lee és mtsai. 2012).

A PUT korai felhalmozódása, valamint az ADC/ODC génexpressziójának indukcióját írták le nem csak abiotikus stresszkörülmények között, hanem *Fusarium graminearum* fertőzést követően búzában (Gardiner és mtsai. 2010). Továbbá, lisztharmatfertőzés esetén árpában a rezisztens árpa változatokban nagyobb mértékű PUT- és SPD-felhalmozódást tapasztaltak (Asthir és mtsai. 2004), míg *Blumeria graminis* f.sp. *avenae* fertőzés során zabnövényekben szintén összefüggést állapítottak meg a rezisztencia mértéke és a SPD mennyisége között (Montilla-Bascón és mtsai. 2016).

1. táblázat A poliamin-tartalom (PUT: putreszcin, SPD: spermidin és SPM: spermin) változásának néhány példája stresszkörülmények között különböző növényekben. ↑: emelkedik, ↓: csökkent, —: nem változik.

Stressz	PUT	SPD	SPM	Növényfaj	Referencia
Hideg	↑	—	—	kukorica	Németh és mtsai. 2002
	↑	↑	—	őszi búza	Szalai és mtsai. 2009
	↓	↑	↑	tavaszi búza	Szalai és mtsai. 2009
	↑	—	↓	<i>Arabidopsis</i>	Cuevas és mtsai. 2008
	↑	↑	↑	hidegtűrő uborka	Zhang és mtsai. 2009
	↑	↓	—	hidegérzékeny uborka	Zhang és mtsai. 2009
Szárazság	↓	↓	↑ vagy —	rizs	Do és mtsai. 2013
	↑	↑	↑	szárazságtűrő búza	Liu és mtsai. 2004
	↑	—	—	szárazságra érzékeny búza	Liu és mtsai. 2004
Kadmium	↑	—	↑	kukorica	Pál és mtsai. 2006
	↑	—	—	búza	Groppa és mtsai. 2003
	↓	—	—	napraforgó	Groppa és mtsai. 2003
Réz	↑	—	—	búza	Groppa és mtsai. 2003
	↓	—	—	napraforgó	Groppa és mtsai. 2003
UV-B	↑	↑	↑	uborka	An és mtsai. 2004
	↓	—	↓	bab	Smith és mtsai. 2001
Só	—	—	—	spenót	Zapata és mtsai. 2004
	—	↑	↑	saláta	Zapata és mtsai. 2004
	—	—	↑	dinnye	Zapata és mtsai. 2004
	—	↑	↑	paprika	Zapata és mtsai. 2004
	—	↑	↑	brokkoli	Zapata és mtsai. 2004
	—	↑	—	cékla	Zapata és mtsai. 2004
	↓	↑	↑	paradicsom	Zapata és mtsai. 2004
	↑	↑	—	búza	Iqbal és mtsai. 2006

Habár a PA-szintek azonnali növekedése a stresszre adott gyakori válaszreakció, mennyiségük idővel akkor is lecsökkenhet a nem stresszelt növények szintjére, ha a stresszhelyzet továbbra is fennáll (Iqbal és *mtsai*. 2006a). Az is előfordulhat, hogy a megnövekedett PA-tartalom vált ki stresszhatást, esetleg károsodást, így nem általánosítható az a kijelentés, hogy minél magasabb a PA-ok szintje, annál jobb. A sóstressz hatására megváltozhat a SPD és SPM együttes aránya a PUT-hez képest, és megállapították, hogy a sótűrő növényfajok kevesebb PUT-t halmoznak fel, hiszen a növény akár károsodhat is, ha több PUT akkumulálódik, és emiatt a SPD és SPM aránya alacsonyabb lesz (Zapata és *mtsai*. 2004). Úgy tűnik, hogy a stressztűrésért felelős fő tényező nem is igazán a PUT megemelkedett szintje, hanem annak fokozott átalakulása, valamint a SPD és SPM erőteljesebb felhalmozásának képessége. Bár megállapítható, hogy a PA-ok sok faj esetében vitathatatlan részét képezik egy adott stressztényezőhöz való alkalmazkodásnak, azok tényleges mennyisége talán nem játszik olyan kulcsfontosságú szerepet, mint ahogy általánosan feltételezték. A stressztűrés és a PA-szintek közötti korreláció nem általános érvényű. Egyre inkább bebizonyosodik, hogy az abiotikus stresszhatások tűrésében elsősorban nem a PA-ok akkumulációja, hanem a jelátviteli folyamatokban való szerepe gyakorol döntő hatást.

2.2.3. *A poliaminok és a stresszválaszok közötti kapcsolatot biztosító jelátviteli komponensek*

A PA-ok egy másik fontos vonatkozása a kettős szerepük, hiszen ROS-források és potenciális ROS-kioltók is egyben, és szerepet játszanak a növényi redox-homeosztázis szabályozásában (Saha és *mtsai*. 2015). A PA-ok DAO és PAO enzimek általi teljes lebontása illetve visszaalakítása során is H_2O_2 termelődik az apoplastban és a peroxiszómákban (Pottosin és Shabala 2014). Régóta ismert, hogy a H_2O_2 olyan szignálmolekula, mely képes az ioncsatornák befolyásolásával közvetlenül hatni különböző folyamatokra, például a sztómazáródásra, és az MAPK kaszkádon keresztül konkrét stresszválasz-folyamatokat is tud aktiválni (Moschou és *mtsai*. 2008). A PA-ok, különösen a SPD, a NADPH-oxidáz aktiválásával a szuperoxid anion ($O_2^{\cdot-}$) képződését is indukálják. A $O_2^{\cdot-}$ azonban spontán módon vagy enzimatisz uton H_2O_2 -dá alakul. A $O_2^{\cdot-}$ és a H_2O_2 aránya fontos transzkripció jel (Andronis és *mtsai*. 2014), és a PA-ok mediátoraként része lehet abban, hogy a növények alkalmazkodni tudjanak a kedvezőtlen körülményekhez (3. ábra).

A PA-ok nem csak a reaktív oxigéngyökök, hanem a nitrogén-monoxid (NO) keletkezésével is kapcsolatban állnak. Kis méretű, könnyen diffundáló gázmolekulaként a NO olyan intra- és intercelluláris hírvivő, amely különféle folyamatokat, például stresszválaszokat vált ki a növényekben. *Arabidopsis* növényekben SPD- és SPM-kezelést követően gyors NO-akkumulációt mutattak ki, míg a PUT-nek kevés hatása volt (Tun és *mtsai*. 2006). Ezzel szemben a szójában exogén PUT hatására termelődött NO (Yang és *mtsai*. 2014). *DAO-1* knockout *Arabidopsis* mutánsokban csökkent NO-kibocsátást figyeltek meg. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a DAO-nak szerepe

Shabala 2014). Ráadásul a PA-ok nem csak a termelődő H_2O_2 vagy NO által képesek befolyásolni az ioncsatornákat, hanem nitroziláció révén gátolják a kifelé egyenirányító K^+ csatornákat és emellett aktiválják a plazmamembrán H^+ -ATP-ázt (Pottosin és *mtsai.* 2014; Baronas és Kurata 2014).

A PA-ok közvetlenül vagy szabályozó fehérjék például transzkripciós faktorok foszforilációjának serkentésével is befolyásolhatják a génexpressziót. A rizsben OSPDK-ként karakterizált, Ca^{2+} -független SnRK2 kináz a stresszválaszt szabályozó különböző molekulák aktiválásában, például a bZIP-típusú ABRE-kötő transzkripciós faktor, az OSBZ8 foszforilációjában játszik szerepet. Az OSPDK génexpresszióját a SPD transzkripciós és translációs szinten egyaránt szabályozza (Gupta és *mtsai.* 2012). Kimutatták azt is, hogy a SPM például serkenti a WIPK-t (sebzés hatására indukálódó protein kináz) és felelős a SIPK (szalicilsav indukálta protein kináz) poszttranszlációs aktiválásáért (Takahashi és *mtsai.* 2003).

2.2.4. *A poliaminok kapcsolata növényi hormonokkal és más, kisméretű védővegyületekkel*

Mivel a NO nem csak a PA-ok esetében funkcionál közbenső jelátviteli molekulaként, a NO lehet a kulcsa a PA-ok és növényi hormonok által kiváltott átfedő válaszoknak. Ezen túlmenően, microarray vizsgálatok kimutatták, hogy a megnövekedett endogén PA-tartalom módosította a különböző növényi hormonok szintézisében illetve jelátvitelében részt vevő gének expressziójának szintjét.

Az ADC túlexpresszállása befolyással volt az APETALA2/etilén reszponzív faktor domén családdhoz tartozó transzkripciós faktorokat (pl. DREB1C, DREB2A) kódoló gének, az auxin, etilén, ABA, gibberellin és SA bioszintézisében szerepet játszó gének, az auxintranszportért felelős gének és az auxinreszponzív fehérjéket, etilén és ABA-reszponzív transzkripciós faktorokat, valamint a jázmonát hatására termelődő fehérjéket kódoló gének szabályozására. Érdekes módon eltérő transzkriptom profilt találtak azoknál a transzgenikus *Arabidopsis* növényeknél, amelyekben vagy a *SAMDC1* vagy a *SPMS* gének expresszállódtak felül. Bár ezekben a genotípusokban a jázmonsav és az ABA bioszintézisében szerepet játszó gének, jázmonsav- és ABA-függő gének, receptor-szerű kinázok, MAP kinázok, a Ca^{2+} szabályozásában szerepet játszó gének és a transzkripciós faktorok génjei hasonlóképpen viselkedtek (Marco és *mtsai.* 2011). Ezek az eredmények megerősítik a PA-ok kettős szerepét: közvetlen védelem és az alkalmazkodás jelátviteli útvonalaiiban való részvétel.

A növényi hormonként az ABA számos élettani folyamatot szabályoz és különböző abiotikus stresszfaktorokkal szembeni tolerancia kialakításában van szerepe (Vishwakarma és *mtsai.* 2017). Az irodalmi adatok alapján a PUT és az ABA abiotikus stresszkörülmények között egy pozitív visszacsatolási körbe kerülnek egymással (Shi és Chan 2014). Az ABRE vagy ABRE-hez kapcsolódó motívumok megjelennek az *ADC2*, *SPDS1* és *SPMS* promótereiben, amelyek szintén erősen érzékenyek a szárazságstresszre (Minocha és *mtsai.* 2014). Az ABA hatással van a PA-ok

lebontására is, hiszen indukálja a PAO expresszióját (Guo és *mtsai*. 2014), miközben a PA-ok hatással vannak az ABA szintézisére (Marco és *mtsai*. 2011). Az ABA bioszintézisében részt vevő fő enzimet kódoló gén, az *NCED* transzkripciós szabályozását figyelték meg az *ADC*-t túltermelő transzgénikus növényekben stresszhatás alatt, mely párhuzamos volt a PUT-felhalmozódással (Espasandin és *mtsai*. 2014; Alet és *mtsai*. 2011). Azonban az *NCED3* csökkentett expressziót és az ABA-függő gének alulszabályozottságát figyelték meg mind az *adc1*, mind *adc2* mutáns növényekben, melyek aztán exogén PUT-kezelés után jobban tűrték az alacsony hőmérsékleti körülményeket (Cuevas és *mtsai*. 2008).

Régóta ismert a SA molekula szerepe a növényi védekező mechanizmusok kiváltásában; sőt az a tény is, hogy az abiotikus stresszhatások során részt vesz a jelátvitelben (Pál és *mtsai*. 2013). Csak néhány tanulmány tesz arról említést, hogy stresszhatás alatt a SA- és a PA-tartalom egymással párhuzamosan hogyan változik, de a közelmúltban végzett vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy a SA-kezelés befolyásolja a PA-ok szintézisét és/vagy lebontását. A SA különböző koncentrációi nyilvánvalóan eltérő hatást gyakoroltak a PA-anyagcserére (Wang és Zhang 2012). Ezenkívül a SPD-nel vagy SPM-nel végzett vetőmag-előkezelés nagyon hatásos volt sóstressz közben a búza SA-tartalmának növelésében (Iqbal és *mtsai*. 2006a,b). Másfelől kimutatták, hogy a MAP-kináz (MEK2) - SIPK/ WIPK kaszkád transzkripciós szinten szabályozza a PA-ok, különösen a PUT szintézisét dohánynövényben (Jang és *mtsai*. 2009). A fenti eredmények alapján összefüggést feltételezhetünk az endogén SA- és a PA-tartalom között, de a köztük működő lehetséges kapcsolat abiotikus stresszhelyzetben még mindig nem tisztázott.

A flavonoidok számos élettani szerepet töltenek be, többek között pl. antioxidánsként gyökfogók, hidegstressz során szén-raktárként működnek, és membránstabilizáló hatásuk is van (Korn és *mtsai*. 2008). A PA-okkal konjugált formát alkotó fenolos vegyületek pedig még hatékonyabb antioxidánsnak bizonyultak (Velikova és *mtsai*. 2007). Habár megemelkedett flavonoid-szintet mértek mind stresszmentes (Ali, Abbas, és Kamal 2009), mind sóstressz alatt (Ghosh és *mtsai*. 2012), továbbá a flavonoid-szintézis egyik kulcs enzimének a fenilalanin-ammónia-liáz (PAL) enzim magasabb aktivitását tapasztalták PA-kezelést követően (Hao és *mtsai*. 2012), a PA-ok és a flavonoidok közötti összefüggést nem tanulmányozták részleteiben.

A PA-ok képesek antioxidáns enzimek aktivitását is serkenteni nem csak közvetlen hatásuk révén (Çakmak és Atici 2009; Ghosh és *mtsai*. 2012), vagy transzkripciós szinten (Parvin és *mtsai*. 2014; Li és *mtsai*. 2014), hanem az S-nitroziláció révén is (Wimalasekera és *mtsai*. 2011) illetve a PA-ok oxidációja során felszabaduló H_2O_2 révén közvetetten is.

Habár a PA- és GSH/PC-tartalom változásairól számos tanulmány beszámol nehézfémstressz során, kevés irodalmi adat van arra vonatkozóan, hogy hogyan befolyásolják a PA-ok a PC-szintézist, külön tekintettel arra a tényre, hogy szintézisük bizonyos módon összefüggésben van egymással. SPM-kezelés Cd-stressz során csökkentette a GSH és PC tartalmat a *Canavalia lineata* levelében,

míg a gyökerében egy olyan PC-forma megjelenését indukálta, melynek Cd megkötő képessége alacsony volt (Yun és *mtsai.* 1997). SPDS túltermelő transzgenikus növényekben, a megemelkedett SPD-tartalom együtt járt a GSH-szint csökkenésével a vad típushoz képest nehézfémstressz során (Wen és *mtsai.* 2010). Nyárfa és fűzfa növények összehasonlításakor azt tapasztalták, hogy a Cd megemelte a PC-szintet a nyárfa levelében, de nem a fűzfában, míg a PA-tartalomban lényegében ellentétes változást figyeltek meg, azaz megemelkedett a fűzfában, de a nyárfában csak a PUT, és csak a gyökérben (Zacchini és *mtsai.* 2011). Habár a SPM-kezelésről kimutatták, hogy véd a Cd okozta oxidatív stressz-szel szemben, mégsem képes megakadályozni a GSH-tartalomban mért csökkenést (Groppa és *mtsai.* 2007). Mindezek alapján a PA-ok és PC-ok közötti kapcsolatról még mindig csak ellentmondásos eredmények állnak rendelkezésre.

Mivel a prolin mennyisége nem csak szárazságstressz során, illetve ABA-kezelés hatására, hanem PA-kezelés után is megemelkedik (Shevyakova és *mtsai.* 2013; Zeid és Shedeed 2007), valamint a PUT, DAO által katalizált lebontása is összefüggésbe hozható a prolinfelhalmozódással (Su és Bai 2008), míg szintézisük pedig a közös prekursor glutamátból indul ki, egyértelmű, de részleteiben még nem világos kapcsolat létezik a prolin és a PA-ok között is.

3. KUTATÁSI CÉL

Csoportunk a PA-ok stressztűrésben betöltött szerepét tanulmányozza, és célja azoknak a kérdéseknek a vizsgálata, melyeket a témában még nem sikerült kielégítően megválaszolni: 1. Az egyes PA-ok (PUT, SPD és SPM) felhalmozódása, illetve a különböző formák (szabad, konjugált és kötött) alapvető fontosságúak-e a növények tűrőképessége és a stresszhatásokra adott válaszreakciók szempontjából? 2. A három fő PA szerepe hasonló vagy egyenrangú a növények stresszválaszaiban? 3. A betöltött szerepeik közül melyek az igazán lényegesek? 4. Hogyan vesznek részt a jelátvitelben? Az ehhez kapcsolódó kutatások egy része kerül dolgozatomban bemutatásra.

- A kutatások első részében a különböző, biotikus és abiotikus stresszfaktorok (lisztharmatfertőzés, alacsony hőmérséklet, UV-B sugárzás, ozmotikus és Cd-stressz) hatását vizsgáltuk az endogén PA-tartalomra gabonanövényekben, keresve az összefüggést a PA-szint és a stresszrezisztencia/-tolerancia mértékével. Kiemelt kérdés volt annak vizsgálata is, hogy az adott stresszhatások során milyen korrelációs kapcsolat van a PA-ok és más védővegyület között, mint pl. a SA, ABA, GSH, aszkorbinsav, antioxidáns enzimek vagy a PC-ok.
- Második lépésben külsőleg adagolt PA-kezeléseket alkalmaztunk normál nevelési körülmények és stresszkörülmények között (ozmotikus és Cd-stressz). A PA-ok lehetséges kedvező hatásának igazolása mellett vizsgáltuk a PA-metabolizmusban bekövetkező változásokat és annak szerepét a stressztoleranciában, illetve kölcsönhatását más védővegyületekkel, mint a SA, ABA, PC-ok és prolin. Külön kérdés volt, hogy melyek a közös és eltérő pontjai a PA, ABA és abiotikus stresszek által indukált jelátviteli és rezisztenciát szabályozó folyamatoknak, ezért PA- és ABA-kezeléseket is alkalmaztunk kontroll nevelési körülmények és ozmotikus stresszkörülmények között. Figyelembe véve, hogy a megnövekedett mennyiségű endogén PA-ok gyorsan átalakulhatnak egymásba, külön kísérletben vizsgáltuk a PUT-szintézis gátlásának hatásait is Cd-stressz során. Vizsgálatainkat nemcsak metabolit szinten, hanem génexpressziós szinten is elvégeztük.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. A növénynevelés körülményei és a növényi anyagok

4.1.1. Búzanövények nevelése és lisztharmatfertőzése üvegházi körülmények között

Korábban szántóföldi kísérleteink során tesztelt 22 búza (*Triticum aestivum* L.) genotípusból (Kovács és mtsai. 2012) kiválasztottunk kettő-kettő olyan levélrozsdával szemben ismert rezisztenciagént hordozó, tavaszi Thatcher-alapú közel-izogén búzavonalat (TC9: Thatcher*6/Transfer, TC19: Thatcher*7/Translocation4, TC26: Thatcher*6/ST-1.25, TC33: Thatcher*6/P.I.58548) melyek eltérő endogén SA-szinttel rendelkeztek. A TC9 és TC26 alacsonyabb, míg a TC19 és TC33 magasabb kezdeti szabad, illetve kötött SA-tartalommal volt jellemezhető. A Thatcher-alapú közel-izogén vonalak szaporító anyagát Dr. James A. Kolmer-től kaptuk (Cereal Disease Laboratory, USDA St. Paul, MN, USA). Ezek a vonalak jól ismert levélrozsdá-rezisztenciáért felelős géneket hordoznak (Lr9, Lr19, Lr26 és Lr33) és különböző mértékű rezisztenciát mutatnak levélrozsdával szemben.

A búzavonalak magjait 2 °C-os, 28 napos vernalizációt követően 2:1 arányú föld:homok keverékbe, 11x18 cm-es cserepekbe (2 növény/cserép) ültettük, majd a martonvásári MTA ATK Mezőgazdasági Intézet üvegházában 22/16 °C-on (nappal/éjszaka), természetes, illetve mesterséges fénnel kiegészítve, 16 órás fotoperiódus mellett neveltük.

A növényeken GS45 felnőttkori stádiumban (Zadoks és mtsai. 1974) lisztharmatfertőzést (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*) végeztünk. A fertőzés a lisztharmat ismert virulenciaspektrumú patotípusait (melyet különböző hordozó gének segítségével határoztak meg: Pm0, 1, 2, 3a, 3b, 3c, 3d, 3f, 4a, 4b, 5, 6, 7, 8, 17, 2+6, 2+4b+8, 1+2+9 és 2+Mld) tartalmazó keverékével, a konídiumok levélfelületre szórásával történt.

A mintaszedés során minden vonal esetében 8-8 cserépről, a zászlós levelek alatti első, második és harmadik leveleket szedtük le a mintavételhez, a fertőzést követően 3 és 7 nappal, mind a kontroll (kontroll 3d és kontroll 7d), mind a fertőzött növények esetén (fertőzött 3d és fertőzött 7d). A leszedett mintákat azonnal folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd feldolgozásig -80 °C-on tároltuk. A leszedett növényi mintákkal a további kísérletek mintavételezése esetén is hasonlóan jártunk el. A Saari-Prescott skála (Saari és Prescott, 1975) szerinti felvételezés során a TC9 és TC19 genotípusok lisztharmattal szemben rezisztensnek, a TC26 és TC33 vonalak érzékenynek bizonyultak (Pál és mtsai. 2013).

4.1.2. Búza-, zab- és árpanövények nevelése és alacsony hőmérsékleti kezelése fitotroni körülmények között

Kiválasztottunk nyolc eltérő vetésidejű és fagyérzékenységű gabona genotípust: a 4.1.1. pontban említett két Thatcher-alapú közel izogén tavaszi búzavonalat (TC19 és TC33), valamint kettő martonvásári őszi búzafajtát (Mv 8 és Mv Hombár), két őszi zab (*Avena sativa*: Kwant and Mv Pehely) és egy-egy tavaszi, illetve őszi árpa (*Hordeum vulgare* L.) változatot (Jubilant és Petra) mely utóbbiakat mind a martonvásári MTA ATK Mezőgazdasági Intézetében nemesítettek. A búzaszemeket 3:1 arányú föld:homok keverékbe, 11x11 cm-es cserepekbe (15 növény/cserép) ültettük, majd a cserepeket véletlenszerű elrendezésben 20/18 °C-on 16/8 órás fény-sötét periódus mellett neveltük Conviron PGV-36 típusú növénynevelő kamrában (Controlled Environments Ltd, Winnipeg, Canada) 10 napos korig. A megvilágítás mértéke $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD, a relatív páratartalom 75% volt. A 10 nap elteltével valamennyi genotípus esetén a cserepeket két csoportra osztottuk. Az egyik csoport továbbra is az eddigi nevelési körülmények között maradt, míg a másik csoport cserepeit egy azonos típusú kamrába, 5 °C-ra helyeztük át, és a növénynevelést további 12 napig folytattuk. A kísérlet végén a kontroll és hideg kezelt növények valamennyi levelét felhasználtuk a mintavételhez.

4.1.3. Búza-, kukorica- és rizsnövények nevelése és kezelése fitotroni körülmények között tápoldatban

A kísérletek ezen részében a kezeléstől függően főzőpohárban, rozsdamentes acélhálón vagy műanyag edényekben tápoldatban nevelt növényeket használtunk. Az UV-B sugárzás, az alacsony hőmérséklet vagy a PEG-indukálta ozmotikus stressz hatásának vizsgálata során a búza-, kukorica- vagy rizsnövényeket üveg főzőpohárban neveltük. Mivel a Cd, más fémekhez hasonlóan, könnyen kötődhet és le is válhat a műanyag felületekről (Munier és Bendell 2018), a Cd-kezeléseket üveg főzőpoharakban végeztük. Ezzel szemben, a PA-ok az üveg felületekhez képesek jobban kötődni, így a PUT-, SPD- és SPM-kezelések során a növényeket műanyag edényekben neveltük (Linskens és Jackson 1987). Az előnevelés bizonyos kezdeti körülményei azonban azonosak voltak, ezeket az alábbiakban foglalhatjuk össze.

Az előkísérleteink eredménye alapján (Kovács és *mtsai*. 2012) kiválasztottunk öt búza genotípust. A 4.1.1. pontban jellemzett két Thatcher-alapú közel izogén tavaszi búzavonal (TC19 és TC33) viszonylag magas endogén SA-tartalommal, míg a három martonvásári őszi búzafajta (Mv Emese, Mv 8 és Mv Hombár) viszonylag alacsony SA-szinttel jellemezhető. A magokat 3 napig desztillált vízzel nedvesített szűrőpapíron, sötétben, 22 °C-on csíráztattuk.

A kukoricaszemeket (*Zea mays* L., Mv 255 hibrid) 30 percig 0,5%-os Neomagnol oldatban fertőtlenítettük, majd desztillált vízzel nedvesített szűrőpapírban csíráztattuk 3 napig 24 °C-on.

A rizs (*Oryza sativa* L.) genetikai anyagokat egy együttműködés keretében Dr. Mei Hanwei bocsátotta rendelkezésünkre (Sanghaji Akadémia, Sanghaji Mezőgazdasági Génbank, Kína). A rizs genotípusokat eltérő szárazság-tolerancia szintjük és eltérő endogén SA tartalmuk alapján választottuk ki (Pál és mtsai. 2014). A szárazsággal szemben toleránsabb genotípusok közül a KN361-1-8-6 és Zhonghan No. 3 alacsonyabb kezdeti SA-tartalommal, míg a szintén toleránsabb IAC1246, valamint az érzékenyebb N22 genotípusok alacsonyabb kezdeti SA-szinttel voltak jellemezhetőek. Összehasonlító előkísérletek során kiválasztásra került egy magyar rizs változat is (Janka), melyet a szarvasi Halászati és Öntözési Kutatóintézettől kaptunk. A csíráztatás során a rizsszemeket desztillált vízzel nedvesített szűrőpapíron egy napig 37 °C-on, majd további 5 napig 27 °C-on inkubáltuk.

A kicsírázott növényeket főzőpoharakba vagy műanyag edényekbe ültettük (7 kukoricanövény/edény, 12 búzanövény/edény és 15 rizsnövény/edény), és 250 ml tápoldatban (a kukorica és búza esetén: 2. táblázatban, míg a rizs esetén a 3. táblázatban leírtaknak megfelelő összetételű tápoldatban) az MTA ATK Mezőgazdasági Intézet Fitotron épületének Conviron típusú növénynevelő kamráiban (Controlled Environments Ltd, Winnipeg, Kanada) neveltük.

2. táblázat. Módosított Hoagland-tápoldat összetétele.

Makroelem összetétel:	Mikroelem összetétel:
0,3125 mM KNO ₃	11,92 mM HBO ₃
0,45 mM Ca(NO ₃) ₂	4,57 mM MnCl ₂ ·4H ₂ O
0,0625 mM KH ₂ PO ₄	0,191 mM ZnSO ₄ ·7H ₂ O
0,125 mM MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,08 mM CuSO ₄ ·5H ₂ O
	0,024 mM (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O
	15,02 mM FeSO ₄ ·7H ₂ O
	23,04 mM Na ₂ EDTA·5H ₂ O

3. táblázat. Rizs tápoldat összetétele.

Makroelem összetétel:	Mikroelem összetétel:
364,76 μM (NH ₄) ₂ SO ₅	9,85 μM Fe-EDTA
182,23 μM KH ₂ PO ₄	46,25 μM H ₃ BO ₄
182,98 μM KNO ₄	0,32 μM CuSO ₄ ·5H ₂ O
365,04 μM Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0,76 μM ZnSO ₄ ·7H ₂ O
2,4 mM NaSiO ₂	9,14 μM MnCl ₂ ·4H ₂ O
	0,38 μM Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O

pH: 5 beállításhoz H₂SO₄-t használtunk.

A növénynevelés körülményei 20/18 °C volt a búza és 22/20 °C a kukorica esetén, 16/8 órás fény-sötét periódus mellett a Conviron GB-48 növénynevelő kamrában, ahol a megvilágítás mértéke 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD, a relatív páratartalom 75% volt. A rizsnövények esetében a Conviron PGV-36 típusú növénynevelő kamrát használtuk, melynek beállításai az alábbiak voltak: 28/26 °C, 13/11 órás fény-sötét periódus, 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD és 70%-os relatív páratartalom.

A növénynevelő edényeket a kamrákban véletlenszerűen helyeztük el, valamint a növények megfelelő tápanyag- és levegő-ellátottsága miatt kétnaponta a tápoldatok teljes cseréjére közben ismételt új elrendezésbe kerültek.

4.1.3.1. *Kadmiumkezelés vizsgálata eltérő szalicilsav-tartalmú búza genotípusokban*

A két viszonylag magas endogén SA-tartalommal jellemezhető TC19 és TC33, valamint az alacsonyabb kezdeti SA-szinttel rendelkező Mv 8 és Mv Hombár genotípusokat használtuk a Cd-kezelés hatásainak vizsgálatára. A 17 napig normál körülmények (4.1.3. alatt búzanövényekre leírt nevelési paraméterekkel) között neveltük a búzanövények, azután a növények egyik felét 7 napig a tápoldathoz adagolt 50 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ -tal kezeltük, másik felét pedig továbbra is kontroll körülmények között tartottuk. A 24 napos kontroll és Cd-kezelt növényekről levél- és gyökérmintát szedtünk. A gyökereket a mintavételezés előtt először desztillált vízzel, utána 3 mM EDTA-oldatban, majd Milli-Q vízben mostuk, annak érdekében, hogy a gyökereken maradó Cd-ot eltávolítsuk, és a Cd-tartalom meghatározását, valamint PC-szint és PCS-aktivitás mérését ne befolyásolja.

4.1.3.2. *UV-B sugárzás módosító hatása a PEG-indukálta ozmotikus illetve kadmiumstresszre búzanövényekben*

A martonvásári Mv Emese búzafajta magjait a 4.1.3. pontban leírtak szerint csíráztattuk, elültettük és a főzőpoharakat két csoportra osztottuk. Az első csoportot normál megvilágításnak (fehér fény, PPFD: 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), míg a másik csoportot fehér fénynek és egyidejűleg alkalmazott UV-B sugárzásnak tettük ki. Az UV-B-t 7 darab UV-B Narrowband TL 100W/01 típusú Philips lámpa szolgáltatta, melynek maximális sugárzása 311 nm-nél mérhető. Az UV-B sugárzás dózisa a kontroll növények esetében 38 $\mu\text{Watt/cm}^2$, míg az UV-B-kezeltéknél 430 $\mu\text{Watt/cm}^2$ volt. A két hét elteltével mindkét megvilágítás (kontroll és UV kontroll) esetén újabb három csoportot hoztunk létre. A növények egy része volt a kontroll, második része 50 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ -ot kapott 7 napig (Cd éd UV+Cd), a harmadik része 15% PEG-6000-et kapott 5 napig (PEG és UV+PEG) a tápoldathoz adagolva. A

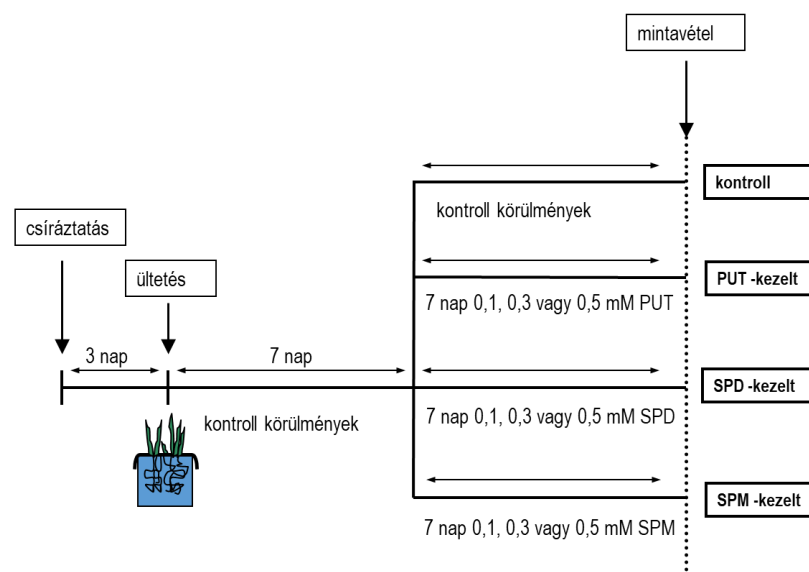
kezelések végén az első, második és harmadik levelekből, illetve a gyökerekből szedtünk mintát. A gyökerek mosása a 4.1.3.1. pontban leírtaknak megfelelően történt.

4.1.3.3. Alacsony hőmérséklet és PEG-indukálta ozmotikus stressz hatása eltérő szalicilsav-tartalmú rizs genotípusokban

N22, KN3611-8-6, Zhonghan No. 3 és IAC1246 genotípusok rizsszemeket a 4.1.3. pontban leírtaknak megfelelő csíráztatást követően üvegpoharakba ültettük és az adott nevelési körülmények között neveltük a 2. táblázatban megadott rizs tápoldaton. 20 nap elteltével a főzőpoharakat három csoportra osztottuk. Az első csoport növényeit továbbra is kontroll körülmények között tartottuk, a második csoport egyedeit 15%-os PEG-6000 kezelésnek tettük ki, míg a harmadik csoport főzőpoharait azonos típusú növénynevelő kamrába helyeztük át 10 °C-ra. A kezelések kezdetétől számított 1 és 6 nap elteltével mindhárom csoportból levélmintát szedtünk.

4.1.3.4. Poliamin-kezelések hatása kukorica- és búzanövényekben

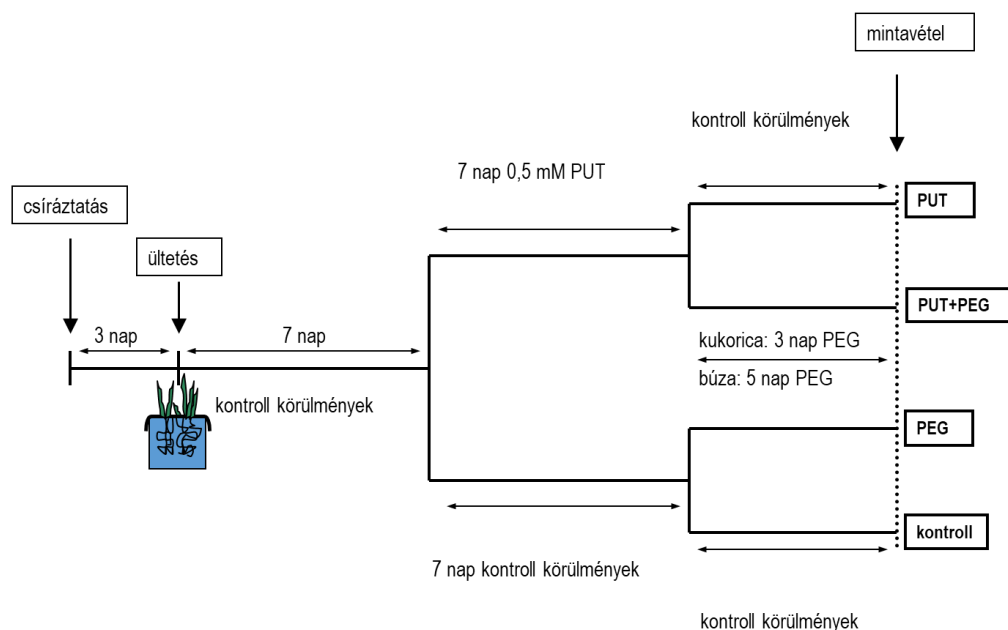
Kukorica (Mv 255) és búza (TC33) növényeket neveltünk a 4.1.3. pontban leírtak megfelelően 7 napos korig. Ekkor a növényeket, a PA-kezelések előkészítéseként az üveg főzőpoharokból műanyag edényekbe helyeztük át. A tápoldatot pedig 0,1, 0,3 vagy 0,5 mM PUT-t (PUT-kezelt), SPD-t (SPD-kezelt) vagy SPM-t (SPM-kezelt) tartalmazóra cseréltük, melyet kétnaponta a kezelésnek megfelelő, frissen elkészített oldattal cseréltünk, akárcsak a kontroll növények esetén. 7 napos kezelés követően a legfiatalabb, teljesen kifejtett leveleket és a gyökereket használtuk a mintavételhez (4. ábra).



4. ábra. Poliamin-kezelések menete kukorica- és búzanövényeken.

4.1.3.5. Putreszcín-előkezelés hatása a PEG-indukálta ozmotikus stressz során kukorica- és búza növényekben

A 4.1.3.4. pontban leírtak szerint nevelt 0,5 mM PUT-nel kezelt kukorica- és búzanövényeket használtuk további kezelésekre. A 7 napos kontroll, illetve PUT-előkezelte növények gyökereit desztillált vízzel kétszer óvatosan mostuk, majd a növényeket a műanyag edényekből üveg főzőpoharakba helyeztük. Mind a kontroll, mind a PUT-előkezelte növényeket két csoportra osztottuk. Az egyik csoportot normál tápoldatra helyeztük (K), ez a PUT-előkezelés esetében, egy ún. „recovery” periódusnak tekinthető (PUT), míg a másik csoportot 15%-os PEG-6000 kezelésnek tettük ki, ozmotikus stressz kiváltására (PEG és PUT+PEG). A PEG-kezelés a kukorica- és búzanövények eltérő ozmotikus stressz érzékenysége miatt, a kukorica esetén 3 nap, a búza esetén pedig 5 nap volt. A tápoldatokat 2 naponta cseréltük, a kezelés végeztével a mindkét növényfaj esetén a négy csoport levél és gyökér mintái kerültek feldolgozásra (5. ábra).

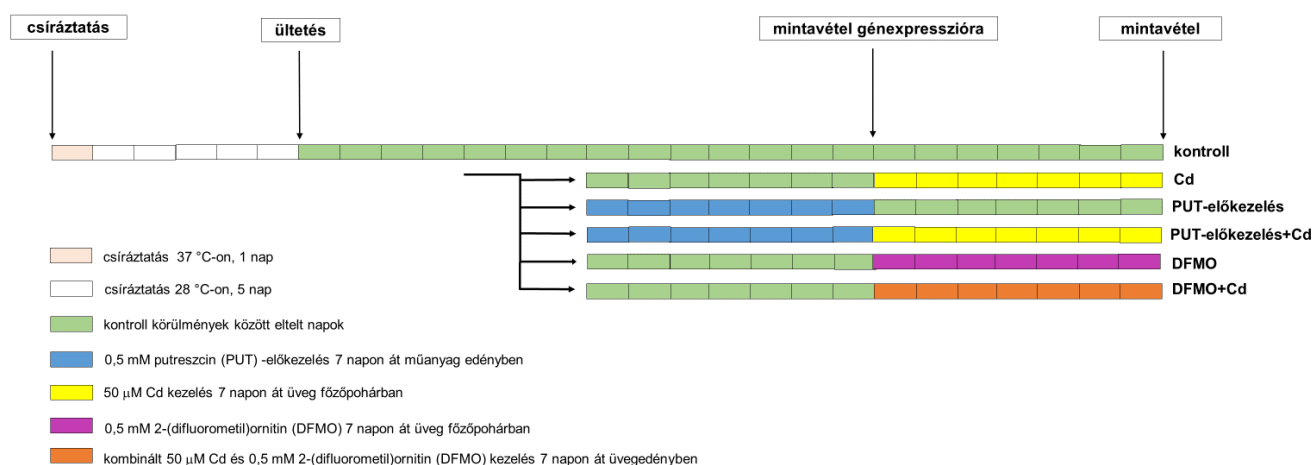


5. ábra. Putreszcín-előkezelés hatása PEG-indukálta ozmotikus stressz során kukorica- és búzanövényekben.

4.1.3.6. Putreszcín-előkezelés, illetve putreszcín-szintézist gátló szer hatása kadmiumstressz során rizsnövényekben

A 4.1.3. pontban leírtaknak megfelelő körülmények között nevelt rizsnövényeket (Janka) 7 nap elteltével 6 csoportra osztottuk a növénynevelési körülményeket szemléltető 6. ábrának megfelelően. Négy csoport továbbra is kontroll nevelési körülmények között nőtt, míg két csoport 7

napon át 0,5 mM PUT-előkezelést kapott. Ezek után, mind a kontroll, mind a PUT-előkezelte csoport egy-egy alcsoportját 50 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ kezelésnek tettük ki (Cd és PUT-előkezelés+Cd). A PUT-előkezelést kapott másik alcsoportot egy 7 napos „recovery” periódusként kontroll nevelési körülmények közé helyeztük vissza (PUT-előkezelés). A növények gyökerein valamennyi esetben kétszeres desztillált vizes mosást végeztünk az előkezelés ideje után. A további három csoport 14 napos korig nőtt kontroll körülmények között. Ezt követően az egyik alcsoport továbbra sem kapott semmilyen kezelést sem (K), egy másik csoportot 0,5 mM DFMO-val (DFMO), míg egy harmadik csoportot kombináltan 0,5 mM DFMO-val és 50 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ -tal kezeltük (DFMO+Cd). A tápoldatokat 2 naponta a kezelésnek megfelelő friss oldatokkal cseréltük. A növények leveleiről a génexpressziós elemzésekhez a 14. és 21. napon, míg a további más elemzésekhez a levelekről és gyökerekről a 21. napon vettünk mintát. A gyökerek mosása a 4.1.3.1. pontban leírtaknak megfelelően történt.



6. ábra. Putreszcin-előkezelés, illetve putreszcin-szintézist gátlószer hatása kadmiumstressz során rizsnövényekben

4.1.3.7. Abszcizinsav-kezelés hatásának vizsgálata putreszcin-kezeléssel összehasonlításban kontroll körülmények között és PEG-indukálta ozmotikus stressz során búzanövényekben

A 4.1.3. pontban leírtaknak megfelelően, TC33 búza genotípusú búzanövényeket neveltünk 14 napos korig. Ekkor a növényeket 0,15 mM ABA-val (ABA) vagy 0,5 mM PUT-nel (PUT) kezeltük 1 napig és az aznapi kontroll növényekkel (K) együtt egy részükről levél és gyökér mintát vettünk. A növények másik részének gyökerét desztillált vízzel mostuk, majd hat csoportot képeztünk. Mind a kontroll, mind az ABA- illetve PUT-előkezelte növények egyik felét kontroll körülmények között

neveltük tovább (K+5d, ABA+5d és PUT+5d) másik felét pedig 15%-os PEG 6000 kezelésnek tettük ki 5 napon át (K+5dPEG, ABA+5dPEG és PUT+5dPEG). A tápoldatokat 2 naponta cseréltük a frissen elkészített megfelelő oldatokkal. Az 5 nap elteltével mind a 6 kezelésből levél és gyökér mintákat szedtünk.

4.2. A növények fiziológiai állapotának meghatározása

4.2.1. Klorofill-a fluoreszcencia indukció mérése

A PSII kvantumhatásfokát jellemző $\Delta F/F_m'$ klorofill-fluoreszcencia indukciós paramétert ($\Delta F/F_m' = (F_m' - F_s)/F_m'$, ahol az F_m' a maximális, míg az F_s a steady state klorofill-fluoreszcencia szinteket jelölik fény adaptált állapotban) PAM-2000 (Walz, Effeltrich, Németország) műszerrel (Janda és mtsai. 1994) az adott nevelési körülmények között a növénynevelő kamrában mértük. A mérések az adott kísérletekben a legfiatalabb, teljesen kifejlett levélen történtek.

4.2.2. A fotoszintetikus aktivitás mérése

A fotoszintetikus aktivitás mérése szintén a növények legfiatalabb, teljesen kifejlett levelein, nyitott rendszerű LI-6400 típusú infravörös gázanalizátorral (LI-COR Inc, Lincoln, Nebraska, USA) történt. Megvilágító fényforrásként a mérőfejhez csatlakoztatható 6400-02 LED lámpát (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA), a hőmérséklet szabályozására a beépített Peltier elemet használtuk. A CO₂ referencia szint 380 $\mu\text{L L}^{-1}$ volt, a méréseket a növénynevelő kamrában az adott fényintenzitás és adott nevelési hőmérsékleten végeztük. A mért víz- és széndioxidmennyiség változásának értékei segítségével a különböző gázcsere paraméterek, mint a nettó fotoszintetikus aktivitás (P_n), a gázcsere nyílások vezetőképesége (g_s), az intercelluláris CO₂-koncentráció (C_i) és a transpiráció (E) meghatározása történt (von Caemmerer és Farquhar 1981).

4.2.3. Lipidperoxidáció meghatározása

A lipidperoxidáció meghatározása a malondialdehid-tartalom (MDA) mérésén alapszik. Az előkészítés során 0,2 g növényi mintát dörzsmozsárban 900 μL 0,1%-os (w/v) triklór-ecetsavval (TCA) eldörzsöltünk, majd 12 000 g-vel 10 percig centrifugáltuk. A felülúszó 450 μL -éhez 2 ml 0,5% (w/v) tiobarbitursavat (TBA) tartalmazó 20%-os (w/v) TCA-t adtunk és az elegyet 90 °C-on 30 percig inkubáltuk. Az MDA-tartalom meghatározása spektrofotometriásan, 532 nm-en történt, a 600 nm-en mért nem specifikus abszorbancia figyelembevételével. A lipidperoxidok koncentrációját az MDA-

tartalomból a $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ extinkciós koefficiens segítségével számoltuk ki és nmol g^{-1} friss tömegben adtuk meg (Thomas és mtsai. 2004).

4.2.4. Hidrogénperoxid-tartalom meghatározása

A H_2O_2 -tartalom meghatározása az ammónium vasszulfát/xylenol orange (FOX-1) módszer szerint történt (Gay és mtsai. 1999). 0,2 g növényi mintát homogenizáltunk 1 ml 10% (w/v) H_3PO_4 segítségével, majd 15 percig centrifugáltuk $15\,000 \text{ g}$ -vel. A felülúszóhoz 50 μl -hez 950 μl FOX reagens adtunk, majd 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. A fotometrálist 560 nm-en végeztük Shimadzu UV-VIS 160A (Kyoto, Japán) spektrofotométerrel. A minták H_2O_2 tartalmát mM g^{-1} friss tömegben adtuk meg a kalibráció elvégzését követően.

4.2.5. Antioxidáns enzimek kivonása és az aktivitások meghatározása

Az izolálás során 0,5 g növényi anyagot kvarchomokkal dörzsöltünk el 2,5 ml jéghideg 0,5 mM TRIS pufferben (pH 7,4), 3 mM MgCl_2 és 1 mM EDTA jelenlétében dörzsmozsárban. A homogenizátumot hűtött centrifugában 20 percig centrifugáltuk $15\,000 \text{ g}$ -vel. A felülúszót Eppendorf csövekbe osztottuk szét. A glutation-reduktáz aktivitását a friss, míg a további enzimeket a -20°C -on tárolt fagyasztott felülúszóból mértük. Az enzimaktivitásokat fotometriásan határoztuk meg (Shimadzu UV-VIS 160A). Mérésig a mintákat jégen tartottuk, a méréseket pedig szobahőmérsékleten végeztük. Az enzimaktivitásokat nkatál g^{-1} friss tömegre adtuk meg.

4.2.5.1. Kataláz (KAT) (EC 1.11.1.6)

A KAT aktivitását 240 nm-en mértük, a H_2O_2 fogyását nyomon követve. A reakcióelegy összterfoglata 3 ml volt, és 0,44 mM TRIS puffert (pH 7,4) 0,0375% H_2O_2 -t és 50 μl növényi mintát tartalmazott (Janda és mtsai. 1999). A reakciót a H_2O_2 hozzáadásával indítottuk el.

4.2.5.2. Gvajakol-peroxidáz (G-POD) (EC 1. 11.1.7)

A gvajakol oxidációja nyomán bekövetkező abszorbancia növekedést 470 nm-en spektrofotométerrel nyomon követve mértük (Ádám és mtsai. 1995), H_2O_2 oldattal indítva a reakciót. A 3 ml reakcióelegy összetétele a következő volt: 88 mM Na-acetát puffer (pH 5,5), 0,88 mM gvajakol, 0,0375% H_2O_2 és 50 μl növényi minta.

4.2.5.3. Aszkorbát-peroxidáz (APX) (EC 1.11.1.11)

Az APX aktivitását a következő összetételű reakcióelegyben mértük: 0,2 M TRIS puffer (pH 7,8), 5,625 mM aszkorbinsav és 0,042% H₂O₂. A reakcióelegy 2,25 ml volt, mely 50 µl mintát tartalmazott, és a reakciót H₂O₂ hozzáadásával indítottuk. Az aszkorbinsav fogyását 290 nm-en követtük nyomon (Janda és *mtsai*. 1999).

4.2.5.4. Glutation-reduktáz (GR) (EC 1.6.4.2)

A GR aktivitásának meghatározásakor a 5,5'-ditio-bisz-(2-nitro-benzoészav) (DTNB) redukcióját mértük 412 nm-en (Smith és *mtsai*. 1988). A reakcióelegy 1 ml össztérfogata 75 mM Na-foszfát puffert (pH 7,5), 0,15 mM dietiléntriamin-pentaecetsavat, 0,75 mM DTNB, 0,1 mM NADPH, 1 mM GSSG. A reakciót 50 µl minta hozzáadásával indítottuk.

4.2.5.5. Glutation-S-transzferáz (GST) (EC 2.5.1.18)

A GST aktivitásának meghatározása 340 nm-en spektrofotometriásan történt az S-2,4-dinitrofenil-glutation képződését nyomon követve (Guthenberg és Mannervik 1981). A 2,75 ml reakcióelegy 72,5 mM Na-foszfát puffert (pH 6,5), 2,6 mM GSH-t, 1 mM 1-kloro-2,4-dinitrobenzént tartalmazott és a reakciót a 100 µl mintával indítottuk.

4.3. Kadmiumtartalom meghatározása

0,1 g száraz elporított növényi részt 2 ml 30%-os H₂O₂ és 2 ml 65%-os salétromsav elegyével roncsoltuk (1 napig 25 °C-on, majd 20 percig 120 °C-on túlnyomáson forraltuk). A minták fémtartalmát ICAP-61E típusú atomabszorpciós készülékkel határoztuk meg (Hegedűs és *mtsai*. 2001).

4.4. Prolintartalom meghatározása

0,5 g növényi anyagot kvarchomok segítségével 5 ml Milli-Q vízben homogenizáltuk, majd 10 percig 4 °C-on és 10 000 g-vel centrifugáltuk. A reakcióelegy 0,5 ml felülúszót, 250 µl 96%-os ecetsavat és 250 µl ninhidrin reagens tartalmazott (Bates és *mtsai*. 1973). 0,5 ml toluollal történő extrahálás után a prolintartalmat 518 nm-en Shimadzu UV-VIS 160A (Kyoto, Japán) spektrofotométerrel mértük. A prolintartalmat standard kalibrációs egyenes segítségével µg g⁻¹ friss tömegre vonatkoztatva adtuk meg.

4.5. Szalicilsav, flavonoid és abszcizinsav-extrakció és mennyiségi analízis

Kukoricanövények esetén 1 g, búza- és rizsnövények esetén 0,5 g növényi mintát folyékony nitrogénben, a növényi mintához képest feleannyi mennyiségű kvarchomok segítségével dörzsmozsárban homogenizáltuk, majd 2 ml 70%-os metanolt adtunk hozzá, mely 250 ng *orto*-anizinsavat (*o*-ANI: belső standard) és 25 µg *para*-hidroxi-benzoésavat (*p*-HBA: extrakciós karrier) tartalmazott. Vortexelést követően 4 °C-on 10 000 *g*-vel 10 percig centrifugáltuk és a felülúszót félretettük. A csapadékot 2 ml 90%-os metanollal újra extraháltuk, vortexeltük, és a fentiek szerint ismét centrifugáltuk. Az így képződött felülúszót a korábban félretetthez hozzáöntöttük. Ezzel az eljárással a növényben lévő szabad fenolos vegyületeket, illetve a kötöttek közül a metanolban oldódókat lehet kinyerni (Meuwly és Metraux 1993). Az összegyűjtött felülúszókat vákuumbepárlóban vizes fázisig pároltuk. Ezután 1 ml 5%-os (w/v) TCA-t adtunk a mintákhoz, vortexeltük, 4 °C-on 10 percig 10 000 *g*-vel centrifugáltuk. A felülúszókat 4 ml ciklohexán: etilacetát = 1:1 (v/v) elegyével particionáltuk. A felső szerves fázis a szabad fenolos vegyületeket, míg az alsó vizes fázis a metanolban oldódó kötött fenolos vegyületeket tartalmazta. A felső fázist Pasteur-pipettával üvegfiolákba helyeztük át és vákuumbepárlóban szárazra pároltuk, majd a mérésig -20 °C-on tároltuk. A kötött fenolos vegyületek savas hidrolízise a következőképpen történt. Az alsó vizes fázishoz 250 µl 0,1 mg/ml *p*-HBA-t, 5 µl 0,05 mg/ml *o*-ANI-t és 1,3 ml 8N HCl-t adtunk, majd 80 °C-on 60 percig inkubáltuk. Ezt követően a fent leírt módon particionáltuk, és a felső szerves fázisokat bepárlás után -20 °C-on tároltuk.

Az így előkészített és tárolt mintákat a folyadékkromatográfiás mérés előtt az „A” szolvens 500 µl-ben visszaoldottuk és 0,45 µm pórusméretű PTFE membránszűrőn átszűrtük. A méréshez Waters típusú HPLC-t (WATERS, Milford, MA, USA) használtunk, mely a következő részekből állt: W2690 pumparendszer (mely tartalmazott egy automata mintaadagolót, oszloptermosztátot és gradiens keverésre alkalmas pumparendszert), egy W474 scanning fluoreszcens detektor és W996 fotodiódasoros detektor. A mérési adatok kiértékelése Millennium32 program (WATERS, Milford, MA, USA) segítségével történt. A mintából 40 µl-t injektáltunk a 4 µm szemcseméretű, 150x4,6 mm méretű Synergi 4u Fusion-RP 80A (Phenomenex, Inc. Kalifornia, USA) analitikai oszlopra. A mérés során kétféle szolvenst használtuk (A: MilliQ víz, 0,1% hangyasav, B: 100% ACN, 0,1% hangyasav). Az elválasztáshoz használt gradiens program a 4. táblázatban található.

Az oszlophőmérséklet az elemzés során 40 °C volt. A SA detektálása 305 nm gerjesztési és 407 nm kisugárzási hullámhosszon, míg az oHCA detektálása 317 nm gerjesztési és 436 nm kisugárzási hullámhosszon történt.

4. táblázat A szalicilsav elválasztáshoz használt gradiens program.

	Idő (perc)	Áramlási sebesség (ml/perc)	A %	B %
1	0	1	85	15
2	10	1	50	50
3	11	1	0	100
4	15	1	0	100
5	16	1	85	15
6	28	1	85	15

A flavonoidok (rutin, miricetin, kvercetin és kempferol) detektálásához a diódasoros UV/VIS detektorral (W996 fotodiódasoros detektor, Waters, USA) 230 és 300 nm között teljes spektrumot vettünk fel, melynek célja az volt, hogy minden vegyületet a maximális abszorbanciánál tudjunk kiértékelni, így a jellemző UV-spektrum és a retenciós idő alapján értékelhető ki a kromatogram. Az ABA detektálása 265 nm-en történt szintén a fent említett UV-VIS detektorral.

4.6. Poliaminok mennyiségi analízise

A mintaelőkészítés során 0,2 g növényi mintát folyékony nitrogénben eldörzsöltünk, 2 ml 0,2 M jéghideg perklórsavval extraháltunk, majd 20 percig jégben állni hagytuk. Ezután 4 °C-on 20 percig 10 000 *g*-vel centrifugáltuk. A poliaminok mennyiségi analízise során a származékképzéshez a felülúszót használtuk (Németh és *mtsai*. 2002). A felülúszó 100 µl-hez 200 µl telített nátrium-karbonátot és 400 µl acetonban oldott danzil-kloridot (5 mg ml⁻¹) adtunk. A reakcióelegyet vortexelés után 60 °C-on, sötétben 60 percig inkubáltuk, majd 100 µl 100 mg ml⁻¹ töménységű prolin oldatot adtunk hozzá, és további 30 percig szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltuk. Ezután a danzilszármazékokat 500 µl toluollal 30 másodpercig extraháltuk, majd a felső, szerves fázist vákuum alatt bepároltuk. A maradékot 0,5 ml 100% metanolban felvettük 0,45 µm pórusméretű PTFE membránszűrőn átszűrtük közvetlenül a kromatográfiás analízis előtt. Folyadékkromatográfiás rendszer a következő egységekből állt: Waters 2690 rendszer, mely tartalmaz egy automata mintaadagolót, oszloptermosztátot és gradiens keverésre alkalmas pumparendszert (WATERS, Milford, MA, USA) és egy W474 típusú scanning fluoreszcens detektor.

A mérési adatok kiértékelése Millenium32 program (WATERS, Milford, MA, USA) segítségével történt. A fent leírt módon előkészített mintákból 5 µl-t injektáltunk az 5 µm szemcseméretű, C18 töltetű, 100x2.1 mm méretű Kinetex oszlopra (Phenomenex, Inc. Kalifornia, USA). A mérés során kétféle szolvenst használtuk (A: 44% ACN és B: ACN:MeOH = 7:3). Az

elválasztáshoz használt gradiens program az 5. táblázatban található. Az elemzés során az oszlophőmérséklet 40 °C volt. A danzil-kloriddal származékképzett PA-ok detektálása fluoreszcens detektorral 340 nm-es gerjesztési és 515 nm-es kisugárzási hullámhosszon történt.

5. táblázat Poliaminok elválasztásához használt gradiens program.

	Idő (perc)	Áramlási sebesség (ml/perc)	A %	B %
1	0	0,5	100	0
2	13	0,5	3	97
3	14	0,5	0	100
4	18	0,5	0	100
5	19	0,5	100	0
6	31	0,5	100	0

4.7. Diamin-oxidáz (EC 1.4.3.6.) és poliamin-oxidáz (EC 1.5.3.3.) aktivitások mérése

0,2 g növényi mintát folyékony nitrogénben homogenizáltunk, majd 600 µl jéghideg extrakciós puffert adunk hozzá, mely a következőket tartalmazta: 0,2 M TRIS (pH: 8), 10% (v/v) glicerol, 0,25% Triton X-100, 1 µM peptin és 0,5 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid. A mintákat 20 percig jégen tartottuk miközben 5 percenként vortexeltük, ezt követően 10 percig centrifugáltuk 15 000 g-vel 4 °C-on. A reakcióelegy 600 µl 100 mM Na-foszfát puffert (pH 6,6), 150 µl felülúszót valamint a 7,5 µl szubsztrátot tartalmazott, mely a DAO esetében 1 M PUT, míg a PAO esetében 1 M SPD. A reakciókat az adott szubsztráttal indítottuk, majd 90 perces 37 °C-on történt inkubáció után 50 µl 20%-os TCA-val állítottuk le. A megfelelő színképződéshez 22,5 µl 0,1 M-os o-aminobenzaldehidet adtunk a mintákhoz és vortexeltük, majd 20 percig jégen hagytuk. A fotometrálas előtt a mintákat centrifugáltuk 10 percig 4 °C-on 15 000 g-vel. Az enzimaktivitásokat 430 nm-en Shimadzu UV-VIS 160A (Kyoto, Japán) spektrofotométerrel mértük vak oldattal szemben, mely a reakcióelegy valamennyi komponensét tartalmazta a felülúszó kivételével (Takács és mtsai. 2016). A DAO és PAO enzim-aktivitásokat U mg⁻¹ friss tömegre adtuk meg.

4.8. A glutation-, γ -glutamil-cisztein- és cisztein-tartalom meghatározása

A minta előkészítés során 0,4 g növényi mintát folyékony nitrogénben 2 ml 0,1 M HCl és 1 mM Na₂EDTA jelenlétében eldörzsöltünk. A mintákat 10 000 g-vel 20 percig centrifugáltuk 4 °C-on. A totál tioltartalom meghatározásához a felülúszó 120 μ l-éhez 180 μ l 0,2 M HEPES (2-(ciklohexilamino)etánszulfonsav) puffert (pH 9,3) és 30 μ l 3 mM ditiotreitolt mértünk. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten 60 percig inkubáltuk, mialatt a diszulfid hidak redukálódtak.

A diszulfidok mennyiségének meghatározásához a szabad tiolok blokkolására volt szükség, mely során a 200 μ l extraktumhoz 300 μ l 0,2 mM-os HEPES puffert (pH 9,3) és 15 μ l 50 mM-os N-etilmaleimidet (NEM) pipettáztunk és szobahőmérsékleten 15 percig állni hagytuk. Ezt követően toluolos extrakcióval távolítottuk el a felesleges NEM-et. Az így kapott kivonatból 300 μ l-t új csőbe mértünk és diszulfidok redukálása céljából 30 μ l 3 mM-os DTT-t adtunk hozzá és a totál tiol frakciónál leírtak szerint inkubáltuk. A származékképzéshez 20 μ l 15 mM monobromobimánt adtunk a reakcióelegyhez és sötétben, szobahőmérsékleten 15 percig inkubáltuk. A tiolcsoportok származékképzése ez idő alatt történt meg, majd a reakciót 350 μ l 0,25%-os (v/v) metánszulfonsavval állítottuk le (Kocsy és mtsai. 2001).

A tiolvegyületek meghatározásának folyadékkromatográfiás méréséhez Waters típusú HPLC-t (WATERS, Milford, MA, USA) használtunk, mely a következő részekeségekből állt: W2690 pumparendszer (automata mintaadagolóval, oszloptermosztáttal és gradiens keverésre alkalmas pumparendszerrel) és egy W474 scanning fluoreszcens detektor. A mérési adatok kiértékelése Millenium32 program (WATERS, Milford, MA, USA) segítségével történt. A mintákból 40 μ l-t injektáltunk a 10 μ m szemcseméretű, 250x4 mm méretű BST Rutin 10 C18 BD oszlopra. A mérés során az alábbi szolvenseket használtuk: A: 90% víz, 10% MeOH, 0,25% ecetsav (pH 3,9) B: 90% MeOH, 10% víz, 0,25% ecetsav. Az elválasztás az 6. táblázatban található gradiens programmal történt. Az oszlophőmérséklet 30 °C volt. A származékképzett minták detektálása fluoreszcens detektorral 380 nm-es gerjesztési és 480 nm-es kisugárzási hullámhosszon történt.

6. Táblázat. Tiolok elválasztásához használt gradiens program.

	Idő (perc)	Áramlási sebesség (ml/perc)	A %	B %
1	0	1,5	100	0
2	10	1,5	92	8
3	15	1,5	86	14
4	17,5	1,5	0	100
5	25,5	1,5	0	100
6	26,5	1,5	100	0
7	31	1,5	100	0

4.9. Fitokelatin-szintáz enzim aktivitásának mérése és fitokelatinok mennyiségi meghatározása

A 750 mg növényi mintát kvarchomokkal dörzsmozsárban dörzsöltük el 750 μ l 50 mM TRIS (pH 8,0) pufferrel, mely 10 mM β -merkaptotetanolt és 14% (v/v) glicerolt tartalmazott. A homogenizátumot 13 000 g-vel 10 percig centrifugáltuk 4 °C-on. Az *in vitro* PCS aktivitásméréshez és az *in vivo* PC-szint méréséhez a felülúszót használtuk, és a következő módszerrel végeztük (Chen és mtsai. 1997). A 300 μ l végtérfogatú reakcióelegy összetétele a következő volt: 200 mM TRIS (pH 8,0), 10 mM β -merkaptotanol, 10 mM GSH, 0,5 mM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ és 200 μ l növényi minta. A reakciót a növényi minta hozzáadásával indítottuk és 60 percig 35 °C-on inkubáltuk. A reakció leállításához 30 μ l 50%-os 5-szulfoszalicilsavat használtunk, majd 10 percig jégen inkubáltuk. A kicsapódott fehérjét 15 000 g-vel történt 5 perc centrifugálással távolítottuk el, és a felülúszót használtuk a HPLC analízishez.

A folyadékkromatográfiás méréshez Waters típusú HPLC-t (WATERS, Milford, MA, USA) használtunk, mely a következő részekegységekből állt: W2690 pumparendszer, (mely tartalmazott egy automata mintaadagolót, oszloptermosztátot és gradiens keverésre alkalmas pumparendszert), egy W 501 pumpa (a származékképzéshez) és egy diódasoros UV/VIS detektor (W996). A mérési adatok kiértékelése Millenium32 program (WATERS, Milford, MA, USA) segítségével történt. A mintából 100 μ l-t injektáltunk a fordított fázisú, 5 μ m szemcseméretű, 100x2,1 mm méretű Hypersil ODS analitikai oszlopra. A mérés során az alábbi szolvenseket használtuk: A: víz, 0,1% trifluor-ecetsav (TFA); B: víz, 20% acetonitril (ACN), 0,1% TFA. Az elválasztás a 7. táblázatban található gradiens programmal történt. Az oszlophőmérséklet 25 °C volt. A fitokelatinok mennyiségi meghatározása „post-column” származékképzéssel történt, a következő összetételű Ellman-reagenssel: 50 mM Na-foszfát puffer (pH 8), 10% ACN és 74,5 μ M DTNB. A reagens áramlási sebessége 1,5 ml/perc volt. A reagens és a minta egy 10 cm hosszú és 1 mm átmérőjű tefloncsőben keveredett. A származékképzés után az elegy abszorbanciáját 410 nm-en mértük az UV detektorral.

A γ -Glu-Cys egységeket tartalmazó fitokelatinok (PC_2 , PC_3 és PC_4) koncentrációját a GSH-ra felvett kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg. A PCS specifikus aktivitását a képződött PC nmól min^{-1} g $^{-1}$ friss tömegre adtuk meg.

7. táblázat. A fitokelatinok HPLC analízise során használt gradiens program.

	Idő (perc)	Áramlási sebesség (ml/perc)	A %	B %
1	0	0,5	100	0
2	2,5	0,5	75	25
3	17,5	0,5	0	100
4	18	0,5	0	100
5	19	0,5	100	0
6	25	0,5	100	0

4.10. Aszkorbát-tartalom meghatározása

0,5 g növényi mintát folyékony nitrogénben homogenizáltunk, majd hozzáadtunk 3 ml 1,5%-os meta-foszforsavat. Az össz aszkorbát-tartalom (AA) meghatározása a dehidroaskorbát-tartalom (DHA) ditiotreitol általi teljes redukálása után történt meg, majd az össz AA és a DHA különbségéből számítottuk ki az AA-tartalmat. Az elválasztást Hyperprep HS C18 oszlopon hajtottunk végre (250x4.6 mm, 8 µm) (ThermoFisher Scientific Inc.) Alliance 2690 rendszer segítségével (Waters, Milford, MA, USA). A kimutatáshoz W996 fotodiódasoros detektorral (Waters, Milford, MA, USA) 248 nm-en történt (Szalai és mtsai. 2014).

4.11. Lipid extrakció és zsírsav analízis

A lipid extrakció és zsírsav analízis a következő lépésekben történt (Pál és mtsai. 2007). 1 g növényi mintát folyékony nitrogénben eldörzsöltünk, majd 3x4 ml metanol: kloroform = 2:1 elegyével centrifugacsövekbe átmossuk, 4 ml vizet adtunk hozzá, és alaposan összeráztuk, illetve vortexeltük. A dörzsmozsarat még egyszer 4 ml kloroformmal átmossuk a centrifugacsőbe és 4 ml 2%-os NaCl oldatot mértünk hozzá. Az extraktumot összeráztuk, vortexeltük és 10 percig 5 000 g-vel centrifugáltuk. Az alsó kloroformos fázist Pasteur pipettával üvegfiolába pipettáztuk, és a csapadékot 2,5 ml kloroformmal újra extraháltuk, azaz összeráztuk, vortexeltük és 5 percig 5 000 g-vel centrifugáltuk. Az alsó kloroformos fázist Pasteur pipettával leszívtuk, és az előzőhöz adtuk. A mintákat vákuumbepárlóban szárazra pároltuk, majd 500 µl toluol: etanol = 4:1 elegyével visszaoldottuk, és a mérésig -20 °C-on tároltuk.

Az összlipid extraktumból a lipid frakciók szétválasztása vékonyréteg kromatográfiával történt. Az extraktumból 4 x 50 µl-t vittünk fel Hamilton fecskendővel a 20 x 20 cm-es szilikagél

(szilikagél 60, Merck, Darmstadt, Germany) rétegre. Száradás után a futtatás a következő összetételű elegyben történt: 50 ml kloroform, 20 ml acetone, 10 ml metanol, 10 ml ecetsav és 5 ml víz. Futtatás után a réteget megszárítottuk, majd primulinnal (100 mg primulin/100 ml acetone:víz = 4:1) lefújtuk. Száradás után UV-fényben a szétvált frakciók foltjai ceruzával körülrajzolhatók. Az egyes foltokat lekapargattuk és üvegfiolába raktuk.

A zsírsavak metilészterezéséhez a lekapargatott szilikagélhez 3 ml kénsavas metanolt (97,5 ml metanol és 2,5 ml kénsav) és belső standardként, 10 µl heptadekánsavat (1 µg/ µl) adtunk. Az elegyet 45 percre 70 °C-os vízfürdőbe, ezután 10 percig jégre helyeztük. A mintákhoz 1 ml vizet és 0,5 ml heptánt adtunk és vortexeltük. A fázisszétválás után a felső heptán fázist Pasteur pipettával gázkromatográfiás fiolákba pipettáztuk és az elemzésig -20 °C-on tároltuk.

A zsírsavak metilésztereinek analízise Shimadzu GC-FID2010 (Shimadzu Co., Kyoto, Japan) gázkromatográffal történt, SP-2380 kapilláris oszlopon (30 m x 0,25 mm I.D., df= 0,20 µm; Supelco/Sigma-Aldrich Co., St.Louis, MO, USA). Injektor hőmérséklete 200 °C volt, míg a mérés során a kollonnatér hőmérséklete a következőképpen változott: a kezdeti 175 °C-os hőmérséklet, nyolc perc elteltével 50 °C/perc sebességgel 240 °C-ra emelkedett, és ezt 5 percen át tartotta. Az injektálás split módban 1/5 split aránnyal történt. A vivőgázként héliumot használtunk, sebessége: 37,8 cm/perc volt. A kiértékeléshez a heptadekánsavat használtuk, mint belső standard. Az adatok kiértékelése a GC 2.10 szoftverrel történt (Shimadzu Co., Kyoto, Japan).

A kettőskötés indexet (DBI) a következőképpen számoltuk: a telítetlen zsírsavak mól %-a szorozva az egyes telítetlen zsírsavakban lévő kettőskötések számával [$1 \times (18:1\%) + 2 \times (18:2\%) + 3 \times (18:3\%)$]. A telítetlenségi százalék értékeket (telítetlenségi %) a $18:1\% + 18:2\% + 18:3\%$ képlet segítségével a mól % értékekből számítottuk. A $t_{16:1}$ zsírsav ugyan tartalmaz telítetlen kötést, de szerkezetéből adódóan telített zsírsavként viselkedik a növényekben, így ennek a mennyiségét nem vettük figyelembe sem a DBI, sem a telítetlenségi % számításakor.

A következő membránfrakciókban vizsgáltuk a zsírsav-összetételt ($t_{16:1}$, 16:0; 18:0; 18:1: olajsav; 18:2: linolsav és 18:3: linolénsav): monogalaktozil-diacilglicerol (MGDG), digalaktozil-diacilglicerol (DGDG), foszfatidil-etanolamin (PE) és PG.

4.12. Génexpresszió vizsgálata valós idejű PCR-rel

A vizsgálni kívánt gének expressziós mintázatának vizsgálatához levél- és gyökérmintákat szedtünk (a 3 független biológiai ismétlésen kívül 3-3 technikai ismétlést alkalmaztunk). Az RNS izolálása TRIzol reagenssel (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), a minták kezelése DNase I-gyel, tisztítása Direct-zol™ RNA MiniPrep Kit-tel (Zymo Research, Irvine, CA, USA) történt a gyártó utasításai szerint. Az izolált RNS mennyiségét és tisztaságát fotometriásan (NanoDrop ND-1000 UV-Vis spectrophotometer, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) határoztuk meg.

A cDNS szintéziséhez M-MLV Reverse Transcriptase-t (Promega Corporation, Madison, WI, USA) használtunk. A valós idejű polimeráz láncreakció (real-time PCR) kivitelezése a vizsgálni kívánt génekre és a háztartási génekre specifikus primerek (Sigma-Aldrich Co. LLC.) (8. táblázat), PCRBIO SyGreen Mix (PCR Biosystems, London, UK) és CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) segítségével, a gyártó által mellékelt leírás szerint történt. A cél gének expresszióját a referencia gén expressziójához viszonyítottuk, az expressziós különbségeket a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszerrel számoltuk ki (Livak és Schmittgen 2001).

8. táblázat. Búza- és rizsnövényekhez használt primer szekvenciák.

Gén		Primer szekvenciák (5' → 3')	Referencia
<i>Ta30797</i> (foszfoglúkonát dehidrogenázhoz hasonló)	Forward Reverse	GCCGTGTCCATGCCAGTG TTAGCCTGAACCACCTGTGC	(Paolacci és mtsai. 2009)
<i>TaADC</i>	Forward Reverse	TCTACCCCGTCAAGTGCAAC GACGAGGCAGCTCATGGT	tervezett
<i>TaODC</i>	Forward Reverse	CGTGCGTGAGGTGATAGG AGCTGAGGGTGCCGTAGA	tervezett
<i>TaOAT</i>	Forward Reverse	TGATGATCGCTCGGCTTTACA CAGTAGCACCCATTGTTGCAG	tervezett
<i>TaP5CS1</i>	Forward Reverse	AGGCTGGGTATGAGAGTGC TAAGGCATCAGGTCGGGAC	tervezett
<i>TaPAO</i>	Forward Reverse	CCAGCCTCCAGTCCGCAAC GCCCAGCTCCTCCACCTCGTC	(Xiong és mtsai. 2017)
<i>TaSAMDC</i>	Forward Reverse	ACAGCCTTCTCCACACAAGA TCCAGACCAGTCATGCACA	tervezett
<i>TaSPDS</i>	Forward Reverse	AGGTATTCAAGGGTGCGGTG TGGGTTACAGGAGTCAGGA	tervezett
<i>TaNCED</i>	Forward Reverse	CCTCGAAGCCCAGCACTAAT GAGAGCGAGAGGTCCAATGG	(Gallé és mtsai. 2013)
<i>OsUBQ5</i>	Forward Reverse	ACCACTTCGACCGCCACTACT ACGCCTAAGCCTGCT GGTT	(Jain és mtsai. 2006)
<i>OsODC3</i>	Forward Reverse	TCTCCACGTCCAACATGAAGAC GGCACTTTCCAGTGATCTAGC	(Do és mtsai. 2013)
<i>OsADC3</i>	Forward Reverse	AATCATCCCAATCCAGTGCCTT TGCCTCCCGCTGATGAAGT	(Do és mtsai. 2013)
<i>OsSPDS/SPMS3</i>	Forward Reverse	AGAGCATGTGGTTGCATACGC AACCCTTGAATGTCTCACGGC	(Do és mtsai. 2013)
<i>OsPCS9</i>	Forward Reverse	ATGGGGGCGGAGGTCCATGA TCAATGCAAGTTCTAGGAGTGA	(Shen és mtsai. 2010)

4.13. Statisztikai analízis

Az eredmények 10 ismételés átlagai a klorofill-*a* fluoreszcencia indukciós és a fotoszintézis aktivitásmérések, 3-5 ismételés átlagai fotometriás mérések, a HPLC és GC analízisek, 3 ismételés átlagai a génexpressziós elemzések meghatározása során. A paraméterek változásait az azonos napos kontroll növényekben mért értékekhez hasonlítottuk. A szignifikancia vizsgálatához Student-féle kétmintás *t*-próbát használtunk. A vizsgált paraméterek közötti kapcsolatok vizsgálatához a paraméterek korrelációs elemzését SPSS 16.0 programmal végeztük.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Poliamin-tartalom változása és annak más védővegyületekkel való kapcsolata különböző stresszhatások során

A PA-k mennyiségi változásait számos stresszhatás esetén, több növényfajban is leírták. Bizonyos esetekben a PA-ok mennyisége és a stressztolerancia mértéke között pozitív összefüggést írtak le, azonban ezek a megállapítások a növényfajtól, az alkalmazott stresszfaktortól és az adott PA-vegyülettől függően is eltérő képet mutattak. A PA-tartalom és a stressztolerancia mértéke közötti összefüggés tisztázása érdekében különböző stresszhatások során vizsgáltuk a legáltalánosabban előforduló PA-ok (PUT, SPD, SPM és KAD) kezdeti, illetve stresszhatásra bekövetkező mennyiségi változását gazdaságilag jelentős gabonanövényekben. Külön kérdésként kerestük a választ arra, hogy milyen kapcsolatban állnak a PA-ok más védővegyületekkel és növényi hormonokkal.

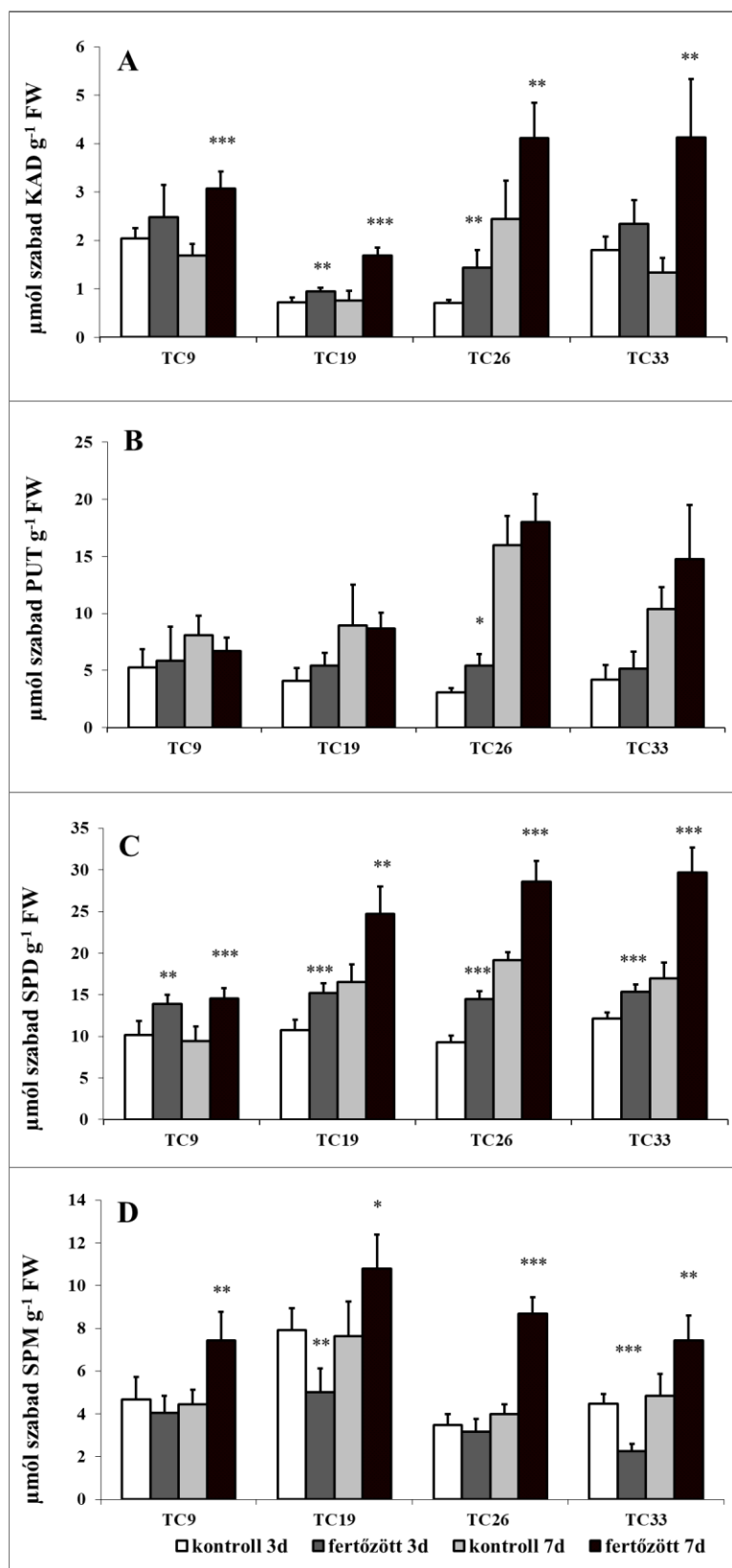
5.1.1. *Lisztharmatfertőzés vizsgálata búzanövényekben*

A korábbi szántóföldi megfigyelésünk alapján négy búza genotípust választottunk ki az eltérő lisztharmattal szembeni toleranciájuk alapján: a TC9 és TC19 lisztharmattal szemben toleránsabb, míg a TC26 és TC33 érzékenyebb vonalnak mutatkozott. A növénynevelés a 4.1.1. pontban leírtaknak megfelelően történt.

5.1.1.1. *A poliamin-tartalom változása lisztharmatfertőzést követően búzanövényekben*

A poliaminok közül a KAD, a PUT, a SPD és a SPM szabad és konjugált (a kis molekulákhoz kötött) formáit elemeztük. Az egyedi PA-vegyületek szabad és konjugált formái ugyanabban a nagyságrendben voltak kimutathatók a búzalevelekben, és mindkét frakcióban a SPD szintje volt a legnagyobb (7-8. ábra).

A szabad KAD-tartalom kontroll körülmények között körülbelül kétszerese volt a TC9 és TC33 vonalakban, mint a másik két genotípusban, bár a TC26 esetén a 7 napos kontrollban emelkedést tapasztaltunk a 3 naposhoz képest (7. A ábra). A lisztharmatfertőzést követően 3 nappal a szabad KAD-tartalom a TC19 és TC26 vonalakban, míg 7 nap elteltével valamennyi genotípus esetén megemelkedett. A legnagyobb mértékű emelkedést a TC33 vonalban mértük (7. A ábra).



7. ábra A szabad poliamin-tartalom változása (kadaverin (KAD): A, putrescin (PUT): B, spermidin (SPD): C és spermin (SPM): D) lisztharmatfertőzést követően 3 illetve 7 nappal eltérő lisztharmat rezisztenciájú búza genotípusokban. *, ** és ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten az azonos napi kontrollhoz képest ($n=5$).

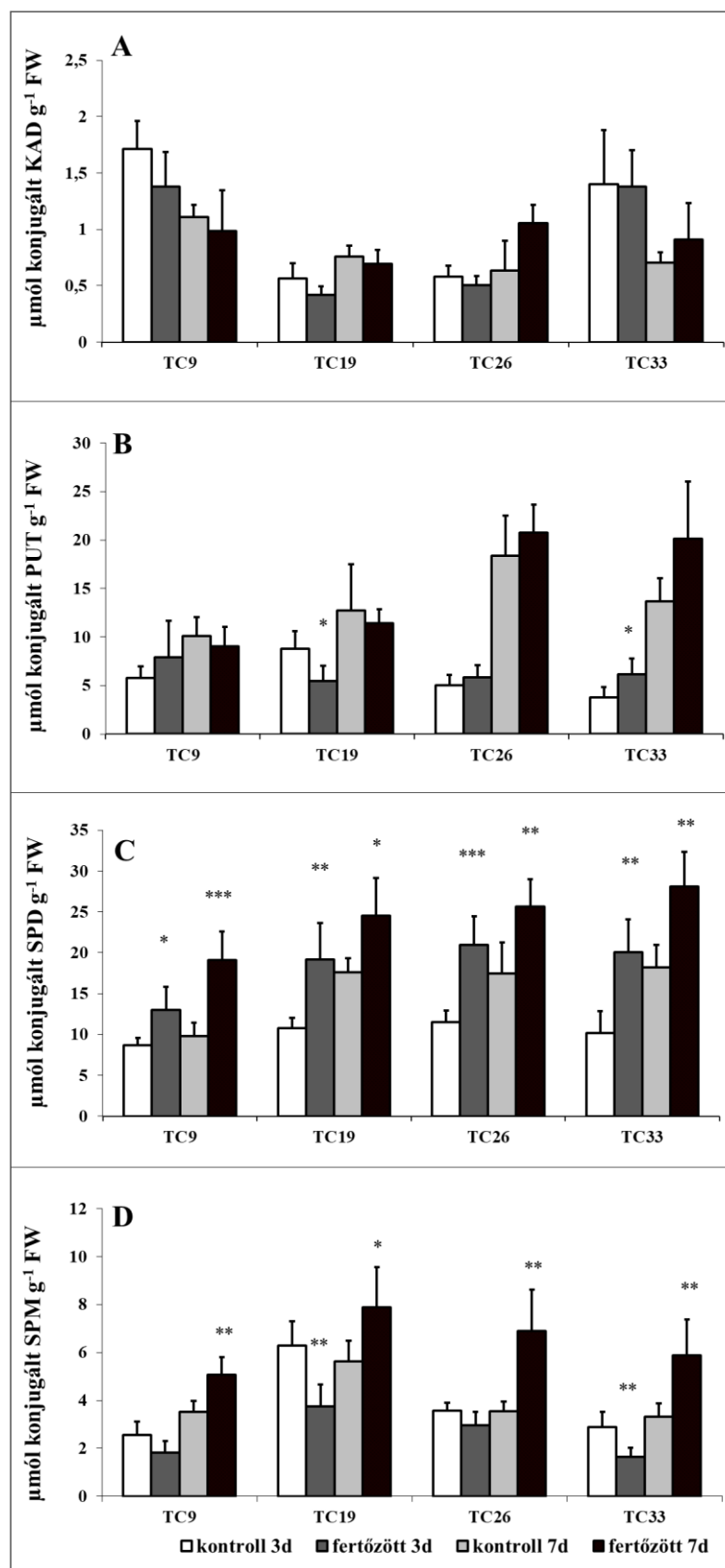
A szabad PUT mennyisége a 3 napos kontroll növényekben nem különbözött egymástól jelentősen, szignifikáns eltérést csak a TC9 és TC26 vonalak között tapasztaltunk. A 7 napos TC26 és TC33 kontroll növények esetén a szabad PUT-tartalom szignifikáns emelkedést mutatott a 3 napos kontrollhoz képest. A fertőzés az azonos napi kontrollokhoz képest csak a 3 napos TC26 esetén okozott a szabad PUT-szintben emelkedést (7. B ábra).

A szabad SPD mennyisége valamennyi vonal 3 napos kontroll növényeiben hasonló értékeket mutatott és a 7. napon a TC9 kivételével emelkedést mutatott a 3. naphoz képest (7. C ábra). A lisztharmatfertőzés mind a 4 genotípusban a szabad SPD mennyiségének szignifikáns emelkedését eredményezte már a 3. napon. A legnagyobb mértékű emelkedés a 7 napos fertőzést követően a TC33 vonal esetén mértük.

A szabad SPM-tartalom a TC19 genotípusban közel kétszer akkora volt, mint amit többi három esetében mértünk, és ez a tendencia mind a 3 napos, mind a 7 napos kontroll növények esetében megmutatkozott (7. D ábra). A fertőzést követően 3 nappal a TC19 és TC33 vonalakban a szabad SPM szintje csökkent, míg a 7. napon valamennyi genotípusban szignifikánsan megemelkedett, legnagyobb mértékben a TC26 esetében.

A konjugált PA-tartalmak kezdeti szintjei hasonló mintázatot mutattak ahhoz, mint amit a szabad frakció esetén fent leírtunk. A konjugált KAD szintje a TC9 és TC33 kontroll növények esetén a 7. napon csökkent a 3. naphoz képest, de a fertőzés nem befolyásolta (8. A ábra). A konjugált PUT-tartalom a 7 napos kontroll TC26 és TC33 vonalakban megemelkedett a 3 napos kontrollhoz viszonyítva, de a fertőzés itt sem okozott jelentős változást (8. B ábra). A konjugált SPD mennyisége a szabad frakció esetén leírtakkal megegyezően megemelkedett a kontroll 7 napos TC19, TC26 és TC33 genotípusokban a 3. napi kontroll értékekhez képest, továbbá a fertőzés szignifikáns emelkedést eredményezett már 3 nap elteltével valamennyi búzavonalban (8. C ábra). A konjugált SPM-tartalom változása a kontroll és lisztharmat-fertőzött vonalakban a szabad SPM-szinttel megegyező mintázatot mutatott (8. D ábra). A TC19 kezdeti konjugált SPM szintje magasabb volt, mint a többi három vizsgált genotípusé, valamint a fertőzés hatására 3 nap elteltével a TC19 és TC33 esetén csökkenést, míg 7 nap után emelkedést tapasztaltunk valamennyi genotípusba.

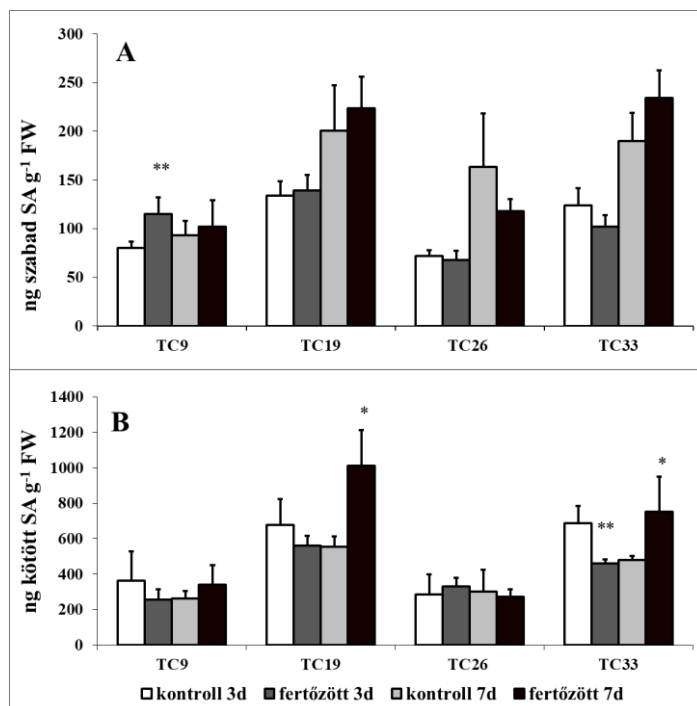
A PA-ok kezdeti illetve fertőzést követően mért mennyisége és a fertőzéssel szembeni rezisztenciafoka között összefüggést nem tudtunk kimutatni.



8. ábra A konjugált poliamin-tartalom változása (kadaverin (KAD): A, putrescin (PUT): B, spermidin (SPD): C és spermin (SPM): D) lisztharmatfertőzést követően 3 illetve 7 nappal eltérő lisztharmat rezisztenciájú búza genotípusokban. *, ** és ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten az azonos napi kontrollhoz képest ($n=5$).

5.1.1.2. A szalicilsav-tartalom változása lisztharmatfertőzést követően búzanövényekben

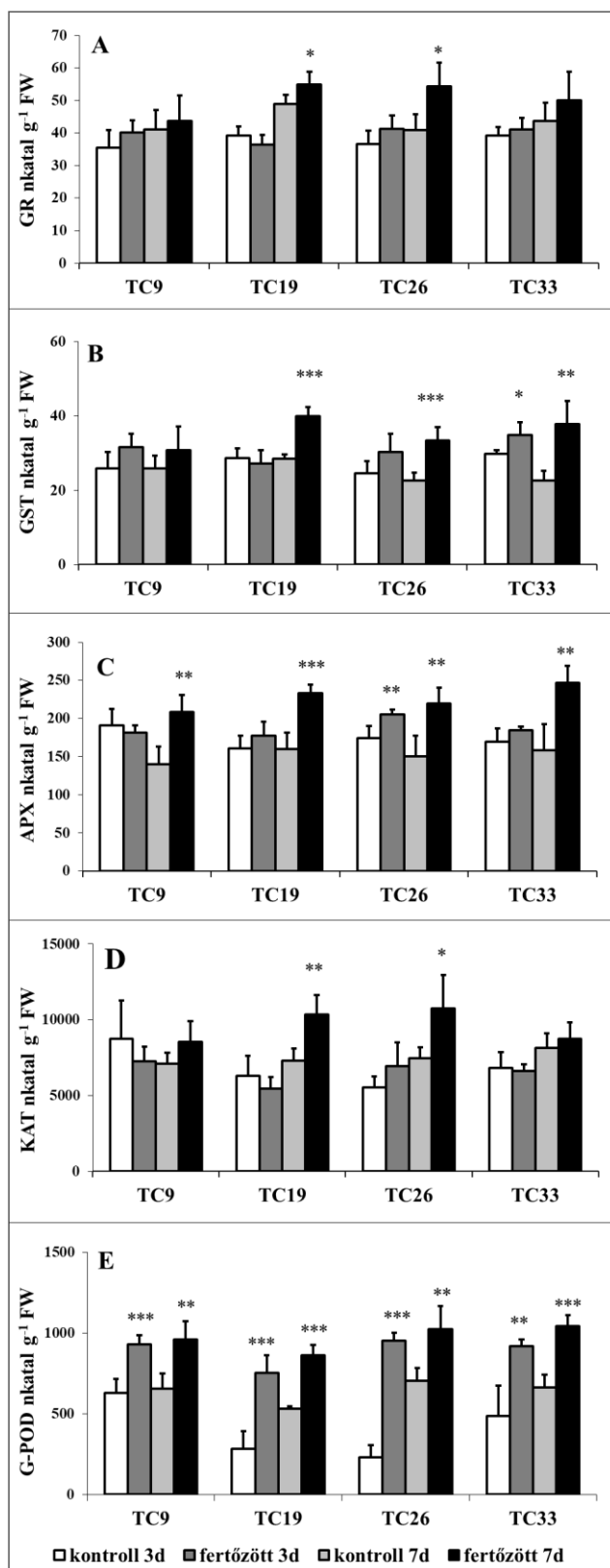
Bár a SA kötött formában 2-5-ször nagyobb mennyiségben fordult elő, mint a szabad frakcióban, mind a szabad, mind a kötött endogén SA-tartalom szignifikánsan nagyobb volt a TC19 és a TC33 vonalakban, mint a TC26 és TC9 vonalakban kontroll körülmények között. A lisztharmatfertőzést követően a szabad SA-tartalom a három napos fertőzött TC9 kivételével nem változott, míg a kötött SA 3 nappal a fertőzést követően csökkent a TC33-ban, de 7 nap elteltével a TC33 és a TC19 vonalakban is szignifikánsan emelkedett. A másik két genotípus esetében - függetlenül a lisztharmat rezisztencia fokára - szignifikáns változás nem volt megfigyelhető (9. ábra).



9. ábra A szabad (A) és kötött (B) szalicilsav-tartalomban (SA) mért változások lisztharmatfertőzést követően 3 illetve 7 nappal eltérő lisztharmat rezisztenciájú búza genotípusokban. * és **: szignifikáns $P \leq 0,05$ és $0,01$ szinten az azonos napi kontrollhoz képest ($n=5$).

5.1.1.3. Az antioxidáns enzimek aktivitásainak változása lisztharmatfertőzést követően búzanövényekben

Az antioxidáns enzimek aktivitásainak kezdeti értékei nem mutattak nagy eltérések a genotípusok között, kifejezett különbséget csak a G-POD enzim értékeiben találtunk. A 3 napos kontroll növényekben a G-POD aktivitása feleakkora volt a TC19 és TC26 vonalakban, a másik két genotípushoz képest (10. E ábra), azonban ez az eltérés a 7. napon már nem volt kimutatható.



10. ábra A glutation-reduktáz (GR: A), a glutation-S-transzferáz (GST: B), az aszkorbát-peroxidáz (APX: C), a kataláz (KAT: D) és a gvajakol-peroxidáz (G-POD: E) enzimek aktivitás változása lisztharmatfertőzést követően 3 illetve 7 nappal eltérő endogén szalicilsav-tartalmú búza genotípusokban. *, ** és ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten az azonos napi kontrollhoz képest ($n=5$).

A lisztharmatfertőzés valamennyi enzim aktivitására hatással volt, de a négy genotípusban eltérő módon. A GR-aktivitás a fertőzést követő 7. napon megemelkedett a TC19 és TC26 vonalakban (10. A ábra). A GST-aktivitás a TC33 genotípusban már a fertőzés 3. napján megemelkedett és ez a 7. napon is kimutatható volt, míg a TC19 és TC26 vonalak esetén a GST enzim indukciója csak a 7. napon volt mérhető (10. B ábra). Az APX enzim aktiválódása a fertőzés után 7 nappal valamennyi genotípusban kimutatható volt, és a TC26 esetén már a 3. napon is (10. C ábra). A KAT-aktivitás változása hasonló tendenciát mutatott a GR esetében leírtakkal (10. D ábra). A lisztharmatfertőzés a G-POD enzimaktivitását már 3 nap elteltével valamennyi vonalban serkentette (10. E ábra).

5.1.1.4. A vizsgált paraméterek korrelációs elemzése

A vizsgált paraméterek között a korreláció irányának és mértékének feltárására SPSS 17.0 statisztikai programot használtunk. A korreláció elemzés eredményét a Függelék 1. táblázata mutatja, a vastagon kiemelt értékek a szignifikáns korrelációs kapcsolatokat jelölik.

A szabad SA-tartalom szoros, pozitív korrelációs kapcsolatot mutatott a szabad és konjugált SPD- és SPM-tartalommal. A PA-ok szabad frakcióiban tapasztalt változások nemcsak az azonos vegyületek konjugált frakcióival mutattak pozitív összefüggést, hanem a különböző PA-vegyület egymás között is szignifikáns kapcsolatot mutattak. Az antioxidáns enzimek aktivitás értékei a legtöbb esetben szoros, pozitív összefüggést mutattak a PA-tartalmakkal. A legtöbb szignifikáns kapcsolat a SPD illetve a GR esetében volt kimutatható.

Megállapíthatjuk, hogy habár a PA-ok és SA, valamint a PA-ok és az antioxidáns enzimek között több szignifikáns pozitív kapcsolat volt kimutatható, egyik PA-vegyület mennyisége és annak változása sem indokolta a lisztharmat rezisztenciában tapasztalt különbségeket.

5.1.2. Alacsony hőmérséklet hatásainak vizsgálata búza-, zab- és árpanövényekben

A alábbi vizsgálathoz az előzőekben már vizsgált magasabb SA-tartalommal rendelkező TC19 és TC33 tavaszi búza mellé kiválasztottunk további hat eltérő fagyérzékenyséű gabona genotípust: az Mv Hombár és Mv8 őszi búza, a Kwant és Mv Pehely tavaszi zab, a Petra őszi árpa és a Jubilant tavaszi árpa genotípusokat. A növénynevelés a 4.1.2. pontban leírtaknak megfelelően történt.

5.1.2.1. Alacsony hőmérséklet hatása a poliamin-tartalomra búza-, zab- és árpanövényekben

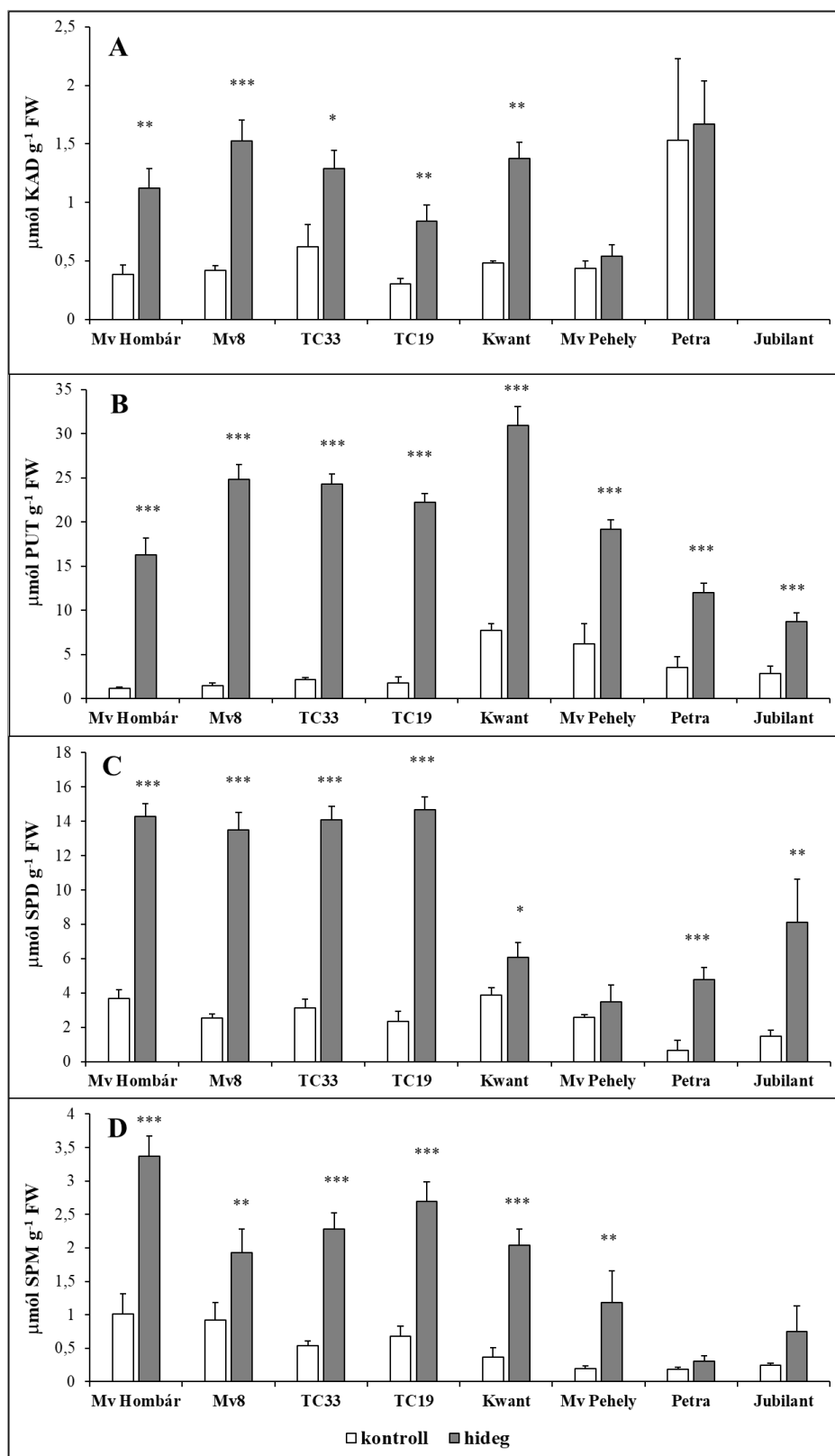
A PA-ok közül a KAD fordult elő a legalacsonyabb mennyiségben a vizsgált növényekben. A búza és zab genotípusokban a KAD hasonló mennyiségben volt mérhető, és a hidegkezelés hatására is hasonló mértékben emelkedett meg. Kivételt csak az Mv Pehely képezett, melyben mennyisége változatlan maradt (11. A ábra). A Petra, őszi árpában a KAD szintje kiemelkedően magas, ellenben a Jubilant, tavaszi árpában kimutathatósági határ alatt volt, és mennyiségüket a hidegkezelés sem befolyásolta (11. A ábra).

Kontroll növénynevelési körülmények között a két zab genotípusban volt a legmagasabb a PUT-szint. Az árpanövényekben a zabhoz képest körülbelül fele akkora volt a PUT mennyisége, míg a legalacsonyabb PUT-tartalom a búzavonalakban volt mérhető függetlenül a vetés típusától (11. B ábra). Az alacsony hőmérsékleti kezelést követően nagymértékű PUT-felhalmozódást figyeltünk meg, mely kevésbé volt látványos az árpanövényekben, mint a búza- vagy zabnövényekben (11. B ábra).

A kezdeti SPD-szint a búza- és zabnövényekben hasonló volt, de alacsonyabb volt a két árpanövényben (11. C ábra). Az alacsony hőmérsékleti kezelés hatására a SPD szintje megemelkedett a búza és árpa genotípusokban. Annak ellenére, hogy a zabnövényekben a SPD-szint viszonylag magas volt, a hidegkezelés csak kismértékű növekedést (Kwant) vagy egyáltalán nem okozott változást (Mv Pehely) (11. C ábra). A SPM-tartalom a búza genotípusokban kissé nagyobb volt, mint a többi gabonanövényben (11. D ábra).

A SPM-tartalom erőteljes emelkedését eredményezte az alacsony hőmérsékleti stressz az őszi és tavaszi búzavonalakban, de ez az emelkedés arányaiban még kifejezettebb volt a zabnövényekben. Az árpanövényekben mind a kontroll, mind a hidegkezelést követően mért SPM mennyisége alacsony volt (11. D ábra).

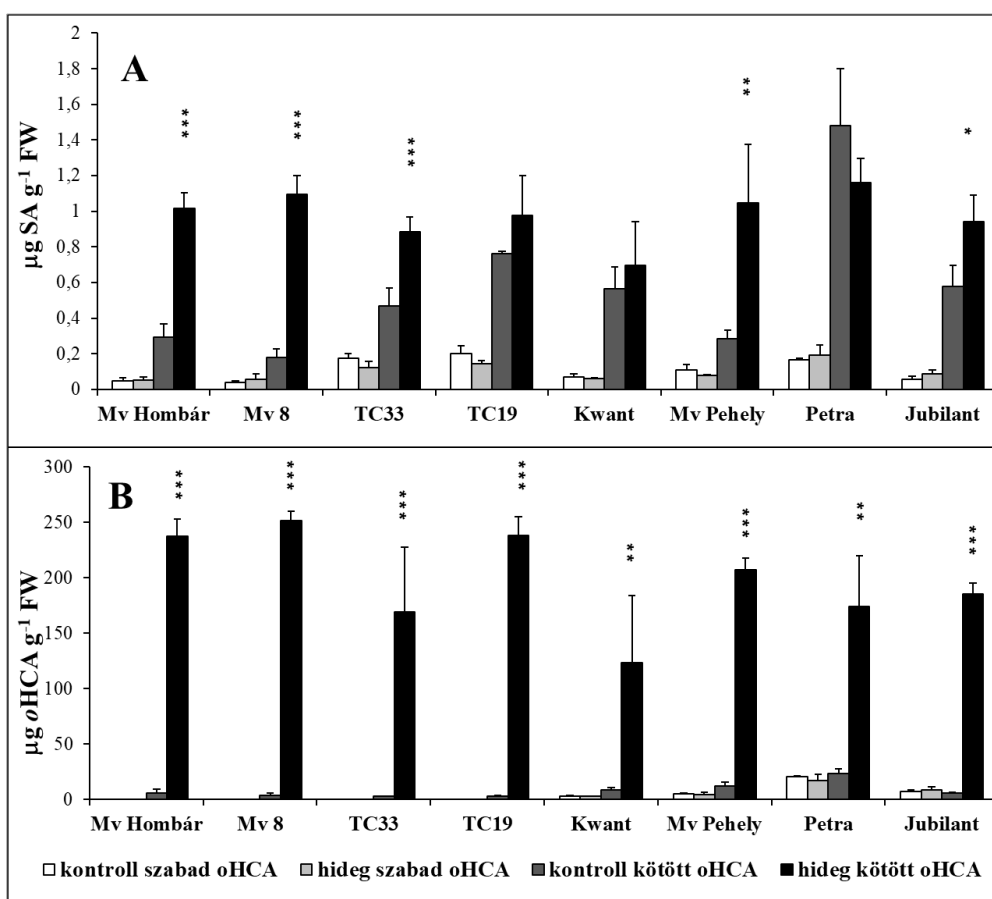
Összeségében elmondható, hogy a PA-tartalomban tapasztalt különbségek illetve változások szorosabb összefüggést mutattak a növényfajhoz való tartozással, mint a fagytoleranciával.



11. ábra A poliamin-tartalom változása (kadaverin (KAD): A, putrescin (PUT): B, spermidin (SPD): C és spermin (SPM): D) őszi búza (Mv Hombár és Mv8), tavaszi búza (TC33 és TC19), tavaszi zab (Kwant és Mv Pehely), őszi árpa (Petra) és tavaszi árpa (Jubilant) növények levelében hidegkezelést követően. *, ** és ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten az azonos napi kontrollhoz képest ($n=5$).

5.1.2.2. Alacsony hőmérséklet hatása a szalicilsav-tartalomra búza-, zab- és árpanövényekben

A SA kezdeti mennyisége, mind szabad, mind kötött formában magasabb volt a tavaszi búzavonalakban, az őszi búzákhöz képest (12. A ábra). A szabad SA tartalma kicsit alacsonyabb, míg a kötött SA szintje körülbelül kétszer akkora volt a Kwant genotípusnak, mint a másik, Mv Pehely, tavaszi zabvonalnak. A Petra őszi árpa esetében mértük a legnagyobb össz SA-szintet, míg a tavaszi árpa, a Jubilant kötött SA tartalma a tavaszi búzavonalakhoz hasonló értéket mutatott. A szabad SA mennyisége a hidegkezelés során egyik genotípusban se változott, míg szignifikáns növekedést tapasztaltunk a hidegkezelést követően az Mv Hombár, Mv8, TC33, Mv Pehely és Jubilant, különös tekintettel az őszi búza és az Mv Pehely tavaszi zabvonalakra (12. A ábra). A tavaszi genotípusok közül a TC19 búza, a Kwant zab és a Jubilant árpa, valamint az őszi genotípusok közül a Petra árpavonalak, mind viszonylag magasabb kezdeti SA-tartalommal jellemezhetők, így az alacsony hőmérsékleti stressz ezt már nem volt képes fokozni (12. A ábra).

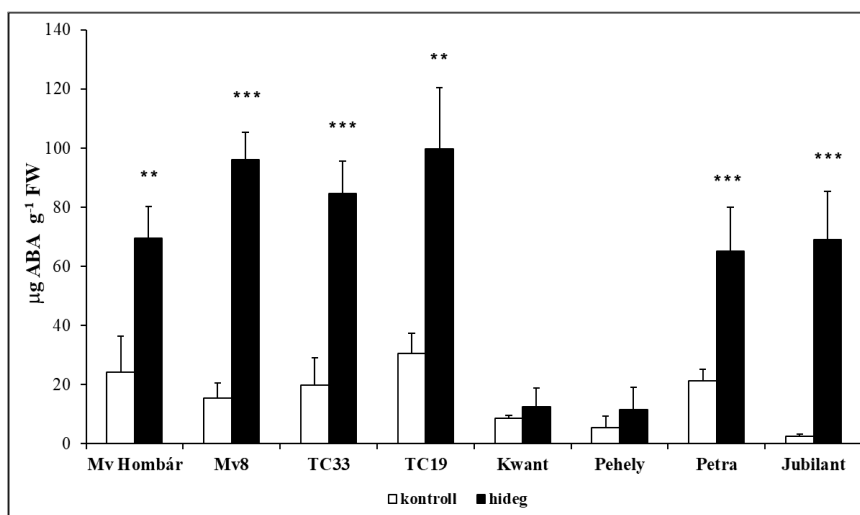


12. ábra A szalicilsav- (SA: A) és orto-hidroxi-fahéjsav- (oHCA: B) tartalom változása őszi búza (Mv Hombár és Mv8), tavaszi búza (TC33 és TC19), tavaszi zab (Kwant és Mv Pehely), őszi árpa (Petra) és tavaszi árpa (Jubilant) növények levelében hidegkezelést követően. *, ** és ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten az azonos napi kontrollhoz képest ($n=5$).

A kezdeti szabad és kötött oHCA-tartalom a Petra, őszi árpában volt a legnagyobb (12. B ábra), míg a búza genotípusok esetén a szabad oHCA a kimutathatósági határ alatt volt (12. B ábra). Az alacsony hőmérsékleti kezelés drasztikus emelkedést eredményezett a kötött oHCA-szintben valamennyi vizsgált vonalban, melynek tendenciája hasonló volt ahhoz, amit a kötött SA-tartalom változásánál tapasztaltunk (12. B ábra).

5.1.2.3. Alacsony hőmérséklet hatása az abszcizinsav-tartalomra búza-, zab- és árpanövényekben

Kontroll körülmények között a legalacsonyabb ABA-szint a zabnövényekben, valamint a tavaszi árpában (Jubilant) volt megfigyelhető (13. ábra). A hidegstressz hatására az ABA mennyisége megemelkedett a búza- és árpanövényekben, de nem változott a zabnövényekben (13. ábra).



13. ábra Az abszcizinsav-tartalom (ABA) változása őszi búza (Mv Hombár and Mv8), tavaszi búza (TC33 és TC19), tavaszi zab (Kwant és Mv Pehely), őszi árpa (Petra) és tavaszi árpa (Jubilant) növények levelében hidegkezelést követően. ** és ***: szignifikáns $P \leq 0,01$ és $0,001$ szinten az azonos napi kontrollhoz képest ($n=5$).

5.1.2.4. Alacsony hőmérséklet hatása a flavonoid-tartalomra búza-, zab- és árpanövényekben

A vizsgált flavonoidok (rutin, miricetin, kvercetin és kempferol) közül a legnagyobb mennyiségben a kvercetin volt jelen, míg a kempferol a kimutathatósági határ alatt volt (9. táblázat). A hidegkezelés a legnagyobb változást a kvercetin esetében eredményezte, bár ezek a változások nem minden esetben voltak szignifikánsak. Az alacsony hőmérsékleti stressz szintén megemelte a legtöbb

esetben a rutin tartalmat főként a kötött frakcióban, illetve a kötött miricetin tartalmat az Mv Hombár, Mv 8, TC19 és Jubilant genotípusokban (9. táblázat).

9. táblázat Hidegkezelés hatása a rutin-, miricetin- and kvercetin-tartalomra őszi búza (Mv Hombár és Mv8), tavaszi búza (TC33 és TC19), tavaszi zab (Kwant és Mv Pehely), őszi árpa (Petra) és tavaszi árpa (Jubilant) növények levelében. *, ** és ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten az azonos napi kontrollhoz képest ($n=5$).

$\mu\text{g g}^{-1}\text{FW}$	kezelés	Mv Hombár	Mv 8	TC33	TC19	Kwant	Mv Pehely	Petra	Jubilant
szabad	kontroll	0,66±0,06	0,36±0,04	0,26±0,19	0,49±0,002	0,02±0,002	0,10±0,07	0,31±0,03	0,19±0,03
rutin	hideg	1,06±0,27	0,56±0,20	0,54±0,08	0,90±0,06***	0,02±0,01	0,34±0,04**	0,63±0,19*	0,62±0,05***
szabad	kontroll	0,05±0,01	0,07±0,05	0,06±0,01	0,09±0,02	0,06±0,003	0,08±0,02	0,21±0,04	0,08±0,01
miricetin	hideg	0,12±0,03**	0,05±0,02	0,09±0,03	0,08±0,002	0,03±0,005	0,04±0,008	0,16±0,04	0,26±0,01***
szabad	kontroll	1,43±0,18	1,22±0,29	0,82±0,19	1,30±0,26	1,72±0,30	1,20±0,25	1,15±0,19	0,94±0,16
kvercetin	hideg	2,71±0,28***	2,29±0,50**	3,44±0,30***	3,05±0,45***	2,51±0,13**	0,34±0,12***	0,90±0,23	2,39±0,05***
kötött	kontroll	0,23±0,04	0,19±0,05	0,22±0,07	0,27±0,06	0,46±0,11	0,43±0,08	0,88±0,08	0,21±0,07
rutin	hideg	3,17±0,13***	3,95±0,28***	3,12±0,14***	3,58±0,69***	1,22±0,57	1,93±0,23**	2,94±0,80**	2,94±0,37***
kötött	kontroll	0,94±0,35	0,89±0,18	2,19±0,56	1,48±0,54	0,93±0,23	0,42±0,16	1,08±0,51	0,53±0,13
miricetin	hideg	4,99±0,43***	5,64±0,41***	2,78±0,10	4,85±0,36***	0,60±0,18	1,12±0,50	0,72±0,18	4,04±1,25***
kötött	kontroll	16,1±2,9	30,7±10,8	9,74±3,05	10,6±3,1	17,8±5,3	17,2±5,2	5,98±1,44	6,89±2,91
kvercetin	hideg	49,0±9,0***	47,1±5,1	38,4±7,5***	42,3±8,9***	20,7±12,8	33,0±1,0**	16,4±8,5	29,7±5,4***

5.1.2.5. Alacsony hőmérséklet hatása az antioxidáns enzimekre búza-, zab- és árpanövényekben

Bár valamennyi genotípus hasonlóan válaszolt a hidegkezelésre, mégis eltérő tendenciákat mutatott az antioxidáns enzimek aktivitásának kezdeti szintje (10. táblázat). A GR-, GST- és KAT-aktivitás alacsonyabb volt az árpanövényekben, míg a G-POD-aktivitás a zabnövényekben volt alacsonyabb a többi genotípushoz képest. A hidegkezelés megemelte a GR-, GST-, KAT- és APX-aktivitását, de csökkentette a G-POD-aktivitást. A legnagyobb mértékű változást az árpa KAT esetében tapasztaltuk, mivel ott, a kezdetben alacsony aktivitás ellenére hasonló szintre emelkedett, mint a többi genotípus esetén (10. táblázat).

10. táblázat Hidegkezelés hatása a glutation-reduktáz (GR), glutation-S-transzferáz (GST), kataláz (KAT), aszcorbát-peroxidáz (APX) és gvajakol-peroxidáz (G-POD) antioxidáns enzimek aktivitására őszi búza (Mv Hombár és Mv8), tavaszi búza (TC33 és TC19), tavaszi zab (Kwant és Mv Pehely), őszi árpa (Petra) és tavaszi árpa (Jubilant) növények levelében. *, ** és ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten az azonos napi kontrollhoz képest ($n=5$).

nkat g-1 FW	kezelés	Mv Hombár	Mv 8	TC33	TC19	Kwant	Mv Pehely	Petra	Jubilant
GR	kontroll	59,2±3,3	46,2±5,8	45,9±5,8	48,8±3,3	51,0±0,4	51,3±2,3	30,3±4,9	28,0±3,6
	hideg	63,7±3,7	57,5±0,5**	57,0±3,9*	57,5±3,6*	65,4±4,2***	60,2±7,0	46,9±5,6**	44,5±1,1***
GST	kontroll	5,9±1,0	5,3±1,2	5,9±1,6	6,6±0,2	8,7±0,8	11,0±0,1	2,1±0,7	2,5±0,3
	hideg	7,8±1,0	7,3±0,2*	8,6±0,6	10,0±0,5***	13,6±0,5***	15,1±0,6***	5,7±0,9***	5,5±2,1
KAT	kontroll	7740±1039	6163±1522	4515±1580	6670±1622	7903±832	8161±1082	1956±172	3373±1167
	hideg	10536±364***	9011±1415	8385±165**	8944±668	9159±724	9365±1004	7621±949***	8261±796***
APX	kontroll	91,0±15,0	113±18,9	95,9±7,9	95,9±18,9	77,2±7,7	66,4±4,1	60,0±11,7	98,8±8,4
	hideg	167±19,9***	152±2,3**	160±20,9***	139±6,3**	100±8,1**	98,3±8,2***	103±15,6***	118±25,5
G-POD	kontroll	339±51,8	368±56,6	443±6,6	446±15,9	116±2,2	100±20,8	416±43,1	489±42,6
	hideg	359±57,5	291±33,2	331±33,7**	237±34,9***	65,2±8,9***	73,8±12,8	263±104	352±67,0*

5.1.2.6. Alacsony hőmérséklet hatása a lipid frakciók zsírsav összetételére búza-, zab- és árpanövényekben

A galaktolipid frakciókban (MGDG és DGDG) a többszörösen telítetlen linolénsav aránya olyan magas a kontroll növényekben (89-96% az MGDG és 82-86% a DGDG esetén), hogy a hidegkezelés ezt már nem tudta befolyásolni. Ennek megfelelően a kettős kötés index és a telítetlenségi százalék ebben a két lipid frakcióban nem változott az alacsony hőmérsékleti stresszhatást követően (11. táblázat).

A PE foszfolipid frakció esetén viszonylag magas telítetlenségi fokot mutattunk ki a két tavaszi búzában (TC19 és TC33), a két tavaszi zabban (Kwant és Mv Pehely) és az őszi árpa, Petra genotípusban (11. táblázat folytatás). A hidegkezelés hatására a 16:0 aránya csökkent az Mv Hombárban, és kevésbé kifejezett csökkenést tapasztaltunk az Mv8 és TC19 vonalak, valamint a Jubilant tavaszi árpa esetén. Szignifikánsan csökkent a 18:0 aránya az Mv Hombár és TC33, a 18:2 mennyisége a TC19 és TC33 növényekben hidegkezelést követően. Ezzel szemben a 18:3 szintje a Kwant tavaszi zab és Petra őszi árpa kivételével a többi gabona genotípusban megemelkedett a kezelés hatására. Ezen zsírsav-összetételben bekövetkezett változások a DBI megemelkedéséhez vezettek a 4 búzavonal, illetve a Jubilant tavaszi árpa esetében.

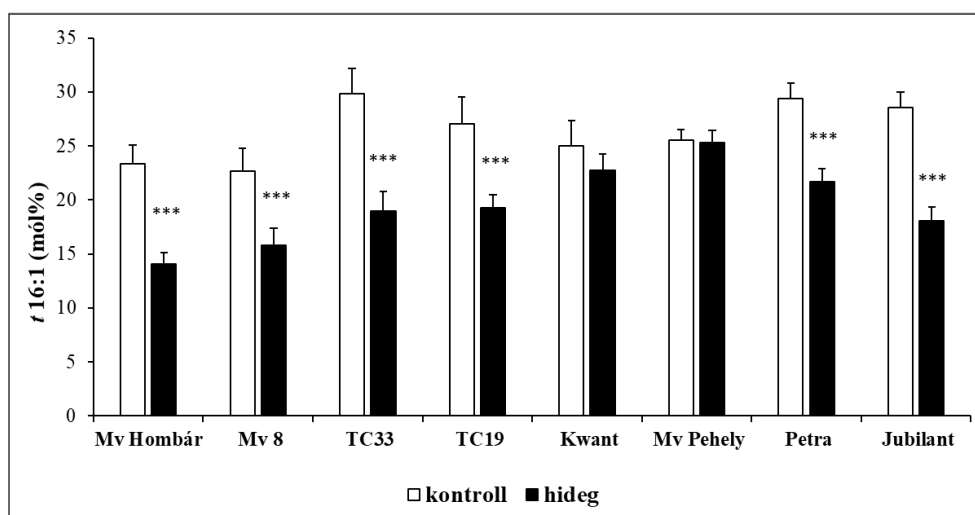
11. táblázat. Alacsony hőmérsékleti kezelés hatása a szabad zsírsav-összetételre (mol%), a kettős kötés indexre (DBI) és a telítettségi százalékra (%unsat) a monogalaktozil-diacilglicerol (MGDG), digalaktozil-diacilglicerol (DGDG), foszfatidil-etanolamin (PE) és foszfatidil-glicerol (PG) lipid frakcióban az őszi búza- (Mv Hombár és Mv8), tavaszi búza- (TC33 és TC19), tavaszi zab- (Kwant és Mv Pehely), őszi árpa- (Petra) és tavaszi árpanövények (Jubilant) levelében. 18:2: linolsav; 18:3: linolénsav; 18:1: olajsav; 16:0: palmitinsav; 18:0: sztearinsav. ** és ***: szignifikáns $P \leq 0,01$ és $0,001$ szinten az azonos napi kontrollhoz képest ($n=5$).

frakció	kezelés	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	DBI	unsat%
MGDG	kontroll Mv Hombár	1,11±0,52	0,1±0,06	0,17±0,09	2,52±1,12	96,1±5,11	293,46±7,89	98,78±1,97
	hideg Mv Hombár	1,34±0,41	0,49±0,11 **	0,29±0,12	1,65±0,97	96,23±2,6	292,28±6,41	98,17±2,17
	kontroll Mv 8	1,62±0,57	0,49±0,07	0,33±0,27	3,19±1,42	94,36±5,74	289,79±7,47	97,88±2,08
	hideg Mv 8	1,9±0,45	0,72±0,17	0,67±0,31	2,09±1,31	94,61±5,42	288,69±5,64	97,37±1,64
	kontroll TC33	1,93±0,37	0,86±0,18	0,11±0,07	2,35±1,17	94,74±6,22	289,05±7,11	97,21±1,57
	hideg TC33	1,82±0,49	0,72±0,14	0,62±0,27	1,49±0,74	95,34±4,7	289,64±6,52	97,46±1,39
	kontroll TC19	1,52±0,61	0,41±0,15	0,44±0,13	2,76±1,21	94,86±4,51	290,54±7,84	98,06±1,2
	hideg TC19	2,02±0,5	0,83±0,17 **	0,52±0,24	1,54±0,75	95,09±3,89	288,87±5,18	97,15±2,87
	kontroll Kwant	1,39±0,38	0,21±0,14	0,87±0,3	2,77±1,2	94,75±5,61	290,67±8,4	98,4±2,41
	hideg Kwant	2,33±0,64	1,65±0,15 ***	0,53±0,14	0,92±0,6	94,57±4,58	286,1±7,53	96,02±3,27
	kontroll Mv Pehely	1,6±0,5	2,12±0,1	1,01±0,59	4,2±1,3	90,87±4,29	282,03±6,08	96,28±2,9
	hideg Mv Pehely	1,38±0,47	0,53±0,09 ***	0,53±0,24	2,09±1,14 **	95,46±5,67	291,11±5,24	98,09±2,1
	kontroll Petra	2,36±0,42	0,9±0,07	0,54±0,35	3,74±1,34	92,46±2,36	285,41±4,83	96,74±2,39
	hideg Petra	2,63±0,47	1,28±0,19 ***	0,89±0,27	2,48±1,27	92,72±4,31	284,01±7,64	96,09±2,47
	kontroll Jubilant	2,34±0,51	4,3±0,1	0,42±0,32	3,5±1,41	89,43±5,43	275,72±5,29	93,36±2,97
	hideg Jubilant	3,52±0,74	1,28±0,15 ***	1±0,5	2,6±1,27	91,6±4,78	281±7,13	95,2±3,54
DGDG	kontroll Mv Hombár	10,48±1,42	1,34±0,56	0,6±0,24	2,36±1,02	85,22±4,7	261±5,69	88,18±2,57
	hideg Mv Hombár	9,7±1,74	1,73±0,48	0,72±0,12	2,31±1,19	85,53±2,53	262±6,47	88,56±2,71
	kontroll Mv 8	10,06±1,61	1,18±0,51	0,56±0,22	2,91±1,35	85,29±4,21	262,26±7,45	88,76±3,5
	hideg Mv 8	9,95±1,18	2,3±0,57	1,39±0,64	2,04±1,08	84,31±4,58	258,41±8,41	87,74±4,3
	kontroll TC33	9,6±1,34	1,09±0,29	1,18±0,3	2,42±1,34	85,7±6,21	263,12±4,87	89,3±2,97
	hideg TC33	9,19±1,08	1,64±0,67	0,6±0,25	1,94±1,01	86,63±5,43	264,37±5,61	89,17±5,04
	kontroll TC19	9,84±1,45	1,28±0,51	1,19±0,21	3,3±1,5	84,39±4,1	260,97±5,36	88,88±4,6
	hideg TC19	9,75±2,07	1,99±0,61	1,06±0,11	2,3±1,21	84,9±4,71	260,36±5,49	88,26±3,21
	kontroll Kwant	9,21±1,9	0,84±0,47	1,41±0,14	2,55±1,07	85,98±3,27	264,46±5,67	89,94±3,61
	hideg Kwant	9,46±1,58	1,07±0,38	1,69±0,09	2,13±1,12	85,65±2,6	262,9±4,51	89,47±4,2
	kontroll Mv Pehely	10,07±2,3	2,24±0,6	1,74±0,16	3,9±1,32	82,04±2,31	255,67±6,57	87,68±2,52
	hideg Mv Pehely	9,83±1,74	1,02±0,42	1,29±0,37	2,06±1,08	85,8±2,39	262,78±6,31	89,14±3,17
	kontroll Petra	10,92±1,28	1,5±0,52	0,89±0,17	3,24±1,1	83,44±4,21	257,7±7,15	87,57±3,54
	hideg Petra	11,23±1,67	2,78±0,61	0,91±0,16	2,51±1,3	82,56±2,37	253,63±7,5	85,99±4,7
	kontroll Jubilant	10,94±1,21	1,5±0,39	1,31±0,25	3,6±1,41	82,64±2,64	256,44±8,17	87,56±4,1
	hideg Jubilant	11,46±1,37	1,85±0,43	1,01±0,08	3,22±1,24	82,46±2,47	254,82±5,61	86,69±3,49

11. táblázat (folytatás). Alacsony hőmérsékleti kezelés hatása a szabad zsírsav-összetételre (mol%), a kettős kötés indexre (DBI) és a telítettségi százalékra (%unsat) a monogalaktozil-diacilglicerol (MGDG), digalaktozil-diacilglicerol (DGDG), foszfadil-etanolamin (PE) és foszfadil-glicerol (PG) lipid frakcióban az őszi búza- (Mv Hombár és Mv8), tavaszi búza- (TC33 és TC19), tavaszi zab- (Kwant és Mv Pehely), őszi árpa- (Petra) és tavaszi árpanövények (Jubilant) levelében. 18:2: linolsav; 18:3: linolénsav; 18:1: olajsav; 16:0: palmitinsav; 18:0: sztearinsav. *, ** és ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, 0,01 és 0,001 szinten az azonos napi kontrollhoz képest (n=5). nd: nem detektálható.

frakció	kezelés	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	DBI	unsat%
PE	kontroll Mv Hombár	30,37±2,54	11,23±0,94	3,23±1,23	29,08±2,58	26,09±1,81	139,66±5,1	58,4±2,37
	hideg Mv Hombár	22,35±2,19 **	8,48±1,1 **	4,51±0,49	34,06±3,45	30,6±1,25 *	164,42±4,87 ***	69,16±4,51
	kontroll Mv 8	33,23±3,1	6,8±1,21	3,6±1,16	35,87±4,21	20,5±1,1	136,82±4,58	59,96±3,2
	hideg Mv 8	30,27±2,74	6,53±1,06	2,6±1,31	31,33±3,18	29,26±1,9 ***	153,06±5,14 **	63,2±3,57
	kontroll TC33	25,47±2,13	7±1,32	5,32±1,4	36,1±2,67	26,11±2,3	155,85±6,4	67,53±2,87
	hideg TC33	23,43±3,04	3,37±0,08 ***	4,36±1,15	28,8±3,41 **	40,04±2,47 ***	182,07±5,17 ***	73,19±3,16
	kontroll TC19	25,88±2,41	4,66±1,18	4,05±1,37	36,26±3,28	29,15±1,05	164±4,91	69,45±2,4
	hideg TC19	21,76±2,15	5,64±1,07	4,21±1,04	29,25±2,7 *	41,13±2,71 ***	186,12±6,04 ***	73,14±3,17
	kontroll Kwant	22,13±2,62	2,26±0,18	5,25±1,23	34±4,61	36,36±1,23	182,32±4,87	75,6±2,87
	hideg Kwant	20,17±2,48	2,52±0,16	4±1,51	34,63±3,27	38,67±1,87	189,29±5,61	77,31±4,2
	kontroll Mv Pehely	25,66±2,83	4,83±0,47	6,23±1,18	35,54±2,31	27,74±1,18	160,51±4,08	69,5±3,24
	hideg Mv Pehely	24,69±1,58	5,08±0,88	4,49±1,27	30,45±3,74	35,29±1,37 ***	171,25±5,64	70,22±3,7
	kontroll Petra	29,47±2,28	2,3±0,69	2,83±1,4	32,73±2,33	32,66±2,05	166,29±4,18	68,23±2,58
	hideg Petra	30,62±2,71	3,7±0,5	1,95±0,09	31,2±2,18	32,53±1,96	161,95±6,78	65,68±3,04
	kontroll Jubilant	35,09±2,34	3,63±0,71	4±1,41	31,3±2,38	25,98±2,7	144,54±4,56	61,28±3,5
	hideg Jubilant	30,22±1,85	2,98±0,49	1,96±1,27	32±2,84	32,85±2,08 ***	164,5±5,12 ***	66,8±2,41
PG	kontroll Mv Hombár	12,36±1,02	1,58±0,08	1,58±1,14	4,1±1,38	56,87±1,34	180,39±4,28	62,55±3,45
	hideg Mv Hombár	18,15±1,57 ***	1,66±0,47	1,34±0,079	4,81±0,09	60±2,18	190,93±4,42 *	66,14±2,59
	kontroll Mv 8	15,37±1,34	2,89±1,03	1,59±0,08	6,1±1,2	51,4±3,08	167,98±5,14	59,08±3,2
	hideg Mv 8	18,89±1,11 ***	3,27±1,21	2,2±1,04	5,4±1,45	54,4±1,97	176,19±4,34	62±3,4
	kontroll TC33	16,11±1,08	2,48±1,14	1,32±0,7	5,52±1,37	44,71±3	146,5±5,61	51,55±2,19
	hideg TC33	17,87±1,84	3,54±1,04	2,01±0,94	5,31±1,09	52,32±1,47 ***	169,6±4,05 ***	59,64±2,89 ***
	kontroll TC19	14,66±1,36	2,5±1,04	1,76±1,12	6,06±1,54	47,93±1,25	157,68±4,12	55,75±4,4
	hideg TC19	19,3±1,25 ***	4,49±1,27	2,35±1,08	5,04±1,18	49,5±1,37	160,95±6,1	56,9±4,78
	kontroll Kwant	16,45±1,41	2,77±1,2	1,88±1,4	3,9±1,05	50±2,3	159,68±4,21	55,78±2,84
	hideg Kwant	21,62±1,24 ***	2,06±1,34	2,14±1,34	4,08±1,48	47,34±4,71	152,33±4,79	53,57±4,4
	kontroll Mv Pehely	20,62±2,08	4,81±1,54	4,08±2,54	5,35±1,39	39,6±2,01	133,57±4,58	49,02±3,61
	hideg Mv Pehely	20,28±0,98	2,04±1,1 *	2,18±1,48	3,9±1,87	46,26±2,37 ***	148,76±6,7 **	52,34±2,51
	kontroll Petra	14,25±1,2	3,33±1,21	2,44±1,29	5,17±0,08	53,2±1,48	172,4±4,51	60,82±3,7
	hideg Petra	20,73±2,3 ***	8,87±1,5 ***	2,52±1,19	5,13±1,07	46,55±2,19 ***	152,45±5,29 **	54,21±2,1 *
	kontroll Jubilant	14,72±1,6	7,63±1,36	nd	10,71±2,3	39,71±1,89	140,54±5,18	50,42±3,27
	hideg Jubilant	22,35±1,32 ***	10,41±1,17 *	5,5±1,25	7,16±3,41	41,23±1,47	143,52±6,23	53,9±2,41

Az őszi búza- és őszi árpanövényekben kontroll körülmények között a PG lipid frakcióra eleve magasabb telítettség volt jellemző a magasabb 18:3 arányának köszönhetően, míg az 5 tavaszi gabona genotípus alacsonyabb telítettségű szinttel rendelkezett (11. táblázat folytatás). A hidegstressz hatására a DBI értéke szignifikánsan megemelkedett a 2 őszi búza, a tavaszi TC33 búza és a tavaszi Mv Pehely zab esetében, ellenben csökkenést mértünk az őszi Petra árpanövényekben. Ez a különbség a zsírsav-összetételben bekövetkezett eltérő változásokból eredtek. A telített 16:0 szintje az Mv Pehely és TC33 kivételével megemelkedett, míg a másik telített zsírsav, a 18:0 aránya a Petra és Jubilant növényekben emelkedett meg. Ezzel szemben, a 18:3 mennyisége a TC33 és Mv Pehely esetén megemelkedett, de csökkent a Petra genotípusban (11. táblázat folytatás). A $t_{16:1}$ mennyisége, mely csak a PG lipid frakcióban kimutatható és telített zsírsavakhoz hasonló tulajdonságokkal rendelkezik, csökkent valamennyi genotípusban, kivéve a két tavaszi zab genotípust (14. ábra).



14. ábra A $trans\text{-}\Delta^3$ -hexadekánsav-tartalom ($t_{16:1}$) változása őszi búza (Mv Hombár and Mv8), tavaszi búza (TC33 és TC19), tavaszi zab (Kwant és Mv Pehely), őszi árpa (Petra) és tavaszi árpa (Jubilant) növények levelében hidegkezelést követően. ***: szignifikáns $P \leq 0,001$ szinten az azonos napi kontrollhoz képest ($n=5$).

5.1.2.7. Alacsony hőmérséklet hatásainak vizsgálata során mért paraméterek korreláció elemzése

A korrelációanalízis eredményét a Függelék 2. és 3. táblázata mutatja be. Kontroll körülmények között, illetve a 12 napos 5 °C-on történt hidegkezelést követően a vizsgált paraméterek eltérő korrelációs mintázatot mutattak. Kontroll növénynevelési körülmények között a kötött SA- és kötött oHCA-tartalom pozitív kapcsolatot mutatott a KAD-tartalommal, míg a szabad oHCA és a

SPD szintjei között negatív irányú összefüggést tapasztaltunk. Egyéb szignifikáns korrelációs viszonyok csak szórványosan fordultak elő (Függelék 2. táblázat).

A legkifejezettebb különbség a fentiekhez képest a hidegkezelést követően abban mutatkozott meg, hogy a SPD mennyisége szoros, pozitív kapcsolatot mutatott a flavonoid és az ABA-tartalommal, míg negatív irányú kölcsönhatásban állt a t16:1 szintjével. Szignifikáns összefüggése volt kimutatható továbbá az flavonoidoknak az oHCA-tartalommal, az APX- és G-POD-aktivitásokkal, valamint az ABA és a flavonoidok között pozitív, míg az ABA és t16:1 között negatív összefüggést találtunk. Szintén negatív kapcsolatot mutatott a korrelációelemzés a t16:1-tartalom és az APX- vagy G-POD-aktivitások között (Függelék 3. táblázat).

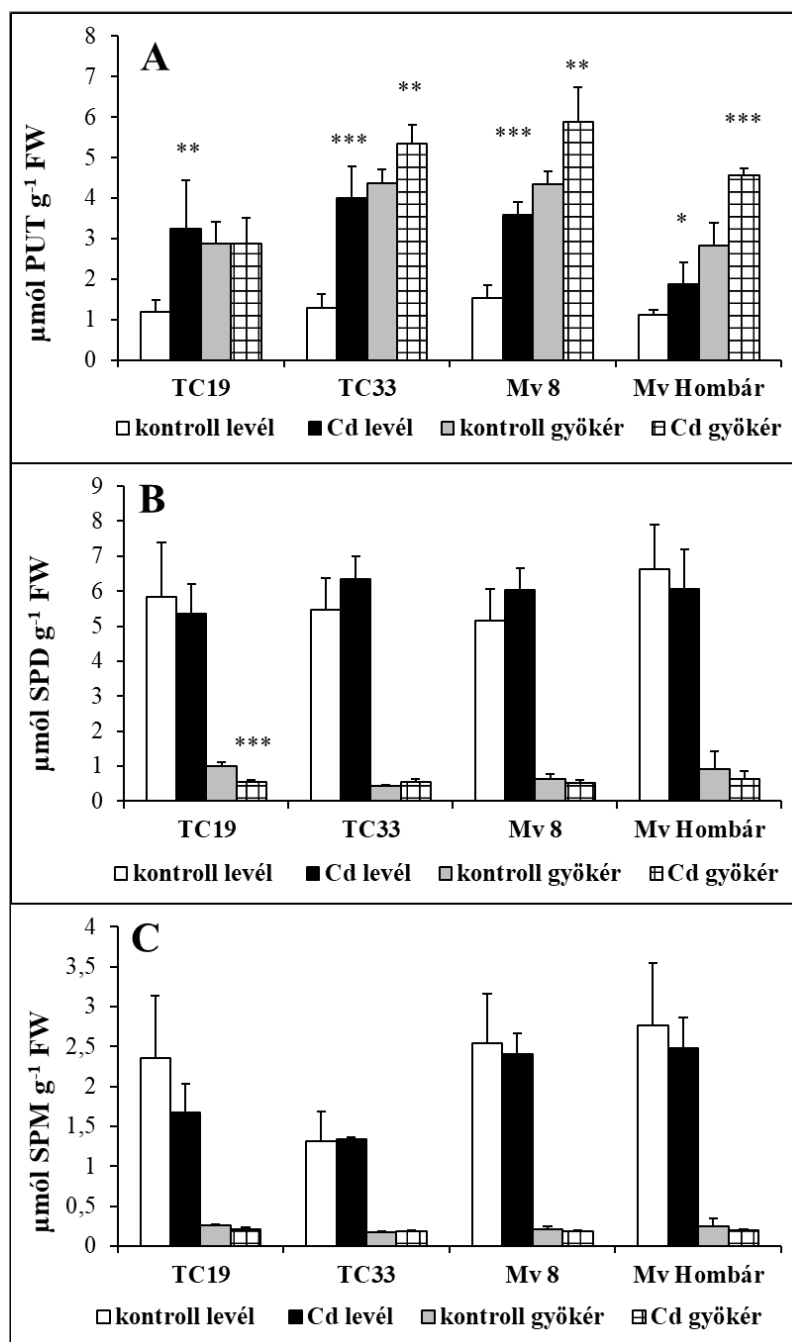
Megállapíthatjuk, hogy habár a PA-ok mennyisége és a hidegtűrés mértéke között direkt összefüggést nem tudtunk kimutatni, a PA-ok közül a SPD szoros korrelációs kapcsolatban állt a hidegtoleranciában szerepet játszó vegyületekkel, úgymint ABA, antioxidáns enzimek, flavonoidok és t16:1.

5.1.3. *Kadmiumkezelés vizsgálata búzanövényekben*

Lisztharmatfertőzés során igazoltuk a PA-oknak a biotikus stressztoleranciában szerepet játszó SA-val, valamint az antioxidáns enzimekkel való kapcsolatát, továbbá alacsony hőmérsékleti kezelés során a PA-oknak a fagyűrés mértékével összefüggésbe hozható vegyületekkel. Mivel a SA-felhalmozódás egyik legjobb kiváltó stressztényezője a Cd, az alábbi kísérlet során a PA-ok és a SA mennyiségi összefüggéseit kívántuk tovább tanulmányozni, eltérő Cd-toleranciafokot mutató búzavonalakban. A PA-ok szintézisével közös prekursoruk révén kapcsolatban áll a GSH és az abból képződő PC-ok szintézise - melyek a nehézfém-detoxifikációban játszanak szerepet – ezért külön kérdés volt a közöttük lehetséges összefüggés megállapítása. A növénynevelés körülményei a 4.1.3.1. illetve a 4.1.3.2. pontban leírtak szerint történt.

5.1.3.1. *Kadmiumkezelés hatása a poliamin-tartalomra*

Kontroll növénynevelési körülmények között az egyes PA-ok hasonló mennyiségben fordultak elő a négy genotípusban, kivéve a TC33 esetén a SPM-tartalom, mely körülbelül feleakkora volt, mint a többi három genotípusban (15. A-C ábra). A Cd-kezelés csak a PUT-tartalmat befolyásolta - függetlenül a növények fiziológiai állapotától illetve a Cd-mal szembeni toleranciafokától - mely a levél esetében valamennyi vizsgált genotípusban szignifikánsan megemelkedett, a gyökérben pedig a TC19 kivételével szintén felhalmozódott (15. A ábra).

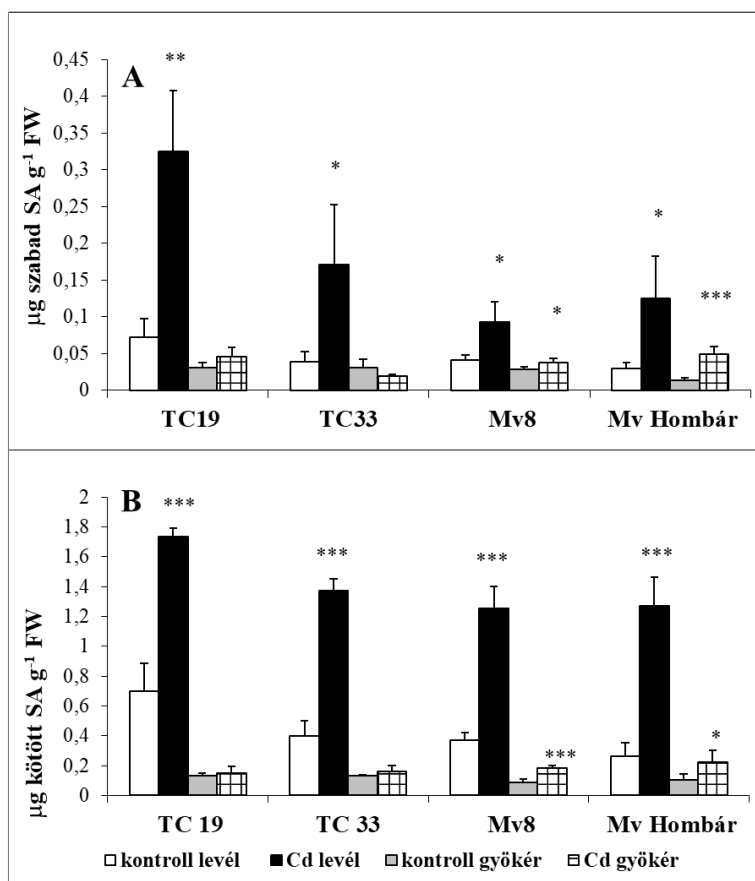


15. ábra 7 napos 50 µM kadmiumkezelés hatása a poliamin-tartalomra (putreszcin: PUT; spermidin: SPD; spermin: SPM) különböző kadmium-toleranciájú búzanövényekben. *, ** és ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten az azonos napi kontrollhoz képest ($n=5$).

5.1.3.2. Kadmiumkezelés hatása a szalicilsav-tartalomra

A legnagyobb össz-SA szint (szabad+kötött) a TC19 genotípusban volt mérhető kontroll körülmények között (16. A-B ábra). Összeségében megállapítható, hogy a TC vonalak SA-tartalma

magasabb volt a martonvásári vonalakéhoz képest. A Cd-kezelés hatására a mind a szabad, mind a kötött SA-tartalom megemelkedett a vizsgált genotípusok levelében, függetlenül a Cd-tolerancia szintjétől. A gyökér esetében a SA a szabad és a kötött frakcióban is megemelkedett, de csak az őszi búzavonalakban (Mv 8 és Mv Hombár), melyek a TC vonalakhoz képest toleránsabbnak bizonyultak.

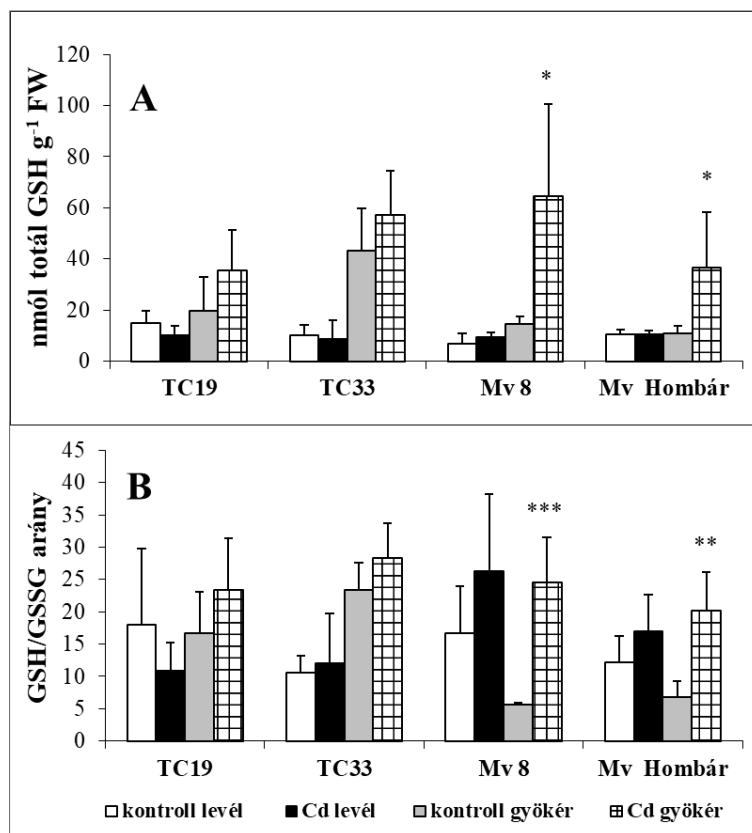


16. ábra 7 napos 50 μM kadmiumkezelés hatása a szabad (A) és kötött (B) szalicilsav-tartalomra különböző kadmium-toleranciájú búzánövényekben. *, ** és ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten az azonos napi kontrollhoz képest ($n=5$).

5.1.3.3. Kadmiumkezelés hatása a glutation-tartalomra

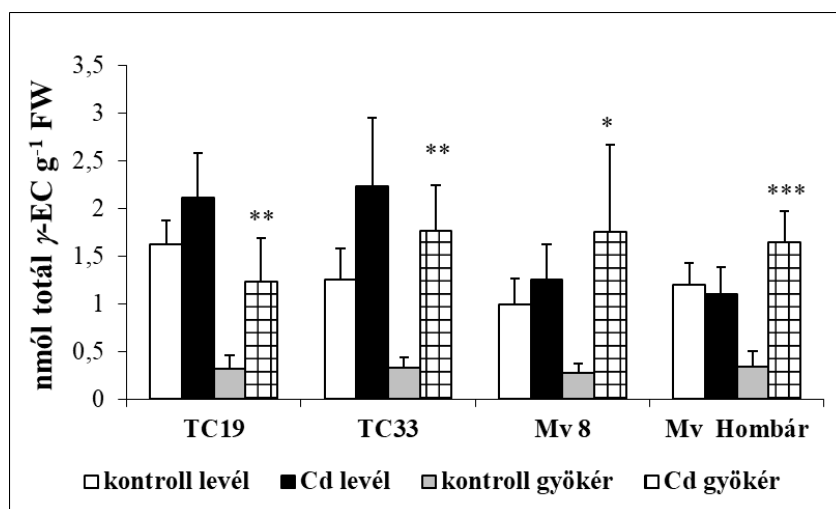
A totál GSH szintje illetve a redukált és oxidált glutation aránya (GSH/GSSG) normál nevelési körülmények között a négy búzavonal levelében azonos volt és a Cd-kezelés ezen paramétereket nem befolyásolta (17. A-B ábra). A gyökerek esetében azonban a tavaszi búzavonalakban (TC19 és TC33) körülbelül kétszer akkora volt mind a GSH-tartalom, mind a GSH/GSSG arány, mint az őszi búza genotípusokban (Mv 8 és Mv Hombár). Az eleve magasabb GSH értékekre a Cd-kezelés nem volt

hatással a tavaszi, míg megemelte az őszi búza genotípusokban, mely utóbbiak a Cd-stressz-szel szemben toleránsabbnak bizonyultak.



17. ábra 7 napos 50 µM kadmiumkezelés hatása a glutation-tartalomra (GSH) (totál: A, redukált/oxidált arány: B) különböző kadmium-toleranciájú búzanövényekben . *, ** és ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten az azonos napi kontrollhoz képest ($n=5$).

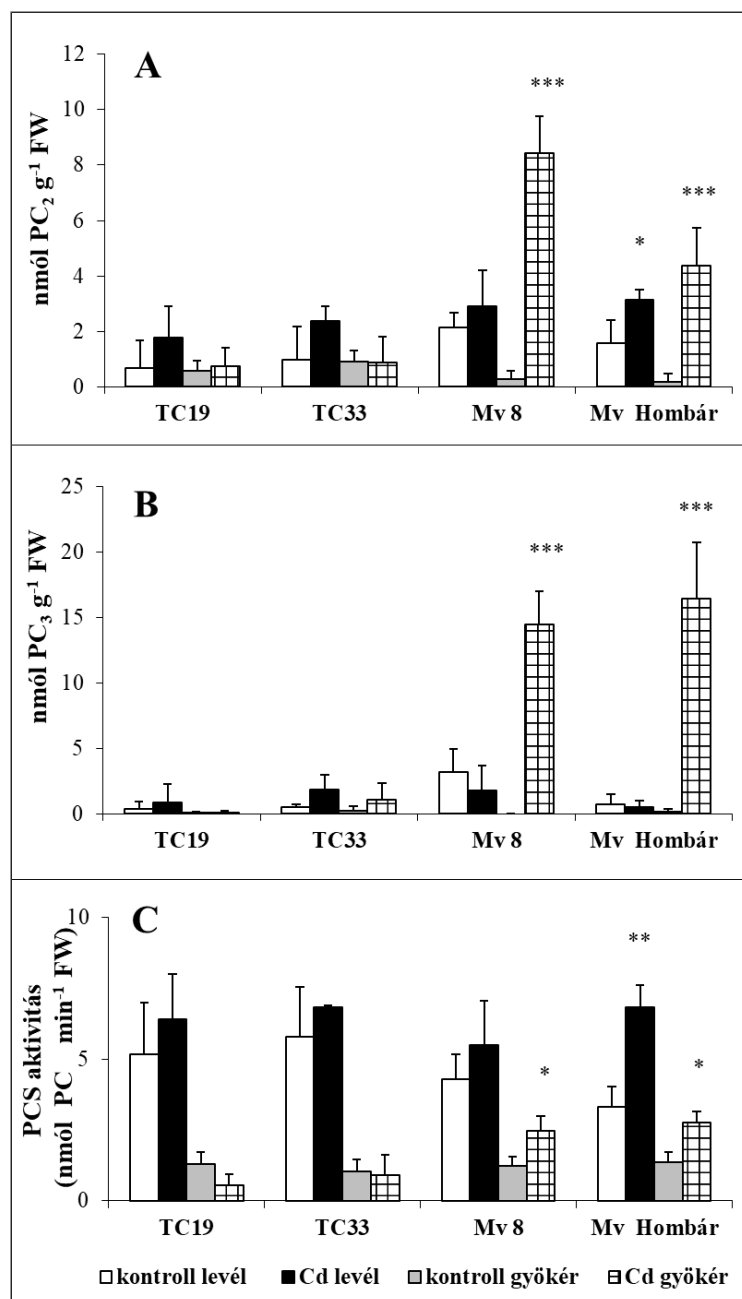
A fentiekkel ellentétben azonban, a glutation-szintézisben sebességkorlátozóként ismert γ -EC mennyisége nem mutatott különbséget a négy vonal esetében, valamint felhalmozódása a gyökérben a Cd-kezelést követően valamennyi genotípusban azonos mértékű volt (18. ábra).



18. ábra 7 napos 50 μ M kadmiumkezelés hatása a γ -glutamil-cisztein (γ -EC) tartalomra különböző kadmium-toleranciájú búzanövényekben. *, ** és ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten az azonos napi kontrollhoz képest ($n=5$).

5.1.3.4. Kadmiumkezelés hatása a fitokelatin-szintézisre

A PC_2 szintjének különbségei illetve változásai a GSH-tartalomnál leírtakhoz hasonlóan alakultak, azaz a levélben mért kontroll értékekben nem volt különbség, míg a gyökérben magasabb kontroll értéket mértünk a tavaszi TC vonalakban, mint a martonvásári vonalakban (19. A ábra). A Cd-kezelés csak az Mv Hombár esetében emelte meg szignifikánsan a levél PC_2 -szintet, de a gyökérben mindkét őszi búzavonal esetében nagymértékű felhalmozódást tapasztaltunk, mely a kontroll értékhez képest 28-szoros, illetve 24-szeres volt az Mv 8 és Mv Hombár esetében. A PC_3 mennyisége a két martonvásári genotípus levelében magasabb volt kontroll körülmények között, és a Cd-kezelés nem befolyásolta (19. B ábra). Ezzel szemben a gyökérben a stresszmentes körülmények között mért PC_3 értékekhez képest drasztikus emelkedést mutattunk ki az Mv 8 és Mv Hombár vonalakban. A PCS-aktivitás a PC-tartalomnak megfelelő változásokat mutatott (19. C ábra). A levél PCS-aktivitás csak az Mv Hombár, a gyökér PCS aktivitás mind az Mv 8, mind az Mv Hombár esetében megemelkedett. Megállapítottuk, hogy a toleránsabbnak bizonyult genotípusokban a PC-ok szintézise nagyobb mértékben indukálódott a kezelés követően.

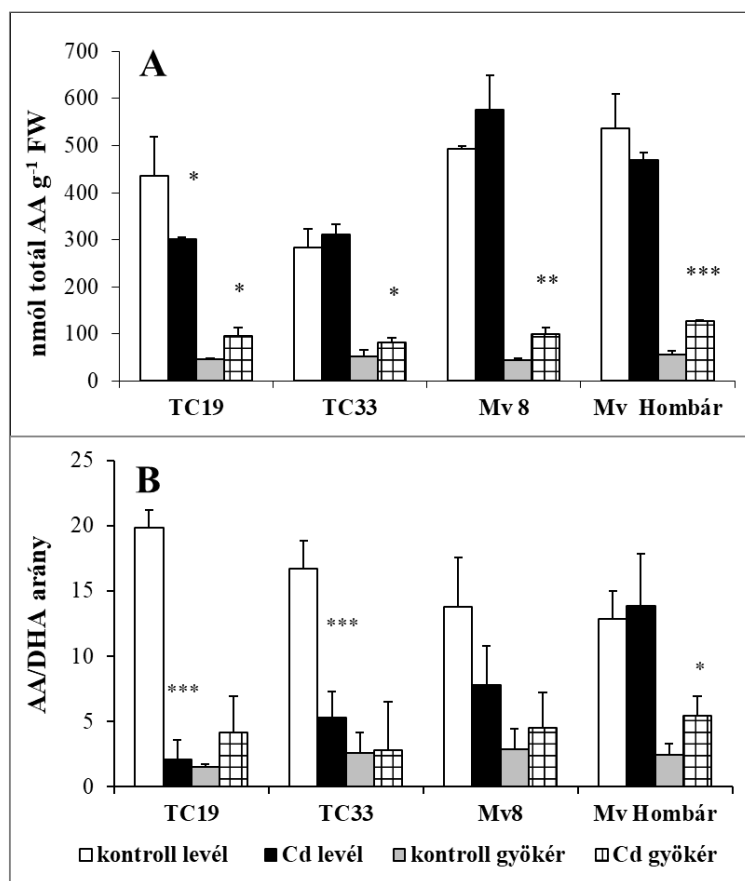


19. ábra 7 napos 50 µM kadmiumkezelés hatása a fitokelatin-tartalomra (PC₂: A, PC₃: B) és a fitokelatin szintáz-aktivitásra (PCS: C) különböző kadmium-toleranciájú búzanövényekben. *,** és ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten az azonos napi kontrollhoz képest ($n=3$).

5.1.3.5. Kadmiumkezelés hatása az aszkorbát-tartalomra

Mivel az aszkorbát-glutation ciklusban a GSH és az AA mennyiségi változásai összefüggésben állnak egymással, és a két-két búza genotípus eltérő Cd-tolerancia szintje összefüggést mutatott a GSH-szintben bekövetkezett változásokkal, megvizsgáltuk a Cd-kezelés hatását az AA szintjére is. Bár az össz AA-tartalom a levélben a két martonvásári vonal esetében

magasabb volt, mint a TC vonalakban, a Cd-kezelés nem befolyásolta (20. A ábra). A gyökér esetében a kontroll körülmények között mért AA-tartalom közel azonos volt és a Cd-kezelés után mind a négy vonalban megemelkedett. A legalacsonyabb kezdeti AA/DHA arányt a levélben az Mv Hombár esetén mértük, és a Cd-kezelés ezt nem volt képes befolyásolni, míg a többi genotípus esetén a Cd-stressz csökkentette értékét (20. B ábra). A gyökérben a Cd-kezelés szignifikáns változást csak az Mv Hombár esetében okozott az AA/DHA arányban.



20. ábra 7 napos 50 µM kadmiumkezelés hatása az aszkorbát-tartalomra (totál: A, redukált/oxidált arány: B) különböző kadmium-toleranciájú búzánövényekben. *,** és ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten az azonos napi kontrollhoz képest ($n=3$).

5.1.3.6. Kadmiumkezelés hatásainak vizsgálata során mért paraméterek korreláció vizsgálata

A levélben szignifikáns korreláció volt kimutatható a PUT és SPD, valamint a SPD és SPM mennyisége között, továbbá érdekes módon a PA-ok közül a PUT-tartalom változása pozitív, míg a SPM negatív kapcsolatot mutatott a SA-tartalom változásával (szabad és kötött formában is) (Függelék 4. táblázat). Hasonló módon eltérően viszonyult a PUT- és a SPM-tartalom a γ -EC

mennyiségéhez illetve PCS-aktivitáshoz. Habár a SA pozitív korrelációt mutatott a γ -EC-tartalom és a PCS-aktivitással, negatív összefüggését tapasztaltunk az AA szintjével. Szintén negatív korrelációt mutattunk ki, az AA mennyisége és a γ -EC-tartalom illetve a PCS-aktivitás között.

A gyökérben a levélhez képest több korrelációs kapcsolat volt kimutatható, és utóbbihoz viszonyítva eltérő módon (Függelék 5. táblázat). A PUT negatív kapcsolatban állt a SPD- és SPM-tartalommal, míg a két utóbbi egymással pozitív korrelációt mutatott. Ennek megfelelően az adott kísérlet során a Cd-toleranciában szerepet játszó, azért felelős vegyületekkel (γ -EC, PC₂, PC₃ és AA és PCS) a PUT szignifikáns, pozitív kapcsolatot mutatott, míg a SPD és SPM negatív korrelációban állt a γ -EC szintjével. Bár a SA- és PA-tartalom között összefüggést nem tudtunk kimutatni, érdekes módon a SA, mind szabad, mind kötött formában szignifikáns, pozitív viszonyban állt a fent felsorolt PUT-rel is összefüggésben álló védővegyületekkel. A nehézfém-méregtelenítésben szerepet játszó vegyületek egyébként egymással is szoros, pozitív kapcsolatot mutattak.

5.1.4. UV-B sugárzás módosítása hatása ozmotikus és kadmiumstressz során búzanövényekben

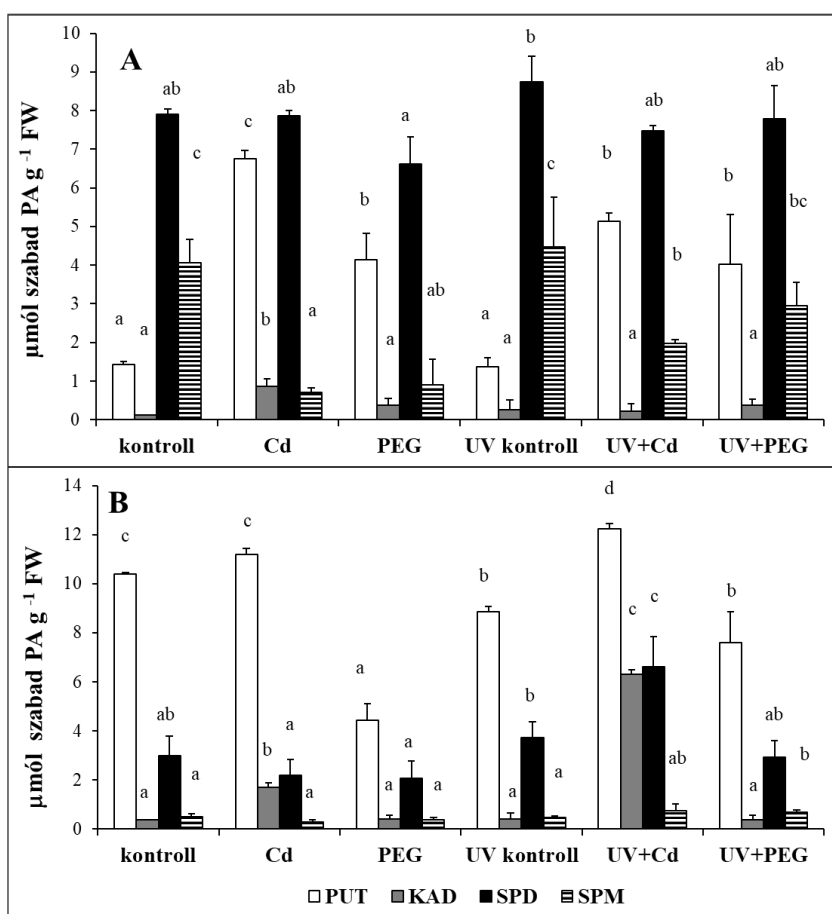
Többféle stresszhatás (lisztharmatfertőzés, alacsony hőmérsékleti stressz és Cd-stressz) során vizsgáltuk a PA-ok és a SA mennyiségi változásai közötti lehetséges összefüggést különböző növényfajok, illetve adott növényfajon belül eltérő genotípusok vizsgálata során az adott stressz körülmények között. Az alábbiakban egyetlen genotípust vizsgáltunk, de három különböző stresszhatás alatt, illetve ezek kombinációja esetében. A növénynevelés körülményei a 4.1.3.2. pontban leírtaknak megfelelően történt.

5.1.4.1. UV-B sugárzás módosító hatása a poliamin-tartalomra ozmotikus illetve kadmiumstressz során

A kísérlet során a szabad PA-frakció mellett a konjugált és kötött frakció is meghatározásra került, de mivel a konjugált frakció mintázata a szabad frakcióban tapasztalt változásokat követte, valamint a kötött forma nagyságrendje a szabad és konjugált frakcióhoz képes alacsony volt, itt csak a szabad frakció adatai kerülnek bemutatásra. Mindhárom frakcióban a SPD volt a legnagyobb mennyiségben előforduló PA.

A Cd, PEG és UV-B stressz eltérő változásokat indukált a PA-ok mennyiségében, valamint kismértékben eltérő hatások érvényesültek a levélben a gyökérhez képest (21. A-B ábra). A KAD tartalom a levélben csak a Cd-kezelés hatására emelkedett meg, a többi kezelés semmilyen hatással nem volt rá. Ellenben a gyökér KAD szintje megemelkedett mind a normál fényen, mind a UV-B

sugárzásnak kitett növények esetén Cd-kezelést követően, ráadásul utóbbi esetben ez az emelkedés még kifejezettebb volt.

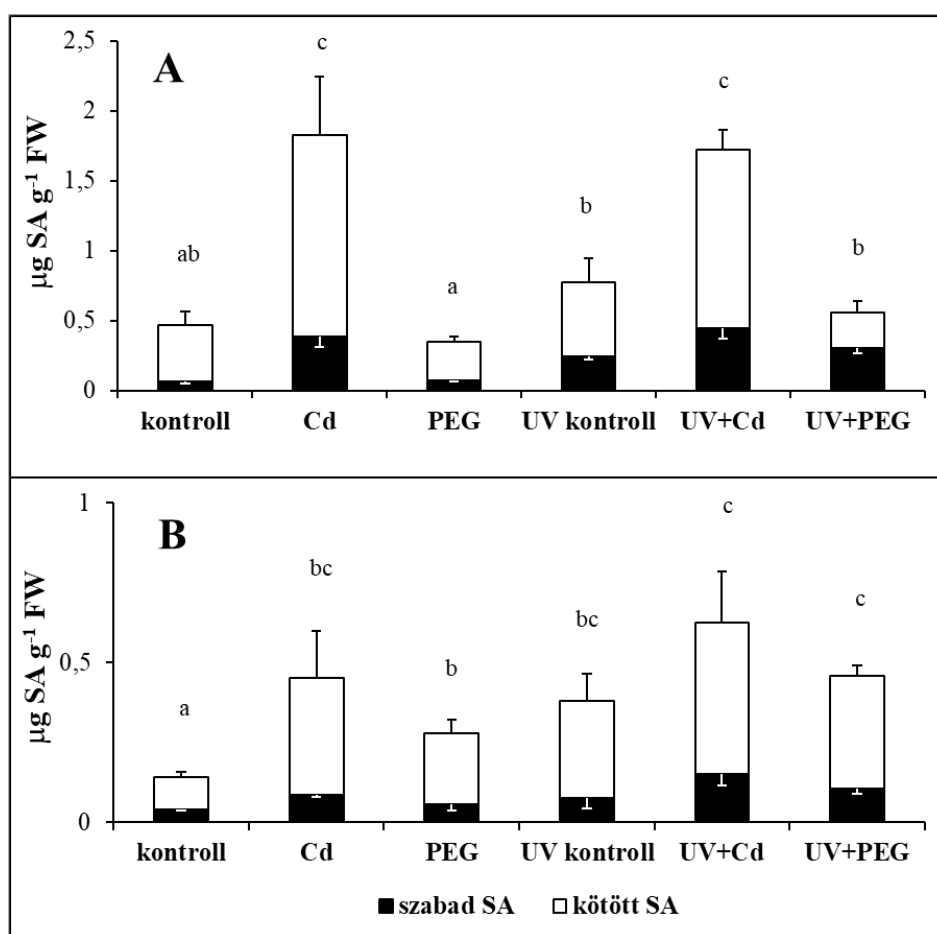


21. ábra UV-B sugárzás és/vagy 50 µM kadmium illetve 15% PEG-kezelés hatása a poliamin-tartalomra (levél: A, gyökér: B) Mv Emese búzanövényekben. PUT: putrescin, KAD: kadaverin, SPD: spermidin, SPM: spermin. A különböző betűjelek a $P \leq 0,05$ szinten szignifikáns változásokat jelölik a kezelések között ($n=5$).

A Cd- és PEG-kezelés hatására PUT-felhalmozódást figyeltünk meg a levelekben, melyet az UV-B sugárzás nem befolyásolt, bár az UV+Cd-kezelés során kisebb mértékű volt önmagában a Cd-kezeléshez képest. A gyökér PUT-tartalom azonban nem változott a Cd-, csökkent a PEG-, UV- és UV+PEG-kezelést követően, míg megemelkedett az UV+Cd-kezelés hatására. A levél SPD szintjét kismértékben, de szignifikánsan megemelte az UV-B kezelés, míg a gyökér SPD mennyiségét csak a kombinált UV+Cd-kezelés volt képes megemelni. A SPM szintje a levélben, mind a Cd, mind a PEG-kezelést követően csökkent normál fényviszonyok között, de az UV-B sugárzásnak kitett növényekben ez a csökkenés kisebb mértékű volt. Ezzel szemben a gyökérben a SPM-tartalmat az UV+PEG kivételével egyik kezelés sem befolyásolta.

5.1.4.2. UV-B sugárzás módosító hatása a szalicilsav-tartalomra ozmotikus illetve kadmiumstressz során

A Cd-kezelés olyan nagymértékű SA-felhalmozódáshoz vezetett már normál fényviszonyok között nevelt búzanövényekben is, hogy bár az UV-B sugárzás önmagában is megemelte a SA-tartalmat, a Cd-kezelés indukálta változást már nem tudta befolyásolni sem a levélben, sem a gyökérben (22. A-B ábra).



22. ábra UV-B sugárzás és/vagy 50 μM kadmium- illetve 15% PEG-kezelés hatása a szalicilsav-tartalomra (SA) (levél: A, gyökér: B) Mv Emese búzanövényekben. A különböző betűjelek a $P \leq 0,05$ szinten szignifikáns változásokat jelölik a kezelések között ($n=5$).

A PEG-kezelés a levélben nem befolyásolta a SA-tartalmat, de a gyökérben kismértékben megemelte, továbbá mind a levélben, mind a gyökérben összeadódó hatást tapasztaltunk a kombinált UV+PEG stressz esetében.

5.1.4.3. Az UV-B sugárzás és/vagy ozmotikus illetve kadmiumstressz során mért paraméterek korreláció elemzése

A levélben szoros pozitív kapcsolat állt fent a két diamin, a PUT és KAD mennyiségi változásai között, valamint a két magasabbrendű PA, a SPD és SPM szintje között, míg negatív korreláció volt kimutatható a PUT vagy a KAD és a SPM mennyisége között. A gyökérben szintén pozitív összefüggésben állt egymással a PUT és KAD, a KAD és SPD, illetve a SPD- és SPM-tartalom változásai. Pozitív kapcsolatot mutatott ki a korreláció elemzés a PA-ok közül a PUT-tartalom és a SA szintje (mind a szabad, mind kötött formájában) között a levélben, míg a gyökérben a PUT kivételével valamennyi vizsgált PA (KAD, SPD és SPM) és a szabad SA szintje között (Függelék 6. táblázat).

5.1.5. Alacsony hőmérséklet és PEG-indukálta ozmotikus stressz hatása eltérő rizsnövényekben

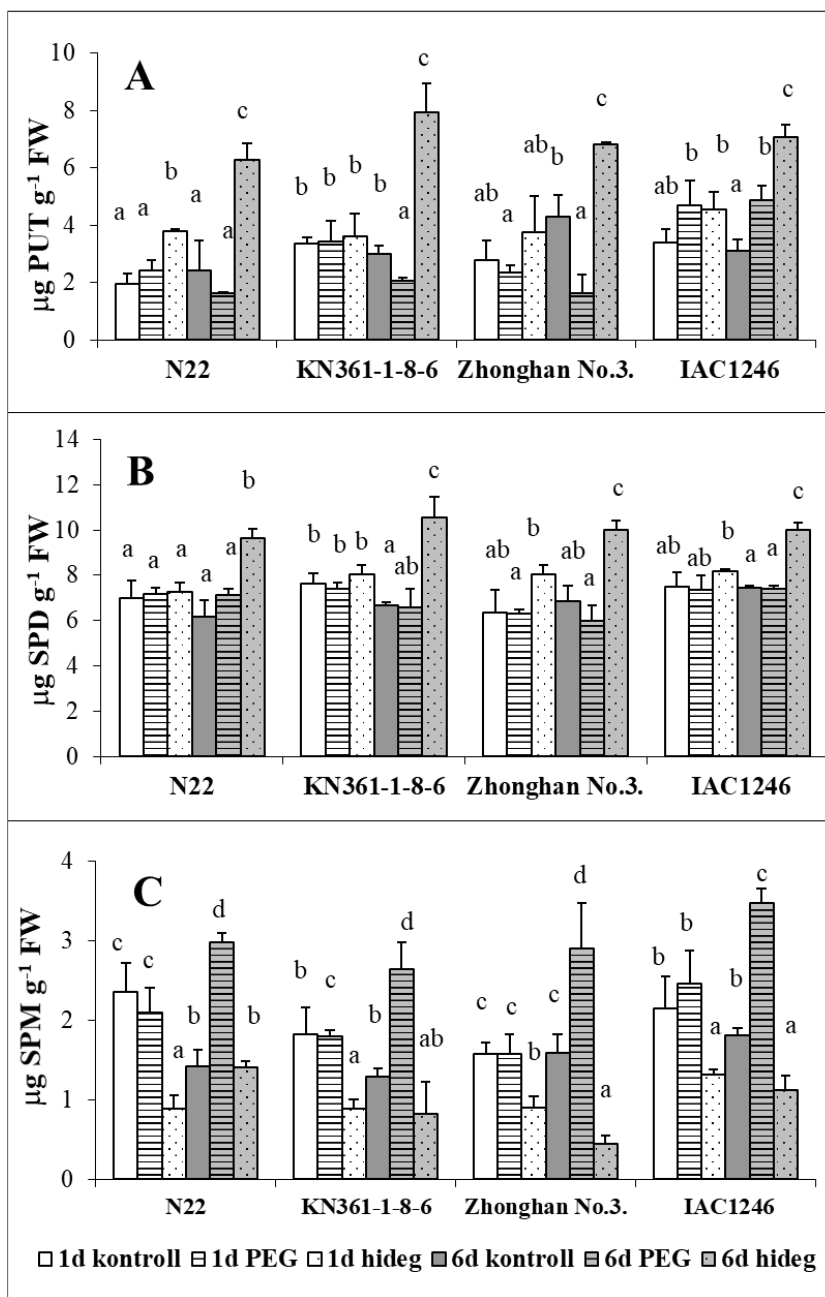
Mivel az eddig vizsgált gabonafélékhez képest a rizsnövényekben a SA mennyisége akár két nagyságrenddel is magasabb lehet (Raskin és *mtsai*. 1990), a következő kísérletben a PA-ok és a SA viszonyának még alaposabb feltárására rizsnövényen alkalmaztunk ozmotikus és alacsony hőmérsékleti stresszhatásokat. A növénynevelés a 4.1.3.3. pontban leírtak szerint történt. Az előzetes kísérletek alapján a KN361-1-8-6, az IAC1246 és a Zhonghan No. 3 genotípusok szárazságtoleráns, míg a N22 genotípus szárazságra érzékeny genotípusnak bizonyult. A 10 °C-os hidegkezelés mint enyhe stressz, késleltetett növekedést okozott a növények számára, de a genotípusok között nem tudtunk különbségeket kimutatni.

5.1.5.1. Alacsony hőmérsékleti és PEG-indukálta ozmotikus stressz hatása a poliamin-tartalomra rizsnövényekben

A genotípusok PA-tartalma nem mutatott különbséget az 1 napos kontrollok (1d kontroll) esetében (23. ábra). A szárazságérzékeny N22 genotípusban szignifikánsan alacsonyabb PUT-tartalmat mértünk a KN361-1-8-6 és IAC246 genotípusokhoz képest, míg szignifikánsan magasabb SPM-szintet a Zhonghan No. 3-ban mért értékhez képest (23. A-C ábra), bár ez a különbség a 6. napra (6d kontroll) eltűnt.

Az 1 napos PEG-kezelés nem befolyásolta a PUT-tartalmat egyik genotípusban sem, míg a 6. napon a KN361-1-8-6 és Zhonghan No. 3 esetében csökkent, de megemelkedett a IAC1246 genotípusban (23. A ábra). A SPD-szintet a PEG-indukálta ozmotikus nem befolyásolta még 6 nap elteltével sem (23. B ábra), ezzel szemben a SPM mennyisége megemelkedett a 6. napon valamennyi genotípusban (23. C ábra). Az alacsony hőmérsékleti stressz 1 nap után megemelte a PUT-tartalmat

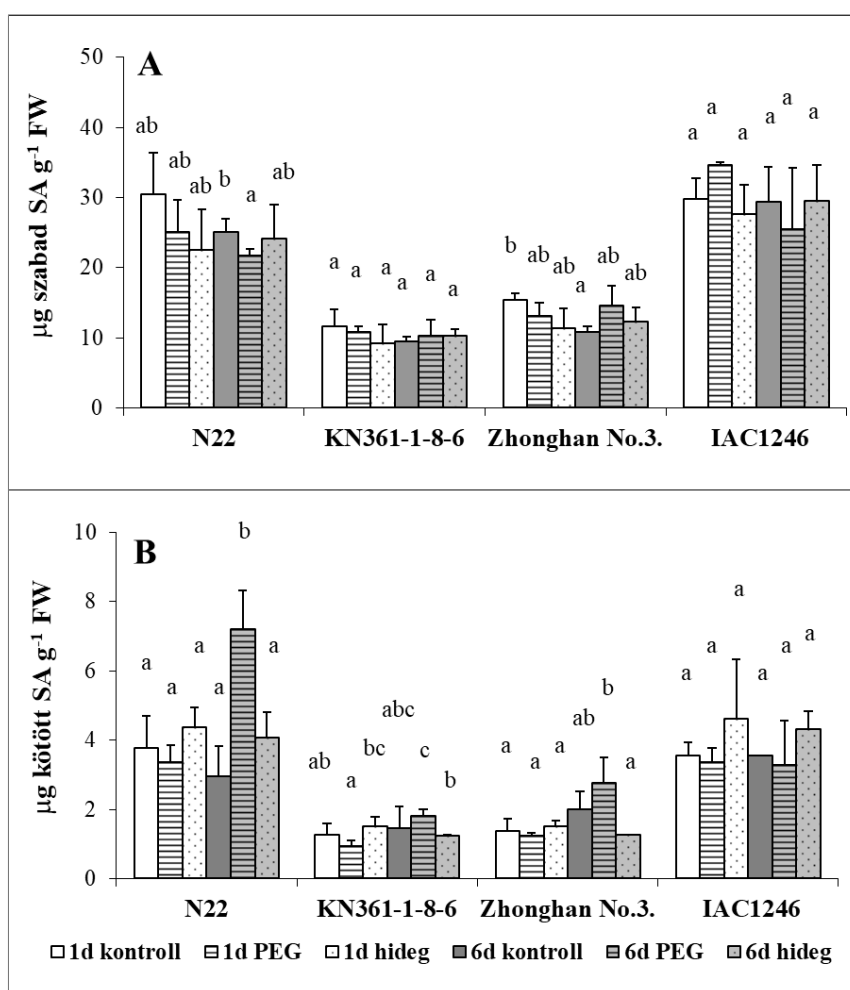
az N22, majd 6 nap után valamennyi genotípus levelében. A SPD-tartalom, a PUT-hez hasonló módon a 6. napon mind a négy genotípusban megemelkedett (23. A-B ábra), míg ezzel ellentétben a SPM szintje csökkent (23. C ábra). A PA-ok mennyisége nem mutatott közvetlen összefüggést a szárazság-tolerancia mértékével, valamint a hidegkezelés során hasonló módon változott valamennyi genotípus esetében.



23. ábra 15% PEG vagy 10 °C-os kezelés hatása a poliamin-tartalomra (putreszcin: A, spermidin: B és spermin: C) különböző rizsnövények levelében. A különböző betűjelek a szignifikáns eltéréseket jelölik $P \leq 0,05$ szinten a kezelések között az adott genotípuson belül ($n=5$).

5.1.5.2. Alacsony hőmérsékleti és PEG-indukálta ozmotikus stressz hatása a szalicilsav-tartalomra rizsnövényekben

A SA kezdeti mennyisége a N22 és IAC1246 genotípusokban több mint kétszer akkor a KN361-1-8-6 és Zhonghan No. 3 genotípusokban mért értékekhez képest, mind a szabad, mind a kötött frakció esetében (24. A-B ábra). Habár néhány esetben szignifikáns különbségek jelentkeztek a kontrollhoz képest, a szabad SA szintje alapvetően nem változott a kezelések során (24. A ábra). A kötött SA esetében csak az N22 genotípusban volt kimutatható szignifikáns emelkedés 6 nappal a PEG-kezelés kezdetétől (24. B ábra).



24. ábra 15% PEG vagy 10 °C-os kezelés hatása a szalicilsav-tartalomra (szabad: A és kötött: B) különböző rizsnövények levelében. A különböző betűjelek a szignifikáns eltéréseket jelölik $P \leq 0,05$ szinten a kezelések között az adott genotípuson belül ($n=5$).

5.1.5.3. Alacsony hőmérsékleti és PEG-indukálta ozmotikus stressz során rizsnövényekben mért paraméterek korreláció elemzése

Habár a szabad és kötött SA-tartalom között valamint a PUT és SPD között pozitív, szignifikáns kapcsolat volt kimutatható, továbbá a negatív összefüggést tapasztaltunk a SPM és PUT vagy SPD között, a SA és PA-ok között szignifikáns korrelációs kapcsolatot jelen kísérletben nem találtunk (Függelék 7. táblázat).

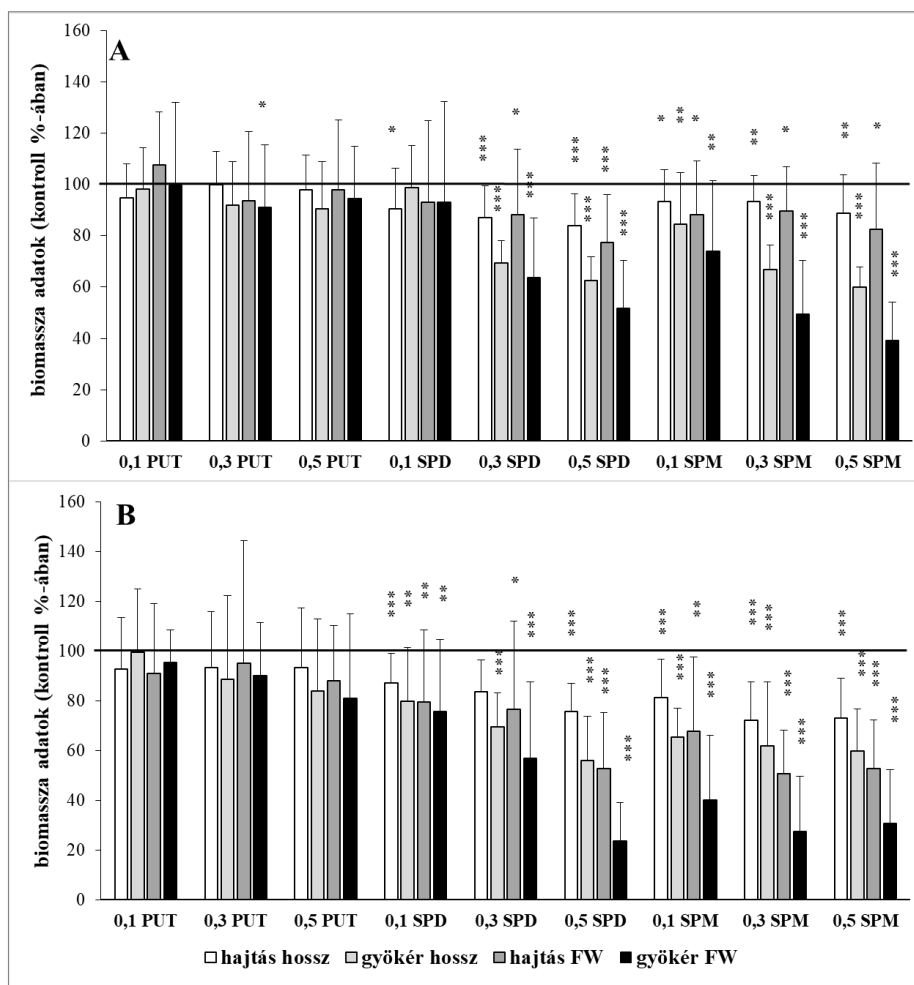
5.2. Poliamin-metabolizmus vizsgálata poliamin-kezelések és különböző stresszhatások során más védővegyületekkel összefüggésben

A PA-ok pozitív, védőhatását a legtöbb esetben általánosítják. Pedig a PA-kezelés hatása függ a vizsgált növényfajtól, az alkalmazott PA-vegyülettől, illetve a stresszfaktortól. Az alábbi kísérletekben PUT-, SPD- vagy SPM-kezeléseket használtunk önmagukban, vagy más védővegyülettel, mint az ABA, történő kezeléssel összehasonlításban, illetve ozmotikus vagy Cd-stressz-szel kombinálva különböző gabonanövényekben.

5.2.1. Poliamin-kezelések hatása búza- és kukoricanövényekben

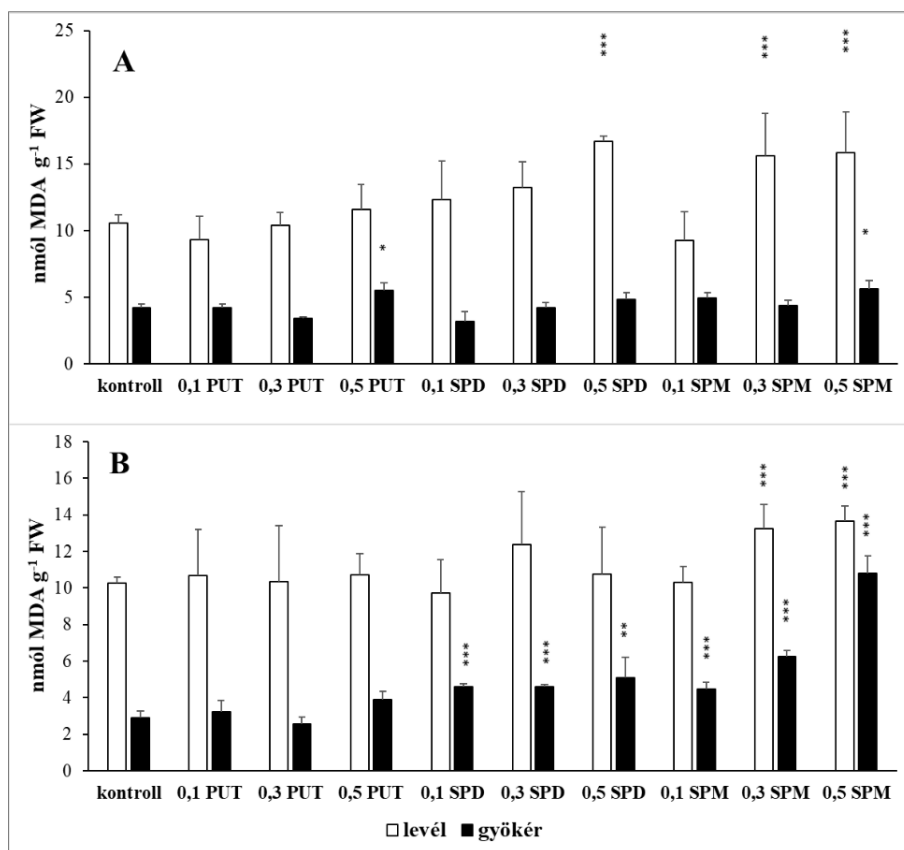
5.2.1.1. A különböző poliamin-kezelések hatása a növekedési paraméterekre és a lipidperoxidációra búza- és kukoricanövényekben

Míg a 7 napos 0,1, 0,3 vagy 0,5 mM PUT-kezelés nem indukált számottevő változásokat a vizsgált növekedési paraméterekben sem a búza, sem a kukorica esetében (25. A-B ábra), a SPD-kezelés koncentrációfüggő módon csökkentette valamennyi paramétert, mindkét növényfajban. Az eredmények azt mutatják, hogy a gyökér érzékenyebben reagált mindkét fajban, mint a hajtás, valamint, hogy a kukorica érzékenyebb volt a PA-kezelésekre, mint a búza.



25. ábra A 0,1, 0,3 és 0,5 mM poliamin-kezelések (putreszcin: PUT, spermidin: SPD és spermin: SPM) hatása a búza- (A) és kukoricanövények (B) növekedési paramétereire a kontroll százalékában kifejezve. *, ** és ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

A biomassza-adatokhoz hasonlóan, a lipidperoxidáció eredményei is azt mutatták, hogy a kukorica gyökére érzékenyebben reagált a PA-kezelésekre, mint a levél, valamint, hogy a magasabbrendű PA-vegyületekkel (SPD és SPM) történő kezelés nagyobb mértékű oxidatív stresszt eredményezett mind a két növényfajban (26. A-B ábra).



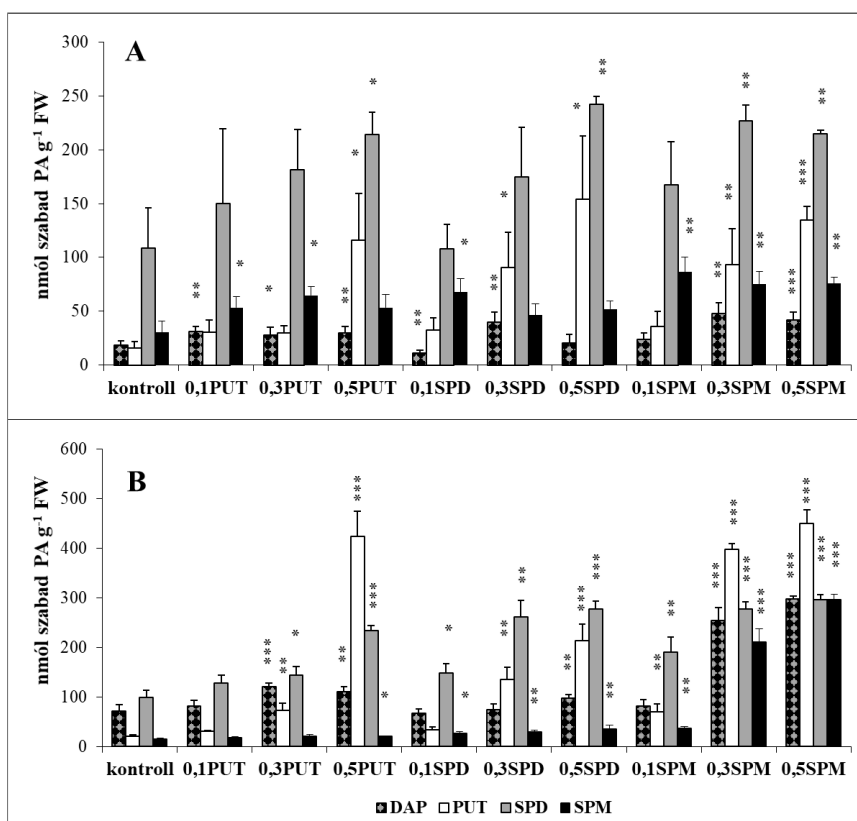
26. ábra A 0,1, 0,3 és 0,5 mM poliamin-kezelések (putreszcín: PUT, spermidin: SPD és spermin: SPM) hatása a búza- (A) és kukoricanövények (B) lipidperoxidációs szintjére. *, ** és ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

5.2.1.2. A különböző poliamin-kezelések hatása a poliamin-tartalomra búza- és kukoricanövényekben

Mivel a PA-kezeléseket hidropónikus kultúrában, a tápoldathoz adagolva alkalmaztuk, nem meglepő, hogy a PA-ok koncentrációfüggő hatásai elsődlegesen a gyökerekben jelentkeztek. Míg a PA-kezeléseknek 0,1 mM koncentrációban enyhe, addig 0,3 vagy 0,5 mM koncentrációknak már kifejezett hatásai voltak a PA-tartalomra (27-28. ábra).

Búzanövényekben a PUT-kezelés nagyfokú PUT-felhalmozódást okozott főleg a gyökérben, mellyel párhuzamosan az apoplasztban a SPD és SPM lebontása során képződő DAP szintje is megemelkedett. A PUT csak a legmagasabb alkalmazott, 0,5 mM-os koncentrációban eredményezett jelentős SPD-szint növekedést mind a levélben, mind a gyökérben (27. A-B ábra). A külsőleg adagolt SPD-t a magasabb koncentrációk esetén (0,3 és 0,5 mM) a búzanövények felvették és a SPD mellett a PUT és SPM mennyisége is megemelkedett, valamint a gyökérből a hajtásba is transzportálták, megemelve az endogén PUT- és SPD-tartalmat a levélben is (27. A-B ábra). A SPM-kezelés

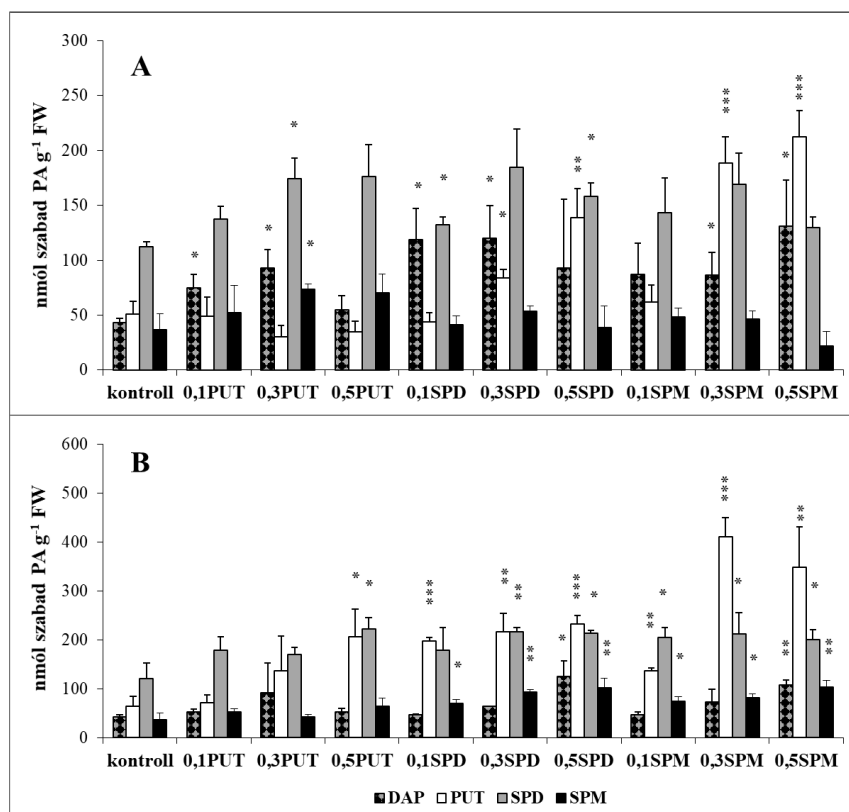
valamennyi vizsgált PA-vegyület és a DAP felhalmozódásához vezetett a búzanövények levelében és gyökerében is (27. A-B ábra).



27. ábra A 0,1, 0,3 és 0,5 mM poliamin-kezelések (putreszcín: PUT, spermidin: SPD és spermin: SPM) hatása a szabad poliamin-tartalomra búzanövények levelében (A) és gyökerében (B) DAP: 1,3-diaminopropán, PUT: putreszcín, SPD: spermidin és SPM: spermin. *, ** és ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

Kismértékű, de koncentrációfüggő növekedési tendencia volt megfigyelhető a kukoricanövényekben a gyökér PUT- és levél SPD-tartalom esetén a PUT-kezelést követően (28. A-B ábra), mely kifejezetten érvényesült és statisztikailag szignifikáns volt a 0,5 mM koncentrációnál. A külsőleg adagolt SPD és SPM, főleg a magasabb koncentrációk esetében és különösen a gyökérben PUT-, SPD- és SPM-felhalmozódást okozott, míg a legnagyobb PUT-szintet a 0,3 illetve 0,5 mM SPM kezelt kukoricanövények levelében és gyökerében mértük (28. A-B ábra).

A legnagyobb mértékű szabad PA-felhalmozódás, mindkét növényfaj esetében a legnagyobb mértékű növekedésgátlással járt együtt. A konjugált PA-tartalomban a szabad frakció esetében tapasztalt és fent leírt tendencia volt kimutatható mindkét növényfaj esetében. Ezen eredmények itt nem kerülnek bemutatásra, de a korrelációanalízis eredményeiben, ami az 5.2.1.4. pontban kerül bemutatásra, is tükröződnek.



28. ábra A 0,1, 0,3 és 0,5 mM poliamin-kezelések (putreszcín: PUT, spermidin: SPD és spermin: SPM) hatása a szabad poliamin-tartalomra kukoricanövények levélben (A) és gyökerében (B) DAP: 1,3-diaminopropán, PUT: putreszcín, SPD: spermidin és SPM: spermin. *, ** és ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

5.2.1.3. A szalicilsav-tartalom változása különböző poliamin-kezeléseket követően búza- és kukoricanövényekben

A különböző PA-kezelések (PUT, SPD és SPM) és a SA-szint közötti összefüggések feltárására a legmagasabb alkalmazott koncentráció (0,5 mM) esetén meghatároztuk a SA-tartalmakat (12. táblázat). Búzában a SPD és SPM megemelte a szabad és kötött SA-tartalmat a levélben. Érdekes módon a gyökérben a szabad SA-szint csökkent a PUT-kezelés esetén, valamint nem változott a SPD-kezelés során, azonban mind a szabad, mind a kötött formában megemelkedett a SPM-kezelést követően.

Jelen kísérleti körülmények között, kukoricában csak a SPD- és SPM-kezelés befolyásolta a SA-tartalmat (12. táblázat). A külsőleg adagolt SPD és SPM megemelte a szabad és kötött SA-szintjét a levélben, és rendkívüli mértékű szabad SA-felhalmozódást eredményezett a kukoricanövények gyökerében.

12. táblázat. Szabad és kötött szalicilsav-tartalom (SA) változása 14 napos búza- és kukoricanövények levelében és gyökerében 7 napos 0,5 mM poliamin-kezeléseket követően. PUT: putreszcín, SPD: spermidin és SPM: spermin. Az eltérő betűk szignifikáns eltérést jelölnek $P \leq 0,05$ szinten az azonos napi kontrollhoz képest ($n=5$).

szabad SA ng g ⁻¹ FW			kötött SA ng g ⁻¹ FW		
kezelések	levél	gyökér	levél	gyökér	
búza	kontroll	58,5±1,78 a	45,09±10,78 b	126,36±54,78 a	31,11±8,28 a
	PUT	66,21±7,83 a	19,07±8,3 a	183,39±54,92 a	41,24±11,85 a
	SPD	109,42±16,45 b	36,28±1,16 b	225,92±46,66 b	31,22±16,47 a
	SPM	100,64±21,8 b	92,6±9,63 c	280,37±55,06 b	62,85±7,79 b
kukorica	kontroll	106,05±32,76 a	79±14,14 a	54,16±12,88 a	22,19±6,35 a
	PUT	120,54±23,2 a	111±46 a	59,1±7,26 a	34,59±11,02 ab
	SPD	224,87±43,7 b	384,88±51,2 b	118,22±18,84 b	31,97±0,68 b
	SPM	267,41±12,25 b	1987±258,4 c	169,97±31,58 c	31,55±2,15 ab

5.2.1.4. Korrelációanalízis a szalicilsav- és poliamin-tartalom között különböző poliamin-kezeléseket követően búza - és kukoricanövényekben

A korrelációs elemzések azt mutatták, hogy az endogén PA- és SA-tartalom között szoros, pozitív összefüggés van, különösen a kukoricanövények esetében (Függelék 8-9. táblázat). Többnyire szoros kapcsolat áll fent a szabad és kötött PA formák között, valamint pozitív összefüggésben lehetnek a gyökérben illetve levélben mért értékek és változások is. Habár a korrelációanalízis csak a lineáris kapcsolatokat jelzi és nem ad választ az ok-okozati kérdésekre, jelen eredmények azt sugallják, hogy a magasabb PA-tartalom összefüggésbe hozható a SA-felhalmozódással.

5.2.2. Putreszcín-kezelés hatása polietilén-glikol indukálta ozmotikus stressz során búza- és kukoricanövényekben

A magasabbrendű PA-okkal (SPD és SPM) történt kezelések során kimutattuk azok kedvezőtlen hatását, valamint hogy a stressz tünetek szorosan korreláltak a PA-ok és a SA felhalmozódásával. Ezzel szemben a PUT-kezelés nem befolyásolta sem a biomassza paramétereket sem a lipidperoxidációt, de szignifikáns növekedést eredményezett a PA-tartalomban mind a búza-, mind a kukorica-növényekben. Az alábbi kísérlet során annak érdekében, hogy még több információt kapjunk a PA-pool változásairól, valamint annak kapcsolatáról a SA-tartalommal, a PUT-előkezelést követően 15 %-os PEG-kezelést alkalmaztunk.

5.2.2.1. Putreszcin-, polietilén-glikol-kezelések és ezek kombinációjának hatása a növekedési paraméterekre, a PSII kvantumhatékonyságára és a gázcsere-paraméterekre búza- és kukoricanövényekben

Amikor a 7 napos 0,5 mM PUT-előkezelést követően a búzanövényeket 5 napra kontroll nevelési körülmények közé helyeztük vissza, a PUT egyértelmű kedvező hatását mutattuk ki, mely a hajtás friss és száraz tömegben, valamint a nettó fotoszintézis értékében is megmutatkozott (13-14. táblázat). Habár a PUT-előkezelés nem tudta megelőzni a PEG hatására tapasztalt gyökér friss és száraz tömegben tapasztalt csökkenést a kombinált kezelés során, a fotoszintetikus aktivitás mégis magasabb volt a PUT-előkezelés + PEG-kezelt növényekben a PEG-kezeltkéhez képest.

13. táblázat 15%-os PEG-kezelés hatása, 7 napos 0,5 mM putreszcin-előkezelést követően, vagy anélkül, a biomassza paraméterekre és a PSII kvantum hatékonyságát jellemző $\Delta F/F_m'$ klorofill-*a* fluoreszcencia indukciós paraméterre. Az eltérő betűk szignifikáns eltérést jelölnek $P \leq 0,05$ szinten az azonos napi kontrollhoz képest ($n=10$).

	kezelések	friss tömeg (g növény ⁻¹)		száraz tömeg (g növény ⁻¹)		$\Delta F/F_m'$
		hajtás	gyökér	hajtás	gyökér	
búza	kontroll	0,89±0,06 a	0,81±0,05 b	0,1049±0,009 a	0,0503±0,009 b	0,414±0,022 ab
	PUT előkezelés	1,12±0,07 b	0,89±0,05 b	0,124±0,001 b	0,0589±0,007 b	0,397±0,015 a
	PEG	0,85±0,11 a	0,63±0,07 a	0,1167±0,001 a	0,0377±0,006 a	0,369±0,052 a
	PUT előkezelés + PEG	0,93±0,08 a	0,61±0,07 a	0,114±0,004 a	0,0484±0,005 ab	0,449±0,024 b
kukorica	kontroll	2,61±0,36 a	1,61±0,25 b	0,45±0,06 b	0,12±0,02 a	0,326±0,037 b
	PUT előkezelés	2,1±0,27 a	1,05±0,16 a	0,31±0,04 a	0,09±0,01 a	0,37±0,028 b
	PEG	2,04±0,38 a	0,98±0,2 a	0,35±0,06 ab	0,11±0,02 a	0,17±0,06 a
	PUT előkezelés + PEG	1,89±0,4 a	0,95±0,22 a	0,29±0,06 a	0,1±0,02 a	0,329±0,05 b

Kukoricában azonban a PUT-előkezelés csökkentette a gyökér friss tömegét és a nettó fotoszintézist, és ozmotikus stressz során sem volt kedvező hatása a biomassza paraméterekre (13-14. táblázat). Mindazonáltal, a PSII kvantumhatékonysága és a nettó fotoszintézis magasabb volt a kombinált kezelések során (PUT-előkezelés + PEG) az önmagában PEG-kezeléshez képest.

A PUT-előkezelés a kukoricában, mint egy tipikus stresszhatás, sztómazáródást váltott ki, mely enyhe csökkenést eredményezett a P_n paraméterben. Azonban ez az enyhe változás a nettó fotoszintézisben, nem jelentkezett a $\Delta F/F_m'$ paraméterben. A magasabb sztómakonduktancia a kombinált PUT- és PEG-kezelések esetén azonban magasabb P_n értékekhez vezetett mind a búza, mind a kukorica esetében, a csak PEG-kezelt növényekhez képest. Ezen eredmények azt mutatják, hogy a PUT-előkezelés bizonyos mértékben enyhíti a PEG kedvezőtlen hatását a fotoszintetikus folyamatokra.

14. táblázat 15%-os PEG-kezelés hatása, 7 napos 0,5 mM putreszcín-előkezelést követően, vagy anélkül, a gázcsere paraméterekre (Pn: nettó CO₂ asszimilációs ráta; Ci: intracelluláris CO₂-koncentráció; gs: sztómakonduktancia and E: transzpiráció). Az eltérő betűk szignifikáns eltérést jelölnek P≤0,05 szinten az azonos napi kontrollhoz képest (n=10).

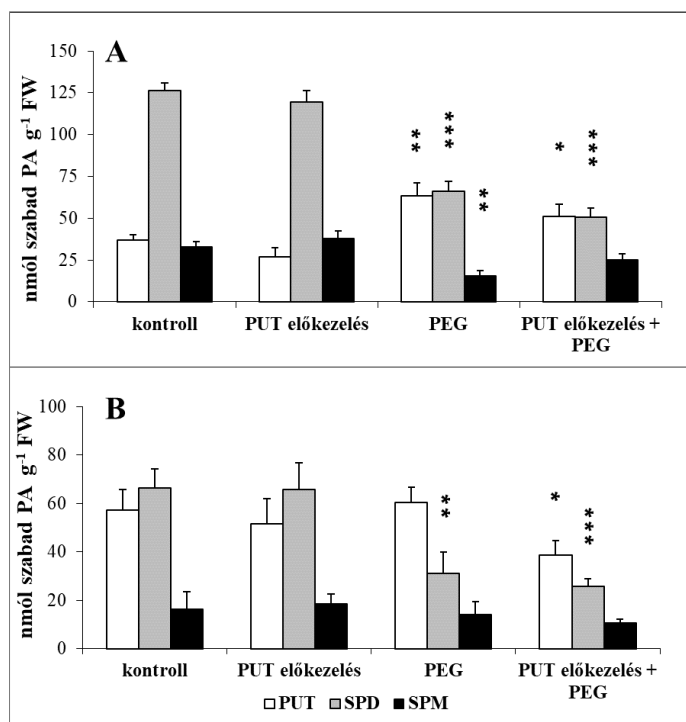
		Pn	Ci	gs	E
		($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
búza	kezelések				
	kontroll	9,38±0,28 c	255,17±12,56 b	164,83±21,53 c	2,27±0,3 b
	PUT előkezelés	10,3±0,19 d	273,33±7,47 b	188,78±17,5 c	2,59±0,12 b
	PEG	5,23±0,31 a	180,44±46,4 a	49,88±3,52 a	0,81±0,13 a
	PUT előkezelés + PEG	6,69±0,23 b	196,44±8,43 a	66,67±4,53 b	0,96±0,25 a
kukorica	kontroll	12,07±0,37 d	226,17±6,03 a	308±14,98 d	2,32±0,22 c
	PUT előkezelés	10,88±0,56 c	241,33±10,16 a	249,83±4,06 c	1,88±0,16 b
	PEG	4,55±0,66 a	324,58±13,93 c	122,92±4,32 a	1,38±0,11 a
	PUT előkezelés + PEG	7,4±0,71 b	296,67±4,64 b	140,1±7,61 b	1,63±0,09 b

5.2.2.2. Putreszcín-, polietilén-glikol-kezelések és ezek kombinációjának hatása a poliamin-tartalomra és poliamin-katabolizmusra búza- és kukoricanövényekben

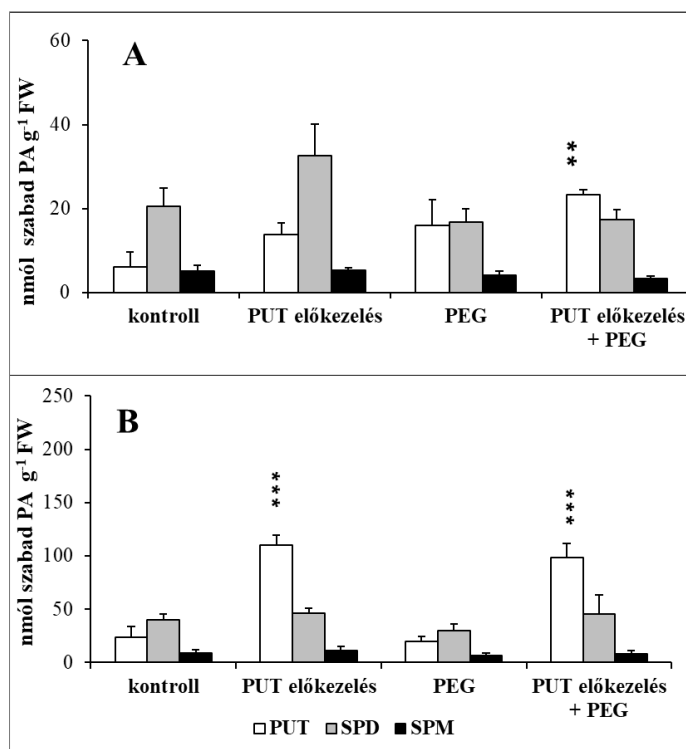
Mivel a szabad és konjugált frakcióban mért PA-tartalmak az adott növényfaj esetében a kezelések során hasonló mintázatot mutattak, itt csak a szabad frakció eredményei kerülnek bemutatásra.

Amikor az 7 napos 0,5 mM PUT-előkezelést követően a búzanövényeket kontroll nevelési körülmények közé helyeztük vissza, a mintegy 5 napos regenerációs időszak után, a külsőleg adagolt PUT nem befolyásolta az endogén PA-tartalmat (29. A-B ábra). A PEG-kezelés önmagában a búzalevéiben megemelte a PUT szintjét, míg csökkentette a SPD- és SPM-tartalmat (29. A ábra), és csökkentette a gyökér SPD mennyiségét is (29. B ábra). A kombinált kezelés esetében (PUT-előkezelés + PEG) a búzanövények levelében a PUT-tartalom megemelkedett és a SPD szintje is csökkent, de a SPM-tartalomban csökkenést nem tapasztaltuk (29. A ábra). A gyökerekben a PUT- és a SPD-tartalom is szignifikánsan csökkent (29. B ábra).

Kukoricában sem a PUT-előkezelés sem a PEG-kezelés önmagában nem okozott változást a levelekben, míg a kombinált kezelés esetén a levél PUT tartalma megemelkedett (30. A ábra). A gyökerekben mind a PUT-előkezelés, mind a PUT-előkezelés + PEG-kezelés hatására PUT-felhalmozódást mértünk (30. B ábra).



29. ábra 0,5 mM putreszcín- és/vagy 15%-os PEG-kezelések hatása a szabad poliamin-tartalomra búzanövények levelében (A) és gyökerében (B) PUT: putreszcín, SPD: spermidin és SPM: spermin. *, ** és ***: szignifikáns $P \leq 0,05$, $0,01$ és $0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).



30. ábra 0,5 mM putreszcín és/vagy 15%-os PEG- kezelések hatása a szabad poliamin-tartalomra kukoricánövények levelében (A) és gyökerében (B) PUT: putreszcín, SPD: spermidin és SPM: spermin. ** és ***: szignifikáns $P \leq 0,01$ és $0,001$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

Habár a PEG-kezelés önmagában és a PUT-előkezelést követően is nagymértékben megemelte a DAP szintjét a búzagyökérben, az apoplasztikus PAO enzim aktivitása csak a PEG-kezelést követően emelkedett meg a gyökérben (15. táblázat). Ezzel párhuzamosan az apoplasztikus DAO enzim aktivitása a levélben csökkent a PUT-előkezelés hatására akár kontroll, akár stressz körülmények követték, míg a gyökérben az ozmotikus stressz hatására megemelkedett (15. táblázat).

A kukorica esetében egyik kezelés sem befolyásolta a DAP-tartalmat vagy a PAO-aktivitást (15. táblázat). Ellenben a DAO aktivitása szignifikánsan megemelkedett a kombinált kezelés esetén mind a levélben, mind a gyökérben. Megállapítottuk, hogy a búza- és kukoricanövények eltérő stratégiát alkalmaznak a PA-metabolizmust illetően.

15. táblázat 15%-os PEG-kezelés hatása, 7 napos 0,5 mM putreszcín-kezelést követően, vagy anélkül a poliamin-katabolizmusra (DAP: 1,3-diaminopropán; DAO: diamin-oxidáz; PAO: poliamin-oxidáz) búza- és kukoricanövények levelében és gyökerében. Az eltérő betűk szignifikáns eltérést jelölnek $P \leq 0,05$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

kezelések	DAP (nmól g ⁻¹ FW)		DAO (Δ ¹ -pirrolin min ⁻¹ g ⁻¹ FW)		PAO (Δ ¹ -pirrolin min ⁻¹ g ⁻¹ FW)	
	levél	gyökér	levél	gyökér	levél	gyökér
Búza						
Kontroll	22,56±12,72 ab	41,18±34,95 a	7,42±0,33 b	3,6±1,48 a	11,32±2,85 a	11,5±1,28 a
PUT előkezelés	21,88±7,96 ab	85,2±15,84 a	5,1±0,69 a	3,63± 0,78 a	11±2,94 a	9,68± 1,29 a
PEG	17,07±2,66 a	181,62±41,5 b	8,42±0,64 b	9,28±1,83 b	12,01±1,17 a	16,06±1,17 b
PUT előkezelés+PEG	32,39±3,22 b	182,31±40,83 b	5,52±0,29 a	3,07±0,58 a	7,04±2,66 a	11,3±3 a
Kukorica						
Kontroll	18,18±3,37 a	10,88±3,57 a	42,32±6,09 a	40±1,77 a	76,12±15,13 a	25,67±2,59 a
PUT előkezelés	22,7±2,74 a	11,26±1,26 a	33,5±11,74 a	46,69±2,26 b	66,36± 13,79 a	21±6,11 a
PEG	11,76±9,2 a	9,2±1,32 a	37,82±10,47 a	44,31±10,46 abc	77,48±5,71 a	36,33±5,5 b
PUT előkezelés+PEG	14,43±2,98 a	11,04±3,78 a	78,93±10,1 b	56,67±7,5 c	77,96± 4,9 a	24,22±8,64 ab

5.2.2.3. Putreszcín-, polietilén-glikol-kezelések és ezek kombinációjának hatása a szalicilsav-tartalomra búza- és kukoricanövényekben

A SA-tartalom eltérő változásokat mutatott a búza- és kukoricanövények esetén (16. táblázat). Az ozmotikus stressz hatására akár önmagában, akár PUT-előkezelést követően alkalmaztuk, a búzalevélben a szabad SA mennyisége megemelkedett. A búzagyökérben azonban a PUT-előkezelés csökkentette a szabad SA, míg a PEG-kezelés megemelte a kötött SA mennyiségét (16. táblázat).

16. táblázat 15%-os PEG-kezelés hatása, 7 napos 0,5 mM putreszcín-kezelést követően, vagy anélkül a szalicilsav-tartalomra (SA) búza- és kukoricanövények levelében és gyökerében. Az eltérő betűk szignifikáns eltérést jelölnek $P \leq 0,05$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

kezelések	szabad SA (ng g ⁻¹ FW)		kötött SA (ng g ⁻¹ FW)	
	levél	gyökér	levél	gyökér
Búza				
Kontroll	72±28,28 a	20,7±0,7 b	384±90,92 a	97,5±18,54 a
PUT előkezelés	57,3±19,23 a	14,05±0,49 a	273,5±115,82 a	83±6,79 a
PEG	189,89±44,53 b	20,85±0,78 b	373,4±87,68 a	138,63±11,72 b
PUT előkezelés+PEG	179,4±37,33 b	20,65±7 ab	373,3±16,54 a	87,53±10,56 a
Kukorica				
Kontroll	85,13±16,39 b	39,44±5,67 b	311,11±46,45 a	30,71±12,33 a
PUT előkezelés	51,11±6,68 a	201,74±25,64 d	392,44±22,2 b	201,52±13,9 c
PEG	57,2±14,1 ab	16,12±5,2 a	376,48±51,4 ab	25,06±9,9 a
PUT előkezelés+PEG	44,88±12,25 a	71,19±13,41 c	515,08±81,66 c	76,29±6,21 b

A PUT előkezelés önmagában és PEG-kezeléssel kombinálva is csökkentette a szabad SA-szintjét a kukoricanövények levelében, míg a gyökérben a PUT-előkezelés megemelte azt, és képes volt megelőzni az ozmotikus stressz negatív hatását (16. táblázat). A kötött SA-tartalom szignifikánsan megemelkedett a PUT előkezelés + PEG kombinált kezelést követően a levélben, míg a gyökérben a kötött SA hasonló módon változott, mint a fent leírt szabad frakcióban.

5.2.3. Putreszcín-kezelés hatása kadmiumstressz során rizsnövényekben

Mivel a PUT-előkezelés védőhatását igazoltuk búza- és kukoricanövényekben is ozmotikus stressz során, a következő kísérletben egy másik abiotikus stresszfaktorral, a kadmiummal szembeni lehetséges védőhatását kívántuk vizsgálni rizsnövényekben. A legfontosabb kérdés a PA-ok és PC-ok szintézisének kapcsolatának feltárása volt, ezért a PUT-kezelés mellett a PUT-szintézis gátlását is vizsgáltuk. A növénynevelés körülményei a 4.1.3.7. pontban leírtak szerint történt.

5.2.3.1. Putreszcín-, 2-(difluorometil)ornitin- és kadmiumkezelések valamint ezek kombinációjának hatása a biomassza paraméterekre, a kadmium- és hidrogénperoxid-tartalomra, valamint az antioxidáns enzimek aktivitására rizsnövényekben

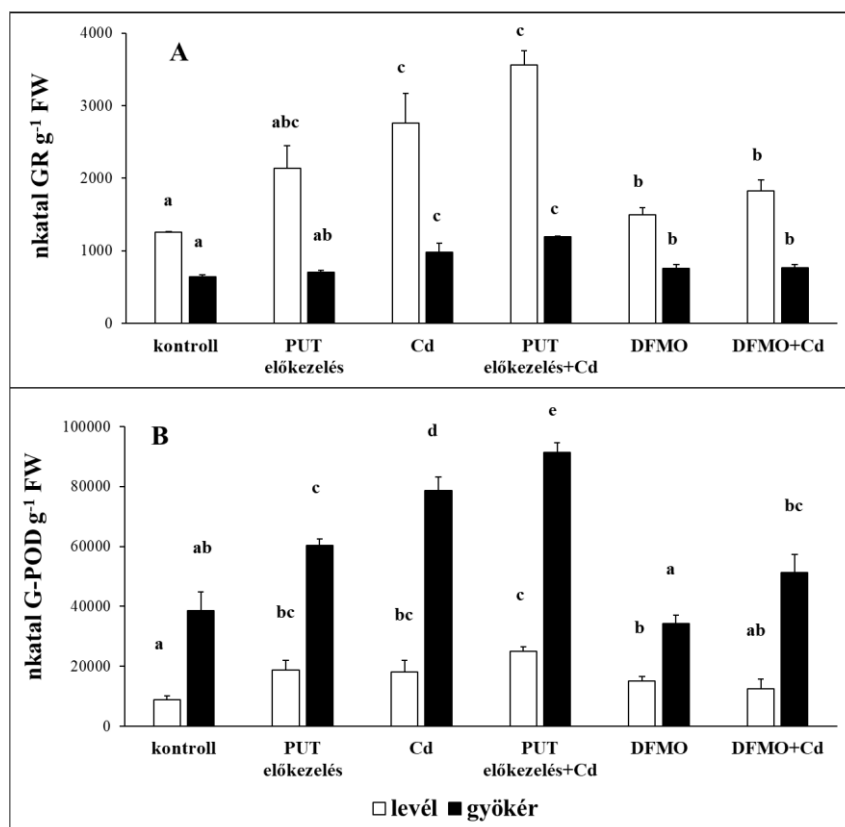
A PUT-előkezelés már önmagában kedvezőtlenül befolyásolta a biomassza paramétereket, ennek megfelelően a PUT-előkezelés + Cd kombinált kezelés még a Cd-kezeléshez képest is nagyobb mértékű biomassza-csökkenést eredményezett (17. táblázat).

17. táblázat A biomassza paraméterek (hajtáshossz és gyökérhossz: cm, hajtás és gyökér frisstömeg: g), a kadmium- ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) és hidrogénperoxid-tartalom (mM g^{-1} FW) változása 7 napos 0,5 mM putreszcín-előkezelés és/vagy 50 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ kezelés, illetve 0,5 mM 2-(difluorometil)ornitin (DFMO) kezelés önmagában vagy 50 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ kezeléssel együtt alkalmazása során rizsben. Az eltérő betűk szignifikáns eltérést jelölnek $P \leq 0,05$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

	kontroll	PUT előkezelés	Cd	PUT előkezelés + Cd	DFMO	DFMO + Cd
hajtáshossz	43,12 $\pm$ 4,87 c	34,81 $\pm$ 4,87 b	36,05 $\pm$ 5,7 b	29,87 $\pm$ 4,35 a	40,83 $\pm$ 2,65 c	34,5 $\pm$ 4,89 b
hajtás friss tömeg	0,49 $\pm$ 0,13 b	0,42 $\pm$ 0,14 b	0,31 $\pm$ 0,09 a	0,31 $\pm$ 0,08 a	0,45 $\pm$ 0,1 b	0,4 $\pm$ 0,09 b
gyökérhossz	19,5 $\pm$ 3,23 d	15 $\pm$ 2,16 c	11,57 $\pm$ 0,79 b	7,68 $\pm$ 3,29 a	21,5 $\pm$ 1,87 d	15,38 $\pm$ 2,14 c
gyökér friss tömeg	0,39 $\pm$ 0,05 d	0,3 $\pm$ 0,06 c	0,18 $\pm$ 0,03 b	0,11 $\pm$ 0,02 a	0,43 $\pm$ 0,06 d	0,22 $\pm$ 0,03 b
levél Cd	0,14 $\pm$ 0,05 a	0,24 $\pm$ 0,25 a	4,00 $\pm$ 0,53 b	6,58 $\pm$ 0,62 b	0,09 $\pm$ 0,04 a	6,63 $\pm$ 0,51 b
gyökér Cd	5,12 $\pm$ 0,4 b	1,88 $\pm$ 0,57 a	1446,85 $\pm$ 222,27 d	1362,86 $\pm$ 134,98 d	5,27 $\pm$ 0,6 b	989,16 $\pm$ 150,2 c
levél H₂O₂	20,77 $\pm$ 6,92 a	24,49 $\pm$ 3,44 a	40,94 $\pm$ 7,76 b	64,87 $\pm$ 10,15 c	17,26 $\pm$ 5,16 a	51,41 $\pm$ 5,98 bc
gyökér H₂O₂	11,71 $\pm$ 2,21 a	14,44 $\pm$ 4,7 a	11,71 $\pm$ 1,41 a	10,26 $\pm$ 0,36 a	13,16 $\pm$ 3,25 a	9,23 $\pm$ 5,08 a

A DFMO-kezelés önmagában nem befolyásolta szignifikánsan a mért paramétereket és érdekes módon a DFMO+Cd-kezelés esetében a gyökérhossz és a hajtás friss tömeg nagyobb volt, a Cd-kezelt növényekhez viszonyítva, továbbá valamennyi paraméter magasabb volt a PUT-előkezelés +Cd-kezelés értékeihez viszonyítva. A Cd-stressz valamennyi kezelés esetében Cd-felhalmozódáshoz vezetett, különösen a gyökérben (17. táblázat). Azonban szignifikánsan alacsonyabb Cd-tartalmat mértünk a DFMO+Cd-kezelt növények gyökerében a másik két Cd-kezeléshez képest (Cd és PUT-előkezelés+Cd. A Cd-stressz H₂O₂-felhalmozódással is együtt járt, mely szintén a PUT-előkezelést követően (PUT-előkezelés+Cd) volt a legnagyobb mértékű (17. táblázat).

Hasonlóan az előzőkhez, a GR- (31. A ábra) és G-POD-aktivitás (31. B ábra) változások is azt mutatták, hogy a legkifejezettebb oxidatív stressz a PUT-előkezelést követő Cd-kezelés során lépett fel, azt sugallva, hogy a két kezelés additív hatással bírt. Ellenben a DFMO-kezelés bizonyos mértékig enyhítette a Cd okozta károsodást.

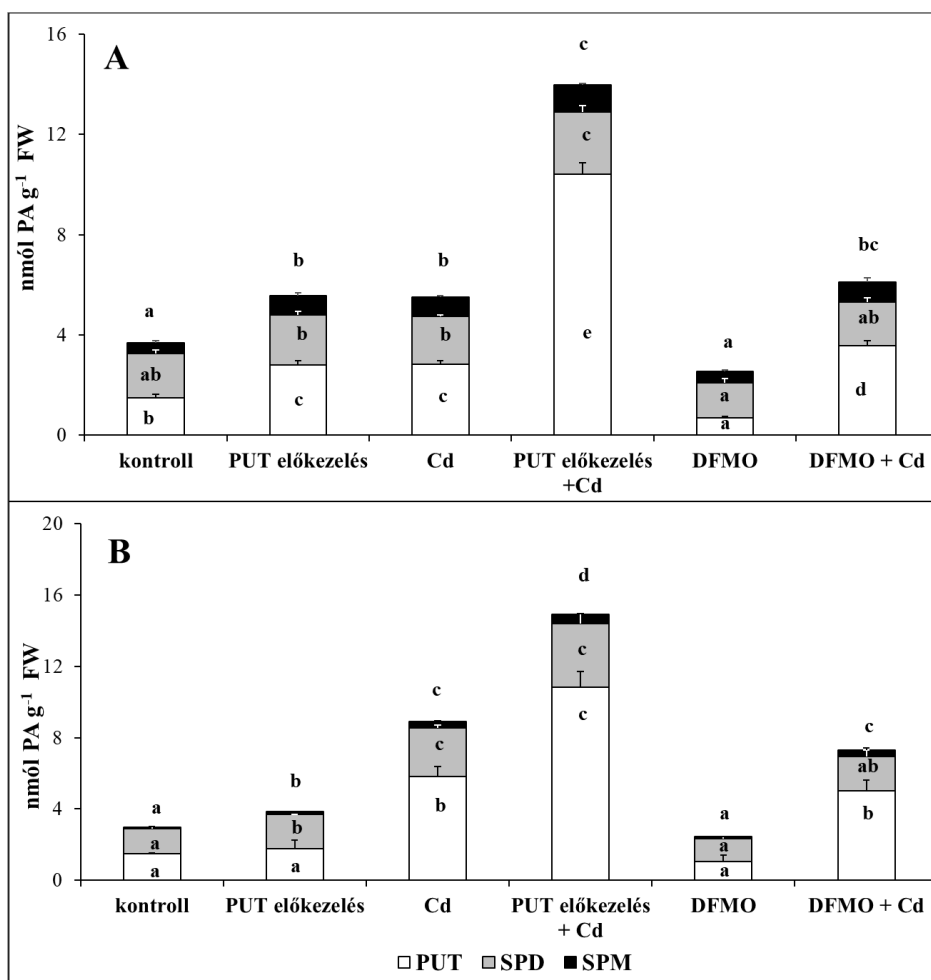


31. ábra 0,5 mM putreszcín- vagy 0,5 mM 2-(difluorometil)ornitin- (DFMO) és/vagy 50 μ M kadmiumkezelések hatása a glutation reduktáz (GR: A) és a gvajakol peroxidáz (G-POD: B) enzimaktivitásra a rizsnövények levelében és gyökerében. Az eltérő betűk szignifikáns eltérést jelölnek $P \leq 0,05$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

5.2.3.2. Putreszcín, 2-(difluorometil)ornitin és kadmiumkezelések valamint ezek kombinációjának hatása a poliamin-metabolizmusra rizsnövényekben

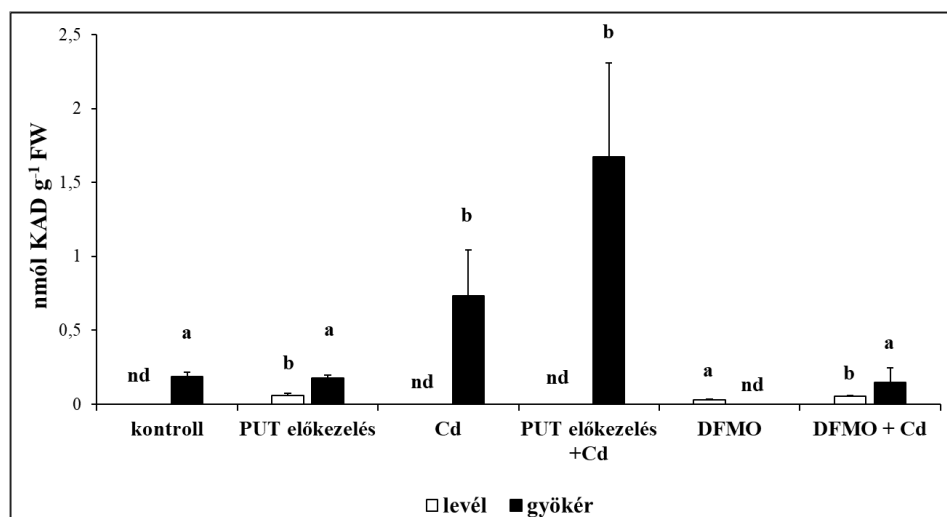
Ahogy az várható volt, az egy hetes 0,5 mM PUT-előkezelés hatására a PA-tartalom megemelkedett a rizsnövényekben (287, 127 és 229%-os emelkedés a PUT, SPD és SPM esetében) Ez azt feltételezi, hogy a PUT nem csak felvételre került, hanem a magasabbrendű PA-ok (SPD és SPM) szintéziséhez is felhasználásra került. Ezen eredmények itt nem kerülnek bemutatásra, mivel az egy hetes regenerációs idő végén is kimutatható volt a kontrollhoz képest magasabb levél PUT-, gyökér SPD-, valamint levél és gyökér SPM-tartalom (32. A-B ábra).

Ezzel ellentétben a DFMO-kezelés hatására a levél PUT-tartalom csökkent, de a többi magasabbrendű PA-ok mennyisége nem változott. A Cd-kezelés önmagában PA-felhalmozódást eredményezett, mely a gyökérben még kifejezettebb volt (32. B ábra). A legnagyobb PA-koncentráció a PUT-előkezelés+Cd-stressz esetén volt kimutatható, ami megint egy additív hatást jelez. Az előbbiekhöz képest a DFMO+Cd-kezelés esetén a PA-felhalmozódás kisebb mértékű volt.



32. ábra 0,5 mM putreszcín- vagy 0,5 mM 2-(difluorometil)ornitin- (DFMO) és/vagy 50 μ M kadmiumkezelések hatása a poliamin-tartalomra rizsnövények levelében (A) és gyökerében (B). PUT: putreszcín, SPD: spermidin, SPM: spermin. Az eltérő betűk szignifikáns eltérést jelölnek $P \leq 0,05$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

A másik diaminnak, a KAD-nek a mennyisége, mely a PUT-től függetlenül szintetizálódik, szintén megemelkedett Cd-stressz során a gyökérben, különösen a PUT-előkezelt növényekben (33. ábra).



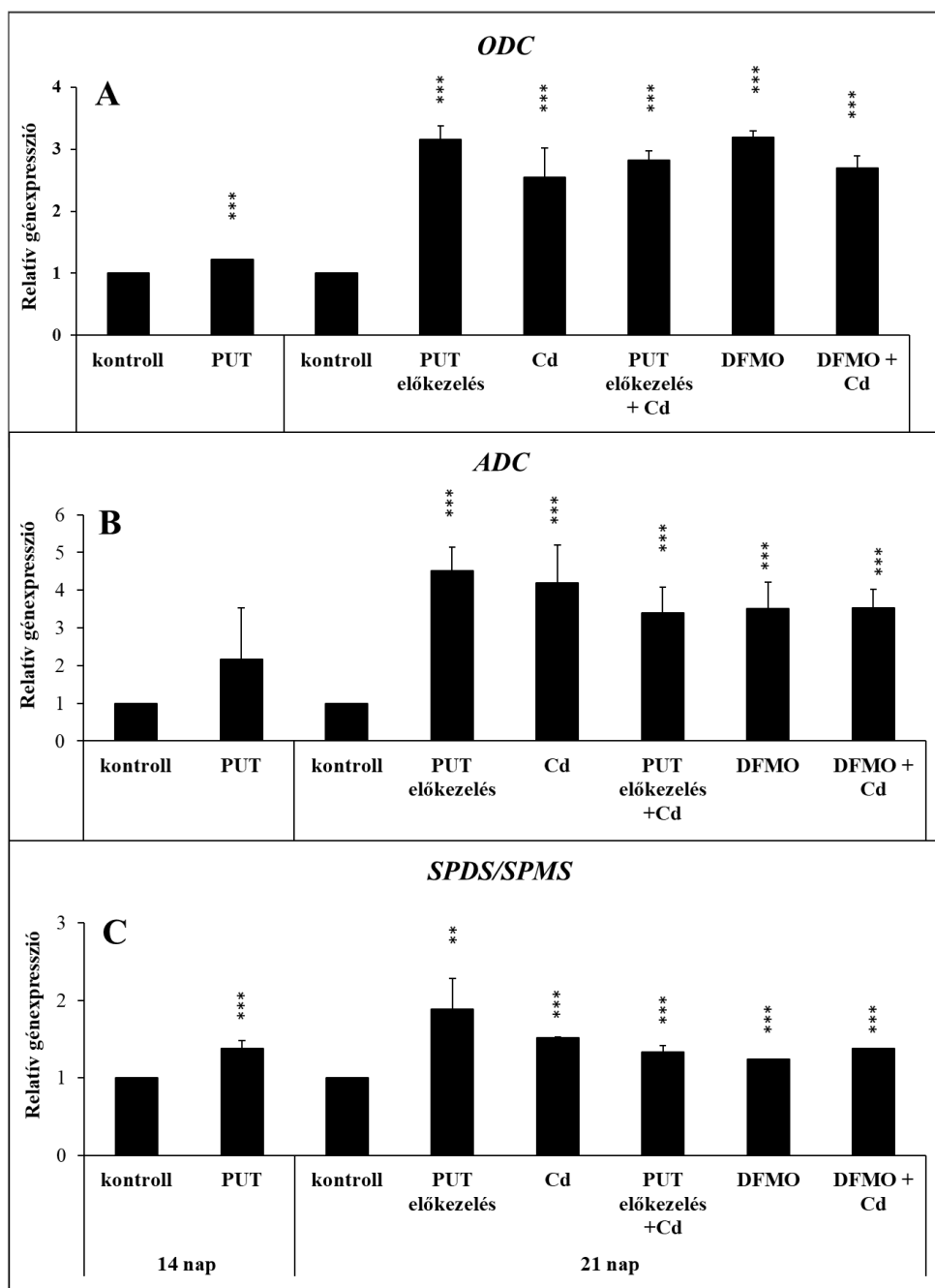
33. ábra 0,5 mM putreszcín- vagy 0,5 mM 2-(difluorometil)ornitin- (DFMO) és/vagy 50 μ M kadmiumkezelések hatása a kadaverin-tartalomra (KAD) rizsnövények levelében és gyökerében. Az eltérő betűk szignifikáns eltérést jelölnek $P \leq 0,05$ szinten a kontrollhoz képest, nd: nem detektálható (n=5).

A PUT és a KAD lebontásáért felelős DAO aktivitása a kombinált PUT- és Cd-kezelés esetében, ahol a legmagasabb PUT- és KAD-szint volt mérhető, megemelkedett (18. táblázat). A magasabbrendű PA-ok (SPD és SPM) lebontásáért felelős PAO enzim aktiválódását mutattuk ki a Cd-kezelések során a levélben, akár PUT-kezelés előzte meg, akár DFMO kezeléssel volt kombinálva, míg a gyökérben valamennyi, különösen a PUT-előkezelés + Cd-kezelés indukálta (18. táblázat), ahol ennek megfelelően a DAP és a H_2O_2 mennyisége is a magasabb volt (17-18. táblázat).

18. táblázat A 1,3-diaminopropán-tartalom (DAP), valamint a diamin- és poliamin-oxidáz (DAO és PAO) enzim aktivitásainak változása 7 napos 0,5 mM putreszcín-előkezelés és/vagy 50 μ M $Cd(NO_3)_2$ kezelés, illetve 0,5 mM 2-(difluorometil)ornitin-kezelés (DFMO) önmagában vagy 50 μ M $Cd(NO_3)_2$ kezeléssel együtt alkalmazása során. Az eltérő betűk szignifikáns eltérést jelölnek $P \leq 0,05$ szinten a kontrollhoz képest (n=5).

kezelések	DAP (nmol g ⁻¹ FW)		DAO (U g ⁻¹ FW)		PAO (U g ⁻¹ FW)	
	levél	gyökér	levél	gyökér	levél	gyökér
Kontroll	47,2±14,5 b	2730,7±847,6 b	10,7±2,8 a	11,1±2,6 a	14,6±2,4 a	12,4±0,4 a
PUT előkezelés	67,4±1,7 bc	1428,6±254,9 ab	8,9±1,2 a	12±2,3 a	17,2±1,6 a	21,3±0,5 b
Cd	52,2±9,9 b	2086,6±231,5 b	10,9±1,2 a	11,7±1,3 a	24±2,2 b	22±1,8 b
PUT előkezelés + Cd	78,23±12 c	3918,1±881,7 b	10,5±0,9 a	18,6±1,2 b	24,7±3,9 b	32,3±0,9 c
DFMO	27,4±6,3 a	693,7±211 a	10,7±0,4 a	13,9±1,6 a	13,7±0,6 a	21,4±1,2 b
DFMO + Cd	24,2±5,9 a	573,5±38,7 a	9,7±0,4 a	12,9±1,4 a	25,2±1,2 b	21,1±2,7 b

Már a 7 napos PUT-előkezelés is enyhén megemelte az *ODC*, *ADC* és *SPDS/SPMS* gének expressziós szintjét, mely emelkedés még kifejezettebbé vált a 7 napos regenerációs időszak végén az azonos napi kontrollhoz képest (34. A-C ábra). A DFMO-kezelés annak érdekében, hogy a PUT-szintézis gátlását kompenzálja, szintén indukálta az *ODC* és *ADC* gének expresszióját (34. A-B ábra).



34. ábra 0,5 mM putreszcín- vagy 0,5 mM 2-(difluorometil)ornitin- (DFMO) és/vagy 50 μ M kadmiumkezelések hatása az ornitin dekarboxiláz (*ODC*: A), arginin dekarboxiláz (*ADC*: B) és a spermidin/spermin szintáz (*SPDS/SPMS*: C) gének relatív expressziójára rizsnövények levelében. ** és ***: a szignifikáns eltérést jelölik $P \leq 0,01$ és $0,001$ szinten az azonos napi kontrollhoz képest ($n=3$).

5.2.3.3. Putreszcín-, 2-(difluorometil)ornitin- és kadmiumkezelések valamint ezek kombinációjának hatása a tioltartalomra és a fitokelatin-szintézisre rizsnövényekben

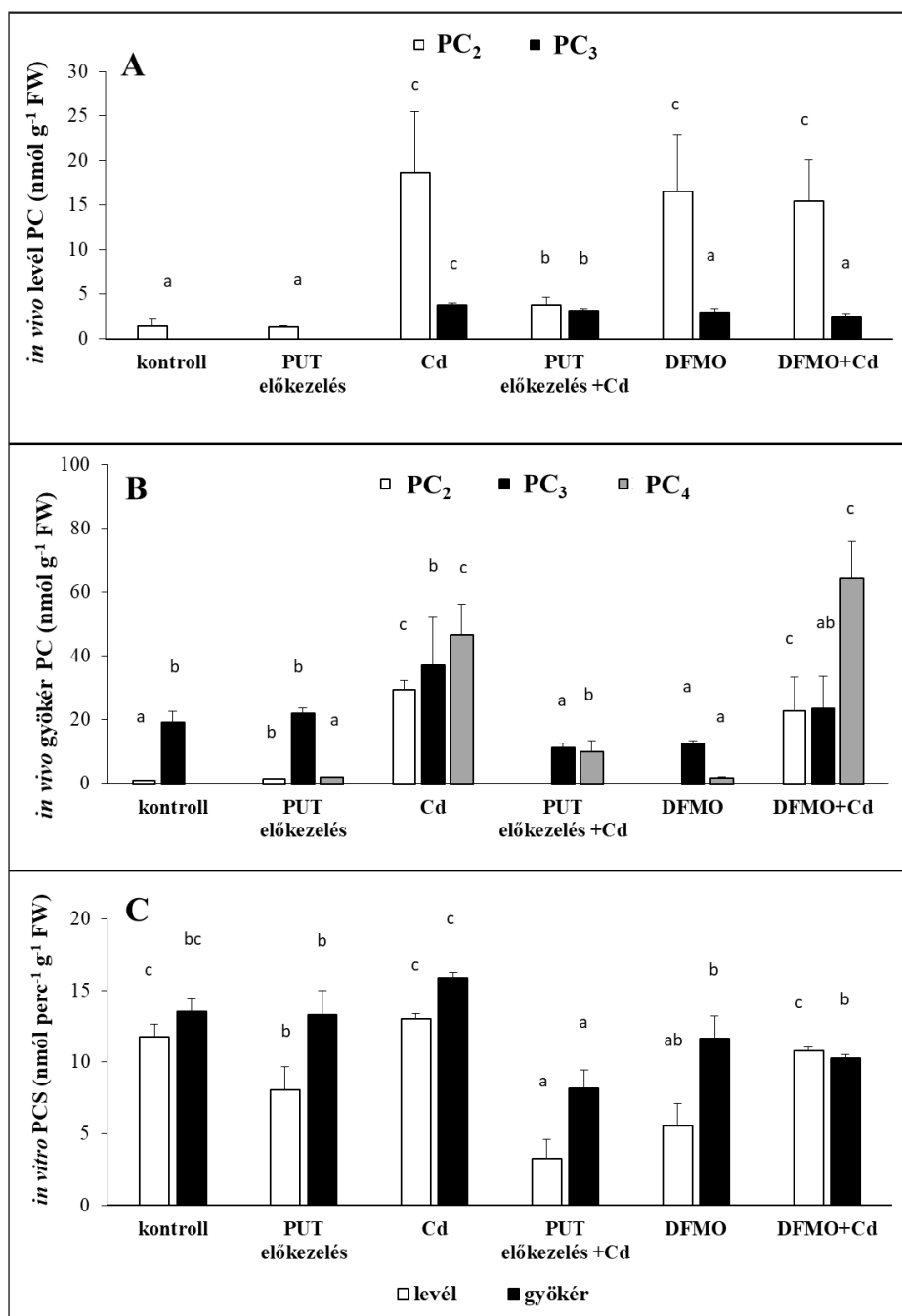
A tiolos vegyületek közül a legnagyobb mennyiségben a hidroximetil-glutation (hmGSH) és a GSH volt detektálható, így ezek kerülnek itt bemutatásra (19. táblázat). A PUT-előkezelés nem befolyásolta a tioltartalmat sem a levélben, sem a gyökérben, azonban a Cd-stressz hatására szignifikáns akkumulációjuk volt megfigyelhető a levélben. A Cd-kezelések között a legkisebb mértékű felhalmozódásukat a PUT-előkezelést követően tapasztaltuk.

19. táblázat A hidroximetil-glutation- (hmGSH) és glutation-tartalom (GSH) változása 7 napos 0,5 mM putreszcín-előkezelés és/vagy 50 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ kezelés, illetve 0,5 mM 2-(difluorometil)ornitin-kezelés (DFMO) önmagában vagy 50 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ kezeléssel együtt alkalmazása során. Az eltérő betűk szignifikáns eltérést jelölnek $P \leq 0,05$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

kezelések	hmGSH (nmól g ⁻¹ FW)		GSH (nmól g ⁻¹ FW)	
	levél	gyökér	levél	gyökér
Kontroll	25,4±1,18 b	29,6±1,72 bc	8,97±1,74 a	10,96±2,96 ab
PUT előkezelés	24,75±3,76 abc	28,48±0,05 b	9,86±0,73 a	9,4±1,34 a
Cd	28,14±1,91 c	28,97±1,38 b	11,67±0,97 b	10,76±0,47 ab
PUT előkezelés + Cd	20,83±2,78 a	23,84±0,71 a	9,04±1,26 a	8,15±1,72 a
DFMO	24,95±0,63 b	30,54±0,37 c	9,83±0,65 a	11,61±0,13 b
DFMO + Cd	27,1±2,25 c	28,54±0,02 b	9,65±2,15 ab	10,2±1,21 a

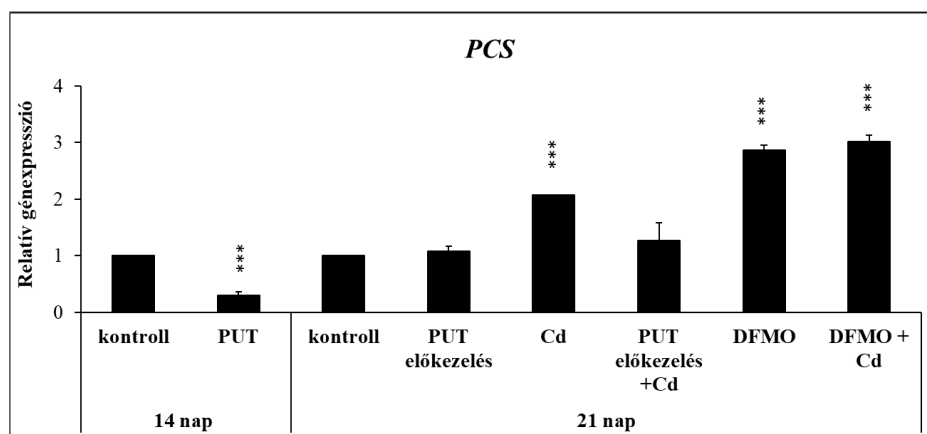
A levélben a PC-ok mennyiségét a PUT-előkezelés nem befolyásolta a kontrollhoz képest, és csak a PC₂ volt detektálható (35. A ábra). A PC₂ és a PC₃ érdekes módon nem csak a Cd-stressz és a DFMO + Cd-kezelés során, hanem önmagában a DFMO-kezelést követően is felhalmozódott. Hasonlóan a tioloknál leírtakhoz, szignifikánsan alacsonyabb PC₂-szint növekedést mértünk a PUT-előkezelés + Cd-kezelés esetén a Cd-kezeléshez képest (Cd), míg a PC₃-tartalom hasonló volt a Cd, DFMO és a DFMO + Cd-kezelt növények levelében (35. A ábra).

A levélben tapasztaltaknak megfelelő mintázat volt megfigyelhető a gyökér PC-szintjének változásaiban (35. B ábra). A PUT-előkezelés nem okozott kifejezett különbségeket, de a Cd- és DFMO + Cd-kezelések PC₂, PC₃ és PC₄ szintézist indukáltak. Bár amikor a Cd-kezelés PUT-előkezelést követően történt, a PC₄ fitokelatinok is megjelentek, a PC₃-szintje csökkent, és a PC₂ pedig nem volt kimutatható (35. B ábra). A PCS, összhangban a PC-tartalmakkal, a legkisebb aktivitást a PUT-előkezelést követően Cd-stressznek kitett növények levelében és gyökerében mutatta (35. C ábra).



35. ábra 0,5 mM putreszcín vagy 0,5 mM 2-(difluorometil)ornitín és/vagy 50 μ M kadmiumkezelések hatása a levél (A) és gyökér (B) *in vivo* fitokelatin-szintre (PC) illetve az *in vitro* fitokelatin szintáz-aktivitásra (PCS: C) rizsnövényekben. Az eltérő betűk szignifikáns eltérést jelölnek $P \leq 0,05$ szinten a kontrollhoz képest ($n=3$).

A génexpresszió vizsgálata során, kimutattuk, hogy a PUT-előkezelés már önmagában csökkenti a PCS gén transzkripciójának mértékét (36. ábra). Habár ez a hatás a regenerációs fázist követően eltűnt, alacsonyabb PCS génexpressziót tapasztaltunk a PUT-előkezelést követően Cd-nak kitett növények levelében, a másik Cd-kezelés során mért értékekhez képest (Cd és DFMO + Cd).



36. ábra 0,5 mM putreszcín vagy 0,5 mM 2-(difluorometil)ornitin (DFMO) és/vagy 50 μ M kadmiumkezelések hatása a fitokelatin szintáz gén (*PCS*) relatív expressziójára rizsnövények levelében. ***: a szignifikáns eltérést jelölik $P \leq 0,001$ szinten az azonos napi kontrollhoz képest ($n=3$).

5.2.4. Putreszcín- és abszciizinsav-kezelések összehasonlítása kontroll és ozmotikus stressz körülmények között búzanövényekben

A PA-ok közül a SPD- és ABA-tartalom pozitív korrelációs kapcsolatát már igazoltuk alacsony hőmérsékleti stressz során. A következő kísérletben azonban a külsőleg adagolt PUT hatását vizsgáltuk az ABA-szintézisre, illetve fordítva, az ABA-kezelés hatását a PA-metabolizmusra. Mivel a PA-ok és a prolin szintézise közös prekursorként a glutamátnál ágazik ketté, külön kérdésként merült fel a PA- és prolinszintézis viszonyának tisztázása a kezelések során. A növénynevelés a 4.1.3.8. pontban leírtak szerint történt.

5.2.4.1. Putreszcín- és abszciizinsav-kezelések hatása kontroll és ozmotikus körülmények között a gázcsere paraméterekre

Annak érdekében, hogy az ABA-, PUT- és PEG-kezelések során a növények fiziológiai állapotáról képet kapjunk meghatároztuk a gázcsere paramétereket (20. táblázat). Az egynapos ABA-kezelés csökkentette a nettó fotoszintézist, ami a gyors és kifejezett sztómazáródásból eredt, és amellyel párhuzamosan csökkent az intracelluláris CO_2 -koncentráció, mutatva, hogy a fotoszintézis tovább folytatódott. Az 1 napos PUT-kezelés nem befolyásolta a mért paramétereket.

Az 5 napos regenerációs időszak végén az ABA-kezelt növényekben (ABA+5d) a fent leírt különbségek döntően eltűntek a P_n és C_i paraméterek esetén az azonos napi kontrollhoz képest (K+5d), míg az enyhén alacsonyabb sztómakonduktancia és transzpiráció még mindig kimutatható volt (20. táblázat). Az 5 napos 15%-os PEG-kezelés magában (K+5dPEG) mint egy enyhe ozmotikus

stressz csökkentette a g_s és E paramétereket, és a kombinált kezelések esetén (ABA+5dPEG és PUT+5dPEG) hasonló értékeket mértünk.

20. táblázat Egynapos 0,15 mM abszcizinsav (ABA) és 0,5 mM putreszcín-előkezelések (PUT), valamint 5 napos 15%-os PEG-kezelés és ezek kombinációinak hatása a gázcsere-paraméterekre (P_n : nettó CO_2 asszimilációs ráta; C_i : intracelluláris CO_2 koncentráció; g_s : sztómakonduktancia and E : transzpiráció). Az eltérő betűk szignifikáns eltérést jelölnek $P \leq 0,05$ szinten a kontrollhoz képest ($n=5$).

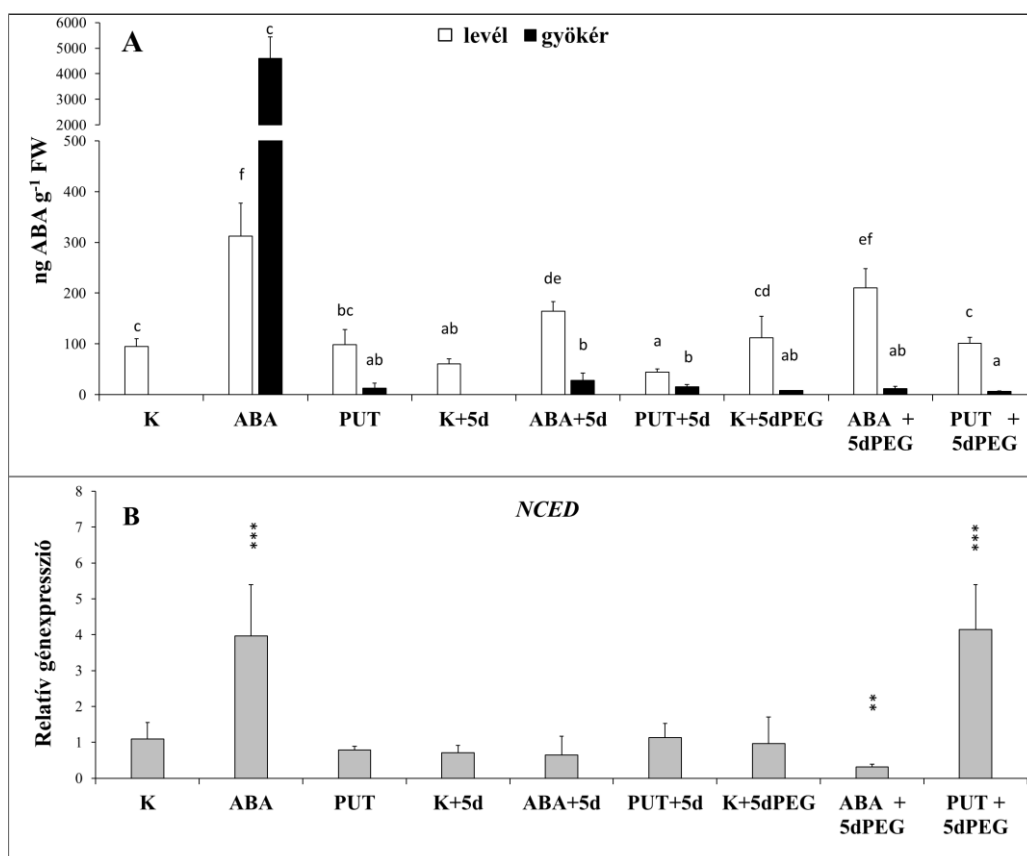
kezelések	P_n ($\mu\text{mol } CO_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	C_i ($\mu\text{mol } CO_2 \text{ mol}^{-1}$)	g_s ($\text{mol } CO_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	E ($\text{mmol } H_2O \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
K	7,592±0,83 b	298±17 b	0,158±0,033 ef	2,122±0,355 d
ABA	5,03±1,683 a	16±5 a	0,018±0,014 a	0,267±0,213 a
PUT	9,04±1,067 b	274±18 b	0,15±0,011 e	1,867±0,197 d
K+5d	6,616±0,86 a	351±19 c	0,238±0,02 g	1,933±0,153 d
ABA+5d	5,8±0,889 a	329±13 c	0,144±0,031 def	1,296 ±0,255 c
PUT+5d	5,853±0,15 a	359±24 c	0,204±0,022 fg	2,033±0,462 d
K+5dPEG	5,037±0,574 a	313±19 bc	0,083±0,019 bc	0,917±0,196 b
ABA+5dPEG	5,733±0,75 a	317±26 bc	0,114±0,043 cdf	1,13±0,294 bc
PUT+5dPEG	5,31±0,41 a	314±1,4 bc	0,100±0,021 cd	1,01±0,155 bc

5.2.4.2. Putreszcín- és abszcizinsav-kezelések hatása kontroll és ozmotikus körülmények között az abszcizinsav-tartalomra és szintézisre

Az alapos gyökérmosás ellenére magas ABA-tartalom volt mérhető a búzanövények gyökerében az ABA-kezelés követően, bár a megemelkedett ABA-szint megjelent a levélben is, továbbá mindkét szervben az 5 napos regenerációs periódus elteltével is kimutatható volt (37. A ábra). A PUT-kezelés nem befolyásolta az ABA tartalmat a levélben, de a gyökér esetében, ahol kezdetben az ABA szintje a detektálási határ alatt volt, kifejezett csúcs volt azonosítható.

A PEG-kezelés önmagában megemelte az ABA mennyiségét, különösen a levélben, és hasonló változásokat tapasztaltunk a PUT+5dPEG-kezelést követően, de a legmagasabb ABA-felhalmozódást az ABA+5dPEG-kezelt növények levelében mértük (37. A ábra).

Az ABA-szintézisért felelős NCED-et kódoló gén alacsony expressziós szintet mutatott a búzanövények levelében, és csak az ABA- illetve az PUT+5dPEG-kezelések voltak képesek megemelni (37. B ábra).



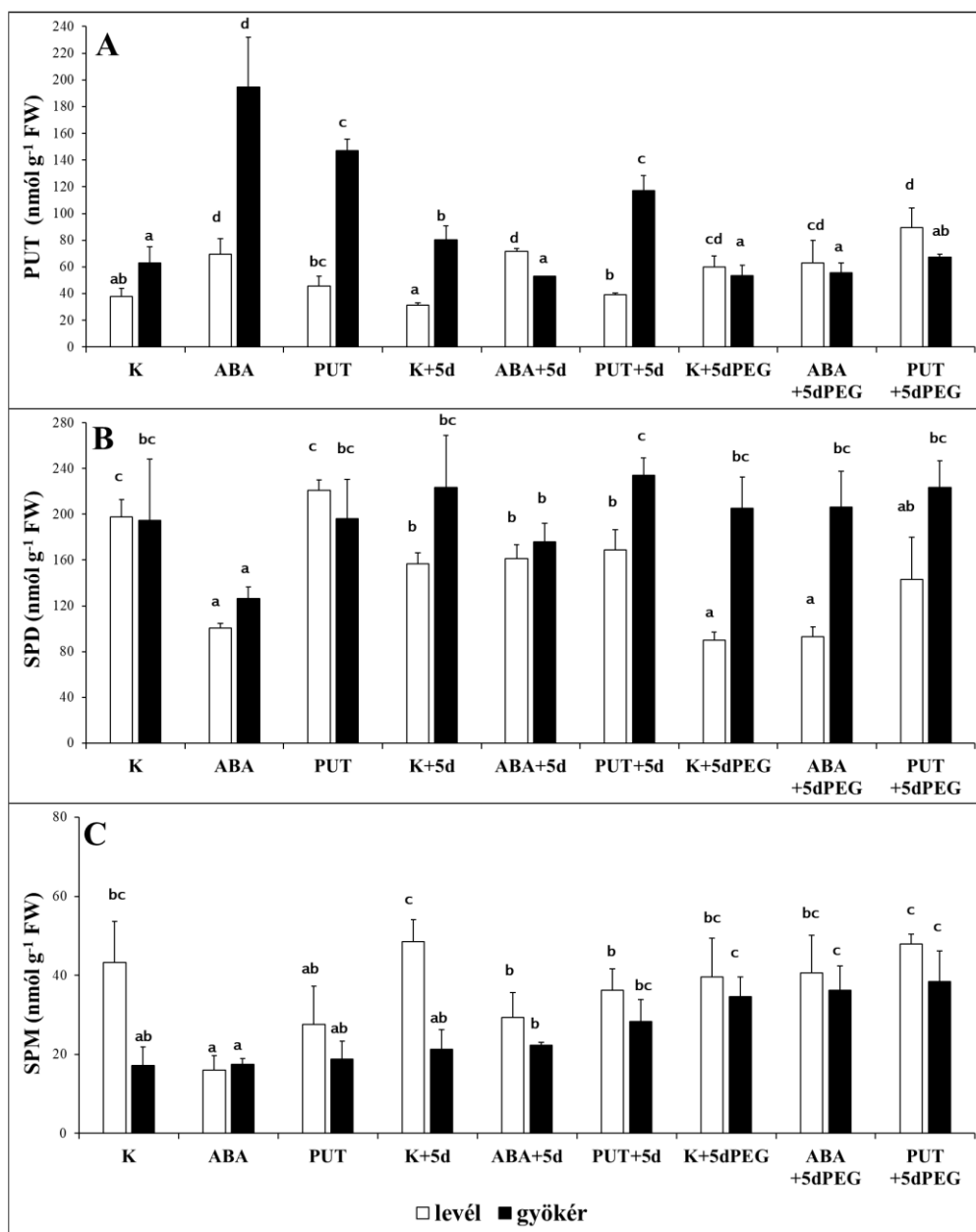
37. ábra 0,15 mM abszcizinsav- (ABA) , 0,5 mM putreszin- (PUT) és/vagy 15%-os PEG-kezelések hatása az abszcizinsav-tartalomra (ABA) a levélben és gyökérben (A) valamint a 9-cisz-epoxikarotenoid-dioxigenáz gén (*NCED*) relatív expressziójára búzanövények levelében (B). Az ABA tartalom esetén az eltérő betűjelek a szignifikáns eltérést jelölik $P \leq 0,05$ szinten az azonos napi kontrollhoz képest. Az *NCED* génexpressziója esetén ** és ***: a szignifikáns eltérést jelölik $P \leq 0,01$ és $0,001$ szinten az azonos napi kontrollhoz képest ($n=3$).

5.2.4.3. Putreszin- és abszcizinsav-kezelések hatása kontroll és ozmotikus körülmények között a poliamin-metabolizmusra

Az egynapos PUT-kezelés hatására PUT halmozódott fel a búzanövények gyökerében, de a kezelés időtartama vagy koncentrációja nem volt elég ahhoz, hogy a PUT a gyökérből a levélbe is transzportálódjon, illetve hogy a magasabbrendű PA-ok mennyiségében változás álljon be (38. A-C ábra). A PUT-felhalmozódás a gyökérben még a PUT+5d-kezelés esetén is kimutatható volt.

Ezzel szemben az ABA-kezelés sokkal kifejezettebb hatással volt a PA-tartalomra. Az 1 napos ABA-kezelés után a PUT-felhalmozódással (38. A ábra) párhuzamosan a SPD mennyisége csökkent a levélben és a gyökérben is (38. B ábra), és a SPM szintje is csökkent a levélben (38. C ábra). Az 5 nap kontroll körülmények közé való visszahelyezés után (ABA+5d) azonban csak a megemelkedett

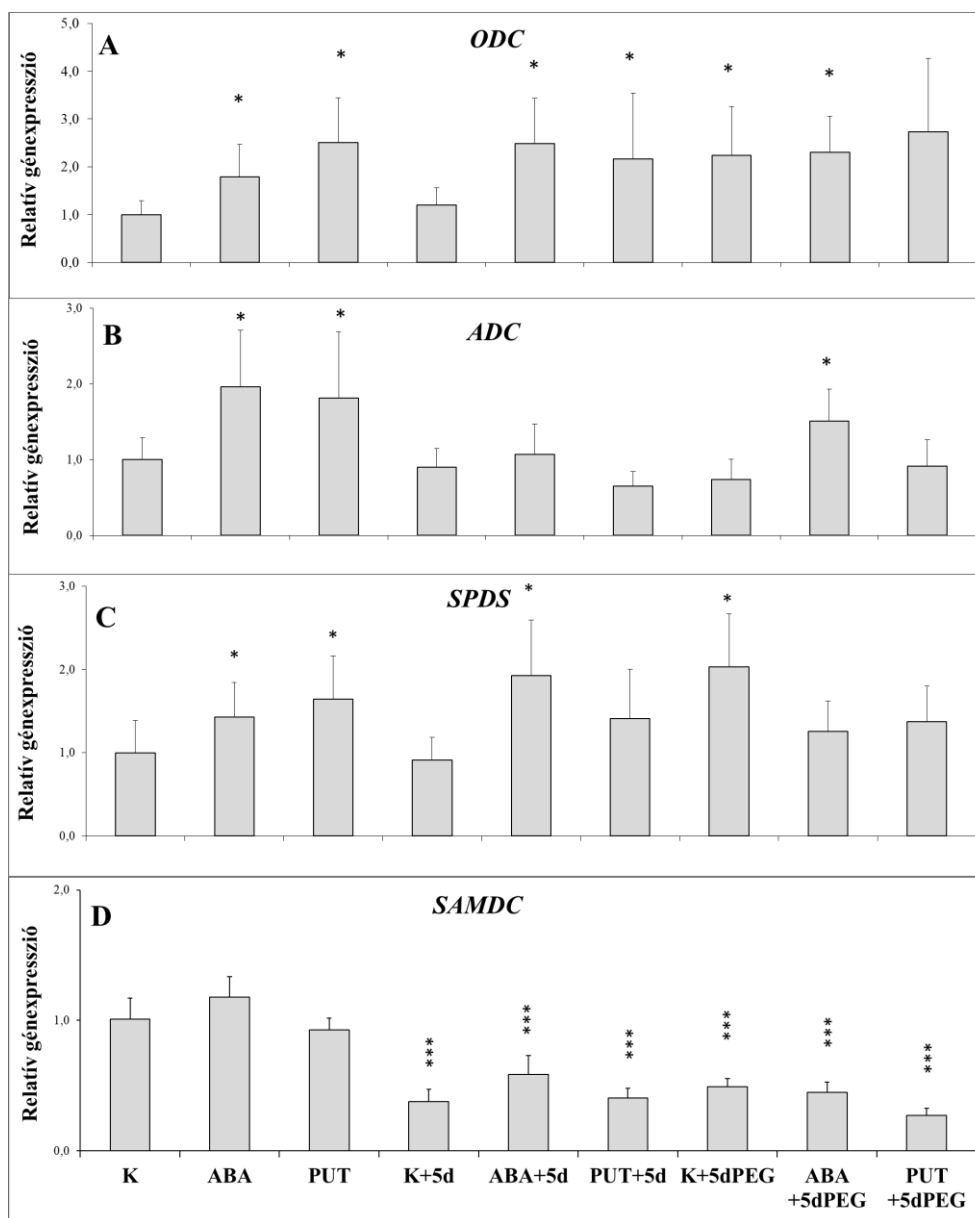
PUT- és csökkent SPM-szint volt kimutatható a búzanövények levelében az azonos napi kontrollhoz képest.



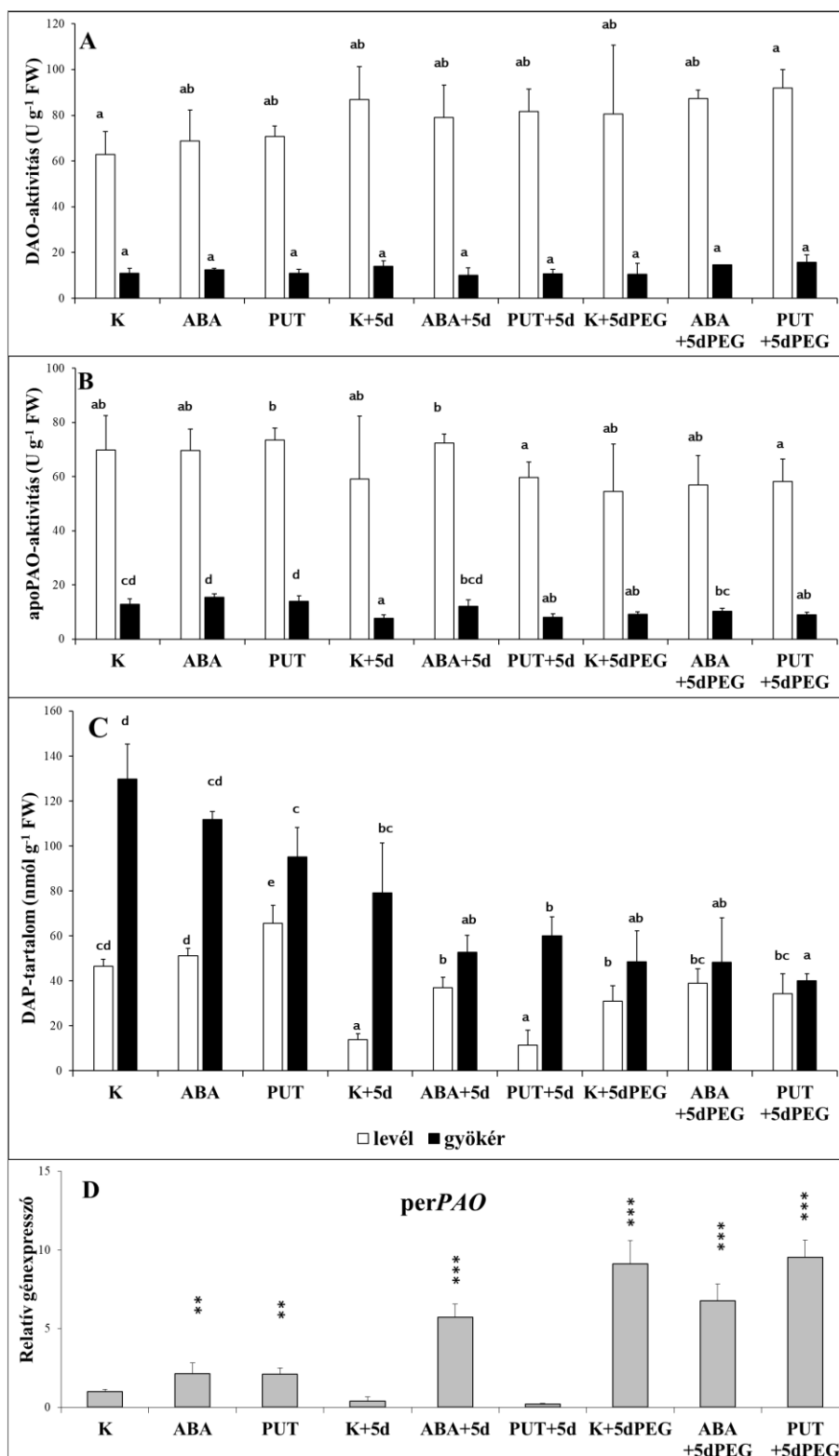
38. ábra 0,15 mM abszcizinsav (ABA), 0,5 mM putreszcín (PUT) és/vagy 15%-os PEG-kezelések hatása a poliamin-tartalomra a búzanövények levelében és gyökérében (PUT: putreszcín: A; SPD: spermidin: B; SPM: spermin: C). Az eltérő betűjelek a szignifikáns eltérést jelölik $P \leq 0,05$ szinten az azonos napi kontrollhoz képest ($n=5$).

A PEG-kezelés részben hasonló befolyással volt a PA-poolra, mint az ABA-kezelés, megemelve a levélben a PUT és a gyökérben a SPM, de csökkentve a levélben a SPD mennyiségét. A kombinált kezelések esetén (ABA+5dPEG és PUT+5dPEG) a PEG-kezeléshez hasonló változásokat tapasztaltunk (38. A-C ábra).

Az alkalmazott kezelések kismértékben befolyásolták a PA-ok szintézisében szerepet játszó géneket a búzanövények levelében (39. A-D ábra). Mindkét PUT-szintézis útvonal aktív volt valamennyi kezelés esetén (39. A-B ábra), de csak az ABA-, PUT- és ABA+5dPEG-kezelések voltak képesek megemelni az *ADC* expresszióját. Az *SPDS* és *SAMDC* gének transzkriptumainak mennyisége nem változott jelentősen a kezelések során (39. C-D ábra).



39. ábra 0,15 mM abszcizinsav- (ABA), 0,5 mM putreszcín- (PUT) és/vagy 15%-os PEG-kezelések hatása a poliamin-bioszintézis enzimek (*ODC*: ornitin dekarboxiláz: A; *ADC*: arginin dekarboxiláz: B; *SPDS*: spermidin szintáz: C; *SAMDC*: S-adenilmetionin dekarboxiláz: D) génexpressziójára a búzanövények levelében. * és ***: a szignifikáns eltérést jelölik $P \leq 0,05$ és 0,001 szinten az azonos napi kontrollhoz képest ($n=3$).



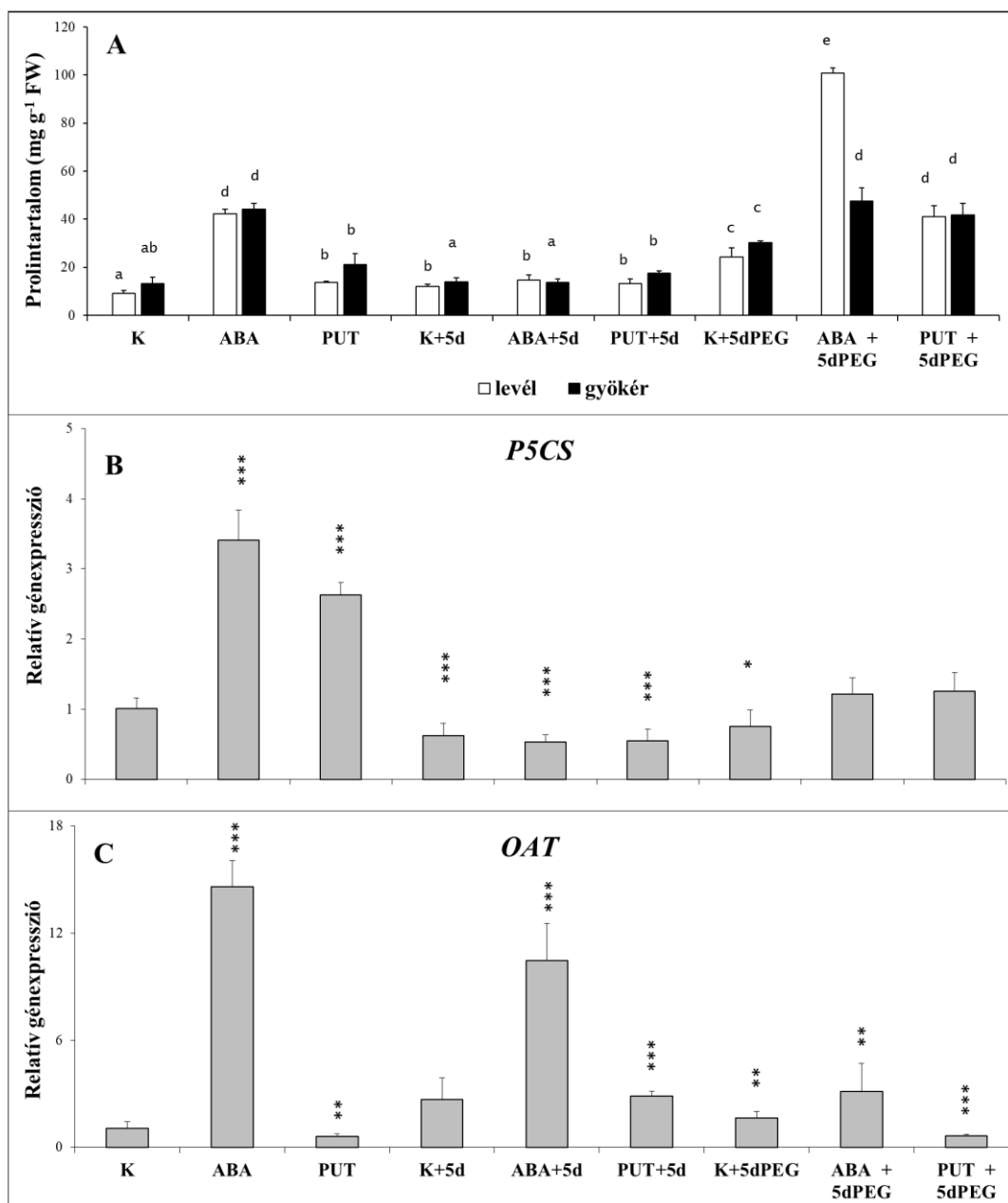
40. ábra 0,15 mM abszcizinsav- (ABA), 0,5 mM putreszcín- (PUT) és/vagy 15%-os PEG-kezelések hatása az apoplaztikus diamin- (A) és poliamin-oxidáz (B) (DAO és PAO) enzimek aktivitására, az 1,3-diaminopropán-tartalomra (DAP) a búzanövények levelében és gyökerében, valamint a peroxiszómális poliamin-oxidáz gén (*perPAO*) expressziójára levélben. A DAO- és apoPAO aktivitások esetén az eltérő betűjelek a szignifikáns eltérést jelölik $P \leq 0,05$ szinten az azonos napi kontrollhoz képest. A *perPAO* génexpresszió esetén ** és ***: a szignifikáns eltérést jelölik $P \leq 0,01$ és $0,001$ szinten az azonos napi kontrollhoz képest ($n=3$).

A PA-ok fő lebontási folyamata az apoplastban történik, a DAO és PAO enzimek katalizálta reakciókban (40. A-B ábra). Habár egyik kezelés sem volt hatással az apoplastikus DAO- és PAO-aktivitásokra, emelkedett DAP-szintet mértünk a PUT-kezelt növények levelében a kontrollhoz képest (40. C ábra). Az ABA+5d-, K+5dPEG-, ABA+5dPEG- és PUT+5dPEG-kezelések szintén megemelték a DAP szintjét a levélben. Eközben a peroxiszómális PAO - mely a PA-ciklusban a SPD/SPM→PUT visszaalakulásért felelős enzim - génexpressziója megemelkedett az ABA+5d- és valamennyi PEG-kezelés esetében (40. D ábra).

5.2.4.4. Putreszcin- és abszizinsav-kezelések hatása kontroll és ozmotikus körülmények között a prolinszintézisre

Az ABA-kezelés nagymértékű prolinfelhalmozódáshoz vezetett a búzanövények levelében és gyökerében is, míg a PUT-kezelés csak enyhe növekedést okozott a levélben (41. A ábra), de ezek a különbségek az 5 napos regenerációs időszak végére eltűntek. Bár az ozmotikus stressz hatására a prolin mennyisége a levélben és a gyökérben is megemelkedett, a kombinált kezelések esetében, összeadódó hatásként még nagyobb prolinfelhalmozódást tapasztaltunk. A legnagyobb prolintartalmat az ABA+5dPEG-kezelt növényekben mértük (41. A ábra).

A prolinszintézisben szerepet játszó enzimeket kódoló gének expressziós szintje a kezelések során eltérően változott (41. B-C ábra). A prolin szintézisét közvetlen a glutamátból katalizáló Δ^1 -pirrolin-5-karboxilát szintáz enzim (P5CS) génjének expressziója különösen az ABA- és PUT-kezelések során mutatott emelkedést, de 5 nap elteltével ez lecsengett, míg a kombinált kezelések (ABA+5dPEG és PUT+5dPEG) esetén, ahol a legnagyobb prolintartalmakat mértük csak kismértékű emelkedést tapasztaltunk (41. B ábra). Ezzel szemben a prolin ornitinből történő szintézisét katalizáló ornitin aminosztransferáz (OAT) enzimet kódoló gén transzkriptum-szintjét az ABA-kezelés olyan módon emelte meg, hogy az 5 napos regenerációs fázis után is kimutatható volt (41. C ábra). Érdekes módon a PUT+5dPEG-kezelés az OAT expresszióját csökkentette (41. C ábra).



41. ábra 0,15 mM abszcizinsav- (ABA), 0,5 mM putreszin- (PUT) és/vagy 15%-os PEG-kezelések hatása a prolintartalomra a búzanövények levelében és gyökerében, valamint a Δ^1 -pirrolin-5-karboxilát szintáz (B) és az ornitin aminotranszferáz (B) enzimeket kódoló gének (*P5CS* és *OAT*) expressziójára a levélben. A prolintartalom esetén az eltérő betűjelek a szignifikáns eltérést jelölik $P \leq 0,05$ szinten az azonos napi kontrollhoz képest. A *P5CS* és *OAT* géneexpressziója esetén * és ***: a szignifikáns eltérést jelölik $P \leq 0,05$ és 0,001 szinten az azonos napi kontrollhoz képest (n=3).

5.2.4.5. Putreszcin- és abszcizinsav-kezelések hatásának vizsgálata során kontroll és ozmotikus körülmények között mért paraméterek korrelációs elemzése

A korrelációanalízis pozitív összefüggést mutatott az ABA- és PUT-, és az ABA- és DAP-tartalom között, de negatív kapcsolatot jelzett az ABA- és SPD-, illetve SPM-tartalom között (Függelék 10. táblázat). Szintén pozitív korreláció volt az ABA-tartalom és az *ADC*, *OAT* és *SAMDC* gének expressziós szintje között. Pozitív összefüggést tapasztaltunk a SPD szintje és az apoplasztikus PAO enzim aktivitása között, míg negatív kapcsolatot mutattunk ki a SPD-tartalom és a perPAO expressziós szintje között (Függelék 10. táblázat). Jelen kísérleti körülmények között szoros negatív kapcsolatot mutattunk ki a SPM mennyisége és az *OAT*, illetve *P5CS* transzkriptum szintje között, míg negatív összefüggés állt fenn a DAP mennyisége és az *ADC*, *NCED* és *SAMDC* gének expressziós szintje között. A prolin- és SPD-tartalom valamint a perPAO gén expressziósszintje között pozitív, de a prolin és SPD között negatív kapcsolat volt kimutatható.

6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

6.1. Endogén poliamin-tartalom változása biotikus és abiotikus stresszfolyamatok során

6.1.1. Lisztharmatfertőzés vizsgálata búzanövényeken

A PA-bioszintézis korai aktiválódását búzában mind biotikus, mind abiotikus stressz körülmények során kimutatták (Romero és *mtsai.* 2018). Azonban az egyes növényfajok, illetve fajon belül is az adott genotípusok különböző válaszreakciókat mutatnak az egyes PA-szinteket illetően; egyesekben a PA-ok felhalmozódnak, míg mások állandó vagy akár csökkent endogén PA-tartalmat mutatnak kedvezőtlen körülmények között (Liu és *mtsai.* 2007). A jelen munkában mind a SPD, mind a SPM szabad és konjugált formái felhalmozódtak a négy vizsgált búzavonalban 7 nappal a lisztharmatfertőzés után. A SPD és SPM prekursora, a PUT valószínűleg felhasználódott a SPD és SPM szintézisére, amelyeket ráadásul konjugált formában is tárolt a növény. Ezeket az eredményeket a korrelációanalízis eredményei is alátámasztották. A PA-k szabad formái szignifikáns, szoros és pozitív korrelációt mutattak a konjugált formákkal. Ez egyrészt nem meglepő, hiszen a biotróf gomba kórokozók túlélésükhöz és szaporodásukhoz az élő növényi gazdasejtek tápanyagait használják fel (Glazebrook 2005). A növények és a kórokozók közötti kompatibilis kölcsönhatás során a zöld sziget-régiókban - a fertőzési helyeket körülvevő területeken, ahol a fotoszintézis indukciója és az öregedés késleltetése figyelhető meg - a gomba patogének a gazdaszervezet PA szintézisét indukálják, ahogy azt a kompatibilis az árpa és a *Puccinia hordei* Otth. (Greenland és Lewis 1984) vagy *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* esetében is kimutatták (Walters és *mtsai.* 1985; Coghlan és Walters 1990). Hasonló eredményeket találtak az árpában, ahol a szabad PUT és SPM szintjei, valamint a PUT, SPD és SPM konjugált formái felhalmozódtak a lisztharmatfertőzést követően (Cowley és Walters 2002). Az is felvetődött, hogy a SPM a legfontosabb PA a kórokozók elleni védekezésben inkompatibilis gazda-kórokozó kölcsönhatásokban (Mitsuya és *mtsai.* 2009). Vizsgálatunk során a PA-ok kezdeti és indukált szintje közötti különbségek azonban nem mutattak kapcsolatot a lisztharmat-rezisztencia mértékével. Így eredményeink arra utalnak, hogy a PA-ok felhalmozódása általános válaszreakció volt a fertőzés során. Az ellenkezőjét találták viszont, amikor a lisztharmatra rezisztens és érzékeny árpafajtákat vizsgáltak, ahol is az ellenálló fajta magasabb PUT- és SPD-szinteket halmozott fel a fertőzés során, mint a fogékony (Asthir és *mtsai.* 2004). A PA-tartalom és a rezisztencia szintje közötti összefüggéseket a zabfajtákban is megfigyelték. A rezisztens genotípus magasabb kezdeti SPD-szintet mutatott, mint az érzékeny, és szignifikáns növekedést mutatott a *Blumeria graminis* f.sp. *avenae* fertőzést követően (host interakcióban), míg *Blumeria graminis* f.sp. *horde* fertőzés során

(non-host interakció) PUT-felhalmozódást tapasztaltak az érzékeny genotípusban (Montilla-Bascón és *mtsai*. 2016).

A PA-ok nemcsak az antioxidáns rendszer komponensei, hanem képesek szabályozni az antioxidáns enzimek génexpresszióját, mint ahogy azt a peroxidáz gén SPM-indukált expressziójában kimutatták dohányban (Hiraga és *mtsai*. 2000). Kísérletünkben a lisztharmatfertőzés valamennyi antioxidáns enzim aktivitására hatással volt, és bár a négy genotípus eltérő módon reagált, továbbá a korreláció analízis pozitív, lineáris összefüggést mutatott az antioxidáns enzimaktivitások többsége között, a válaszreakció és a rezisztencia mértéke között összefüggést nem tudtunk kimutatni. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az antioxidáns enzimek aktivitásának változása a fertőzés következménye, nem pedig az ellenállás oka. Árpában a G-POD, a szuperoxid-diszmutáz, a GST, az APX és a GR enzim aktivitását jelentősen megnövelte a lisztharmatfertőzés az érzékeny növényekben, míg kevésbé jelentős patogén-indukált növekedést tapasztaltak a rezisztens genotípusban (Harrach és *mtsai*. 2008). Mivel esetünkben az SPD-tartalom szignifikáns összefüggést mutatott az összes vizsgált antioxidáns enzim aktivitásával, továbbá a GR valamennyi PA-vegyülettel korrelációt mutatott, feltételezhető, hogy a PA-k és az antioxidáns enzimek között kapcsolat van.

Bizonyított, hogy a SA-kezelés hatással van a PA-katabolizmusra (Szepesi és *mtsai*. 2011) és a tartalomra (Németh és *mtsai*. 2002), továbbá az exogén PA-ok is befolyásolják a SA-szintet (Iqbal és *mtsai*. 2006a,b). Azt is kimutatták, hogy a dohánynövényekben a TMV-fertőzést követő SPM-felhalmozódás indukálta a növényi védekezésben részt vevő két fontos MAPK aktivitását: WIPK és SIPK (Takahashi és *mtsai*. 2003). Számos bizonyíték van arra vonatkozólag is, hogy a SA-val, a jázmonsavval és a MAPK-val kapcsolatos jelátviteli utak szerepet játszanak a lisztharmat-rezisztencia kialakulásában búzában (Luo 2002). Irodalmi adatok alapján, úgy tűnik, összefüggés van az endogén SA- és PA-tartalom, valamint az antioxidáns aktivitások és a növények érzékenysége vagy rezisztenciája között különböző biotikus stresszek során (Liu és *mtsai*. 2007; Talieva és Kondrat'eva 2002). Nem világos azonban, hogy az endogén SA- és PA-tartalmak hogyan befolyásolják egymást. A jelenlegi munkánkban a korrelációanalízis a SPD- és SPM-tartalmak (szabad és konjugált formák) és a szabad SA-szint közötti szignifikáns pozitív korrelációt mutatott, míg a KAD- és PUT-tartalmak közül csak a konjugált PUT szintje korrelált a szabad SA szintjével.

Összefoglalva, bár néha szoros, pozitív korrelációt találtunk a SA- és PA-szintek között, valamint az antioxidáns enzimaktivitások között, - amelyek mindegyike fontos szerepet játszhat a védekező mechanizmusokban - nem találtunk közvetlen összefüggést ezen paraméterek változásai és a lisztharmat-rezisztencia között (Pál és *mtsai*. 2013). Ugyanakkor nem szabad elfeledkezni arról, hogy a PA-ok, a katabolizmusuk során képződő H_2O_2 révén szerepet játszanak jelátviteli folyamatokban. Továbbá, hogy a megemelkedett PA-szint hatására a fokozott DAO- és PAO-aktivitásból származó H_2O_2 képződése felelős lehet a kórokozó-támadások során a HR és/vagy a PCD szabályozásában (Cowley és Walters 2002; Moschou és Roubelakis-Angelakis 2014).

6.1.2. Alacsony hőmérséklet hatásainak vizsgálata búza-, zab- és árpanövényekben

A hidegkezelés hatása számos növényi hormonra és stresszvédő vegyületre, mint a flavonoidok vagy a PA-ok, továbbá az antioxidáns aktivitásokra és a lipidösszetételre a hideg-akklimatizációs időszak alatt, már jól ismert. Ezen túlmenően, e vegyületek és a hidegtolerancia közötti összefüggést is tanulmányozták különböző növényekben (Szalai és mtsai. 2001; Zhang és mtsai. 2009; Gould és Lister 2006; Nägele és mtsai. 2011; Kosová és mtsai. 2012; Pál és mtsai. 2013). A nagyobb endogén PUT- vagy SPD-mennyiséget felhalmozó transzgénikus növények fokozott rezisztenciát mutattak több környezeti stressz-szel szemben (Kasukabe és mtsai. 2004; Wang és mtsai. 2011), azonban a korreláció nem minden esetben egyértelmű. Szoros kapcsolatot mutattak ki a fagytolerancia és a szabad SPM mennyisége között *Thellungiella* növényekben, míg a rokon *Arabidopsis* vonalakban nem (Lee és mtsai. 2012). A PA-ok, különösen az SPD és a hidegtűrés közötti szoros összefüggésről számoltak be babban (Guye és mtsai. 1986) és a rizsben (Lee és mtsai. 1997). Hasonlóképpen, a PUT és a SPD mennyisége a vad típusú paradicsomnövények hideg kezelésénél nőtt; míg az ABA-hiányos paradicsomnövényekben csak a PUT-szint emelkedett meg (Kim és mtsai. 2002). Jelen kísérletben a kezdeti PUT-tartalom alacsony volt a búzafajtákban, de mennyiségük megemelkedett alacsony hőmérsékleti kezelést követően, különösen az őszi fajtákban, míg a zab és árpa genotípusok esetében, amelyek eleve magasabb PUT-tartalommal voltak jellemezhetők, a hidegkezelés viszonylag kisebb további felhalmozódást váltott ki. Az a tény, hogy az alacsony hőmérsékletre érzékeny növényekben, mint pl. a kukorica, a hidegkezelés PUT-felhalmozódást eredményezhet (Németh és mtsai. 2002), azt sugallja, hogy a PUT mennyisége nem áll közvetlen kapcsolatban a hidegtűréssel, hanem az általános alkalmazkodási folyamat része. Vizsgálatunk során a búza- és zabnövények hasonló kezdeti SPD-szinttel rendelkeztek, de a búza- és árpanövényekben nagyobb hideg-indukálta felhalmozódást észleltünk, függetlenül a vetéstípustól. A hidegkezelés nem befolyásolta az SPM-szintet sem a tavaszi, sem az őszi árpanövényekben. Ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy a PA-tartalom hidegkezelés során bekövetkező változásai nagyobb összefüggést mutattak a genetikai háttérrel, mint a növények vetéstípusával és így a hidegtűréssel.

A PUT szerepét a hideg akklimatizáció folyamatában, legalább is részben az ABA bioszintézisének szabályozása révén játsza *Arabidopsis*-ban (Cuevas és mtsai. 2008). Az ABA-függő jelátvitel és transzkripció szabályozás szükséges, de nem elegendő a sikeres hideg-akklimatizációhoz, mivel nem minden alacsony hőmérséklet-indukálta gén ABA-függő (Theocharis és mtsai. 2012; Li és mtsai. 2014). Ugyanakkor a SPD- és SPM-szintézisben részt vevő gének mind abiotikus stressz, mind ABA-kezelés által aktiválódnak (Jiménez-Bremont és mtsai. 2007). Kísérleteinkben hasonló kezdeti ABA-szintet mértünk a búzanövényekben és az őszi árpában, és ennek mennyisége a két tavaszi zabfajta kivételével hidegkezelést követően megemelkedett. Bár a

tavaszi árpának volt a legalacsonyabb a kezdeti ABA-tartalma, mégis a legnagyobb hideg-indukálta felhalmozódást mutatta. A korrelációanalízis pozitív összefüggést mutatott ki az ABA- és a SPD-tartalom között hideg körülmények között. Ez összefüggésben van azzal, hogy a PUT-tartalom minden genotípus esetében megemelkedett, de a SPD-tartalom csak azokban a genotípusokban mutatott figyelemre méltó növekedést, amelyekben az ABA-szint is emelkedett a hidegkezelés után.

A SA és rokon vegyületeinek szerepe a hidegakklimatizációs folyamatokban ismert (Sasheva és mtsai. 2013). Emellett a SA és az ABA közötti kapcsolatot is tanulmányoztuk alacsony hőmérsékleti stressz során (Pál és mtsai. 2011). Kísérletünkben a hidegkezelés megnövelte a kötött SA-tartalmat az alacsonyabb kezdeti SA-szinttel jellemezhető genotípusok esetében (őszi búza: Mv Hombár, Mv 8, tavaszi búza: TC33, tavaszi zab: Mv Pehely és tavaszi árpa: Jubilant), míg a kötött oHCA-szint valamennyi genotípusban megemelkedett, különösen a búzanövényekben, függetlenül a vetéstípustól. Mivel az oHCA antioxidáns tulajdonságokkal rendelkezik (Foley és mtsai. 1999), antioxidáns szerepet játszhat a hidegstressz során is. A SA és a flavonoidok szintézise is a fenilpropanoid útvonalból indul ki, ráadásul a SA-kezelés befolyásolja a flavonoidok szintézisét (Gondor és mtsai. 2016a). A flavonoidok feltételezett élettani funkciói közé tartozik a ROS méregtelenítése, valamint hideg körülmények között mint szénraktár játszanak szerepet, és közvetlen hatással vannak a membránstabilitásra (Korn és mtsai. 2008). Bár ismert, hogy a PA-ok fenolos vegyületekkel képesek konjugálódni, és ezzel növelni azok antioxidáns kapacitását (Velikova és mtsai. 2007), továbbá, hogy a PA-kezelés megemelte a flavonoid-tartalmat mind kontroll körülmények között (Ali és mtsai. 2009), mind sóstressz során (Ghosh és mtsai. 2012), a PA-okkal való kapcsolatukat még nem vizsgálták alaposan. A kísérletünkben a SPD- és a ABA-tartalom pozitív korrelációt mutatott a flavonoidok mennyiségével hidegkezelés után. Ez összhangban van azzal, hogy a PA- és az ABA-kezelések növelték a PAL aktivitását, amely a fenolos vegyületek szintézisének egyik legfontosabb enzime (Hao és mtsai. 2012). Jelen körülmények között a flavonoidok többsége pozitívan korrelált a hideg-indukálta kötött oHCA-szinttel és APX aktivitással. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az alacsony hőmérséklet nem specifikusan indukált bizonyos flavonoid formákat, hanem az egész fenolos szintézisút aktiválódott, a redox szabályozási rendszer részeként.

Az alacsony hőmérsékletnek való kitettség növeli a ROS mennyiségét nemcsak hidegre érzékeny, hanem a toleráns növényekben is. Fagytűrő és fagyérzékeny gabonafélék összehasonlítása során azt tapasztalták, hogy a fagytűrés szoros összefüggést mutatott az G-POD és az APX enzimek aktivitásaival, de csak az edzésnek kitett levelekben (Janda és mtsai. 2003). Jelen kísérletben az árpafajták viszonylag alacsony kezdeti GR-, GST- és KAT-, tavaszi zabnövények pedig nagyon alacsony G-POD-aktivitással voltak jellemezhetőek. A G-POD aktivitása nem változott szignifikánsan az őszi búza és a őszi árpa fajtákban, de csökkent a tavaszi búza és a tavaszi árpa genotípusokban hidegkezelés hatására. Pozitív korrelációt mutattunk ki a PUT/ SPD és a GR, a SPD és az APX, valamint a SPM és a GR, a KAT és az APX között, alacsony hőmérsékleti körülmények között. A

hidegkezelés előidézte egy másik PA, a KAD szintézisét is, mely a PUT-SPD-SPM útvonaltól függetlenül szintetizálódik, és azt feltételezik, hogy szabad gyökfogó tulajdonsággal rendelkezik (Szalai és *mtsai*. 2009). A PA-ok magasabb szintje pozitív korrelációt mutatott az indukálódott antioxidánsokkal, így a feltételezhető, hogy a PA-felhalmozódás képes optimalizálni az anyagcsere folyamatok arányát, és ezáltal biztosítani a növény növekedését és túlélését stressz körülmények között.

A gabonafélék hidegedzése változásokat indukál a PG lipidfrakcióban, ami hozzájárul a fehérjékből és pigmentekből álló tilakoid membránrendszer megfelelő szerveződésének fenntartásához, pl. a D1 fehérje optimális konformációjának megőrzéséhez, a fotokémiai komplexumok stabilizálásához és a hatékony lineáris elektrontranszport elősegítéséhez (Kruse és *mtsai*. 2000). A gabonafélékben kimutatták, hogy a PG *t16:1* tartalmának megváltoztatására irányuló képesség közvetlen kapcsolatban van a fagytoleranciával (Huner és *mtsai*. 1989; Szalai és *mtsai*. 2001). Vizsgálataink során a *t16:1* és a SPD, az ABA, az APX, a G-POD és a rutin között szoros, negatív kapcsolat volt kimutatható. A *t16:1* és az APX/G-POD közötti erős negatív korreláció összhangban van a gabonafélékben a fagyűrőssel összefüggésbe hozott, hidegedzés során tapasztalt *t16:1* csökkenés (Szalai és *mtsai*. 2001), illetve APX- és G-POD-aktivitás növekedés szerepével (Janda és *mtsai*. 2003). Mivel a PG *t16:1* tartalmának hidegindukálta csökkenését általában nem tapasztalták különféle hidegtoleráns kétszikű fajokban (Huner és *mtsai*. 1989), és hasonló változásokat mutattunk ki a hidegérzékeny kukorica-növényekben kadmiumkezelést követően (Pál és *mtsai*. 2007), úgy tűnik, hogy ez nem egy fő tényező a fagytolerancia kialakításában, hanem az általános stresszválasz része. Azt is meg kell azonban említeni, hogy az SPD- és SPM-tartalom szignifikáns, pozitív korrelációt mutatott hidegkezelést követően a PG lipidfrakció DBI-vel, ami arra utal, hogy a PA-ok lehetséges szabályozó szerepet játszanak a lipid-anyagcserében.

Összefoglalva, a különböző gabonafajokban a hidegre indukálódó vegyületek mintázatában szignifikáns eltéréseket találtunk. A legjelentősebb különbségeket a tavaszi zabfajták mutatták, a többi gabona genotípushoz képest. Ezek pedig a SPD felhalmozódásának és a *t16:1*-tartalom csökkentésének hiányában, a kisebb kezdeti és a hidegre nem indukálható ABA-tartalomban és G-POD-aktivásban mutatkoztak meg. A SPD, flavonoidokkal, ABA-val, *t16:1*-tal és APX-zal kimutatott szoros kapcsolata azt mutatja, hogy a SPD döntő szerepet játszhat a gabonafélék hideg akklimatizációs jelátviteli folyamataiban (Gondor és *mtsai*. 2016c).

6.1.3. Kadmiumkezelés vizsgálata búzanövényekben

A Cd-indukálta oxidatív stressz számos védővegyület szintézisét aktiválja, beleértve a PC-okat, a SA-at, az AA-ot, és hatással van az antioxidáns enzimek aktivitására is (Pál és *mtsai*. 2005; Zhao 2011). A különböző Cd-toleranciájú indiai mustárfajtákban kimutatták, hogy a magasabb

toleranciaszint az antioxidáns rendszer jobb összehangoltságának köszönhető (Gill és *mtsai.* 2011). Bár hasonló kezdeti antioxidáns enzimaktivitást mutattak az uborka toleráns és érzékeny sejtvonalai, a Cd-stressz különböző változásokat indukált (Gzyl és *mtsai.* 2009). A nehézfémstressz az antioxidáns védelmi rendszer nem-enzimikus elemeit is aktiválja, pl. az AA és GSH szintézisét (Shan és *mtsai.* 2012). A növényi stressztolerancia összefüggését az AA-szinttel mind biotikus, mind abiotikus stresszek során bizonyították (Zhang 2013). Számos növényfajban kimutatták a GSH - az aszkorbát-glutation-ciklus másik fontos összetevőjének - és prekursorainak mennyiségi változásait (Gill és Tuteja 2011), illetve megemelkedett szintjük védőszerepét is nehézfémstressz során (Pál és *mtsai.* 2006); Zagorchev és *mtsai.* 2013). A GSH-nak, kiindulási vegyületként szerepe van a PC-szintézisben is, mely utóbbi nehézfémkötő peptidek felhalmozódása Cd stress során régóta tanulmányozott (Stolt és *mtsai.* 2003).

Az általunk vizsgált 4 búzafajtát eltérő kezdeti SA-szintjük alapján választottuk, azonban sem a kezdeti, sem a Cd-indukálta SA-felhalmozódás nem volt összefüggésbe hozható a Cd-tolerancia mértékével (Kovács és *mtsai.* 2014a). Ellenben, a legnagyobb összes AA-tartalmat a legtoleránsabb (Mv Hombár) és a legalacsonyabbat pedig a legérzékenyebb genotípusban detektáltuk (TC33). A Cd-kezelés valamennyi búzafajta gyökerében megnövelte az AA-szintet, de az Mv Hombár gyökereiben az AA/DHA arány is enyhén megemelkedett. A Cd kis mértékben befolyásolta csak a levél AA-tartalmát, de csökkentette az AA/DHA arányt a TC-vonalak és az Mv 8 leveleiben, jelezve ezzel, hogy a Cd oxidatív stresszt indukált ezekben a genotípusokban. A gyökér GSH-tartalom növekedésével párhuzamosan megfigyeltük a gyökérben a GR enzim indukcióját is (Kovács és *mtsai.* 2014a), amely összefügghet az Mv 8 és az Mv Hombár gyökerében tapasztalt megemelkedett GSH/GSSG aránnyal. A magas GSH/GSSG arányt a GR támogatja, és a stressztűrő genotípusokban ez az arány általában magasabb, mint az érzékenyekben (Kocsy és *mtsai.* 2004). Így a négy vizsgált búza genotípus GR aktivitása, GSH tartalma és GSH/GSSG aránya összefüggésben állt a Cd-tolerancia mértékével.

Cd-kezelés serkentette a PC-szintézist durum búza gyökerében, a legnagyobb felhalmozódást a PC₃-ban okozva, míg a levélben nem okozott változást (Paradiso és *mtsai.* 2008). Korábban kukoricában is azt találtuk, hogy a Cd növelte a PC₂-szintet a gyökerekben, de nem befolyásolta azt a levelekben (Pál és *mtsai.* 2006). Az alábbi kísérletben a Cd-kezelés csak az Mv Hombár és Mv 8 genotípusok gyökerében növelte a PC₂- és PC₃-szinteket, és enyhe emelkedést tapasztaltunk az Mv Hombár levelében. Az Mv Hombár és az Mv 8 gyökerében, valamint az Mv Hombár leveleiben megnövekedett a PCS aktivitása is a Cd-kezelést követően.

A nehézfém-méregtelenítésben azonban nem csak tiolos eredetű vegyületek, mint a GSH vagy PC-oknak van szerepük, hanem nem-tiolos eredetű vegyületeknek is, pl. PA-ok (Anjum és *mtsai.* 2015). Számos tanulmány számolt be a PA-ok megnövekedett szintjéről nehézfémstressz során (Kuthanová és *mtsai.* 2004; Groppa és *mtsai.* 2007). Azonban csak alig áll rendelkezésre információ

a PA-ok és a PC-ok közötti kapcsolatról nehézfémstressz körülmények között. Pedig ennek feltárása már csak azért is érdekes, mert a magasabbrendű PA-ok (SPD és SPM) szintézise és a GSH/PC-ok szintézise közös prekursoruk miatt antagonisztikus kapcsolatban lehet. A jelen kísérleti beállításban a Cd-kezelés a PA-ok közül csak a PUT-tartalmat befolyásolta, nevezetesen valamennyi genotípus esetén megemelte, mind a levélben, mind a gyökérben. Ennek megfelelően a levélben pozitív összefüggést mutatott a PUT-tartalom a γ -EC-tartalommal és PCS-aktivitással, míg a gyökérben a γ -EC-, a PC₂-, a PC₃- és az AA-tartalommal, valamint a PCS-aktivitással. Ellenben a levél SPM szintje negatív korrelációban volt a γ -EC, az AA mennyiségével és a PCS-aktivitással, a gyökér SPD-tartalom pedig γ -EC mennyiségével.

Összefoglalva, a Cd-tolerancia eltérő mértéke a búzanövények gyökeriben tapasztalt különbségekkel magyarázható, azaz a PC-szintézis különböző mértékű indukciójával, amely a GSH tartalom változásaihoz kapcsolódott, és összefüggésben volt a GSH redox állapotával és a GR aktivitással (Kovács és mtsai. 2014a). Ugyanakkor bár a γ -EC mennyisége a gyökérben valamennyi genotípus esetében, a GSH/PC-ok mennyisége már csak a toleránsabb genotípusokban emelkedett meg a Cd-kezelést követően, továbbá a γ -EC mennyisége a magasabbrendű PA-okkal negatív korrelációt mutatott. Mindezen eredményekből úgy tűnik, hogy habár a PC-ok szintéziséhez szükséges a SPD/SPM-felhalmozódás hiánya, de a γ -EC szintézisét követő lépések szabályozásában már más, a PA-ok szintézisétől független folyamatok is részt vehetnek. A szabad és kötött SA pozitív korreláció mutatott a PCS-aktivitással, mind a levélben, mind a gyökérben. Ez összhangban más eredményekkel, mint pl. hogy SA-as magáztatás csökkentette a Cd-kezelés-indukálta oxidatív stresszt, és módosította a PC-ok mennyiségét és azok arányát kukoricában (Szalai és mtsai. 2013; Gondor és mtsai. 2016b), valamint, hogy krómstressz során a SA-kezelés hatására megemelkedett a tiol- és PC-tartalom, a PCS transzkripciós szintjével párhuzamosan rizsben (Huda és mtsai. 2016). Mindazonáltal kísérletünkben a SA-tartalom, szabad és kötött formájában pozitív korrelációs kapcsolatban állt a PUT, míg negatív kapcsolatban volt a SPM-tartalommal a levélben.

6.1.4. UV-B sugárzás módosító hatása ozmotikus és kadmiumstressz során búzanövényekben

Számos növényfaj esetében kimutatták az UV-B sugárzás közvetlen és közvetett hatásait a növényi növekedésre és metabolizmusra (Zlatev és mtsai. 2012). Az UV-B-stressz más stressztényezőkkel való kölcsönhatásának vizsgálata segíthet megérteni a növények alkalmazkodó mechanizmusait a változó környezeti állapotokhoz. Ezen kísérlet a fő cél az volt, hogy megvizsgáljuk, milyen hatással van a folyamatos, kiegészítő UV-B sugárzás, növeli-e vagy csökkenti a Cd vagy PEG-indukálta ozmotikus stressz hatását, valamint, hogy feltárjuk a PA- és SA-tartalom változásainak feltételezett szerepét ezen folyamatok során.

A járulékos UV-B sugárzásnak kitett növényeknél a növekedés késleltetését figyeltük meg, és míg a Cd-stressz-indukálta oxidatív stresszt fokozta, addig érdekes módon enyhítette a PEG-kezelés által kiváltott hervadást. Ezen eredmények azt mutatták, hogy a Cd-, PEG- és UV-B-kezelés önmagában is károsodást okozhat, de a hatásmechanizmusuk eltér (Kovács és *mtsai*. 2014b).

Az előző fejezetben már leírtakhoz hasonlóan a SA ebben a kísérletben is felhalmozódott a Cd-kezelés során. A levélben és a gyökérben a teljes SA-tartalom változása hasonló mintázatot mutatott, és megállapítható, hogy a Cd nagyobb hatást gyakorolt SA-szintre, mint a PEG vagy az UV-B sugárzás önmagában; továbbá az UV-B fény nem tudta tovább fokozni a Cd-indukált SA-felhalmozódást. Ugyanakkor az UV-B sugárzás hatékonyabban emelte a SA-tartalmat, mint a PEG-kezelés, és a kombinált kezelés is hasonló értékű SA-szintet eredményezett, mint az UV-B-stressz magában. Bár az endogén SA-felhalmozódást szárazságstressz során több alkalommal is kimutatták (Bandurska és Stroiński 2005; Abreu és Munné-Bosch 2008), a jelen kísérleti körülmények között a PEG-kezelés nem indukálta a SA-felhalmozódást, de az UV-B sugárzással együtt szignifikáns növekedést eredményezett. Hasonlóan, árpában a SA-tartalom növekedését mutatták ki, amikor a szárazságstresszt UV-B kezelés előzte meg (Bandurska és Cieślak 2013). A megnövekedett SA-tartalom felelős lehet az UV-B hervadást enyhítő hatásáért a PEG-kezelés során, ahogy a megemelkedett endogén SA-szint esetében kimutatták, hogy ROS-felhalmozódást kiváltva serkenti a sztómazáródást (Melotto és *mtsai*. 2006). Ez a megfigyelés összhangban van egy későbbi tanulmánnyal is, ahol kimutatták, hogy a *SIZ1* gén hiánya, amely egy *Arabidopsis* SUMO E3 ligázot kódol, növelte a sztómazáródást és fokozta a szárazságtűrést az SA-indukált ROS-felhalmozódás révén (Miura és *mtsai*. 2013). Mivel a sztómazáródás szabályozásának fontos szerepe van a vízvesztés elkerülésében, az UV-B-stressz által kiváltott SA-felhalmozódás pozitív hatást gyakorolhat a PEG-kezelt növényekre. Viszont, bár az exogén SA védőhatását a nehézfémstressz során bizonyították kukoricában (Krantev és *mtsai*. 2008) és borsóban (Popova és *mtsai*. 2009), maga a SA-kezelés is oxidatív stresszt válthat ki a gyökérrendszerben (Pál és *mtsai*. 2002).

A SA-tartalomban észlelt változások szoros, pozitív korrelációs kapcsolatban álltak a levél PUT-szintjében, illetve a gyökér KAD-szintjében bekövetkező változásokkal. A legnagyobb mértékű PA-felhalmozódás a gyökérben volt tapasztalható a kombinált UV-B+Cd kezelés során, mind a KAD, mind a SPD esetében. Ez egyrészt jelzi újra, a KAD, mint antioxidáns szerepét (Szalai és *mtsai*. 2009), másrészt a felveti a túlzott mértékű magasabbrendű PA-felhalmozódás nem feltétlenül kedvező hatását, akár a metabolizmusuk révén felhalmozódó H_2O_2 , akár a szintézisükből adódóan a PC-okkal való antagonisztikus kapcsolatuk miatt. Ugyanakkor, az UV-B+PEG kezelés esetén a nagyobb SPM-felhalmozódásnak a levélben, illetve PUT- és SPM-szinteknek a gyökérben - a PEG-kezelt növényekben mérthez képest – szerepük lehet a sztómazáródás serkentésében. Lóbab és szőlőnövényekben bizonyított, hogy a DAO- és PAO-aktivitásnak, H_2O_2 termelő reakcióként szerepe van az ABA-indukált sztómazáródásban (An és *mtsai*. 2008; Paschalidis és *mtsai*. 2010).

Összefoglalva, az UV-B sugárzás pozitív vagy negatív hatást gyakorolhat ugyanolyan feltételek mellett a búzában, attól függően, hogy milyen típusú másodlagos abiotikus stressztényezőt alkalmaztunk. A megfigyelt kedvező vagy káros hatások pedig kapcsolatban voltak a SA- és PA-tartalomban megfigyelt változásokkal (Kovács és *mtsai*. 2014b).

6.1.5. Alacsony hőmérséklet és PEG-indukálta ozmotikus stressz hatása rizsnövényekben

Mivel az eddig bemutatott eredmények alapján a SA- és PA-tartalom között szoros korrelációs kapcsolat áll fent, és az eddigiekben tanulmányozott gabonanövényekhez képest a rizsnövényeket sokkal nagyobb SA-tartalom jellemzi, vizsgálatainkat különböző szárazságtoleranciájú rizs genotípusokon folytattuk.

Ismert, hogy az SA szerepet játszhat a rizs redox egyensúlyának fenntartásában, és megvédi a növényeket az oxidatív károsodástól (Yang és *mtsai*. 2004); azonban a magas SA-szint szerepe és hatásmechanizmusának pontos részletei még nem egyértelműek. Jelen munkánk során, bár mind a 10 °C-os alacsony hőmérsékleti kezelés, mind a PEG-indukálta ozmotikus stressz kimutatható fiziológiai stresszválaszokat indukált a rizsnövényekben (Pál és *mtsai*. 2014), a levélben lévő SA-tartalmat nem befolyásolta jelentősen egyik alkalmazott stresszfaktor sem. Meg kell említeni azt is, hogy alacsonyabb hőmérsékleti kezelés során (5 °C), enyhe SA-szint növekedést mutattak ki, különösen a konjugált formában, ugyanakkor az exogén SA előkezelés csökkentette a hidegtoleranciát rizsnövényekben (Wang és *mtsai*. 2009).

Számos, különböző növényfaj esetében PA-felhalmozódást mutattak ki olyan környezeti stressztényezőkre, mint pl. a szárazság vagy alacsony hőmérséklet (Alcázar és *mtsai*. 2010). Sőt, rizsnövényekben összefüggést találtak a PUT-, SPD- és SPM-felhalmozódás mértéke és a szárazságtolerancia között (Yang és *mtsai*. 2007), valamint a megemelkedett PA-szintézis transzgenikus rizsben növelte a szárazság-toleranciát (Capell és *mtsai*. 2004). A SPM levélfelületre permetezve hatékony kezelésnek bizonyult a szárazságtűrés növelésére (Farooq és *mtsai*. 2010), míg egy másik vizsgálatban a nagyobb mennyiségű SPM-felhalmozódás (és nem PUT vagy SPD) korrelált a hidegtűréssel szintén rizsben (Bodapati és *mtsai*. 2005). A jelen kísérletünkben a PA-szintek, azaz a PUT-, a SPD- és a SPM-szintek csak kis mértékben különböztek a vizsgált genotípusokban, és amíg a szárazság főként az SPM-szinteket indukálta, addig az alacsony hőmérséklet a PUT szintjét jelentősen, a SPD szintjét pedig kismértékben, de statisztikailag szignifikáns módon növelte, a SPM szintjét pedig csökkentette valamennyi genotípus esetén. Ezek az eredmények alátámasztják azt a korábbi elméletet, hogy a szárazság- és a hidegstressz hatásai a PA-bioszintézisre egymástól elkülönülnek (Alcázar és *mtsai*. 2006). Szárazság-, hideg- és sóstressz valamint ABA-kezelés összehasonlítása során rizsben azt tapasztalták, hogy a szárazság, ABA- és sókezelés indukálta

génexpressziós mintázat sokkal jobban hasonlít egymásra, mint a hideg- és ABA-kezelés, vagy a hideg- és sókezelés során tapasztalt transzkriptum mintázat (Rabbani és *mtsai*. 2003).

Összefoglalva, eredményeink azt mutatták, hogy bár a szárazságérzékeny genotípusok rendszerint enyhén nagyobb SA-szinttel rendelkeztek, mint a toleránsak, a SA-tartalom (sem a teljes, sem a szabad, sem a kötött szint) és a szárazság-tolerancia mértéke között nem volt szoros összefüggés. Az egyedi PA-szintek stressz-specikusan változtak a hideg- és szárazságstressz során, de a vártakkal ellentétben a PA-tartalom sem korrelált a stressztolerancia mértékével, és a PA-ok mennyiségi változásai nem mutatott összefüggést a SA-tartalommal sem (Pál és *mtsai*. 2014).

6.2. Poliamin-kezelések hatása kontroll és abiotikus stressz körülmények között

Az előzőekben az endogén PA-tartalom változásait vizsgáltuk különböző stresszhatások során, és kerestük az összefüggést a PA-szint és a stressztolerancia között. A következőkben a megemelkedett endogén PA-készlet hatásait igyekeztünk feltárni. Az endogén PA-szint kétféle módon növelhető, a növények felveszik a külsőleg adagolt PA-okat, vagy transzgenikus növényekben, a PA-szintézisben részt vevő gének nagyobb mértékű expressziós szintje miatt több PA szintetizálódik. Az alábbi kísérletekben az előbbi megoldást választottuk.

6.2.1. Poliamin-kezelések hatása búza- és kukoricanövényekben

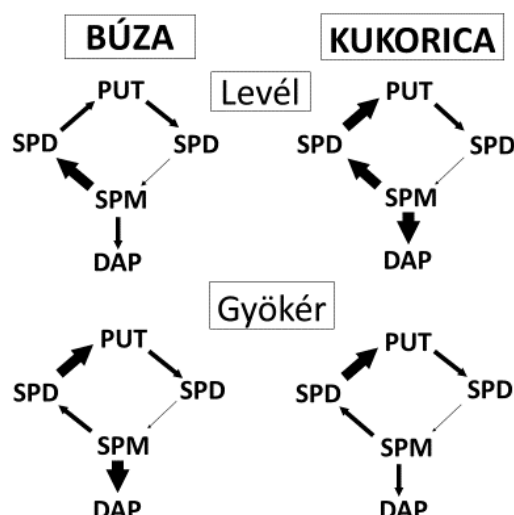
Számos tanulmány bizonyítja a PA-ok kedvező hatását különböző stressztényezőkkel szemben, pl. a kationkoncentráció, az antioxidánsok, a citrátszekréció, a fitohormonok és egyéb stresszválaszban szerepet játszó folyamatok szabályozása révén (Minocha és *mtsai*. 2014; Li és *mtsai*. 2014). Ez a védőhatás azonban eltérő lehet a növényfajok, az egyes PA-vegyületek vagy azok koncentrációjának függvényében. Eddig csak néhány tanulmány foglalkozott a PA-ok lehetséges káros hatásával. Lehet-e azt mondani, hogy minél több a PA, annál jobb a növénynek? A kérdés tisztázása érdekében a jelen munka a PA-kezelések hatásainak hátterét vizsgálta a PA-pool változásainak tanulmányozásán keresztül kukorica- és búzanövényekben.

Az első kísérletben olyan PUT, SPD és SPM koncentrációkat alkalmaztuk a tápoldathoz adagolva, amelyekről korábban kimutatták, hogy hatásosak különböző stresszfaktorokkal szemben (Lakra és *mtsai*. 2006; Cuevas és *mtsai*. 2008; Pandolfi és *mtsai*. 2010; Gupta és *mtsai*. 2012; Mandal és *mtsai*. 2013; Kotakis és *mtsai*. 2014). Míg az exogén PUT nem mutatott negatív hatást sem a búza, sem a kukoricanövényekben, a SPD és különösen a SPM koncentrációfüggő negatív hatásai növekedésgátlásban és oxidatív stresszben nyilvánultak meg. Az eredmények azt is megmutatták, hogy a kukoricanövények érzékenyebben reagáltak a magasabbrendű PA-okra, mint a búza. A SPD-

kezelés *Arabidopsis*-ban (Tassoni és *mtsai*. 2000) és kukoricában gyökérnövekedés-gátlást és növénymorfológiai változásokat eredményezett, és utóbbiban PCD-t indukált (Tisi és *mtsai*. 2011). A PA-metabolizmus citotoxikus termékeinek valóban szerepe van a PCD kaszkádban (Moschou és *mtsai*. 2008). Ugyanakkor arról is beszámoltak, hogy a zab ADC-t túlexpresszáló transzgenikus búzánövények, habár magasabb PA-szintet mutattak (különösen a PUT esetén, mely körülbelül 300-400 nmol g⁻¹ FW értékre emelkedett), fenotípusos elváltozást nem mutattak, és termékenyek maradtak. Ez utóbbi kísérletben mért PA-tartalmak és a felhalmozódás sebessége pedig hasonló volt a jelen kísérletünkben búza- és a kukoricanövények esetében a PA-kezelést követően tapasztalt értékekhez.

Az alábbi kísérleti beállításban a PA-kezelések mind a búza-, mind a kukoricanövényekben PA-felhalmozódáshoz vezettek. A növények számos különböző mechanizmust alkalmazhatnak az endogén PA-szintek szabályozására, beleértve a gyökerekből a hajtásokba való transzlokációt, a kis molekulákhoz való konjugációt, vagy a magasabbrendű PA-ok PUT-né való visszaalakítását a PA-ciklusban (Kubiś és *mtsai*. 2014; Pál és *mtsai*. 2015). Valamennyi PA-kezelés mind a búza-, mind a kukoricanövényekben kifejezett PUT-felhalmozódást okozott, különösen a gyökerekben, ami a SPM-SPD-PUT visszaalakulás meglétét jelezte. Ugyanakkor az exogén PUT vagy SPD alkalmazása a magasabbrendű PA-ok (SPD vagy SPM) felhalmozódását is indukálta, ami arra utal, hogy a PUT és a SPD felvételük után felhasználnak a SPD/SPM-né történő további szintézishez. Azonban találtunk néhány különbséget a két növényfaj között (42. ábra).

Amíg a búzagyökér által felvett PUT transzportálódott a levélbe is, és tovább metabolizálódott, addig a kukorica esetében inkább a gyökérben maradt, és csak kis mennyiségű SPD-akkumulációt találtunk. A SPD-kezelés esetében az endogén SPD-szint megemelkedett a búza gyökereiben, ami a hajtásba való transzlokációt, a PUT-né való visszalakulást, a SPM-né való továbbalakulást, és - bár kevésbé intenzíven, mint a kukorica esetében - a melléktermékként DAP-ot képező oxidációjának lehetőségét megerősítve. A kukorica gyökerében a felvett SPD PUT-né alakult vissza vagy SPM-né szintetizálódott tovább már a legalacsonyabb (0,1 mM) alkalmazott koncentráció esetén is, de a levelekben csak a PUT és a DAP szintje emelkedett meg. A két növényfaj között a legérdekesebb különbséget a SPM-kezelést követően tapasztaltuk. A búza gyökerei felvették a SPM-t, és a hajtás leveleiben is megjelent, de ezt PUT- és SPD-felhalmozódás is kísérte, főleg a gyökerekben, a PA-ciklus visszalakulási oldalának aktivitását mutatva. Emellett a SPM oxidálódott is, mivel nagy mennyiségű DAP volt kimutatható. A kukorica által felvett SPM nem eredményezett magas endogén SPM-tartalmat, azonban mind levélben, mind a gyökérben olyan mértékben halmozódott fel a PUT, hogy az felelős lehet a búzánál tapasztaltaknál súlyosabb negatív hatásért.



42. ábra A poliamin-ciklus lehetséges mechanizmusa a poliamin-kezelt búza- és kukoricanövények leveleiben és gyökereiben. Az adott poliamin-kezelés az alkalmazott poliamin felhalmozódását eredményezte mind a kukorica-, mind a búzanövények gyökereiben. Mindkét növényfajban előfordulhat a magasabbrendű poliaminok átalakítása a putreszcinné vagy a spermidinné a poliamin-ciklusban. Ennek megfelelően az összes poliaminkezelés jelentősen megnövelte a putreszcin-felhalmozódást, különösen a gyökerekben. A gyökérből a hajtásba történő transzlokáció mellett az adott endogén poliamin-szintek növekedése további szintézist indíthat el a magasabbrendű poliaminok felé, illetve beléphetnek a terminális katabolizmusba is. A nyílak vastagsága mutatja a PA-ciklusban az egyes lépések intenzitásában mutatkozó feltételezett különbségeket a búza- és a kukoricalevelek és gyökerekben.

Mivel a 0,5 mM PUT-kezelésnek még nem volt negatív hatása, de mindkét növényfajban PA-felhalmozódást indukált, a továbbiakban ezzel a koncentrációval dolgoztunk tovább. A második kísérletben azt vizsgáltuk, hogy a PUT-kezelt növények hogyan reagáltak a PEG által kiváltott ozmotikus stresszre. A búzában a PEG-kezelés sztómazáródást és a nettó fotoszintézis csökkenését okozta, ahogyan azt a kukoricában is észleltük, de az $\Delta F/F_m'$ csökkenése és az intercelluláris CO_2 koncentrációjának növekedése nélkül, ami arra enged következtetni, hogy az ozmotikus stressz a búzában kevésbé volt súlyos, mint a kukoricában. Ezt a biomassa-paraméterek is alátámasztották. Mindazonáltal, a PUT-előkezelés mindkét növényfajban védelmet biztosított az ozmotikus stressz-szel szemben, amint azt a szignifikánsan magasabb effektív kvantumhatásfok és a CO_2 asszimilációs ráta is bizonyította. Mivel a gyökerekben a legmagasabb prolinfelhalmozódást a PUT-előkezelt + PEG-kezelt növények esetében mértük mindkét fajban, ez azt sugallta, hogy a prolin hozzájárulhat a PUT által kiváltott ozmotikus toleranciához.

A PUT-előkezelés után megfigyelt különbségek a búza és a kukorica között az első kísérletsorozatban arra engedtek következtetni, hogy a PA-anyagcsere eltérhet a két fajban. Az 5

napos „recovery” periódus után, a PUT-előkezelésnek önmagában nem volt hatása az endogén PA-szintre sem a búza levelében, sem a gyökerében. Vélhetőleg a többféle metabolikus mechanizmusnak (transzlokáció, katabolizmus és/vagy további szintézis) köszönhetően lényegében a kontrollnak megfelelő szintet mutatott. Ezzel szemben a PEG-kezelés növelte a szabad PUT szintjét, és csökkentette a szabad SPD és SPM mennyiségét a levelekben, miközben a DAP-szint, és a DAO és PAO aktivitása nem változott, ami arra utal, hogy a magasabbrendű PA-ok PUT-né alakulhattak vissza. A PEG-indukálta ozmotikus stressz más körülmények között is növelte a PUT- és csökkentette az SPD- és SPM-tartalmat búzalevélben (Marcínska és *mtsai*. 2013; (Kovács és *mtsai*. 2014b). A gyökérben eltérő mechanizmusok domináltak. Itt az ozmotikus stressz csökkentette az SPD szintjét a szabad és konjugált frakciókban, viszont fokozott PAO-aktivitás kíséretében, ami jelentős DAP-felhalmozódást eredményezett. A megnövekedett DAO-aktivitás a búzagyökérben pedig felelős lehet a változatlan PUT-tartalomért. A kombinált kezelés eredményei részben hasonlóak a PEG-kezelés során leírtakkal: a levelek szabad PUT tartalma növekedett, a szabad SPD-szint csökkent, de a SPM mennyisége nem változott, míg a gyökérben a PUT- és a SPD-szint is csökkent. Kísérletünkben a PUT-előkezelt búzanövények PUT tartalmának kevésbé kifejezett növekedése vagy akár csökkenése az ozmotikus stressz során azt jelezheti, hogy a PUT, a SPM szintézisére használódott fel a levelekben, ebből kifolyólag utóbbi szintje nem csökkent. Ezek az eredmények összhangban vannak azzal a megfigyeléssel, hogy a *Craterostigma plantagineum*-ban a kiszáradással szembeni tolerancia összefüggésben volt a PUT, SPM felé történő „csatornázásával” (Alcázar és *mtsai*. 2010).

A kukoricalevélben csak a kombinált kezelés (PUT előkezelt + PEG) növelte a PUT-szintet, amelyet magasabb DAO-aktivitás kísért. Ezzel szemben a gyökérben a PUT-előkezelés akár „recovery” periódus, akár PEG-kezelés követte, PUT-felhalmozódást indukált, mellyel párhuzamosan a DAO-aktivitás is megemelkedett. Ez azt sugallja, hogy az első kísérlethez hasonlóan, a kukoricában a PA-ok transzlokációja a hajtás felé nem annyira hangsúlyos, mint a búzában, viszont a PUT oxidációja erőteljesebb. Az a tény, hogy a PUT-tartalom a kontroll körülmények közé visszahelyezés után is magas maradt, felelős lehet a PUT kisebb mértékű védő hatásáért kukoricában.

Korábbi kísérleteink során szoros korrelációs kapcsolatot mutattunk ki a PA-ok és a SA között. Néhány irodalmi adat szerint a SA-kezelés hatással van a PA-ok szintézisére és/vagy katabolizmusára (Németh és *mtsai*. 2002; Szepesi és *mtsai*. 2011; Wang és Zhang 2012; Hassannejad és *mtsai*. 2012). Továbbá úgy tűnik, hogy az exogén PA is hatással van a SA-tartalomra normál nevelési körülmények között. Kimutatták, hogy 0,5 mM SPD-kezelés megnövelte a levél SA-tartalmat búzában, de ugyanabban a koncentrációban a PUT- és SPD-kezelések csökkentették azt a gyökérben (Rahdari és Hoseini 2013), míg az SPD nem befolyásolta az uborka endogén SA tartalmát normál nevelési körülmények között (Radhakrishnan és Lee 2013). A túlzott SA-felhalmozódás káros lehet a növényekre. Negatív összefüggést figyeltek meg a SA és a *cpr1 Arabidopsis* mutáns növények

- melyek magas szabad és kötött SA-szinteket mutattak - növekedése között, valamint azok fokozott oxidatív károsodása között alacsony hőmérsékleti stressz körülmények során (Scott és *mtsai.* 2004). A jelen munkánkban a 0,5 mM PUT nem befolyásolta az endogén SA-tartalmat sem a búzában, sem a kukoricában, ugyanakkor a SPD és SPM ugyanabban a koncentrációban alkalmazva mind a búza, mind kukorica levelében indukálta a szabad és kötött SA, valamint a kukorica gyökerében a szabad SA felhalmozódását. Mindezen eredmények azt mutatják, hogy a PA és SA jelátviteli utak közötti kölcsönhatás létezik, és megerősíti a felvetésünket, hogy a kukorica érzékenyebb a magasabbrendű PA-okra.

Különbségeket figyeltünk meg abban is, ahogyan a búza- és kukoricanövények SA tartalma változott az ozmotikus stressz során, sőt a PUT-előkezelés is eltérő változásokat okozott. A PEG-indukálta ozmotikus stressz során az UV-B sugárzás pozitív hatását figyeltük meg a SA-tartalomra a búzában (Kovács és *mtsai.* 2014b), ahol a megemelkedett endogén SA-szint sztomatikus záródást segíthetett elő (Melotto és *mtsai.* 2006). A jelen kísérletben a PUT-előkezelés búzában csökkentette a szabad SA mennyiségét, ami a PAL (ligninek, flavonoidok, antocianinok és egyszerű fenolos vegyületek szintézisében kulcsfontosságú enzim) aktivitásának változásával is összhangban volt (Szalai és *mtsai.* 2017). Más korábbi vizsgálatok során, ahol a SPD-nek kedvező hatásáról számoltak be, a SPD szintén csökkentette a SA-tartalmat, pl. búzanövények gyökerében (Rahdari és Hoseini 2013), vagy hasonlóképpen uborkában sóstressz körülmények között (Radhakrishnan és Lee 2013). Az alábbi kísérletünkben a PEG-kezelés jelentős szabad SA-felhalmozódást okozott a búzalevélben, és növelte a kötött SA-szintet a gyökérben, valószínűleg a PAL fokozott aktivitásának köszönhetően. Azonban csak a szabad SA-tartalom növekedett a búza levelében a kombinált kezelés során hasonló mértékben ahhoz, mint amit PEG-kezelés esetében tapasztaltunk.

Ezzel szemben, jóllehet a PUT-nel előkezelt kukoricanövények leveleiben csökkent a szabad SA-szint, a gyökerekben nagymértékű szabad SA-felhalmozódást figyeltünk meg, mellyel párhuzamosan mind a levélben, mind a gyökérben nőtt a kötött SA-tartalom is. A PEG-kezelés önmagában csökkentette a kukorica leveleiben és gyökereiben a szabad SA-szintet, mely összhangban volt a levelek csökkent PAL aktivitásával, de a kombinált kezelésben a PUT-előkezelés által kiváltott SA-felhalmozódás megakadályozta ezt a gyökérben; továbbá a levélben a legmagasabb kötött SA-tartalom a kombinált kezelést követően volt mérhető. Érdekes módon a SA-felhalmozódást magas PUT-szint kísérte kukoricában, és viszonylag magasabb PUT-tartalom, a SPD- és SPM-szinthez képest búzában. A PUT túlzott mértékű felhalmozódása maga is oxidatív stresszt válthatott ki kukoricában, mivel mind a PA-ok katabolizmusa, mind a visszaalakulása során H_2O_2 képződik az apoplasztban és a peroxiszómákban (Moschou és *mtsai.* 2008). Mindazonáltal a DAO- és PAO-aktivitások során felhalmozódó H_2O_2 -nak szerepe van a sztómazáródásban is (An és *mtsai.* 2008; Paschalidis és *mtsai.* 2010). A PA-tartalom változásai és azok kölcsönös összefüggései felelősek

lehetnek a PUT-előkezelés gázcsere-paraméterek változásaiban is megnyilvánuló hatásaiért kukoricában.

A PUT-kezelés védőhatásának mélyebb, a génexpresszió szintjén való feltárására microarray analízist is végeztünk a búzanövények levelén kontroll és ozmotikus stressz körülmények között. (Ezeket az eredményeket jelen dolgozatban részletesen nem mutattam be a dolgozat terjedelmére tett követelmény miatt.) Kimutattuk, hogy a PUT-előkezelés különféle általános stresszválaszhoz kötődő gének egyedi kifejeződését indukálta, s habár a PUT- és a PEG-kezelés hatásai között nyilvánvaló különbség volt, figyelemre méltó átfedést is tapasztaltunk. Mindez azt sugallja, hogy a PUT-előkezelés már kontroll körülmények között számos védekezési folyamatot indíthat el (Pál és *mtsai*. 2018b).

Bár a PA-okat általában hasonló molekulák családjaként tekintik, a különböző PA-ok eltérő vagy akár ellenkező hatásúak lehetnek. A PA-ciklus intenzíven működik mind a levelekben, mind a gyökerekben a búza- és a kukoricánövények esetében is. Mindazonáltal különbségek lehetnek a ciklus egyes lépéseinek intenzitásában. A búza gyökerében dominánsak a SPM/SPD felől a PUT és a DAP felé irányuló reakciók, míg a levélben a SPD felhalmozódása is jelentős, ami a kevésbé jelentős katabolizmus és visszalakulása következménye lehet. Ezzel szemben a kukoricagyökérben a visszalakulás a domináns, ami magas PUT-felhalmozódást eredményez, míg a levelekben a terminális oxidáció erőteljes, megnövelve a DAP mennyiségét. A növények megpróbálták fenntartani az optimális PA-arányt, különösen a túlzott mennyiségű SPM csökkentésére tettek kísérletet; azonban a magas PUT-szintnek is lehetnek negatív hatásai, amint azt a biomassza-paraméterek csökkenése is mutatta. A PA-poolban a PA-cikluson keresztül megvalósuló finomhangolás lehet a kulcs a kedvező és kedvezőtlen hatások közötti egyensúly megteremtésére, ami növelheti vagy csökkentheti a növény fitneszt, és felelős lehet a különböző növényfajokban tapasztalt különbségekért. A PA-ok és az SA között megfigyelt pozitív kapcsolatok feltárása a PA-ok stresszkörülmények közötti szerepének és hatásmechanizmusainak mélyebb megértéséhez vezethetnek.

6.2.2. Putreszcin-kezelés hatása kadmiumstressz során rizsnövényekben

Az irodalmi adatok azt mutatják, hogy a PA-ok, melyek kulcsfontosságú vegyületek a Cd-stressz indukálta növényi válaszok jelátvitelében (Chmielowska-Bąk és *mtsai*. 2013), fémkelátor szerepet is képesek betölteni (Lomozik és *mtsai*. 2005). A PA-kezelések fokozott nehézfém-toleranciát eredményeztek az antioxidáns védekezőrendszer szabályozása, illetve az endogén növényi hormonokra gyakorolt hatásuk révén számos növényfaj esetén (Anjum és *mtsai*. 2015; Hsu és Kao 2007). Emellett azt is kimutatták, hogy a magasabb SPD-szint, a SPDS-t túltermelő transzgenikus európai körte esetében szintén növelte a nehézfém-toleranciát (Wen és *mtsai*. 2010). A PC-ok és a

magasabbrendű PA-ok anyagcseréje a cisztein, mint közös prekursor miatt kapcsolódik egymáshoz, ennek ellenére kevés kutatást végeztek a közvetlen kapcsolatuk feltárására nehézfémstressz körülmények között. Az alábbi kísérletben két megközelítésből vizsgáltuk a PA-ok hatását a Cd-indukálta stresszválaszokra, különös tekintettel a PC-szintézisre. Rizsnövényeket exogén PUT-nel vagy a PUT-szintézis inhibitorával, DFMO-val kezeltük, Cd-kezeléssel kombinálva vagy anélkül.

Eredményeink azt mutatták, hogy a Cd-kezelés jelentős Cd-felvételt eredményezett, különösen a gyökerekben, gátolta a növekedést és oxidatív stresszt indukált a rizsnövényekben. Érdekes módon, a korábban búza és kukorica esetén kapott eredményeinkkel ellentétben (Szalai és *mtsai*. 2017), a 0,5 mM PUT-előkezelés önmagában is enyhe növekedésgátlást okozott a rizsnövényekben, és a gyökerekben a GR és a G-POD aktivitása is megemelkedett. Hasonló eredményeket kaptak magasabb koncentrációjú (1 mM) PUT-kezelés esetében búzában is (Groppa és *mtsai*. 2007). Ugyanakkor alacsonyabb koncentrációban (0,01-1 mM) a PUT fokozta a rizsgyökér növekedését, miközben a SPD és SPM gátolta (Lee 1997). A jelen vizsgálatban additív hatásként a PUT-előkezelés + Cd-kezelt rizsnövényekben tapasztaltuk a legnagyobb növekedésgátlást, H₂O₂-tartalmat és antioxidáns-aktivitást, ami arra utal, hogy ilyen körülmények között a PUT-előkezelés nemcsak, hogy nem biztosított védelmet Cd-stressz ellen, hanem fokozta azt. Ezzel szemben a DFMO-kezelésnek alig volt negatív hatása stresszmentes körülmények között, ezen kívül bizonyos mértékig csökkentette a Cd-indukált növekedésgátlást, a gyökér Cd felvételét és az antioxidáns enzimaktivitások Cd általi indukcióját mind a levelekben, mind a gyökérben. Ezzel ellentétben búzanövényekben a 0,1 mM Cd és 1 mM DFMO egyidejű alkalmazása nem állította helyre a normális gyökérnövekedést (Groppa és *mtsai*. 2007).

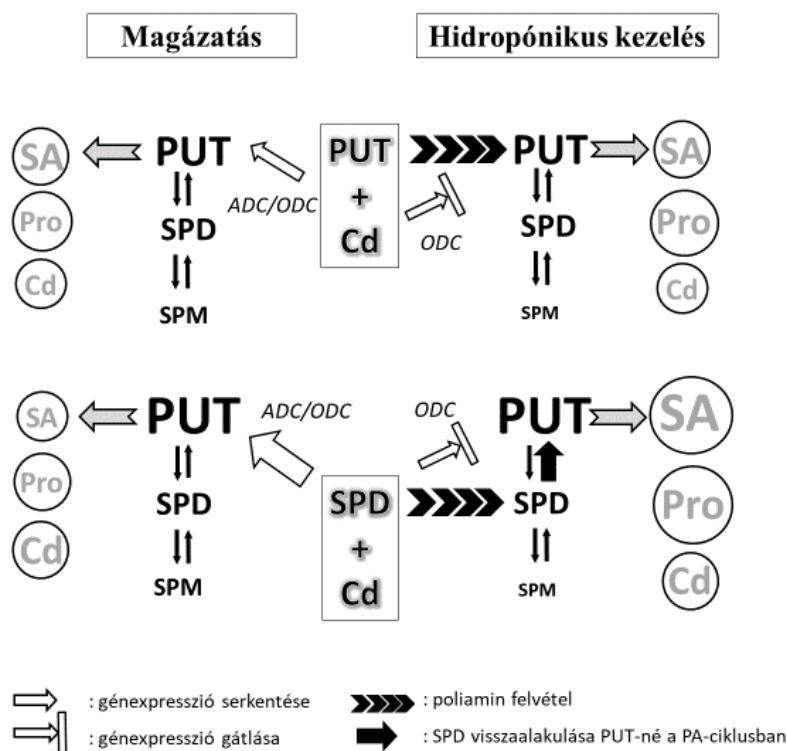
Számos tanulmány számolt be arról, hogy a nehézfémstressz hatására a PA-szintézisben résztvevő enzimeket kódoló gének expressziója megnőtt, következésképpen az endogén PA-szint is (Groppa és *mtsai*. 2007; Kuthanová és *mtsai*. 2004; Pathak és *mtsai*. 2014). Kísérletünkben mind a PUT-előkezelés, mind a Cd-kezelések megnövelték az endogén PA-tartalmat, a legnagyobb mértékű PA-felhalmozódást pedig a PUT-előkezelés + Cd-kezelés okozta, különösen a PUT-tartalomban. Ezzel párhuzamosan az *ODC* és *ADC* génexpressziós szintek is emelkedtek. Ellenben, a DFMO-kezelés önmagában csökkentette a levelek PUT tartalmát, és Cd-mal kombinációban alkalmazva, lényegesen csökkentette a gyökérben a KAD- és SPD-tartalmat a csak Cd-mal kezelt növényekben mért értékekhez képest. Bizonyított, hogy a DFMO gátolta a KAD-szintézis enzimét, a lizin-dekarboxilázt is *Leguminosae*-ben (Bunsupa és *mtsai*. 2012). A fent leírt PA-tartalomban tapasztalt változásokkal párhuzamosan minden kezelés növelte a PAO-aktivitást a gyökérben, míg a levélben csak a Cd-kezelések (Cd, PUT-előkezelés + Cd vagy DFMO + Cd) növelték. A DAO-aktivitást csak a PUT-előkezelés + Cd-kezelés befolyásolta a rizs gyökerében. Ezek az eredmények azt mutatták, hogy a PA-k felhalmozódása - exogén PUT- és/vagy Cd-kezelések hatására - számos különböző mechanizmust indukált az endogén PA-szintek szabályozására, mint pl. a PUT átalakulása

magasabbrendű PA-okká, vagy a katabolikus enzimek aktiválása. A magasabbrendű PA-ok katabolizmusa során képződő DAP szintje szignifikánsan megnövekedett a PUT-előkezelés + Cd-kezelést követően, miközben csökkent a DFMO- vagy a DFMO + Cd-kezelte növényeknél, jelezve, hogy a PUT- és DFMO-kezelés eltérő metabolikus utakat indukált. Hasonlóan, a DFMO-nak önmagában nem volt hatása a búza endogén PUT, SPD vagy SPM tartalmára, de a DFMO + Cd-kezelte növényeknél a gyökér PUT-tartalom alacsonyabb volt a Cd-kezeltekhez képest (Groppa és *mtsai*. 2007).

Annak érdekében, hogy feltárjuk, miért volt előnyös a DFMO-kezelés a PUT-kezeléssel szemben a Cd-stressz során, meghatároztuk a nehézfémek detoxifikációban szerepet játszó tiolok és PC-ok mennyiségét, feltételezve, hogy a PA-szintézis megváltozása befolyásolhatja azok szintjét. A PC-ok a GSH-ból szintetizálódnak, és tiolcsoportjuk révén képesek a nehézfémekkel kelátot képezni, mely fém-PC komplexek a vakuolumokba szekvesztrálódnak. Számos növényben, így a rizsben is kimutatták, hogy Cd-tolerancia mértéke összefüggésben áll azzal, hogy milyen mértékben képesek a növények növelni a GSH- és a PC-tartalmukat (Cai és *mtsai*. 2011). A jelen vizsgálat során a PUT-előkezelés csökkentette rizsnövények levelében a PCS génexpressziós szintjét. A PUT gátló hatása az *in vivo* PCS aktivitásában is megmutatkozott, bár mindeközben a tiol- és a PC-tartalom nem változott sem a levélben sem a gyökérben. Azonban, amikor a PUT-előkezelést a Cd-stressz követte, mind a teljes tiol-, mind a PC-tartalom jelentősen alacsonyabb értéket mutatott a Cd- vagy a DFMO + Cd-kezeléssel összehasonlítva. Hasonló módon, mind a GSH, mind a PC szintje csökkent a *Canavalia lineata* gyökereiben a SPM + Cd-kezelést követően; ráadásul az SPM + Cd-kezelés egy olyan PC forma megjelenését indukálta a gyökérben, amely kisebb Cd-kötő képességgel rendelkezett (Yun és *mtsai*. 1997). Az SPDS-t túltermelő transzgenikus európai körte esetében a GSH-tartalom kevesebb volt, mint a vad típusban nehézfémstressz körülmények között (Wen és *mtsai*. 2010). Érdekes módon, nyárfa- és fűzfánövények összehasonlító tanulmánya azt mutatta, hogy a Cd-kezelés fokozta a nyárfa PC tartalmát, különösen a leveleken, de fűzfában nem, míg a növelte a PA-tartalmat mind a fűzfa gyökerében, mind levelében, de a nyárfa esetében csak a gyökér PUT-szintjét (Zacchini és *mtsai*. 2011). A SPM-kezelés szintén védett a Cd által kiváltott oxidatív károsodással szemben búzában, de nem volt képes a GSH-szintet helyreállítani (Groppa és *mtsai*. 2007). Rizsben a SPD- és SPM-, de nem a PUT-kezelés volt képes csökkenteni a Cd-toxicitást, és megakadályozni a Cd GSH-szintet csökkentő hatását (Hsu és Kao 2007). A PUT- vagy a magasabbrendű PA-kezelések hatásai közötti különbségek azzal a ténnyel is magyarázhatóak, hogy a magasabbrendű PA-ok exogén alkalmazása nem igényel további dcSAM felhasználást a szintézisükhöz, míg a PUT-kezelést követően a PUT SPD/SPM-felé irányuló „csatornázása” nagy mennyiségű ciszteint használ fel (Pál és *mtsai*. 2015). A PA-k és a tiolok közötti kapcsolatot e tekintetben azonban még nem vizsgálták. Mivel a PC-ok a GSH-ból szintetizálódnak, a sejteknek pótolnia kell az elhasználódott GSH-t. Ez azonban egy energiaigényes folyamat, amely késleltetheti a növekedést (Kovács és *mtsai*. 2014a).

Ennek ellenére a SPD-nel kombinált krómkezelés során bár nagyobb GSH- és PC-tartalmakat mértek reteknel, ez mégsem társult a növekedési paraméterek helyreállításával (Choudhary és mtsai. 2012).

Azonban nemcsak az egyes PA-vegyületeknek lehet eltérő hatása, hanem a PA-kezelés hatásmechanizmusa a kezelés módjától is függhet, mivel eltérő metabolikus változások indukálódnak, ahogy azt búzanövények esetében igazoltuk (Tajti és mtsai. 2018) (43. ábra).



43. ábra Magázttatásos és hidropónikus poliamin-kezelések hatásainak összehasonlítása kadmiumstressz során búzában. A betűk mérete a felhalmozódás mértékét, a nyilak vastagsága a hatás intenzitását (serkentés vagy gátlás); a fehér nyilak a génexpressziós változásokat, a fekete nyilak a poliamin-ciklusban való visszaalakulást, míg a csíkozott nyilak a poliamin-felvételt jelölik. ADC: arginin-dekarboxiláz; ODC: ornitin-dekarboxiláz; Pro: prolin; PUT: putreszcin; SA: szalicilsav; SPD: spermidin; SPM: spermin (Tajti és mtsai. 2018).

A 0,5 mM PUT hidropónikus és magázttatásos kezelés formájában is hatékony volt a Cd-indukálta stressz-szel szemben, amit a kisebb mértékű SA-felhalmozódás is bizonyított. Ezzel szemben a SPD-nek ugyanazon koncentrációban csak magázttatásos formában volt kedvező hatása, míg a tápoldathoz adagolva fokozta a Cd-stressz hatását, drasztikusan megemelve a SA-szintet. A hidropónikus SPD + Cd-kezelés továbbá csökkentette a PCS expressziós szintjét a Cd-kezeléshez viszonyítva (Tajti és mtsai. 2018).

Megállapíthatjuk, hogy bizonyos esetekben a PA-ok védelmet nyújtanak a nehézfémstressz során, gátolják a Cd-felvételt vagy annak a sejtbe való bejutását, mivel a PA-ok döntően az apoplasztban lokalizálódnak (Groppa és *mtsai*. 2007). Ugyanakkor figyelembe kell venni azt is, hogy a magasabbrendű PA-ok és PC-ok szintézise antagonista kapcsolatban áll. Ez megmagyarázhatja, hogy miért a SPD és a SPM, de nem a PUT, volt képes csökkenteni a Cd toxicitását rizsben (Hsu és Kao 2007). Igaz a SPD/SPM visszalakulhat PUT-né vagy SPD-né a PA-ciklusban miközben H_2O_2 halmozódik fel, ami a gyökérnövekedés gátlásához vezethet (Wen és *mtsai*. 2010). Az is lehetséges, hogy a PA-ok kelátképzőként a PA-Cd kötés révén csökkentik a PC-szintézis indukcióját. Azonban azt még nem bizonyították, hogy a PA-Cd komplexek ugyanannyira hatékonyak-e a vakuoláris szekvesztrációban, mint a PC-Cd komplexek. Esetünkben legalább három mechanizmus magyarázhatja a PUT PCS-aktivitást gátló hatását a rizslevélben: 1. A PUT-előkezelés csökkenti a PCS génexpressziós szintjét, 2. A PUT-előkezelés csökkenti a PCS-aktivitást, valószínűleg a GSH-tartalom, azaz a szubsztrát-pool kimerülése miatt 3. a PUT-előkezelés + Cd-kezelésben, ahol a legalacsonyabb PCS-aktivitást találtuk, a PA-Cd kötés csökkentheti a szabad Cd^{2+} mennyiségét, melynek megfelelő szintje szükséges a PCS enzim, valamint a PCS génexpresszió indukálásához.

6.2.3. Putreszcin- és abszcizinsav-kezelések összehasonlítása kontroll és ozmotikus stresszkörülmények között búzanövényekben

Az alábbi kísérlet során az ABA- és a PEG-kezelések hatását és azok kombinációit vizsgáltuk a PA-anyagcserére, annak érdekében, hogy feltárjuk az ABA és a PA-ok közötti kölcsönhatásokat a stresszválaszokban, különös tekintettel a prolin-metabolizmusra. Valamint, annak érdekében, hogy kizárjuk és megkülönböztessük a megnövekedett PUT-szint hatását, PUT-kezelést is alkalmaztunk. Ezenkívül, az 1 napos ABA- vagy PUT-kezelések hatását egy 5 napos „recovery” periódus után is megvizsgáltuk az ABA és a PUT hatásainak további differenciálódása érdekében. A különböző, lehetséges kapcsolatok érthetőbb és részletesebb bemutatása érdekében az egyes összefüggéseket több alfejezetben mutatjuk be (Pál és *mtsai*. 2018c).

6.2.3.1. Az abszcizinsav és a poliaminok kapcsolata

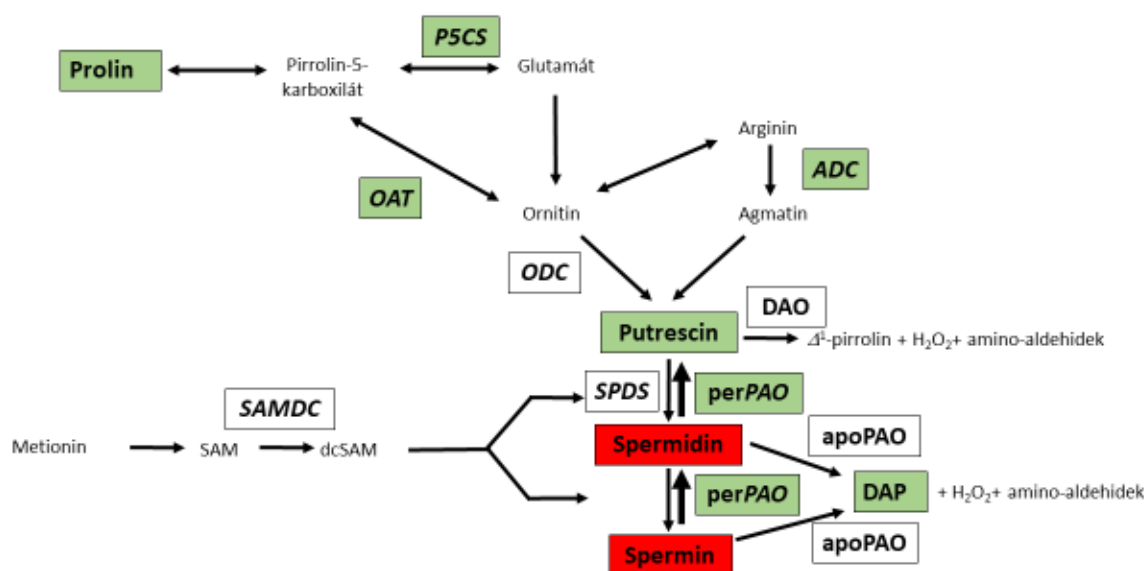
Korábban kimutatták, hogy a PUT-szintek gyors növekedésére van szükség az ABA felhalmozódásához *Arabidopsis*-ban hidegstressznek kitettség során, és hogy a PUT-kezelés az *NCED* génexpressziós szintjét is megemelte (Cuevas és *mtsai*. 2008). A legfrissebb eredmények azt mutatták, hogy az exogén PUT növeli az ABA-tartalmat és az *NCED* transzkriptum szintjét a paradicsom leveleiben alacsony hőmérsékleti stressz során (Diao és *mtsai*. 2017). Más tanulmányok azonban arra utalnak, hogy az *NCED* expressziós-szintje a genotípustól is függhet; és a kifejeződés

szintje nem mindig korrelál a PEG által indukált ozmotikus stressz körülmények között tapasztalt ABA-tartalom változásaival (Gallé és *mtsai.* 2013). Kísérletünkben, habár a PUT-kezelés nem befolyásolta az *NCED* génexpressziós szintjét és az ABA-tartalmat a búzalevelekben, a gyökér ABA-tartalmában kismértékű, de egyértelmű növekedését okozott, ami párhuzamban állt a PUT felhalmozódásával. Az alábbi kísérletünkben az *NCED* génexpressziója csak az ABA- és PUT + PEG-kezelt növények leveleiben indukálódott.

A PUT-kezelés ABA-tartalomra kifejtett hatásának hiányával ellentétben az ABA-kezelés jelentősen befolyásolta a PA-anyagcserére. A leginkább jellemző változások, a PUT-szint kontrollhoz képest mért növekedése és a SPD-tartalom csökkenése voltak az ABA-kezelt növényekben. Sőt, az 1 napos ABA-kezelés PUT-szintet növelő és SPM-szint csökkenő hatása még a kontroll körülmények közé való visszahelyezés (ABA + 5d) után is észlelhető volt. A korrelációs analízis azt is kimutatta, hogy az ABA- és a PUT-, valamint az ABA- és a DAP-tartalmak között pozitív kapcsolat áll fenn, míg negatív korrelációt azonosítottunk az ABA- és a SPD- vagy SPM-szintek között. Ugyanakkor az eredmények azt is jelezték, hogy az ABA-indukálta PUT-felhalmozódás mértéke alacsonyabb volt, mint a SPD-tartalomban bekövetkező csökkenés. Azonban ezek a változások nem a levélben mért *SPDS* vagy *SAMDC* gének expressziós-szintjének csökkenéséből eredtek, jelezve, hogy nem a szintézis oldalán történt módosulás felelős a SPD/SPM-szintek csökkenéséért. A PUT felhalmozódása párhuzamban állt a fokozott *ADC* génexpresszióval, az ABA- és PUT-kezelések esetében búzanövényekben. Ezek arra engednek következtetni, hogy az exogén módon alkalmazott PUT nemcsak, hogy felvételre került a búzanövények gyökere által és transzlokálódott a hajtásba, hanem *de novo* szintézist is indukált a levelekben. Eredményeink összhangban vannak azzal a korábbi megállapítással, amikor is az ABA-kezelés a PUT-tartalom növekedését indukálta, de ez megelőzhető volt az α -difluor-metil-arginin (*ADC*-inhibitor) vagy α -difluor-metilornitin (*ODC*-inhibitor) adagolásával (Aurisano és *mtsai.* 1993). Az exogén ABA szintén növelte a PUT-tartalmat csicseriborsóban (Bueno és Matilla 1992), míg kukoricában az ABA-kezelés a *SPDS*-t kódoló gén transzkripció aktivációján keresztül indukálta a PA-szintézist (Jiménez-Bremont és *mtsai.* 2007). Jelen kísérleti körülmények között pozitív korrelációt találtunk az ABA-tartalom és az *ADC* és a *SAMDC* gének expressziós-szintje között.

Az ABA-kezelés fokozta az apoPAO aktivitását, valamint az apoPAO-t kódoló gén expressziós szintjét kukoricában (Xue és *mtsai.* 2009), míg *Arabidopsis*-ban a perPAO aktivitását fokozta, a PA-ok visszalakulását serkentve (Moschou és *mtsai.* 2008). Szintén ABA-kezelést követően, nemcsak a PAO-ok aktivitásának növekedését, hanem a PA-ok citoszolból apoplasztba irányuló transzportját (exodus) figyelték meg szőlőben (Paschalidis és *mtsai.* 2010). Ezzel szemben a jelen kísérletünkben az ABA- vagy PUT-kezelések nem befolyásolták jelentősen a DAO és az apoPAO aktivitását, melyek PUT és SPD/SPM terminális katabolizmusáért felelősek. A feltételezhetően peroxisómális PAO génexpresszióját azonban csak az ABA-kezelések indukálták,

ami azt jelezte, hogy a SPD/SPM-nek a PUT-né történő visszalakulása a levelekben serkentődött. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy az ABA komplex módon, transzkripciós szinten modulálja a PA-metabolizmust, és a megfigyelt PA-mintázat kialakulásában szerepe van a PA-ok visszalakulásának (44. ábra) (Pál és *mtsai*. 2018c).



44. ábra A poliamin-metabolizmus kapcsolata a prolinszintézissel búzanövényekben. A zöld dobozok az 1 napos 0,15 mM abszcizinsav-kezelés által indukált növekedéseket jelzik, a fehér dobozok nem jeleznek változást, míg a piros dobozok mutatják a gátló hatást. ADC: arginin-dekarboxiláz; apoPAO: apoplaztikus poliamin-oxidáz; DAO: diamin-oxidáz; DAP: 1,3-diaminopropán; OAT: ornitin aminotranszferáz; ODC: ornitin-dekarboxiláz; *perPAO*: peroxisomális poliamin-oxidáz; *P5CS*: Δ^1 -pirrolin-5-karboxilát szintáz; *SAMDC*: S-adenozilmetionin-dekarboxiláz; *SPDS*: spermidin-szintáz (Pál és *mtsai*. 2018c).

6.2.3.2. A poliaminok és az ozmotikus-stressz

Az ABA kulcsfontosságú szerepet játszik a növényekben az ozmotikus vagy a szárazságstressz körülmények között adott válaszaikban (Zhu 2002). Bioszintézise vélhetőleg először a gyökerekben indukálódik, majd a xylemen keresztül eljuthat a levelekbe is. A PA-anyagcserét ozmotikus stressz körülményei között régóta vizsgálják (Flores és Galston 1984; Paschalidis és *mtsai*. 2010). Az eredmények azonban gyakran ellentmondásosak, és különösen az ABA-jelátvitellel való kapcsolat kevésbé ismert. Az alábbi kísérletben érdekes módon az ABA-indukált változás a PA-mintázatban hasonló volt a PEG-kezelés során tapasztaltakhoz, azaz nőtt a PUT-, de csökkent a SPD-

tartalom a búzanövények levelében. Ennek ellenére a PEG önmagában, de a kombinált kezelések esetében (ABA + 5dPEG és PUT + 5dPEG) sem befolyásolta a PA-szintézisben résztvevő enzimek génexpressziós mintázatát, kivéve az *ADC*-t, melynek transzkripció szintje némileg nőtt az ABA + 5dPEG kezelést követően. Hasonlóan, az ozmotikus stressz semmilyen formában sem befolyásolta az apoplasztikus DAO- vagy PAO-aktivitást, bár a levél DAP-szintje nőtt, és a *perPAO* génexpressziós szintje is.

Részből hasonlókat találtak búzanövényekben, mikor 0,1 mM ABA- vagy 15%-os PEG-kezeléseket alkalmaztak 3 hétig; egyik kezelés sem befolyásolta a PUT-tartalmat, de folyamatosan csökkentette az SPD-szintet, ezzel párhuzamosan pedig a megnövekedett a SPM-tartalom (Kovács és *mtsai*. 2010). Kevés olyan tanulmány áll azonban rendelkezésre, melyek a PA-ok metabolizmusában szerepet játszó enzimek aktivitásának vagy az azokat kódoló gének expressziós szintjének változására fókuszálna. A PA-szintézis mutáns *Arabidopsis*-ok vizsgálata során megállapították, hogy a szárazságstressz a SPD/SPM-nek a PUT-né történő visszacsatornázást eredményezi, de nem a SPM terminális katabolizmusát (Alcázar és *mtsai*. 2011). A vízhiányhoz hasonlóan az ABA-kezelés növeli a sztomatikus rezisztenciát és csökkenti a transzpirációt, ahogy ezt a kísérletünkben is kimutattuk. Sőt, ahogy az előzőekben már bemutattuk, a PUT és SPD 0,5 mM koncentrációban alkalmazva 7 napig szintén sztómazáródást okoz (Szalai és *mtsai*. 2017). Ezenkívül, kimutatták a DAO és a PAO szerepét is az ABA által indukált sztómazáródásban (An és *mtsai*. 2008; Paschalidis és *mtsai*. 2010). A jelen kísérletben a megfigyelt sztómazáródás ellenére az apoplasztikus DAO- és PAO-aktivitások nem változtak. Ugyanakkor az erőteljesebb SPD-degradáció a PAO-aktivitás növekedése nélkül is megtörténhet, hiszen egyes eredmények azt sugallták, hogy a már eleve nagymértékű apoplasztikus DAO/PAO-aktivitás indukálása helyett a megfelelően szabályozott PA-exodus felelős a sejt PA-pooljának változásaiért (Cona és *mtsai*. 2006). A jelen kísérletben a PEG-kezelt növények leveleiben megnövekedett *perPAO* génexpressziót mutattunk ki.

Összefoglalva, a PA-szintézis enzimek génexpressziós szintje nem csökkent, míg a DAP- és PUT-tartalom növekedett; emellett a *perPAO* transzkriptum szintje megemelkedett ozmotikus stressz körülmények között, ami azt sugallja, hogy mind a terminális katabolizmus, mind a visszaalakulás részt vehet a SPD-szint csökkentésében. A korrelációs analízisek is kimutatták, hogy a SPD-tartalom pozitív kapcsolatban állt az apoplasztikus PAO-aktivitással, de negatív összefüggést mutatott a *perPAO* génexpressziós szintjével. Ezek szerint a PA-tartalom ozmotikus stressz által indukált változásai komplex folyamatok (szintézis, exodus, lebomlás és visszaalakulás) eredőiként jelennek meg (Pál és *mtsai*. 2018c).

6.2.3.3. *A poliaminok és a prolin kapcsolata*

A prolintartalom megemelkedése a szárazságstressz egyik korai indikátora (Verslues és Sharma 2010). Mindazonáltal régóta fennálló kérdés, hogy a prolinfelhalmozódás és a prolinanyagcsere hogyan módosul a szárazságtűrés kialakítása során (Bhaskara és *mtsai*. 2015). Ezért is fontos megérteni a prolin- és a PA-metabolizmus közötti összefüggéseket.

Kimutatták, hogy a PUT bioszintézisének felül-szabályozottsága széleskörű metabolikus újratervezéshez vezet (Majumdar és *mtsai*. 2013; 2016). A PUT- és a prolinszintézis közös prekursora a glutamát, így a PA-poolban bekövetkező változások a PA és a prolin szintézisútja közötti eltolódást válthatja ki. Az ornitinnek, központi kapcsoló szerepe lehet, mivel nemcsak a saját szintézisét befolyásolja a glutamátból, hanem az arginin és prolin szintézisét is. Azonban még mindig nem világos, hogy melyik útvonal felelős a fokozott prolinfelhalmozódásért: közvetlenül a glutamátból kiinduló szintézis, melyet a P5CS katalizál, vagy az ornitintől az OAT által katalizált reakció (Majumdar és *mtsai*. 2016). A magas PUT-szintézist mutató transzgenikus *Arabidopsis*-ban kimutatták, hogy a prolinszintézis szabályozása független a glutamát-ornitin-arginin útvonaltól, amely utóbbi inkább enzimatikusan, mint transzkripciós szinten szabályozott. Azonban a glutamát áramlásának/elosztásának szabályozása a PA- vagy prolinszintézis irányába stressz körülmények között, amikor a PA-többség áll rendelkezésre, még mindig rejtélyes. Ezenkívül nem csak a PA- és a prolinszintézis között van kapcsolat, hanem a PA-katabolizmusról is kimutatták, hogy összefüggésben van a prolinfelhalmozódással. Kimutatták, hogy a jelentős prolinakkumuláció paradicsomban együttjárt a PUT- és SPD-szintek gyors csökkenésével, és a DAP mennyiségének növekedésével, ugyanakkor DAO inhibitor alkalmazása a prolin felhalmozódását gátolta (Aziz és *mtsai*. 1998). A korrelációs analízis során kimutattuk, hogy a jelenlegi kísérleti körülmények között az OAT transzkriptum-szint pozitív kapcsolatban állt az ABA-tartalommal és negatív kapcsolatban a SPM-szinttel, míg a P5CS expressziós szintje szintén negatív kapcsolatban állt a SPM-tartalommal, de pozitív kapcsolatban az ADC, az NCED és a SAMDC génexpressziós szintjével, valamint a DAP és az ABA tartalmával.

Kísérletünkben mind az ABA-, mind a PUT-kezelések, valamint az ozmotikus stressz is növelték a prolin szintjét, a legnagyobb felhalmozódását az ABA + 5dPEG-kezelt növények leveleiben okozva. Bár a prolinfelhalmozódás pozitív korrelációban volt a PUT-tartalommal és negatív összefüggést mutatott SPD-tartalommal, ez közvetlen ok-okozati hatásként nem volt felelős a prolinszint megfigyelt növekedéséért. Annak ellenére, hogy az ABA kezelésnek és az ozmotikus stressznek hasonló hatása volt a PA-készletre, eltérő hatásuk volt a prolinszintézisre a búzanövények levelében. Az ABA- vagy PUT-előkezelések PUT-felhalmozódást eredményeztek, és kiváltották a P5CS expressziójának aktiválódását, de csak az ABA-előkezelés növelte az OAT transzkriptum szintjét. Bár a prolinfelhalmozódást 5 napos PEG-kezelés után is megfigyeltük, az ozmotikus stressz

nem befolyásolta egyik prolin bioszintézis útvonalhoz tartozó enzim génexpresszióját sem. Azonban az a tény, hogy a legnagyobb prolintartalmat az ABA + 5dPEG-kezelt növényekben mértük, nem magyarázható csupán az *OAT* vagy *P5CS* génexpressziójában észlelt változásokkal. Az *OAT* és a *P5CS*, ABA-indukált fokozott expressziós szintjei felelősek a prolinfelhalmozódásért, de ezek a változások közvetlenül nem kapcsolódtak az endogén PUT-felhalmozódáshoz, mivel a PUT-előkezelés csak a *P5CS*-et indukálta és a prolintartalom kisebb mértékű növekedését eredményezte a PUT + 5dPEG-kezelés esetén. Ezenkívül beszámoltak arról is, hogy a *P5CS* enzim a prolinszint negatív visszacsatolási szabályozása alatt áll (Verslues és Sharma 2010). Ezek szerint a prolinszintézis részben független, és nem antagonistán módon a PA-szintézis által szabályozott. Mindazonáltal, mivel kísérletünkben a prolin felhalmozódása pozitív korrelációban volt a megnövekedett *perPAO* génexpressziós-szinttel, nem zárható ki a PA-katabolizmus és a PA-ciklus szerepe sem (44. ábra) (Pál és *mtsai*. 2018c).

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A növények egyszerre többféle kedvezőtlen környezeti hatásnak lehetnek kitéve, amelyek csökkentik a várható mezőgazdasági hozamot. Világszerte minden évben nagy mennyiségű termésvesztést okozhat a nem megfelelő vízellátottság, az extrém hőmérsékleti változások, az UV-B sugárzás, a nehézfém-szennyezés, illetve a kórokozók és kártevők hatása, valamint ezek additív hatásai. A nemesítők feladata évről évre, hogy a népesség növekvő igényeinek megfelelően mind nagyobb termést ígérő fajták ugyanakkor a kedvezőtlen környezeti körülményeknek is ellenállóak legyenek. Ahhoz, hogy ilyen növényeket elő lehessen állítani, elméleti szempontból mindenekelőtt a növények védekező és szabályozási folyamatait kell megismerni. Ugyanakkor, a környezettudatos mezőgazdasági termelés előtérbe kerülésével gyakorlati szempontból nagy jelentősége van azon, a természetben is előforduló vegyületek vizsgálatának, melyek a gazdasági növények stresszérzékenységét csökkenteni képesek.

Mára nyilvánvalóvá vált, hogy nincs minden egyes stressztényezőre külön specifikus, lineáris jelátviteli útvonal, hanem olyan összekapcsolt hálózatok vannak, amelyek közös elágazásokat tartalmaznak, melyeken keresztül a különböző utak „áthallása” (crosstalk) valósulhat meg. Az ilyen közös elemek fő kapcsolási pontként szolgálhatnak, és alapvető szerepet játszhatnak a stressztűrésben. A PA-ok minden élő sejtben megtalálhatók, és egyre inkább egyértelmű, hogy közvetlen védő szerepük mellett kapcsolási pontokként különböző celluláris folyamatokat szabályoznak, a PA-indukált válaszreakciók pedig sok szinten összekapcsolódnak. A legelterjedtebb PA-ok, azaz a PUT, SPD és SPM különféle fiziológiai folyamatokat, például a fotoszintézist, az antioxidáns rendszert és az ioncsatornákat képesek befolyásolni stresszhatás alatt, de specifikusságuk és hatékonyságuk eltérő mértékű. Mindezek alapján jelen munkában egyrészt az endogén PA-tartalom és a stressztolerancia mértéke közötti összefüggéseket kerestük, másrészt a külsőleg adagolt PA-ok által kiváltott változásokat tanulmányoztuk különböző stresszhatások során, különös tekintettel arra, hogy mindeközben az endogén PA-ok szintje milyen kapcsolatban van más védővegyületekkel.

7.1. Poliamin-tartalom változása és annak más védővegyületekkel való kapcsolata különböző stresszhatások során

Kutatásaink első részében tehát biotikus és abiotikus stresszfaktorok hatását vizsgáltuk az egyedi endogén PA-tartalomra különböző stressztoleranciájú gabonanövényekben. A SA szerepe számos biotikus, majd később abiotikus stresszválasz során bizonyított. Mivel a célkitűzéseink egyike

a PA-ok és más növényi hormonok kapcsolatának jellemzése volt, így jó kiindulási alapként szolgált a korábbi kísérletünk során tesztelt nagyszámú búzagenotípusból kiválasztott eltérő endogén SA-szinttel rendelkező genotípusok vizsgálata, melyek eltérő stressztűrő képességgel is rendelkeztek.

Lisztharmatfertőzés során a PA-ok, különösen a SPD mennyisége már a 3. naptól megemelkedik, és bár néha szoros, pozitív korrelációt mutattunk ki a SA- és PA-szintek, valamint a PA-tartalom és az antioxidáns enzimaktivitások között, nem találtunk közvetlen összefüggést PA-szintek, azok változásai és a lisztharmat-rezisztencia között az eltérő kezdeti SA-tartalommal jellemzett búzavonalakban.

A különböző fagytoleranciájú gabonafajok levelében, a hidegre indukálódó, illetve fagytoleranciában szerepet játszó vegyületek mintázatában szignifikáns eltéréseket találtunk. A legjelentősebb különbségeket a tavaszi zabfajták mutatták, a többi gabona genotípushoz képest, ugyanis ezek képtelenek voltak a hidegkezelés során SPD-t felhalmozni. A SPD-szint, flavonoidokkal, ABA-val, *t*16:1-tal és APX-zal kimutatott szoros kapcsolata azt mutatja, hogy a SPD döntő szerepet játszhat a gabonafélék hidegakklimatizációs jelátviteli folyamataiban.

Cd-stressz során a PUT mennyisége emelkedett meg a búzanövények levelében és gyökerében, a magasabbrendű PA-ok felhalmozódására nem került sor. A Cd-tolerancia eltérő mértéke a PUT-tartalom emelkedésével nem mutatott összefüggést, de a PC-szintézis különböző mértékű indukciójával a búzanövények gyökerében szoros kapcsolatban állt. Eredményeink azt sugallták, hogy habár a PC-ok szintézisé együtt jár a SPD/SPM-felhalmozódás hiányával, de a γ -EC szintézisét követő lépések szabályozásában már más, a PA-ok szintézisétől független folyamatok vehetnek részt. A szabad és kötött SA pozitív korrelációt mutatott a PCS-aktivitással, mind a levélben, mind a gyökérben, továbbá szintén pozitív korrelációs kapcsolatban állt a PUT-, míg negatív kapcsolatban SPM-tartalommal a levélben.

Kimutattuk, hogy az UV-B sugárzás ugyanolyan feltételek mellett pozitív vagy negatív hatást is gyakorolhat a búzában, attól függően, hogy milyen típusú másodlagos abiotikus stressztényezőt alkalmaztunk. A megfigyelt kedvező vagy káros hatások pedig kapcsolatban voltak a PA-tartalomban megfigyelt változásokkal. A Cd-stressz UV-B sugárzással kombinálva, mint egy összegző hatásként nagymértékű PA-felhalmozódást okozott, mellyel párhuzamosan a legnagyobb mértékű SA-akkumuláció szintén az UV+Cd-kezelt növények gyökerében volt kimutatható. Míg az UV-B sugárzás csökkentette a PEG-indukálta ozmotikus stressz tüneteit, mely során a SA-felhalmozódás mellett káros mennyiségű PA-akkumuláció nem volt megfigyelhető.

Rizsnövényekben a még kifejezettebb kezdeti SA-tartalombeli különbségek befolyásoló hatását tudtuk vizsgálni. Bár a szárazságérzékeny genotípusok rendszerint enyhén nagyobb SA-

szinttel rendelkeztek, mint a toleránsak, a SA-tartalom és a szárazságtolerancia mértéke között nem volt szoros összefüggés a rizsnövényekben. Hasonlóan, bár az egyedi PA-szintek stressz-specikusan változtak a hideg- és szárazságstressz során, de a vártakkal ellentétben a PA-tartalom sem korrelált a stressztolerancia mértékével, továbbá a PA-ok mennyiségi változásai nem mutattak összefüggést a SA-tartalommal sem.

Az irodalmi adatok alapján felmerült kérdésre tehát, hogy vajon az egyes PA-ok felhalmozódása elengedhetetlen-e a növények toleranciája és a stresszválaszok szempontjából, eredményeink alapján a következő választ adhatjuk. A PA-ok felhalmozódása nem bizonyítja feltétlenül, hogy egyedi szerepük van a közvetlen stresszvédelemben. Ráadásul a különböző PA-ok mennyiségi változásai eltérő irányúak lehetnek. Ugyanakkor, habár nincs közvetlen összefüggés a stressztolerancia és a PA-ok mennyiségi változásai között, azok számos védővegyülettel (pl. flavonoidok, antioxidánsok, PC-ok, növényi hormonok) korrelációt mutattak. Ebből kifolyólag, ideje, hogy a PA-okra ne csak direkt védőmolekulákként tekintsünk, hanem olyan sokoldalú vegyületekként, amelyek meghatározó szerepet játszanak a stressztűrési szabályozásában, közvetlen kölcsönhatásba kerül más anyagcsere-útvonalakkal és hormonális keresztthatásokkal, illetve aktiválhatják a stresszre válaszreakciót adó gének expresszióját is.

7.2. Poliamin-kezelések hatása kontroll és abiotikus stressz körülmények között

Az előbbi eredményekre alapozva, második lépésben külsőleg adagolt különböző PA-kezeléseket alkalmaztunk normál nevelési és stresszkörülmények között gabonanövényeken. Bár a PA-okat általában hasonló molekulák családjaként tekintik, a különböző PA-ok külsőleg adagolva eltérő vagy akár ellenkező hatásúak lehetnek, továbbá a hatásmechanizmusuk az alkalmazott növényfajtól is függ. Vizsgálataink során megcáfoltuk a korábban a PA-okról kialakult „minél több, annál jobb” elvet. A magasabbrendű PA-okkal (SPD és SPM) történt kezelések során, különösen a magasabb koncentrációk esetén, és búzával összehasonlítva, a kukoricában még inkább, a felhalmozódó PA-ok mennyisége összefüggésben volt a növények növekedésének gátlásával, a fotoszintetikus hatékonyság romlásával, az oxidatív stressz és a SA-felhalmozódás mértékével. A növények megpróbálták fenntartani az optimális PA arányt, ennek érdekében a PA-ciklus intenzíven működött mind a levelekben, mind a gyökerekben a búza- és a kukoricánövények esetében is, de különbségeket mutattunk ki a ciklus egyes lépéseinek intenzitásában. A PA-ok és az SA között megfigyelt pozitív kapcsolatok feltárása a PA-ok stresszkörülmények közötti szerepének és hatásmechanizmusainak mélyebb megértéséhez vezethetnek. Ugyanakkor a PUT-kezelés növényi növekedést és fotoszintézis serkentő hatása mellett, elő-kezelésként alkalmazva védelmet nyújtott az

ozmotikus stressz-szel szemben, de hatása kedvezőbb volt a búzanövények esetében, mint a kukoricában.

Bár bizonyos esetekben a PA-ok védelmet nyújtanak a nehézfémstressz során pl. búzanövényekben, de rizsben ugyanazon körülmények között alkalmazva a PUT fokozta a Cd-indukálta oxidatív stressz, sőt a legnagyobb mértékű PA-felhalmozódás a PUT-előkezelt növényekben együtt járt a Cd-stressz során tapasztalt csekély mértékű PC-szintézissel. A háttérben meghúzódó folyamatok vizsgálatához figyelembe kell venni, hogy a magasabbrendű PA-ok és PC-ok szintézise antagonista kapcsolatban állhat. Azonban az is lehetséges, hogy a PA-ok kelátképzőként a PA-Cd kötés révén csökkentik a PC-szintézis indukcióját (mind enzimatisz szinten, mind génexpressziós szinten). Ráadásul a PUT közvetlenül is hatással lehet a PCS génexpressziójára.

ABA- és PUT-kezelések összehasonlító vizsgálata során kimutattuk, hogy összefüggés van a PA-ok anyagcseréje és az ABA-jelátvitel között, ami a SPD- és SPM-tartalom szabályozott szinten való fenntartását eredményezte ozmotikus stressz alatt a búzanövényekben. Az ABA komplex módon befolyásolta a PA-metabolizmust, így a megjelenő PA-mintázat a transzkripciós szabályozás, másrészt a katabolizmus és/vagy a visszaalakulás eredményének megnyilvánulása mind kontroll körülmények között, mind ozmotikus stressz során. Annak ellenére, hogy az ABA és az ozmotikus stressz hasonló hatást gyakorolt a PA-készletre, különböző hatást fejtettek ki a prolinszintézisre. A prolin és a PA-ok szintézise részben függetlenül és nem antagonista módon szabályozott; emellett a PA-katabolizmus és a PA-ciklus is kapcsolatban lehet a prolinszintézissel.

Kutatásaink során igazoltuk a PA-metabolizmusban a PA-ciklus kulcsfontosságát. Eredményeinkből kitűnik, hogy a PA-ok metabolizmusa dinamikus. Az abszorbeált exogén PA-ok vagy a megnövekedett mennyiségű endogén PA-ok gyorsan átalakulhatnak egymásba a PA-ciklus során, és a ciklus egyes lépéseinek intenzitása különbözik a növényfajoktól, a szervektől és a stresszkörülményektől függően. Így a lehetséges kedvező hatás sem egyértelműen várható. A PA-készlet PA-cikluson keresztül megvalósuló finomhangolása lehet a kulcs a kedvező és kedvezőtlen hatások közötti egyensúly megteremtésére, és ami felelős lehet a különböző növényfajokban tapasztalt különbségekért. A PA-ok bioszintézisében és katabolizmusában részt vevő enzimekre tehát fontos szerepet játszanak. Kísérleteink során pl. kimutattuk, hogy a PUT-szintézis gátlása DFMO-val rizsben kedvező volt Cd-stressz során. Ugyanakkor, míg az apoplasztikus DAO/PAO enzimek hatékonyságát sokkal inkább a szubsztrátok mennyisége, mint a tényleges aktivitás változás befolyásolja, addig a perPAO génexpressziója érzékenyen reagált az alkalmazott kezelésekre.

A PA-ok védő hatása egyrészt molekuláris szinten, direkt módon valósulhat meg, de metabolizmusuk más vegyületek szintézisével (pl. prolin, és PC-ok) való összefüggése miatt összetett módon. Másrészt a PA-ok növényi hormonokkal (pl. SA és ABA) együttműködve, valamint a

microarray analízisünk során tapasztaltak alapján igazoltan a génexpressziós szinten kifejtett hatásuk által a jelátvitelben betöltött szerepe is mind hangsúlyosabb.

Az eredményektől azt reméljük, hogy a PA-metabolizmus szabályozásának megismerése új lehetőségeket mutat a gabonafélék környezeti változásokkal szembeni védelmében. A gyakorlati hasznosíthatóságát elsősorban abban látjuk, hogy alapot szolgáltathatnak jobb stresszellenállóságú haszonnövények előállításához, illetve ezen vegyületeknek mint stressztolerancia-serkentőknek, széleskörű, mezőgazdasági módszerként alkalmazásának kidolgozásához.

8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- Habár szoros, pozitív korrelációt találtunk a SA- és PA-szintek, valamint a PA-tartalom és az antioxidáns enzimaktivitások között, nem találtunk közvetlen összefüggést PA-szintek, azok változásai és a liztharmat-rezisztencia között búzanövényekben.
- Különböző fagytoleranciájú gabonafajok esetén kimutattuk, hogy a tavaszi zab fajtákban a hidegkezelés során hiányzik a SPD-felhalmozódás. A SPD-szint, flavonoidokkal, ABA-val, *t16*: 1-tal és APX-zal kimutatott szoros kapcsolata azt mutatja, hogy a SPD döntő szerepet játszhat a gabonafélék hideg akklimatizációs jelátviteli folyamataiban.
- A Cd-tolerancia mértéke a GSH/PC-metabolizmus eltérő intenzitásával volt összefüggésben búzanövényekben, azonban a PA-szintek változása csak a γ -EC-tartalommal mutatott összefüggést.
- Kimutattuk, hogy az UV-B sugárzás pozitív vagy negatív hatást is kifejthet ugyanolyan feltételek mellett a búzában, attól függően, hogy milyen típusú a másodlagos stresszfraktor. A védő hatás megléte, vagy hiánya pedig kapcsolatban volt a PA-tartalomban megfigyelt változásokkal.
- Bár az egyedi PA-szintek stressz-specifikus változást mutatta a hideg- és szárazságstressz során rizsnövényekben, a vártakkal ellentétben a PA-tartalom nem mutatott összefüggést a stressztolerancia mértékével, továbbá a PA-ok mennyiségi változásai nem mutattak kapcsolatot a SA-tartalommal sem.
- Ellentétben a PUT-nel, a magasabbrendű PA-ok (SPD és SPM) koncentrációfüggő módon káros hatást fejtett ki kukorica- és búzanövényekben is. A kukoricánövények érzékenyebbnak bizonyultak ezen káros hatással szemben, melynek hátterében a búzától eltérő PA-metabolizmus állt.
- A PUT-előkezelés védelmet nyújtott az ozmotikus stressz-szel szemben, mind kukorica-, mind búzanövényekben. A kedvező hatás összefüggésben volt a PA-tartalommal és metabolizmussal, valamint a SA-tartalom váltoásaival.
- A PUT-előkezelés fokozta, míg a PUT-szintézis gátlása csökkentette a Cd károsító hatását rizsnövényekben. A PUT gátolta a PC szintézist enzimatis és génexpressziós szinten is.
- A PA-metabolizmus és az ABA-jelátvitel között meglévő kapcsolat vezet a PA és a prolin szintjének megfelelő szinten szabályozott fenntartásához ozmotikus stressz körülmények között búzanövényekben.

9. FELHASZNÁLT IRODALOM

- Abreu M.E., Munné-Bosch S. (2008) Salicylic acid may be involved in the regulation of drought-induced leaf senescence in perennials: A case study in field-grown *Salvia officinalis* L. plants. *Environ Exp Bot* **64**:105–112.
- Ádám A.L., Bestwick C.S., Barna B., Mansfield J.W. (1995) Enzymes regulating the accumulation of active oxygen species during the hypersensitive reaction of bean to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Planta* **197**:240–249.
- Alcázar R., Altabella T., Marco F., Bortolotti C., Reymond M., Koncz C., Carrasco P., Tiburcio A. (2010) Polyamines: Molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta* **231**:1237–1249.
- Alcázar R., Bitrián M., Bartels D., Koncz C., Altabella T., Tiburcio A.F. (2011) Polyamine metabolic canalization in response to drought stress in *Arabidopsis* and the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Signal Behav* **6**:243–μ.
- Alcázar R., Cuevas J.C., Patron M., Altabella T., Tiburcio A.F. (2006) Absciscic acid modulates polyamine metabolism under water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* **128**:448–455.
- Alet A.I., Sanchez D.H., Cuevas J.C., del Valle S., Altabella T., Tiburcio A.F., Marco F., Ferrando A., Espasandín F.D., González M.E., Carrasco P., Ruiz O.A. (2011) Putrescine accumulation in *Arabidopsis thaliana* transgenic lines enhances tolerance to dehydration and freezing stress. *Plant Signal Behav* **6**:278–286.
- Ali R.M., Abbas H.M., Kamal R.K. (2009) The effects of treatment with polyamines on dry matter and some metabolites in salinity – stressed chamomile and sweet majoram seedlings. *Plant Soil Environ* **55**: 477–483.
- An Z., Jing W., Liu Y., Zhang W. (2008) Hydrogen peroxide generated by copper amine oxidase is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *J Exp Bot* **59**:815–825.
- An L.Z., Liu G.X., Zhang M.X., Chen T., Liu Y.H., Feng H.Y., Xu S.J., Qiang W.Y., Wang X.L. (2004) Effect of enhanced UV-B radiation on polyamine content and membrane permeability in cucumber leaves. *Russ J Plant Physl* **51**:658–662.
- Andronis E.A., Moschou P.N., Toumi I., Roubelakis-Angelakis K.A. (2014) Peroxisomal polyamine oxidase and NADPH-oxidase cross-talk for ROS homeostasis which affects respiration rate in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci* **5**:132.
- Anjum N.A., Hasanuzzaman M., Hossain M.A., Thangavel P., Roychoudhury A., Gill S.S., Rodrigo M.A.M., Adam V., Fujita M., Kizek R., Duarte A.C., Pereira E., Ahmad I. (2015) Jacks of metal/metalloid chelation trade in plants - an overview. *Front Plant Sci* **6**:192.
- Van Assche F., Clijsters H. (1990) Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ* **13**:195–206.
- Asthir B., Spoor W., Duffus C.M. (2004) Involvement of polyamines, diamine oxidase and polyamine oxidase in resistance of barley to *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Euphytica* **136**:307–312.
- Aurisano N., Bertani A., Mattana M., Reggiani R. (1993) Absciscic acid induced stress-like polyamine pattern in wheat seedlings, and its reversal by potassium ions. *Physiol Plant* **89**:687–692.
- Aziz A., Martin-Tanguy J., Larher F. (1998) Stress-induced changes in polyamine and tyramine levels can regulate proline accumulation in tomato leaf discs treated with sodium chloride. *Physiol Plant* **104**:195–202.
- Bakht J., Bano A., Dominy P. (2006) The role of abscisic acid and low temperature in chickpea (*Cicer arietinum*) cold tolerance. II. Effects on plasma membrane structure and function. *J Exp Bot* **57**:3707–3715.
- Ballaré C.L., Caldwell M.M., Flint S.D., Robinson S.A., Bornman J.F. (2011) Effects of solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. Patterns, mechanisms, and interactions with climate

- change. *Photoch Photobio Sci* **10**:226–241.
- Bandurska H., Cieślak M. (2013) The interactive effect of water deficit and UV-B radiation on salicylic acid accumulation in barley roots and leaves. *Environ Exp Bot* **94**:9–18.
- Bandurska H., Stroiński A. (2005) The effect of salicylic acid on barley response to water deficit. *Acta Physiol Plant* **27**:379–386.
- Baronas V.A., Kurata H.T. (2014) Inward rectifiers and their regulation by endogenous polyamines. *Front Physiol* **5**:325.
- Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* **39**:205–207.
- Baumann K. (2017) Stress Responses: Membrane-to-nucleus signals modulate plant cold tolerance. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**:276–277.
- Bhaskara G.B., Yang T.H., Verslues P.E. (2015) Dynamic proline metabolism: importance and regulation in water limited environments. *Front Plant Sci* **6**:484.
- Bodapati N., Gunawardena T., Fukai S. (2005) Increasing cold tolerance in rice by selecting for high polyamine and gibberellic acid content. *RIRDC*:27.
- Böddi B., Keresztes Á., Csapó B., Kovács J., Páldi E., Láng F. (1997) Differences in the etioplast ultrastructure and chlorophyll biosynthesis time course of cold tolerant and cold sensitive maize lines under cold treatment. *Maydica* **42**: 305–311.
- Brunetti P., Zanella L., De Paolis A., Di Litta D., Cecchetti V., Falasca G., Barbieri M., Altamura M.M., Costantino P., Cardarelli M. (2015) Cadmium-inducible expression of the ABC-type transporter AtABCC3 increases phytochelatin-mediated cadmium tolerance in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **66**:3815–3829.
- Bueno M., Matilla A. (1992) Absciscic acid increases the content of free polyamines and delays mitotic activity induced by spermine in isolated embryonic axes of chick-pea seeds. *Physiol Plant* **85**:531–536.
- Bunsupa S., Katayama K., Ikeura E., Oikawa A., Toyooka K., Saito K., Yamazaki M. (2012) Lysine decarboxylase catalyzes the first step of quinolizidine alkaloid biosynthesis and coevolved with alkaloid production in *Leguminosae*. *Plant Cell* **24**:1202–1216.
- von Caemmerer S., Farquhar G.D. (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* **153**:376–387.
- Cai Y., Cao F., Cheng W., Zhang G., Wu F. (2011) Modulation of exogenous glutathione in phytochelatin and photosynthetic performance against cd stress in the two rice genotypes differing in cd tolerance. *Biol Trace Elem Res* **143**:1159–1173.
- Çakmak T., Atici Ö. (2009) Effects of putrescine and low temperature on the apoplastic antioxidant enzymes in the leaves of two wheat cultivars. *Plant Soil Environ* **55**:320–326.
- Van Camp W., Van Montagu M., Inzé D. (1998) H₂O₂ and NO: Redox signals in disease resistance. *Trends Plant Sci* **3**:330–334.
- Capell T., Bassie L., Christou P. (2004) Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *PNAS* **101**:9909–9914.
- Chapman D.J., De-Felice J., Barber J. (1983) Growth temperature effects on thylakoid membrane lipid and protein content of pea chloroplasts. *Plant Physiol* **72**:225–8.
- Chen L.J., Xiang H.Z., Miao Y., Zhang L., Guo Z.F., Zhao X.H., Lin J.W., Li T.L. (2014) An overview of cold resistance in plants. *J Agron Crop Sci* **200**:237–245.
- Chen J., Zhou J., Goldsbrough P.B. (1997) Characterization of phytochelatin synthase from tomato. *Physiol Plant* **101**:165–172.
- Cheng J., Qiu H., Chang Z., Jiang Z., Yin W. (2016) The effect of cadmium on the growth and antioxidant response for freshwater algae *Chlorella vulgaris*. *SpringerPlus* **5**:1290.
- Chmielowska-Bąk J., Lefèvre I., Lutts S., Deckert J. (2013) Short term signaling responses in roots of young soybean seedlings exposed to cadmium stress. *J Plant Physiol* **170**:1585–1594.
- Choudhary S.P., Kanwar M., Bhardwaj R., Yu J.Q., Tran L.S.P. (2012) Chromium stress mitigation

- by polyamine-brassinosteroid application involves phytohormonal and physiological strategies in *Raphanus sativus* L. (K. Wu, Ed.). PLoS One 7:e33210.
- Christmann A., Weiler E.W., Steudle E., Grill E. (2007) A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. Plant J 52:167–174.
- Cobbett C.S. (2000) Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. Plant Physiol 123:825–832.
- Coghlan S.E., Walters D.R. (1990) Polyamine metabolism in ‘green-islands’ on powdery mildew-infected barley leaves: possible interactions with senescence. New Phytol 116:417–424.
- Cona A., Rea G., Angelini R., Federico R., Tavladoraki P. (2006) Functions of amine oxidases in plant development and defence. Trends Plant Sci 11:80–88.
- Cosio C., Martinoia E., Keller C. (2004) Hyperaccumulation of cadmium and zinc in *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri* at the leaf cellular level. Plant Physiol 134:716–725.
- Cowley T., Walters D.R. (2002) Polyamine metabolism in barley reacting hypersensitively to the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. Environment 25:461–468.
- Cuevas J.C., Lopez-Cobollo R., Alcazar R., Zarza X., Koncz C., Altabella T., Salinas J., Tiburcio A.F., Ferrando A. (2008) Putrescine is involved in Arabidopsis freezing tolerance and cold acclimation by regulating abscisic acid levels in response to low temperature. Plant Physiol 148:1094–1105.
- Czégény G., Mátaí A., Hideg É. (2016) UV-B effects on leaves-oxidative stress and acclimation in controlled environments. Plant Sci 248:57–63.
- Diao Q., Song Y., Shi D., Qi H. (2017) Interaction of polyamines, abscisic acid, nitric oxide, and hydrogen peroxide under chilling stress in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings. Front Plant Sci 8:203.
- Do P.T., Degenkolbe T., Erban A., Heyer A.G., Kopka J., Köhl K.I., Hinch D.K., Zuther E. (2013) Dissecting rice polyamine metabolism under controlled long-term drought stress (G.K. Pandey, Ed.). PLoS One 8:e60325.
- Do P.T., Drechsel O., Heyer A.G., Hinch D.K., Zuther E. (2014) Changes in free polyamine levels, expression of polyamine biosynthesis genes, and performance of rice cultivars under salt stress: a comparison with responses to drought. Front Plant Sci 5:182.
- Drazkiewicz M., Tukendorf A., Baszyński T. (2003) Age-dependent response of maize leaf segments to cadmium treatment: Effect on chlorophyll fluorescence and phytochelatin accumulation. J Plant Physiol 160:247–254.
- Esmer I., Tüney I., Özakça D.Ü., Sukatar A. (2017) Protective effects of polyamines against UV-A and UV-B illumination in *Physcia semipinnata thalli*. Bot Serb 41:17–24.
- Espasandin F.D., Maiale S.J., Calzadilla P., Ruiz O.A., Sansberro P.A. (2014) Transcriptional regulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) gene by putrescine accumulation positively modulates ABA synthesis and drought tolerance in *Lotus tenuis* plants. Plant Physiol Biochem 76:29–35.
- Fariduddin Q., Varshney P., Yusuf M., Ahmad A. (2013) Polyamines: potent modulators of plant responses to stress. J Plant Interac 8:1–16.
- Farooq M., Wahid A., Lee D.J., Cheema S.A., Aziz T. (2010) Comparative time course action of the foliar applied glycinebetaine, salicylic acid, nitrous oxide, brassinosteroids and spermine in improving drought resistance of rice. J Agron Crop Sci 196:336–345.
- Fedina I.S., Velitchkova M.Y. (2009) Physiological responses of higher plants to UV-B radiation. In: Climate Change and Crops. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 283–305.
- Finkelstein R. (2013) Abscisic acid synthesis and response. The Arabidopsis Book 11:e0166.
- Flores H.E., Galston A.W. (1984) Osmotic stress-induced polyamine accumulation in cereal leaves : I. Physiological parameters of the response. Plant Physiol 75:102–9.
- Foley S., Navaratnam S., McGarvey D.J., Land E.J., Truscott T.G., Rice-Evans C.A. (1999) Singlet oxygen quenching and the redox properties of hydroxycinnamic acids. Free Radic Biol Med

26:1202–1208.

- Fu G., Shen Z.X. (2017) Effects of enhanced UV-B radiation on plant physiology and growth on the Tibetan Plateau: a meta-analysis. *Acta Physiol Plant* **39**:85.
- Gallé Á., Csiszár J., Benyó D., Laskay G., Leviczky T., Erdei L., Tari I. (2013) Isohydic and anisohydic strategies of wheat genotypes under osmotic stress: Biosynthesis and function of ABA in stress responses. *J Plant Physiol* **170**:1389–1399.
- Gardiner D.M., Kazan K., Praud S., Torney F.J., Rusu A., Manners J.M. (2010) Early activation of wheat polyamine biosynthesis during *Fusarium* head blight implicates putrescine as an inducer of trichothecene mycotoxin production. *BMC Plant Biol* **10**:289.
- Gay C., Collins J., Gebicki J.M. (1999) Hydroperoxide assay with the ferric–xylenol orange complex. *Anal Biochem* **273**:149–155.
- Ghanta S., Datta R., Bhattacharyya D., Sinha R., Kumar D., Hazra S., Mazumdar A.B., Chattopadhyay S. (2014) Multistep involvement of glutathione with salicylic acid and ethylene to combat environmental stress. *J Plant Physiol* **171**:940–950.
- Ghosh N., Das S.P., Mandal C., Gupta S., Das K., Dey N., Adak M.K. (2012) Variations of antioxidative responses in two rice cultivars with polyamine treatment under salinity stress. *Physiol Mol Biol Plants* **18**:301–313.
- Gill S.S., Khan N.A., Tuteja N. (2011) Differential cadmium stress tolerance in five indian mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars: An evaluation of the role of antioxidant machinery. *Plant Sci* **6**:293–300.
- Gill S.S., Tuteja N. (2011) Cadmium stress tolerance in crop plants: probing the role of sulfur. *Plant Signal Behav* **6**:215–22.
- Glazebrook J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **43**:205–227.
- Gondor O.K., Janda T., Soós V., Pál M., Majláth I., Adak M.K., Balázs E., Szalai G. (2016a) Salicylic acid induction of flavonoid biosynthesis pathways in wheat varies by treatment. *Front Plant Sci* **7**:1447.
- Gondor O.K., Pál M., Darkó É., Janda T., Szalai G. (2016b) Salicylic acid and sodium salicylate alleviate cadmium toxicity to different extents in maize (*Zea mays* L.). *PLoS One* **11**:e0160157.
- Gondor O.K., Szalai G., Kovács V., Janda T., Pál M. (2014) Impact of UV-B on drought- or cadmium-induced changes in the fatty acid composition of membrane lipid fractions in wheat. *Ecotoxicol Environ Saf* **108**:129–134.
- Gondor O.K., Szalai G., Kovács V., Janda T., Pál M. (2016c) Relationship between polyamines and other cold-induced response mechanisms in different cereal species. *J Agron Crop Sci* **202**:217–230.
- Gould K.S., Lister C. (2006) Flavonoid functions in plants. In: *Flavonoids : chemistry, biochemistry, and applications*. CRC Press, pp 397–441.
- Greenland A.J., Lewis D.H. (1984) Amines in barley leaves infected by brown rust and their possible relevance to formation of ‘green islands’. *New Phytol* **96**:283–291.
- Grill E., Winnacker E.L., Zenk M.H. (1985) Phytochelatins: The principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* **230**:674–676.
- Groppa M.D., Benavides M.P., Tomaro M.L. (2003) Polyamine metabolism in sunflower and wheat leaf discs under cadmium or copper stress. *Plant Sci* **164**:293–299.
- Groppa M.D., Tomaro M.L., Benavides M.P. (2001) Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. *Plant Sci* **161**:481–488.
- Groppa M.D., Tomaro M.L., Benavides M.P. (2007) Polyamines and heavy metal stress: The antioxidant behavior of spermine in cadmium- and copper-treated wheat leaves. *BioMetals* **20**:185–195.
- Guo Z., Tan J., Zhuo C., Wang C., Xiang B., Wang Z. (2014) Absciscic 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 Biotech J* **12**:601–612.
- Gupta B., Gupta K., Sengupta D.N. (2012) Spermidine-mediated in vitro phosphorylation of transcriptional regulator OSBZ8 by SNF1-type serine/threonine protein kinase SAPK4 homolog in indica rice. *Acta Physiol Plant* **34**:1321–1336.
- Guthenberg C., Mannervik B. (1981) Glutathione S-transferase (transferase pi) from human placenta is identical or closely related to glutathione S-transferase (transferase rho) from erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* **661**:255–60.
- Guye M.G., Vigh L., Wilson J.M. (1986) Polyamine titre in relation to chill-sensitivity in *Phaseolus* sp. *J Exp Bot* **37**:1036–1043.
- Gzyl J., Rymer K., Gwózdź E.A. (2009) Differential response of antioxidant enzymes to cadmium stress in tolerant and sensitive cell line of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Acta Biochim Pol* **56**:723–727.
- Hall J.L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* **53**:1–11.
- Hamdani S., Yaakoubi H., Carpentier R. (2011) Polyamines interaction with thylakoid proteins during stress. *J Photochem Photobiol B* **104**:314–319.
- Han Y., Chaouch S., Mhamdi A., Queval G., Zechmann B., Noctor G. (2013) Functional analysis of *Arabidopsis* mutants points to novel roles for glutathione in coupling H₂O₂ to activation of salicylic acid accumulation and signaling. *Antioxid Redox Signal* **18**:2106–2121.
- Hao G., Ji H., Li Y., Shi R., Wang J., Feng L., Huang L. (2012) Exogenous ABA and polyamines enhanced salvianolic acids contents in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza* Bge. f. *alba*. *Plant OMICS* **5**:446–452.
- Harrach B.D., Fodor J., Pogány M., Preuss J., Barna B. (2008) Antioxidant, ethylene and membrane leakage responses to powdery mildew infection of near-isogenic barley lines with various types of resistance. *Eur J Plant Pathol* **121**:21–33.
- Hartung W., Sauter A., Hose E. (2002) Absciscic acid in the xylem: Where does it come from, where does it go to? *J Exp Bot* **53**:27–32.
- Hasan M.K., Ahammed G.J., Yin L., Shi K., Xia X., Zhou Y., Yu J., Zhou J. (2015) Melatonin mitigates cadmium phytotoxicity through modulation of phytochelatin biosynthesis, vacuolar sequestration, and antioxidant potential in *Solanum lycopersicum* L. *Front Plant Sci* **6**:601.
- Hassannejad S., Bernard F., Mirzajani F., Gholami M. (2012) SA improvement of hyperhydricity reversion in *Thymus daenensis* shoots culture may be associated with polyamines changes. *Plant Physiol Biochem* **51**:40–46.
- Hegedűs A., Erdei S., Horváth G. (2001) Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Sci* **160**:1085–1093.
- Herndon J.M., Hoisington R.D., Whiteside M. (2018) Deadly ultraviolet UV-C and UV-B penetration to Earth's surface: Human and environmental health implications. *EESRJ* **14**:1–11.
- Herrera-Vásquez A., Salinas P., Holuigue L. (2015) Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. *Front Plant Sci* **6**:171.
- Hideg É., Jansen M.A.K., Strid Å. (2013) UV-B exposure, ROS, and stress: Inseparable companions or loosely linked associates? *Trends Plant Sci* **18**:107–115.
- Hiraga S., Ito H., Yamakawa H., Ohtsubo N., Seo S., Mitsuhashi I., Matsui H., Honma M., Ohashi Y. (2000) An HR-induced tobacco peroxidase gene is responsive to spermine, but not to salicylate, methyl jasmonate, and ethephon. *MPMI* **13**:210–216.
- Horváth E., Pál M., Szalai G., Páldi E., Janda T. (2007) Exogenous 4-hydroxybenzoic acid and salicylic acid modulate the effect of short-term drought and freezing stress on wheat plants. *Biol Plant* **51**:480–487.
- Horváth E., Szalai G., Janda T. (2007) Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *J Plant Growth Regul* **26**:290–300.

- Hsu Y.T., Kao C.H. (2007) Cadmium-induced oxidative damage in rice leaves is reduced by polyamines. *Plant Soil* **291**:27–37.
- Huda A.K.M.N., Swaraz A.M., Reza M.A., Haque M.A., Kabir A.H. (2016) Remediation of chromium toxicity through exogenous salicylic acid in rice (*Oryza sativa* L.). *Water, Air, and Soil Pollution* **227**
- Huner N.P., Williams J.P., Maissan E.E., Myscich E.G., Krol M., Laroche A., Singh J. (1989) Low temperature-induced decrease in trans-delta-hexadecenoic acid content is correlated with freezing tolerance in cereals. *Plant Physiol* **89**:144–50.
- Iannelli M.A., Pietrini F., Fiore L., Petrilli L., Massacci A. (2002) Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants. *Plant Physiol Biochem* **40**:977–982.
- Iba K. (2002) Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annu Rev Plant Biol* **53**:225–245.
- Ioannidis N.E., Cruz J.A., Kotzabasis K., Kramer D.M. (2012) Evidence that putrescine modulates the higher plant photosynthetic proton circuit (S.M. Theg, Ed.). *PLoS One* **7**:e29864.
- Iqbal M., Ashraf M., Jamil A., Ur-Rehman S. (2006a) Does seed priming induce changes in the levels of some endogenous plant hormones in hexaploid wheat plants under salt stress? *J Integr Plant Biol* **48**:181–189.
- Iqbal M., Ashraf M., Rehman S.U., Rha E.S. (2006b) Does polyamine seed pretreatment modulate growth and levels of some plant growth regulators in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) plants under salt stress? *Bot Stud* **47**:239–250.
- Jain M., Nijhawan A., Tyagi A.K., Khurana J.P. (2006) Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* **345**:646–651.
- Janda T., Szalai G., Kissimon J., Paldi E., Marton C., Szigeti Z. (1994) Role of irradiance in the chilling injury of young maize plants studied by chlorophyll fluorescence induction measurements. *Photosynthetica* **30**:293–299.
- Janda T., Szalai G., Rios-Gonzalez K., Veisz O., Páldi E. (2003) Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. *Plant Sci* **164**:301–306.
- Janda T., Szalai G., Tari I., Páldi E. (1999) Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta* **208**:175–180.
- Jang E.K., Min K.H., Kim S.H., Nam S.H., Zhang S., Kim Y.C., Cho B.H., Yang K.Y. (2009) Mitogen-activated protein kinase cascade in the signaling for polyamine biosynthesis in tobacco. *Plant Cell Physiol* **50**:658–664.
- Janowiak F., Maas B., Dörffling K. (2002) Importance of abscisic acid for chilling tolerance of maize seedlings. *J Plant Physiol* **159**:635–643.
- Jiménez-Bremont J.F., Marina M., de la Luz Guerrero-González M., Rossi F.R., Sánchez-Rangel D., Rodríguez-Kessler M., Ruiz O.A., Gárriz A. (2014) Physiological and molecular implications of plant polyamine metabolism during biotic interactions. *Front Plant Sci* **5**:95.
- Jiménez-Bremont J.F., Ruiz O.A., Rodríguez-Kessler M. (2007) Modulation of spermidine and spermine levels in maize seedlings subjected to long-term salt stress. *Plant Physiol Biochem* **45**:812–821.
- Kacholi D.S., Sahu M. (2018) Levels and health risk assessment of heavy metals in soil, water, and vegetables of Dar es Salaam, Tanzania. *J Chem* **2018**:1–9.
- Kasukabe Y., He L., Nada K., Misawa S., Ihara I., Tachibana S. (2004) Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **45**:712–722.
- Kim T.E., Kim S.K., Han T.J., Lee J.S., Chang S.C. (2002) ABA and polyamines act independently in primary leaves of cold-stressed tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Physiol Plant* **115**:370–376.
- Király Z. (2004) Védekezési mechanizmusok az élővilágban. *Magyar Tudomány* **10**:1090.
- Kocsy G., von Ballmoos P., Rügsegger A., Szalai G., Galiba G., Brunold C. (2001) Increasing the

- glutathione content in a chilling-sensitive maize genotype using safeners increased protection against chilling-induced injury. *Plant Physiol* **127**:1147–56.
- Kocsy G., Kobrehel K., Szalai G., Duviau M.P., Buzás Z., Galiba G. (2004) Abiotic stress-induced changes in glutathione and thioredoxin h levels in maize. *Environ Exp Bot* **52**:101–112.
- Kohli S.K., Handa N., Gautam V., Bali S., Sharma A., Khanna K., Arora S., Thukral A.K., Ohri P., Karpets Y.V., Kolupaev Y.E., Bhardwaj R. (2017) ROS signaling in plants under heavy metal stress. In: *Reactive oxygen species and antioxidant systems in plants: Role and regulation under abiotic stress*. Springer Singapore, Singapore, pp 185–214.
- Komáromi J., Jankovics T., Fábrián A., Puskás K., Zhang Z., Zhang M., Li H., Jager K., Láng L., Vida G. (2015) Powdery mildew resistance in wheat cultivar Mv Hombár is conferred by a new gene, *PmHo*. *Phytopathology* **106**:1–9.
- Königshofer H., Tromballa H.W., Löppert H.G. (2008) Early events in signalling high-temperature stress in tobacco BY2 cells involve alterations in membrane fluidity and enhanced hydrogen peroxide production. *Plant Cell Environ* **31**:1771–1780.
- Korn M., Peterek S., Mock H.P., Heyer A.G., Hinch D.K. (2008) Heterosis in the freezing tolerance, and sugar and flavonoid contents of crosses between *Arabidopsis thaliana* accessions of widely varying freezing tolerance. *Plant Cell Environ* **31**:813–827.
- Kosová K., Prášil I.T., Vítámvás P., Dobrev P., Motyka V., Floková K., Novák O., Turečková V., Rolčík J., Pešek B., Trávníčková A., Gaudinová A., Galiba G., Janda T., Vlasáková E., Prášilová P., Vanková R. (2012) Complex phytohormone responses during the cold acclimation of two wheat cultivars differing in cold tolerance, winter Samanta and spring Sandra. *J Plant Physiol* **169**:567–576.
- Kotakis C., Theodoropoulou E., Tassis K., Oustamanolakis C., Ioannidis N.E., Kotzabasis K. (2014) Putrescine, a fast-acting switch for tolerance against osmotic stress. *J Plant Physiol* **171**:48–51.
- Kovács V., Gondor O.K., Szalai G., Darkó É., Majláth I., Janda T., Pál M. (2014a) Synthesis and role of salicylic acid in wheat varieties with different levels of cadmium tolerance. *J Hazard Mater* **280**:12–19.
- Kovács V., Gondor O.K., Szalai G., Majláth I., Janda T., Pál M. (2014b) UV-B radiation modifies the acclimation processes to drought or cadmium in wheat. *Environ Exp Bot* **100**:122–131.
- Kovács Z., Simon-Sarkadi L., Szűcs A., Kocsy G. (2010) Differential effects of cold, osmotic stress and abscisic acid on polyamine accumulation in wheat. *Amino Acids* **38**:623–631.
- Kovács V., Vida G., Szalai G., Janda T., Pál M. (2012) Relationship between biotic stress tolerance and protective compounds in wheat genotypes. *Acta Agron Hung* **60**:131–141.
- Krantev A., Yordanova R., Janda T., Szalai G., Popova L. (2008) Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. *J Plant Physiol* **165**:920–931.
- Krantev A., Yordanova R., Popova L. (2006) Salicylic acid decreases Cd toxicity in maize plants. *Gen Appl Plant Physiol*:45–52.
- Kruse O., Hankamer B., Konczak C., Gerle C., Morris E., Radunz A., Schmid G.H., Barber J. (2000) Phosphatidylglycerol is involved in the dimerization of photosystem II. *J Biol Chem* **275**:6509–6514.
- Kubiś J., Floryszak-Wieczorek J., Arasimowicz-Jelonek M. (2014) Polyamines induce adaptive responses in water deficit stressed cucumber roots. *Journal of Plant Research* **127**:151–158.
- Kumar D., Chapagai D., Dean P., Davenport M. (2015) Biotic and abiotic stress signaling mediated by salicylic acid. In: *Elucidation of abiotic stress signaling in plants: Functional genomics perspectives*. Springer New York, New York, NY, pp 329–346.
- Kuthanová A., Gemperlová L., Zelenková S., Eder J., Macháček I., Opatrný Z., Cvikrová M. (2004) Cytological changes and alterations in polyamine contents induced by cadmium in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiol Biochem* **42**:149–156.
- Kuznetsov V. V., Shevyakova N.I. (2007) Polyamines and Stress Tolerance of Plants. *Plant Stress* **1**:50–71.

- Lagriffoul A., Mocquot B., Mench M., Vangronsveld J. (1998) Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.). *Plant Soil* **200**:241–250.
- Lakra N., Mishra S.N., Singh D.B., Tomar P.C. (2006) Exogenous putrescine effect on cation concentration in leaf of *Brassica juncea* seedlings subjected to Cd and Pb along with salinity stress. *J Environ Biol* **27**:263–269
- Lata C., Prasad M. (2011) Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *J Exp Bot* **62**:4731–4748.
- Lee T.M. (1997) Polyamine regulation of growth and chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) roots cultured in vitro. *Plant Sci* **122**:111–117.
- Lee Y.P., Babakov A., de Boer B., Zuther E., Hinch D.K. (2012) Comparison of freezing tolerance, compatible solutes and polyamines in geographically diverse collections of *Thellungiella* sp. and *Arabidopsis thaliana* accessions. *BMC Plant Biol* **12**:131.
- Lee T.-M., Lur H.-S., Chu C. (1997) Role of abscisic acid in chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. II. Modulation of free polyamine levels. *Plant Sci* **126**:1–10.
- Li X., Cai J., Liu F., Dai T., Cao W., Jiang D. (2014) Exogenous abscisic acid application during grain filling in winter wheat improves cold tolerance of offspring's seedlings. *J Agron Crop Sci* **200**:467–478.
- Li Z., Peng Y., Zhang X.Q., Pan M.H., Ma X., Huang L.K., Yan Y.H. (2014) Exogenous spermidine improves water stress tolerance of white clover (*Trifolium repens* L.) involved in antioxidant defence, gene expression and proline metabolism. *Plant OMICS* **7**:517–526.
- Lightfoot H.L., Hall J. (2014) Endogenous polyamine function - The RNA perspective. *Nucleic Acids Res* **42**:11275–11290.
- Linskens H.F., Jackson J.F. (1987) High performance liquid chromatography in plant sciences. Springer Berlin Heidelberg.
- Liu H.P., Dong B.H., Zhang Y.Y., Liu Z.P., Liu Y.L. (2004) Relationship between osmotic stress and the levels of free, conjugated and bound polyamines in leaves of wheat seedlings. *Plant Sci* **166**:1261–1267.
- Liu T., Kim D.W., Niitsu M., Berberich T., Kusano T. (2014) *Oryza sativa* polyamine oxidase 1 back-converts tetraamines, spermine and thermospermine, to spermidine. *Plant Cell Rep* **33**:143–151.
- Liu J.H., Kitashiba H., Wang J., Ban Y., Moriguchi T. (2007) Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. *Plant Biotech* **24**:117–126.
- Liu S., Lv Z., Liu Y., Li L., Zhang L. (2018) Network analysis of ABA-dependent and ABA-independent drought responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Genet Mol Res* **41**:624–637
- Liu J.-H., Wang W., Wu H., Gong X., Moriguchi T. (2015) Polyamines function in stress tolerance: from synthesis to regulation. *Front Plant Sci* **6**:827.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**:402–408.
- Lomozik L., Gasowska A., Bregier-Jarzebowska R., Jastrzab R. (2005a) Coordination chemistry of polyamines and their interactions in ternary systems including metal ions, nucleosides and nucleotides. *Coord Chem Rev* **249**:2335–2350.
- López-Climent M.F., Arbona V., Pérez-Clemente R.M., Zandalinas S.I., Gómez-Cadenas A. (2014) Effect of cadmium and calcium treatments on phytochelatin and glutathione levels in citrus plants. *Plant Biology* **16**:79–87.
- Luo M. (2002) Gene expression profiling related to powdery mildew resistance in wheat with the method of suppression subtractive hybridization. *Chin Sci Bull* **47**:1990.
- Majer P., Czégény G., Sándor G., Dix P.J., Hideg É. (2014) Antioxidant defence in UV-irradiated tobacco leaves is centred on hydrogen-peroxide neutralization. *Plant Physiol Biochem* **82**:239–243.
- Majláth I., Szalai G., Janda T. (2011) Exploration of cold signalling related to ascorbate and salicylic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Acta Biol Szeged* **55**:117–118.

- Majumdar R., Barchi B., Turlapati S.A., Gagne M., Minocha R., Long S., Minocha S.C. (2016) Glutamate, ornithine, arginine, proline, and polyamine metabolic interactions: The pathway is regulated at the post-transcriptional Level. *Front Plant Sci* **7**:78.
- Mandal C., Ghosh N., Maiti S., Das K., Gupta S., Dey N., Adak M.K. (2013) Antioxidative responses of *Salvinia* (*Salvinia natans* Linn.) to aluminium stress and its modulation by polyamine. *Physiol Mol Biol Plants* **19**:91–103.
- Mapelli S., Brambilla I.M., Radyukina N.L., Ivanov Y. V, Kartashov A. V, Reggiani R., Kuznetsov V. V (2008) Free and bound polyamines changes in different plants as a consequence of UV-B light irradiation. *Gen Appl Plant Physiol* **34**:55–66.
- Marcinińska I., Czyczyło-Mysza I., Skrzypek E., Grzesiak M.T., Janowiak F., Filek M., Dziurka M., Dziurka K., Waligórski P., Juzoń K., Cyganek K., Grzesiak S. (2013) Alleviation of osmotic stress effects by exogenous application of salicylic or abscisic acid on wheat seedlings. *Int J Mol Sci* **14**:13171–13193.
- Marco F., Alcázar R., Tiburcio A.F., Carrasco P. (2011) Interactions between polyamines and abiotic stress pathway responses unraveled by transcriptome analysis of polyamine overproducers. *OMICS* **15**:775–781.
- Martel A.B., Qaderi M.M. (2016) Does salicylic acid mitigate the adverse effects of temperature and ultraviolet-B radiation on pea (*Pisum sativum*) plants? *Environ Exp Bot* **122**:39–48.
- Melotto M., Underwood W., Koczan J., Nomura K., He S.Y. (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**:969–980.
- Mendoza-Cózatl D., Loza-Tavera H., Hernández-Navarro A., Moreno-Sánchez R. (2005) Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiol Rev* **29**:653–671.
- Métraux J.P. (2002) Recent breakthroughs in the study of salicylic acid biosynthesis. *Trends Plant Sci* **7**:332–334.
- Metwally A., Finkemeier I., Georgi M., Dietz K.-J. (2003) Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiol* **132**:272–81.
- Meuwly P., Métraux J.P. (1993) Ortho-anisic acid as internal standard for the simultaneous quantitation of salicylic acid and its putative biosynthetic precursors in cucumber leaves. *Anal Biochem* **214**:500–505.
- Meuwly P., Rauser W.E. (1992) Alteration of thiol pools in roots and shoots of maize seedlings exposed to cadmium adaptation and developmental cost. *Plant Physiol* **99**:8–15.
- Minocha R., Majumdar R., Minocha S.C. (2014) Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship1. *Front Plant Sci* **5**:175.
- Mishra S., Srivastava S., Tripathi R.D., Govindarajan R., Kuriakose S. V., Prasad M.N.V. (2006) Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiol Biochem* **44**:25–37.
- Miura K., Furumoto T. (2013) Cold signaling and cold response in plants. *Int J Mol Sci* **14**:5312–5337.
- Miura K., Okamoto H., Okuma E., Shiba H., Kamada H., Hasegawa P.M., Murata Y. (2013) SIZ1 deficiency causes reduced stomatal aperture and enhanced drought tolerance via controlling salicylic acid-induced accumulation of reactive oxygen species in *Arabidopsis*. *Plant J* **73**:91–104.
- Montilla-Bascón G., Rubiales D., Altabella T., Prats E. (2016) Free polyamine and polyamine regulation during pre-penetration and penetration resistance events in oat against crown rust (*Puccinia coronata* f. sp. *avenae*). *Plant Pathol* **65**:392–401.
- Moschou P.N., Paschalidis K.A., Delis I.D., Andriopoulou A.H., Lagiotis G.D., Yakoumakis D.I., Roubelakis-Angelakis K.A. (2008) Spermidine exodus and oxidation in the apoplast induced by abiotic stress is responsible for H₂O₂ signatures that direct tolerance responses in tobacco. *Plant Cell* **20**:1708–1724.
- Moschou P.N., Roubelakis-Angelakis K.A. (2014) Polyamines and programmed cell death. *J Exp*

- Bot **65**:1285–1296.
- Munier B., Bendell L.I. (2018) Macro and micro plastics sorb and desorb metals and act as a point source of trace metals to coastal ecosystems. PLoS One **13**:e0191759.
- Murata N., Ishizaki-Nishizawa O., Higashi S., Hayashi H., Tasaka Y., Nishida I. (1992) Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants. Nature **356**:710–713.
- Nägele T., Kandel B.A., Frana S., Meißner M., Heyer A.G. (2011) A systems biology approach for the analysis of carbohydrate dynamics during acclimation to low temperature in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Journal **278**:506–518.
- Nayyar H., Kaur S., Smita, Singh K.J., Dhir K.K., Bains T. (2005) Water stress-induced injury to reproductive phase in chickpea: Evaluation of stress sensitivity in wild and cultivated species in relation to abscisic acid and polyamines. J Agron Crop Sci **191**:450–457.
- Németh M., Janda T., Horváth E., Páldi E., Szalai G. (2002) Exogenous salicylic acid increases polyamine content but may decrease drought tolerance in maize. Plant Sci **162**:569–574.
- Pál M., Gondor O., Janda T. (2013) Role of salicylic acid in acclimation to low temperature. Acta Agron Hung **61**:161–172.
- Pál M., Horváth E., Janda T., Páldi E., Szalai G. (2005) Cadmium stimulates the accumulation of salicylic acid and its putative precursors in maize (*Zea mays*) plants. Physiol Plant **125**:356–364.
- Pál M., Horváth E., Janda T., Páldi E., Szalai G. (2006) The effect of cadmium stress on phytochelatin, thiol and polyamine content in maize. Cereal Res Commun **34**:65–68.
- Pál M., Janda T. (2017) Role of polyamine metabolism in plant pathogen interactions. Plant Sci Phytopathol **1**:95–100.
- Pál M., Janda T., Szalai G. (2011) Absciscic acid may alter the salicylic acid-related abiotic stress response in maize. J Agron Crop Sci **197**:368–377.
- Pál M., Janda T., Szalai G. (2018a) Interactions between plant hormones and thiol-related heavy metal chelators. Plant Growth Regul **85**:173–185.
- Pál M., Kovács V., Szalai G., Soós V., Ma X., Liu H., Mei H., Janda T. (2014) Salicylic acid and abiotic stress responses in rice. J Agron Crop Sci **200**:1–11.
- Pál M., Kovács V., Vida G., Szalai G., Janda T. (2013) Changes induced by powdery mildew in the salicylic acid and polyamine contents and the antioxidant enzyme activities of wheat lines. Eur J Plant Pathol **135**:35–47.
- Pál M., Leskó K., Janda T., Páldi E., Szalai G. (2007) Cadmium-induced changes in the membrane lipid composition of maize plants. Cereal Res Commun **35**:1631–1642.
- Pál M., Majláth I., Németh E., Hamow K.Á., Szalai G., Rudnóy S., Balassa G., Janda T. (2018b) The effects of putrescine are partly overlapping with osmotic stress processes in wheat. Plant Sci **268**:67–76.
- Pál M., Szalai G., Horváth E., Janda T., Páldi E. (2002) Effect of salicylic acid during heavy metal stress. Acta Biol Szeged **46**:119–120.
- Pál M., Szalai G., Janda T. (2015) Speculation: Polyamines are important in abiotic stress signaling. Plant Sci **237**:16–23.
- Pál M., Szalai G., Kovács V., Gondor O.K., Janda T. (2013) Salicylic Acid-Mediated Abiotic Stress Tolerance. In: Salicylic Acid. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 183–247.
- Pál M., Tajti J., Szalai G., Peeva V., Végh B., Janda T. (2018c) Interaction of polyamines, abscisic acid and proline under osmotic stress in the leaves of wheat plants. Sci Rep **8**: 12839.
- Pandolfi C., Pottosin I., Cuin T., Mancuso S., Shabala S. (2010) Specificity of polyamine effects on nacl-induced ion flux kinetics and salt stress amelioration in plants. Plant Cell Physiol **51**:422–434.
- Paolacci A.R., Tanzarella O.A., Porceddu E., Ciaffi M. (2009) Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. BMC Mol Biol **10**:11.
- Paradiso A., Berardino R., De Pinto M.C., Sanità Di Toppi L., Storelli M.M., Tommasi F., De Gara L. (2008) Increase in ascorbate-glutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cadmium in durum wheat plants. Plant Cell Physiol **49**:362–374.

- Parmar P., Kumari N., Sharma V. (2013) Structural and functional alterations in photosynthetic apparatus of plants under cadmium stress. *Bot Stud* **54**:45.
- Parvaiz A., Ashwani K., Aditi G., Xiangyang H., Khalid U.R.H., Mohamed Mahgoub A., Satyawati S. (2012) Polyamines: Role in plants under abiotic stress. In: *Crop Production for Agricultural Improvement*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 491–512.
- Parvin S., Lee O.R., Sathiyaraj G., Khorolragchaa A., Kim Y.J., Yang D.C. (2014) Spermidine alleviates the growth of saline-stressed ginseng seedlings through antioxidative defense system. *Gene* **537**:70–78.
- Paschalidis K.A., Toumi I., Moschou P.N., Roubelakis-Angelakis K.A. (2010) ABA-dependent amine oxidases-derived H₂O₂ affects stomata conductance. *Plant Signal Behav* **5**:1153–1156.
- Pathak M.R., Teixeira da Silva J.A., Wani S.H. (2014) Polyamines in response to abiotic stress tolerance through transgenic approaches. *GM Crops Food* **5**:87–96.
- Pillai M.A., Akiyama T. (2004) Differential expression of an S-adenosyl-L-methionine decarboxylase gene involved in polyamine biosynthesis under low temperature stress in japonica and indica rice genotypes. *Mol Genet Genomics* **271**:141–149.
- de Pinto M.C., Locato V., de Gara L. (2012) Redox regulation in plant programmed cell death. *Plant Cell Environ* **35**:234–244.
- Popova L.P., Maslenkova L.T., Yordanova R.Y., Ivanova A.P., Krantev A.P., Szalai G., Janda T. (2009) Exogenous treatment with salicylic acid attenuates cadmium toxicity in pea seedlings. *Plant Physiol Biochem* **47**:224–231.
- Pottosin I., Shabala S. (2014) Polyamines control of cation transport across plant membranes: implications for ion homeostasis and abiotic stress signaling. *Front Plant Sci* **5**:154.
- Pottosin I., Velarde-Buendía A.M., Bose J., Fuglsang A.T., Shabala S. (2014) Polyamines cause plasma membrane depolarization, activate Ca²⁺, and modulate H-ATPase pump activity in pea roots. *J Exp Bot* **65**:2463–2472.
- Prabhavathi V.R., Rajam M.V. (2007) Polyamine accumulation in transgenic eggplant enhances tolerance to multiple abiotic stresses and fungal resistance. *Plant Biotech* **24**:273–282.
- Rabbani M.A., Maruyama K., Abe H., Khan M.A., Katsura K., Ito Y., Yoshiwara K., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2003) Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiol* **133**:1755–1767.
- Radhakrishnan R., Lee I.J. (2013) Regulation of salicylic acid, jasmonic acid and fatty acids in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by spermidine promotes plant growth against salt stress. *Acta Physiol Plant* **35**:3315–3322.
- Rahdari P., Hoseini S.M. (2013) Roll of poly amines (spermidine and putrescine) on protein , chlorophyll and phenolic compounds in wheat (*Triticum aestivum* L .) under salinity stress. *J Nov Appl Sci* **2**:746–751.
- Rahimzadeh M.R., Rahimzadeh M.R., Kazemi S., Moghadamnia A.A. (2017) Cadmium toxicity and treatment: An update. *Caspian Journal of Internal Medicine* **8**:135–145.
- Raskin I., Skubatz H., Tang W., Meeuse B.J.D. (1990) Salicylic acid levels in thermogenic and non-thermogenic plants. *Ann Bot* **66**:369–373.
- Rauser W.E. (2003) Phytochelatin-based complexes bind various amounts of cadmium in maize seedlings depending on the time of exposure, the concentration of cadmium and the tissue. *New Phytol* **158**:269–278.
- Rauser W.E., Meuwly P. (1995) Retention of cadmium in roots of maize seedlings. Role of complexation by phytochelatins and related thiol peptides. *Plant Physiol* **109**:195–202.
- Rizzini L., Favory J.J., Cloix C., Faggionato D., O'Hara A., Kaiserli E., Baumeister R., Schäfer E., Nagy F., Jenkins G.I., Ulm R. (2011) Perception of UV-B by the *Arabidopsis* UVR8 protein. *Science* **332**:103–106.
- Romero F.M., Maiale S.J., Rossi F.R., Marina M., Ruíz O.A., Gárriz A. (2018) Polyamine

- metabolism responses to biotic and abiotic stress. In: *Methods Mol Biol*. pp 37–49.
- Rosales E.P., Iannone M.F., Groppa M.D., Benavides M.P. (2012) Polyamines modulate nitrate reductase activity in wheat leaves: Involvement of nitric oxide. *Amino Acids* **42**:857–865.
- Saari E.E., Prescott J.M. (1975) A scale for appraising the foliar intensity of wheat diseases. *Plant Disease Reporter* **59**: 377–380
- Saha J., Brauer E.K., Sengupta A., Popescu S.C., Gupta K., Gupta B. (2015) Polyamines as redox homeostasis regulators during salt stress in plants. *Front Env Sci Eng* **3**:21.
- Sanità Di Toppi L., Gabbriellini R. (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environ Exp Bot* **41**:105–130.
- Sasheva P., Yordanova R., Janda T., Szalai G., Maslenskova L. (2013) Study of primary photosynthetic reactions in winter wheat cultivars after cold hardening and freezing. Effect of salicylic acid. *Bulg J Agric Sci* **19**:45–48
- Schmidt U. (2003) Enhancing phytoextraction: The effect of chemical soil manipulation on mobility, plant accumulation, and leaching of heavy metals. *J Environ Qual* **32**:1939–1954.
- Scott I.M., Clarke S.M., Wood J.E., Mur L.A.J. (2004) Salicylate accumulation inhibits growth at chilling temperature in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **135**:1040–9.
- Sewelam N., Kazan K., Schenk P.M. (2016) Global plant stress signaling: Reactive oxygen species at the cross-road. *Front Plant Sci* **7**:187.
- Sfichi L., Ioannidis N., Kotzabasis K. (2004) Thylakoid-associated polyamines adjust the UV-B sensitivity of the photosynthetic apparatus by means of light-harvesting complex II changes. *Photoch Photobio Sci* **80**:499.
- Shah K., Kumar R.G., Verma S., Dubey R.S. (2001) Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Sci* **161**:1135–1144.
- Shan C., Dai H., Sun Y. (2012) Hydrogen sulfide protects wheat seedlings against copper stress by regulating the ascorbate and glutathione metabolism in leaves. *Aust J Crop Sci* **6**:248–254.
- Shen G., Zhu C., Du Q. (2010) Genome-wide identification of PHYTOCHELATIN and PHYTOCH _ SYNTH domain-containing phytochelatin family from rice. *Electron J Biol* **6**:73–79.
- Shevyakova N.I., Musatenko L.I., Stetsenko L.A., Rakitin V.Y., Vedenicheva N.P., Kuznetsov V. V. (2013) Effect of ABA on the contents of proline, polyamines, and cytokinins in the common ice plants under salt stress. *Russ J Plant Physl* **60**:741–748.
- Shi H., Chan Z. (2014) Improvement of plant abiotic stress tolerance through modulation of the polyamine pathway. *J Integr Plant Biol* **56**:114–121.
- Smith J., Burritt D., Bannister P. (2001) Ultraviolet-B radiation leads to a reduction in free polyamines in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Growth Regul* **35**:289–294.
- Smith I.K., Vierheller T.L., Thorne C.A. (1988) Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal Biochem* **175**:408–413.
- Souza J.F., Rauser W.E. (2003) Maize and radish sequester excess cadmium and zinc in different ways. *Plant Sci* **165**:1009–1022.
- Stolt J.P., Sneller F.E.C., Bryngelsson T., Lundborg T., Schat H. (2003) Phytochelatin and cadmium accumulation in wheat. *Environ Exp Bot* **49**:21–28.
- Strasdeit H., Duhme A.K., Kneer R., Zenk M.H., Hermes C., Nolting H.F. (1991) Evidence for discrete Cd(SCys)₄ units in cadmium phytochelatin complexes from EXAFS spectroscopy. *J Chem Soc, Chem Commun* **0**:1129–1130.
- Su G.X., Bai X. (2008) Contribution of putrescine degradation to proline accumulation in soybean leaves under salinity. *Biol Plant* **52**:796–799.
- Szabados L., Savaouré A. (2010) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci* **15**:89–97.
- Szalai G., Janda T., Bartók T., Páidi E. (1997) Role of light in changes in free amino acid and polyamine contents at chilling temperature in maize (*Zea mays*). *Physiol Plant* **101**:434–438.
- Szalai G., Janda K., Darkó É., Janda T., Peeva V., Pál M. (2017) Comparative analysis of polyamine

- metabolism in wheat and maize plants. *Plant Physiol Biochem* **112**:239–250.
- Szalai G., Janda T., Golan-goldhirsh A., Páldi E. (2002) Effect of Cd treatment on phytochelatin synthesis in maize. *Acta Biologica Szegediensis* **46**:121–122.
- Szalai G., Janda T., Pál M. (2014) Routine sample preparation and HPLC analysis for ascorbic acid (vitamin C) determination in wheat plants and *Arabidopsis* leaf tissues. *Acta Biol Hung* **65**:205–217.
- Szalai G., Janda T., Páldi E., Dubacq J.P. (2001) Changes in the fatty acid unsaturation after hardening in wheat chromosome substitution lines with different cold tolerance. *J Plant Physiol* **158**:663–666.
- Szalai G., Krantev A., Yordanova R., Popova L.P., Janda T. (2013) Influence of salicylic acid on phytochelatin synthesis in *Zea mays* during Cd stress. *Turk J Bot* **37**:708–714.
- Szalai G., Majláth I., Pál M., Gondor O.K., Rudnóy S., Oláh C., Vanková R., Kalapos B., Janda T. (2018) Janus-faced nature of light in the cold acclimation processes of maize. *Front Plant Sci* **9**:1–17.
- Szalai G., Pap M., Janda T. (2009) Light-induced frost tolerance differs in winter and spring wheat plants. *J Plant Physiol* **166**:1826–1831.
- Szepesi Á., Gémes K., Orosz G., Peto A., Takács Z., Vorák M., Tari I. (2011) Interaction between salicylic acid and polyamines and their possible roles in tomato hardening processes. *Acta Biol Szeged* **55**:165–166.
- Tajti J., Janda T., Majláth I., Szalai G., Pál M. (2018) Comparative study on the effects of putrescine and spermidine pre-treatment on cadmium stress in wheat. *Ecotoxicol Environ Saf* **148**:546–554.
- Takács Z., Poór P., Tari I. (2016) Comparison of polyamine metabolism in tomato plants exposed to different concentrations of salicylic acid under light or dark conditions. *Plant Physiol Biochem* **108**:266–278.
- Takahashi Y., Berberich T., Miyazaki A., Seo S., Ohashi Y., Kusano T. (2003) Spermine signalling in tobacco: Activation of mitogen-activated protein kinases by spermine is mediated through mitochondrial dysfunction. *Plant J* **36**:820–829.
- Takahashi Y., Cong R., Sagor G.H.M., Niitsu M., Berberich T., Kusano T. (2010) Characterization of five polyamine oxidase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* **29**:955–965.
- Talieva M.N., Kondrat'eva V. V. (2002) Influence of exogenous salicylic acid on the level of phytohormones in tissues of *Phlox paniculata* and *Phlox setacea* leaves with special reference to resistance against the powdery mildew causative agent *Erysiphe cichoracearum* D.C. f. *phlogis* Jacz. *Izv Akad Nauk Ser Biol* **6**:674–678.
- Tang C.F., Liu Y.G., Zeng G.M., Li X., Xu W.H., Li C.F., Yuan X.Z. (2005) Effects of exogenous spermidine on antioxidant system responses of *Typha latifolia* L. under Cd²⁺ stress. *Journal of Integrative Plant Biology* **47**:428–434.
- Tanou G., Ziogas V., Belghazi M., Christou A., Filippou P., Job D., Fotopoulos V., Molassiotis A. (2014) Polyamines reprogram oxidative and nitrosative status and the proteome of citrus plants exposed to salinity stress. *Plant Cell Environ* **37**:864–885.
- Tarhan L., Kavakcioglu B. (2016) Glutathione metabolism in *Urtica dioica* in response to cadmium based oxidative stress. *Biol Plant* **60**:163–172.
- Tari I., Jolán C., Gallé Á., Bajkán S., Szepesi Á., Vashegyi I. (2003) Élettani megközelítések gazdasági növényeink szárazságtűrésének genetikai transzformációval történő javítására. *Botanikai Közlemények* **90**:139–158.
- Theocharis A., Clément C., Barka E.A. (2012) Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta* **235**:1091–1105.
- Thomas J.C., Perron M., Davies E.C. (2004) Genetic responsiveness to copper in the Ice Plant, *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Sci* **167**:259–266.
- Tiburcio A.F., Altabella T., Bitrián M., Alcázar R. (2014) The roles of polyamines during the lifespan of plants: From development to stress. *Planta* **240**:1–18.
- Tisi A., Federico R., Moreno S., Lucretti S., Moschou P.N., Roubelakis-Angelakis K.A., Angelini R.,

- Cona A. (2011) Perturbation of polyamine catabolism can strongly affect root development and xylem differentiation. *Plant Physiol* **157**:200–215.
- Tukendorf A., Rauser W.E. (1990) Changes in glutathione and phytochelatins in roots of maize seedlings exposed to cadmium. *Plant Sci* **70**:155–166.
- Tun N.N., Santa-Catarina C., Begum T., Silveira V., Handro W., Segal Floh E.I., Scherer G.F.E. (2006) Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Physiol* **47**:346–354.
- Upchurch R.G. (2008) Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnol Lett* **30**:967–977.
- Vandenbussche F., Yu N., Li W., Vanhaelewyn L., Hamshou M., Van Der Straeten D., Smagghe G. (2018) An ultraviolet B condition that affects growth and defense in *Arabidopsis*. *Plant Sci* **268**:54–63.
- Vanhaelewyn L., Prinsen E., Van Der Straeten D., Vandenbussche F. (2016) Hormone-controlled UV-B responses in plants. *J Exp Bot* **67**:4469–4482.
- Velikova V.B., Edreva A.M., Tsonev T.D., Jones H.G. (2007) Singlet oxygen quenching by phenylamides and their parent compounds. *Z Naturforsch C* **62**:833–838.
- Verslues P.E., Sharma S. (2010) Proline Metabolism and Its Implications for Plant-Environment Interaction. *Arabidopsis Book*. 2010; 8: e0140.
- Vishwakarma K., Upadhyay N., Kumar N., Yadav G., Singh J., Mishra R.K., Kumar V., Verma R., Upadhyay R.G., Pandey M., Sharma S. (2017) Absciscic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: A review on current knowledge and future prospects. *Front Plant Sci* **08**:161.
- Vojtechov M., Lebllov S. (1991) Uptake of lead and cadmium by maize seedlings and the effect of heavy metals on the activity of phosphoenolpyruvate carboxylase isolated from maize. *Biol Plant* **33**:386–394.
- Walters D.R., Wilson P.W.F., Shuttleton M.A. (1985) Relative changes in levels of polyamines and activities of their biosynthetic enzymes in barley infected with the powdery mildew fungus, *Erysiphe graminis* d.c. ex *merat* f.sp. *hordei marchal*. *New Phytol* **101**:695–705.
- Wang X., Cai X., Xu C., Wang Q., Dai S. (2016) Drought-responsive mechanisms in plant leaves revealed by proteomics. *Int J Mol Sci* **17**
- Wang D.H., Li X.X., Su Z.K., Ren H.X. (2009) The role of salicylic acid in response of two rice cultivars to chilling stress. *Biol Plant* **53**:545–552.
- Wang J., Sun P.P., Chen C.L., Wang Y., Fu X.Z., Liu J.H. (2011) An arginine decarboxylase gene *PtADC* from *Poncirus trifoliata* confers abiotic stress tolerance and promotes primary root growth in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **62**:2899–2914.
- Wang W., Vinocur B., Altman A. (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218**:1–14.
- Wang X., Zhang Y. (2012) Regulation of salicylic acid on polyamine synthesis under NaCl stress in leaves of the yali pear. *Res J Appl Sci Eng Technol* **4**:3704–3708.
- Wen X.P., Ban Y., Inoue H., Matsuda N., Moriguchi T. (2010) Spermidine levels are implicated in heavy metal tolerance in a spermidine synthase overexpressing transgenic European pear by exerting antioxidant activities. *Transgenic Res* **19**:91–103.
- Wildermuth M.C., Dewdney J., Wu G., Ausubel F.M. (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**:562–565.
- Wimalasekera R., Tebartz F., Scherer G.F.E. (2011) Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Sci* **181**:593–603.
- Wimalasekera R., Villar C., Begum T., Scherer G.F.E. (2011) COPPER AMINE OXIDASE1 (CuAO1) of *Arabidopsis thaliana* contributes to abscisic acid- and polyamine-induced nitric oxide biosynthesis and abscisic acid signal transduction. *Mol Plant* **4**:663–678.
- Xiong H., Guo H., Xie Y., Zhao L., Gu J., Zhao S., Li J., Liu L. (2017) RNAseq analysis reveals pathways and candidate genes associated with salinity tolerance in a spaceflight-induced wheat

- mutant. *Sci Rep* **7**:2731.
- Xiong L., Schumaker K.S., Zhu J.-K. (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* **14**:S165–S183.
- Xue B., Zhang A., Jiang M. (2009) Involvement of polyamine oxidase in abscisic acid-induced cytosolic antioxidant defense in leaves of maize. *J Integr Plant Biol* **51**:225–234.
- Yadav S.K. (2010a) Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agron Sustain Dev* **30**:515–527.
- Yadav S.K. (2010b) Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatin in heavy metal stress tolerance of plants. *S Afr J Bot* **76**:167–179.
- Yamaguchi K., Takahashi Y., Berberich T., Imai A., Miyazaki A., Takahashi T., Michael A., Kusano T. (2006) The polyamine spermine protects against high salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **580**:6783–6788.
- Yang Y., Qi M., Mei C. (2004) Endogenous salicylic acid protects rice plants from oxidative damage caused by aging as well as biotic and abiotic stress. *Plant J* **40**:909–919.
- Yang B., Wu J., Gao F., Wang J., Su G. (2014) Polyamine-induced nitric oxide generation and its potential requirement for peroxide in suspension cells of soybean cotyledon node callus. *Plant Physiol Biochem* **79**:41–47.
- Yang J., Zhang J., Liu K., Wang Z., Liu L. (2007) Involvement of polyamines in the drought resistance of rice. *J Exp Bot* **58**:1545–1555.
- Ye B., Muller H.H., Zhang J., Gressel J. (1997) Constitutively elevated levels of putrescine and putrescine-generating enzymes correlated with oxidant stress resistance in *Conyza bonariensis* and Wheat. *Plant Physiol* **115**:1443–1451.
- You J., Chan Z. (2015) ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants. *Front Plant Sci* **6**:1092.
- Yun I.S., Hwang I.D., Moon B.Y., Kwon Y.M. (1997) Effect of spermine on the phytochelatin concentration and composition in cadmium-treated roots of *Canavalia lineata* seedlings. *J Plant Biol* **40**:275–278.
- Zacchini M., Iori V., Mugnozza G.S., Pietrini F., Massacci A. (2011) Cadmium accumulation and tolerance in *Populus nigra* and *Salix alba*. *Biol Plant* **55**:383–386.
- Zadoks J.C., Chang T.T., Konzak C.F. (1974) A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res* **14**:415–421.
- Zagorchev L., Seal C.E., Kranner I., Odjakova M. (2013) A central role for thiols in plant tolerance to abiotic stress. *Int J Mol Sci* **14**:7405–7432.
- Zapata P.J., Serrano M., Pretel M.T., Amorós A., Botella M.Á. (2004) Polyamines and ethylene changes during germination of different plant species under salinity. *Plant Sci* **167**:781–788.
- Zeid I.M., Shedeed Z.A. (2007) Alterations in nitrogen metabolites after putrescine treatment in alfalfa under drought stress. *Pak J Biol Sci* **10**:1513–1518.
- Zhang Y. (2013) *Ascorbic Acid in Plants*. Springer New York, New York, NY.
- Zhang W., Jiang B., Li W., Song H., Yu Y., Chen J. (2009) Polyamines enhance chilling tolerance of cucumber (*Cucumis sativus* L.) through modulating antioxidative system. *Sci Hortic* **122**:200–208.
- Zhao Y. (2011) Cadmium accumulation and antioxidative defenses in leaves of *Triticum aestivum* L. and *Zea mays* L. *Afr J Biotechnol* **10**:2936–2943.
- Zhao H., Yang H. (2008) Exogenous polyamines alleviate the lipid peroxidation induced by cadmium chloride stress in *Malus hupehensis* Rehd. *Scientia Horticulturae* **116**:442–447.
- Zhu J.K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* **53**:247–73.
- Zlatev Z.S., J. C. Lidon F., Kaimakanova M. (2012) Plant physiological responses to UV-B radiation. *Emir J Food Agric* **24**:481–501.
- Zuk-Golaszewska K. (2003) The effect of UV-B radiation on plant growth and development. *Plant Soil Environ* **49**:135–140.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönet illeti az MTA ATK Mezőgazdasági Intézet vezetőségét, hogy lehetővé tették a munka elvégzését.

Köszönetem Dr. Páldi Emilnek, hogy friss diplomásként bizalmat szavazott nekem. Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Szalai Gabriella volt témavezetőmnek, akinek segítségére, tanácsaira és támogatására még mindig számíthatok.

Külön köszönet Dr. Janda Tibornak a PhD utáni munkám során nyújtott segítségéért, valamint az értekezés alapos átnézéséért.

Köszönöm volt doktoranduszaimnak, Dr. Kovács Viktóriának és Tajti Juditnak a segítségét a kísérletes munkák egy részében.

Köszönöm közvetlen munkatársaimnak Dr. Darkó Évának, Dr. Gondor Orsolya Kingának, Dr. Majláth Imrének munkájukat egy-egy részfeladat során.

Külön köszönet illeti Kövesdi Ferencné, Kóti Gyulánét†, Janicskáné Oláh Tímeát, akikre mindig számíthattam és segítségük nélkül ez a munka talán el sem készülhetett volna.

Köszönetemet fejezem ki mindazoknak a munkatársaknak, akik bármilyen formában segítették a munkámat.

Köszönöm szüleimnek, hogy lehetővé tették számomra, hogy tanuljak és folyamatosan motiváltak céljaim elérésében.

Ajánlom Rékának és Regőnek.

FÜGGELÉK

Függelék 1. táblázat A szabad és konjugált poliamin-tartalmak (putreszcin: PUT, kadavarin: KAD, spermidin: SPD, spermin: SPM), a szabad és kötött szalicilsav-tartalom (SA), valamint a glutation-reduktáz (GR), glutation-S-transzferáz (GST), aszkorbát-peroxidáz (APX), kataláz (KAT) és gvajakol-peroxidáz (G-POD) enzimek aktivitás értékeinek korrelációanalízise lisztharmatfertőzött búzanövények esetén. A szignifikáns korrelációs kapcsolatok vastagon kiemelve.

	szabad SA	kötött SA	GR	GST	KAT	APX	G-POD	szabad PUT	konj. PUT	szabad KAD	konj. KAD	szabad SPD	konj. SPD	szabad SPM	konj. SPM
szabad SA	1														
kötött SA	0,708	1													
GR	0,635	0,404	1												
GST	0,339	0,552	0,651	1											
KAT	0,377	0,196	0,783	0,495	1										
APX	0,249	0,365	0,581	0,807	0,622	1									
G-POD	0,157	-0,049	0,498	0,589	0,554	0,654	1								
szabad PUT	0,494	0,065	0,754	0,202	0,722	0,234	0,404	1							
konj. PUT	0,588	0,178	0,803	0,236	0,725	0,228	0,309	0,967	1						
szabad KAD	0,110	0,066	0,632	0,598	0,790	0,547	0,623	0,663	0,612	1					
konj. KAD	-0,302	-0,157	-0,107	0,171	0,296	0,032	0,163	-0,114	-0,179	0,405	1				
szabad SPD	0,658	0,432	0,891	0,642	0,758	0,670	0,602	0,812	0,808	0,677	-0,152	1			
konj. SPD	0,534	0,370	0,800	0,653	0,570	0,708	0,698	0,628	0,618	0,545	-0,327	0,899	1		
szabad SPM	0,697	0,411	0,661	0,245	0,422	0,246	0,046	0,386	0,486	0,055	-0,272	0,462	0,375	1	
konj. SPM	0,561	0,428	0,630	0,327	0,535	0,492	0,167	0,443	0,549	0,178	-0,413	0,608	0,509	0,631	1

Függelék 2. táblázat. A szabad és kötött szalicilsav- (SA), a poliamin- (putreszcin: PUT, kadavarin: KAD, spermidin: SPD, spermin: SPM), az abszcizinsav- (ABA) és a szabad és kötött flavonoid-tartalmak, a glutation-reduktáz (GR), glutation-S-transzferáz (GST), aszskorbát-peroxidáz (APX), kataláz (KAT) és gvajakol-peroxidáz (G-POD) enzimek aktivitás értékeinek, valamint a monogalaktozil-diacilglicerol (MGDG), digalaktozil-diacilglicerol (DGDG), foszfatidil-etanolamin (PE) és foszfatidil-glicerol (PG) lipid frakció kettős kötés index (DBI) értékeinek és a *transz*- Δ^3 -hexadekánsav-tartalom (t16:1) korrelációanalízise kontroll körülmények között eltérő fagytoleranciájú gabonanövényekben. A szignifikáns korrelációs kapcsolatok $P \leq 0,05$ szignifikancia szinten vastagon kiemelve.

	szabad SA	kötött SA	szabad oHCA	kötött oHCA	PUT	KAD	SPD	SPM	GR	GST	KAT	APX	G-POD	DBI MGDG	DBI DGDG	DBI PE	DBI PG	t16:1	szabad rutin	kötött rutin	szabad miricetin	kötött miricetin	szabad kvercetin	kötött kvercetin	ABA
szabad SA	1																								
kötött SA	0,57	1																							
szabad oHCA	0,22	0,83	1																						
kötött oHCA	0,18	0,73	0,94	1																					
PUT	-0,09	0,07	0,24	0,39	1																				
KAD	0,44	0,71	0,69	0,79	0,11	1																			
SPD	-0,31	-0,69	-0,79	-0,58	0,18	-0,37	1																		
SPM	-0,28	-0,51	-0,68	-0,62	-0,66	-0,27	0,50	1																	
GR	-0,15	-0,62	-0,71	-0,43	0,05	-0,23	0,86	0,60	1																
GST	-0,03	-0,54	-0,48	-0,21	0,56	-0,24	0,65	0,00	0,74	1															
KAT	-0,31	-0,69	-0,68	-0,43	0,30	-0,44	0,80	0,40	0,90	0,87	1														
APX	-0,29	-0,56	-0,70	-0,85	-0,65	-0,62	0,24	0,69	0,10	-0,22	0,07	1													
G-POD	0,32	0,33	0,08	-0,21	-0,82	-0,02	-0,50	0,22	-0,52	-0,82	-0,69	0,50	1												
DBI MGDG	0,09	-0,15	-0,47	-0,27	-0,21	0,21	0,63	0,73	0,73	0,25	0,47	0,17	-0,11	1											
DBI DGDG	-0,03	-0,24	-0,57	-0,49	-0,05	0,00	0,69	0,55	0,48	0,15	0,31	0,41	-0,05	0,80	1										
DBI PE	0,46	0,48	0,29	0,39	0,76	0,37	0,07	-0,58	0,01	0,36	0,09	-0,66	-0,45	0,09	0,18	1									
DBI PG	-0,17	0,23	0,08	0,16	-0,38	0,40	0,09	0,61	0,21	-0,37	-0,02	0,07	-0,34	0,69	0,41	-0,16	1								
t16:1	0,31	-0,24	-0,41	-0,57	-0,05	-0,53	0,17	-0,19	-0,09	0,11	-0,05	0,31	0,27	-0,45	-0,28	0,31	-0,38	1							
szabad rutin	0,08	-0,02	-0,24	-0,24	-0,83	0,00	0,04	0,77	0,30	-0,32	0,03	0,36	0,52	0,51	0,11	-0,55	0,66	-0,24	1						
kötött rutin	0,32	0,81	0,88	0,96	0,44	0,85	-0,51	-0,59	-0,37	-0,16	-0,39	-0,86	-0,22	-0,10	-0,29	0,58	0,22	-0,55	-0,25	1					
szabad miricetin	0,43	0,92	0,93	0,86	0,03	0,77	-0,84	-0,50	-0,66	-0,54	-0,71	-0,58	0,26	-0,26	-0,44	0,27	0,23	-0,45	-0,01	0,86	1				
kötött miricetin	0,66	0,17	-0,26	-0,29	-0,38	0,27	0,19	0,25	0,11	-0,13	-0,22	0,23	0,45	0,49	0,59	0,14	0,11	0,41	0,26	-0,13	-0,04	1			
szabad kvercetin	-0,33	-0,08	-0,16	0,06	0,47	-0,02	0,51	0,22	0,55	0,45	0,65	-0,22	-0,63	0,53	0,40	0,43	0,46	-0,51	0,00	0,18	-0,17	-0,32	1		
kötött kvercetin	-0,58	-0,68	-0,51	-0,34	0,02	-0,22	0,46	0,55	0,53	0,42	0,59	0,41	-0,43	0,40	0,38	-0,31	0,22	-0,42	0,02	-0,35	-0,48	-0,27	0,40	1	
ABA	0,55	0,29	-0,14	-0,10	-0,60	0,33	0,03	0,56	0,29	-0,19	-0,03	0,14	0,46	0,71	0,37	-0,03	0,62	-0,17	0,80	0,04	0,18	0,63	0,07	-0,12	1

Függelék 3. táblázat. A szabad és kötött szalicilsav- (SA), a poliamin- (putreszcin: PUT, kadavarin: KAD, spermidin: SPD, spermin: SPM), az abszcizinsav- (ABA) és a szabad és kötött flavonoid-tartalmak, a glutation-reduktáz (GR), glutation-S-transzferáz (GST), aszskorbát-peroxidáz (APX), kataláz (KAT) és gvajakol-peroxidáz (G-POD) enzimek aktivitás értékeinek, valamint a monogalaktozil-diacilglicerol (MGDG), digalaktozil-diacilglicerol (DGDG), foszfatidil-etanolamin (PE) és foszfatidil-glicerol (PG) lipid frakció kettős kötés index (DBI) értékeinek és a *transz*- Δ^3 -hexadekánsav-tartalom (t16:1) korrelációanalízise 12 napos 5 °C-os kezelést követően eltérő fagytoleranciájú gabonanövényekben. A szignifikáns korrelációs kapcsolatok $P \leq 0,05$ szignifikancia szinten vastagon kiemelve.

	szabad SA	kötött SA	szabad oHCA	kötött oHCA	PUT	KAD	SPD	SPM	GR	GST	KAT	APX	G-POD	DBI MGDG	DBI DGDG	DBI PE	DBI PG	t16:1	szabad rutin	kötött rutin	szabad miricetin	kötött miricetin	szabad kvercetin	kötött kvercetin	ABA
szabad SA	1																								
kötött SA	0,35	1																							
szabad oHCA	0,62	0,39	1																						
kötött oHCA	-0,18	0,65	-0,37	1																					
PUT	-0,32	-0,57	-0,64	-0,19	1																				
KAD	0,22	0,11	0,02	-0,11	0,47	1																			
SPD	-0,14	-0,01	-0,70	0,56	0,22	0,15	1																		
SPM	-0,43	-0,31	-0,86	0,37	0,49	0,17	0,77	1																	
GR	-0,58	-0,43	-0,73	0,04	0,77	0,30	0,22	0,74	1																
GST	-0,33	-0,44	-0,35	-0,24	0,61	-0,08	-0,36	0,17	0,70	1															
KAT	-0,74	-0,15	-0,68	0,42	0,28	-0,07	0,32	0,76	0,79	0,40	1														
APX	-0,23	0,09	-0,65	0,56	0,12	0,19	0,95	0,74	0,23	-0,41	0,39	1													
G-POD	0,12	0,34	-0,02	0,40	-0,51	-0,05	0,64	0,17	-0,46	-0,89	-0,10	0,72	1												
DBI MGDG	-0,33	0,10	-0,69	0,48	0,17	0,24	0,42	0,72	0,77	0,45	0,73	0,51	-0,12	1											
DBI DGDG	-0,44	-0,54	-0,77	-0,08	0,58	0,09	0,27	0,68	0,85	0,70	0,60	0,30	-0,36	0,76	1										
DBI PE	0,13	-0,77	-0,32	-0,51	0,62	-0,05	0,03	0,33	0,42	0,59	0,04	-0,15	-0,47	0,12	-0,62	1									
DBI PG	-0,33	0,17	-0,59	0,55	0,01	0,45	0,77	0,78	0,49	-0,24	0,62	0,88	0,49	0,68	0,36	-0,24	1								
t16:1	0,29	-0,17	0,38	-0,56	0,16	-0,09	-0,81	-0,54	0,02	0,68	-0,33	-0,86	-0,84	-0,14	0,12	0,43	-0,77	1							
szabad rutin	0,19	0,53	-0,11	0,72	-0,51	-0,11	0,63	0,40	-0,19	-0,57	0,25	0,65	0,74	0,26	-0,21	-0,33	0,56	-0,71	1						
kötött rutin	0,20	0,59	-0,17	0,76	-0,27	0,10	0,73	0,22	-0,34	-0,71	-0,09	0,71	0,78	0,11	-0,33	-0,49	0,52	-0,74	0,75	1					
szabad miricetin	0,27	0,19	0,55	-0,06	-0,86	-0,48	-0,07	-0,42	-0,82	-0,74	-0,41	-0,03	0,64	-0,69	-0,71	-0,36	-0,26	-0,45	0,39	0,25	1				
kötött miricetin	-0,32	0,24	-0,55	0,80	-0,09	-0,17	0,83	0,54	0,00	-0,47	0,36	0,79	0,67	0,23	-0,06	-0,35	0,61	-0,61	0,69	0,81	0,16	1			
szabad kvercetin	-0,15	-0,52	-0,62	0,04	0,35	0,06	0,82	0,68	0,21	-0,26	0,16	0,71	0,49	0,09	0,33	0,39	0,47	-0,35	0,27	0,36	0,04	0,56	1		
kötött kvercetin	-0,46	0,19	-0,79	0,82	0,15	-0,08	0,83	0,74	0,37	-0,10	0,63	0,85	0,45	0,68	0,38	-0,20	0,78	-0,37	0,61	0,64	-0,21	0,86	0,47	1	
ABA	0,29	0,37	-0,20	0,58	-0,16	0,14	0,81	0,28	-0,34	-0,73	-0,19	0,73	0,80	0,00	-0,28	-0,27	0,47	-0,73	0,70	0,95	0,28	0,77	0,57	0,56	1

Függelék 4. táblázat. A levélben mért poliamin- (putreszcin: PUT, spermidin: SPD, spermin: SPM), szabad és kötött szalicilsav- (SA), glutation- (GSH), aszkorbát-tartalom (AA) és a γ -glutamil-cisztein (γ -EC), valamint a fitokelatin-szint (PC₂ és PC₃) és fitokelatin szintáz-aktivitás (PCS) értékeinek korreláció elemzése 7 napos 50 μ M kadmiumkezelést követően. A szignifikáns korrelációs kapcsolatok $P \leq 0,05$ szignifikancia szinten vastagon kiemelve.

	PUT	SPD	SPM	szabad SA	kötött SA	GSH	γ -EC	PC2	PC3	PCS	AA
PUT	1										
SPD	0,347	1									
SPM	-0,208	0,543	1								
szabad SA	0,543	-0,113	-0,354	1							
kötött SA	0,722	-0,058	-0,408	0,789	1						
GSH	-0,228	-0,103	-0,008	-0,09	0,015	1					
γ -EC	0,527	0,058	-0,382	0,471	0,504	0,271	1				
PC2	0,271	0,068	0,105	-0,077	0,258	-0,274	-0,186	1			
PC3	0,127	-0,199	-0,04	-0,065	-0,025	-0,284	-0,016	0,195	1		
PCS	0,663	-0,076	-0,627	0,806	0,851	-0,049	0,666	0,065	0,052	1	
AA	-0,214	0,259	0,778	-0,493	-0,44	-0,082	-0,42	0,254	0,204	-0,7	1

Függelék 5. táblázat. A gyökérben mért poliamin- (putreszcin: PUT, spermidin: SPD, spermin: SPM), szabad és kötött szalicilsav- (SA), glutation- (GSH), aszkorbát-tartalom (AA) és a γ -glutamil-cisztein (γ -EC), valamint a fitokelatin-szint (PC₂ és PC₃) és fitokelatin szintáz-aktivitás (PCS) értékeinek korreláció elemzése 7 napos 50 μ M kadmiumkezelést követően. A szignifikáns korrelációs kapcsolatok $P \leq 0,05$ szignifikancia szinten vastagon kiemelve.

	PUT	SPD	SPM	szabad SA	kötött SA	GSH	γ -EC	PC2	PC3	PCS	AA
PUT	1										
SPD	-0,399	1									
SPM	-0,478	0,874	1								
szabad SA	0,12	-0,229	-0,183	1							
kötött SA	0,222	-0,14	-0,167	0,515	1						
GSH	-0,01	0,023	0,083	-0,149	0,15	1					
γ -EC	0,524	-0,327	-0,316	0,284	0,485	0,338	1				
PC2	0,699	-0,247	-0,286	0,394	0,472	0,144	0,616	1			
PC3	0,51	-0,198	-0,239	0,495	0,578	0,189	0,573	0,875	1		
PCS	0,461	0,007	-0,092	0,351	0,505	0,049	0,364	0,796	0,923	1	
AA	0,324	-0,28	-0,224	0,601	0,651	0,238	0,741	0,624	0,747	0,544	1

Függelék 6. táblázat. A poliamin- (putreszcin: PUT, kadavarin: KAD, spermidin: SPD, spermin: SPM), szabad és kötött szalicilsav-tartalom (SA) értékeinek korreláció elemzése 50 μ M kadmium vagy 15%-os PEG-kezelést követően normál megvilágítási viszonyok között vagy kiegészítő UV-B sugárzás mellett a búzánövények levelében illetve gyökerében. A szignifikáns korrelációs kapcsolatok $P \leq 0,05$ szignifikancia szinten vastagon kiemelve.

		PUT	KAD	SPD	SPM	szabad SA	kötött SA
levél	PUT	1					
	KAD	0,77	1				
	SPD	-0,44	0,072	1			
	SPM	-0,894	-0,689	0,727	1		
	szabad SA	0,643	0,404	0,235	-0,275	1	
	kötött SA	0,691	0,529	0,099	-0,465	0,776	1
gyökér	PUT	1					
	KAD	0,631	1				
	SPD	0,587	0,873	1			
	SPM	0,238	0,521	0,76	1		
	szabad SA	0,468	0,836	0,776	0,665	1	
	kötött SA	0,388	0,717	0,588	0,416	0,943	1

Függelék 7. táblázat. Rizsnövények levelében mért poliamin (putreszcin: PUT, spermidin: SPD, spermin: SPM), szabad és kötött szalicilsav-tartalom (SA) értékeinek korreláció elemzése 15%-os PEG vagy 10 °C-os hidegkezelést követően. A szignifikáns korrelációs kapcsolatok $P \leq 0,05$ szignifikancia szinten vastagon kiemelve.

	szabad SA	kötött SA	PUT	SPD	SPM
szabad SA	1				
kötött SA	0,77	1			
PUT	0,097	-0,027	1		
SPD	0,104	0,054	0,924	1	
SPM	0,238	0,27	-0,625	-0,643	1

Függelék 8. táblázat A poliamin- (putreszcin: PUT, spermidin: SPD, spermin: SPM) szabad (sz), konjugált (k) formában, illetve a szabad és kötött szalicilsav-tartalom (szSA és kSA) értékeinek korreláció elemzése 7 napos, 0,5 mM putreszcin-, spermidine- és spermin-kezelés követően búzanövények levelében (L) és gyökerében (Gy). A szignifikáns korrelációs kapcsolatok $P \leq 0,05$ szignifikancia szinten vastagon kiemelve.

	szSA L	szSA Gy	kSA L	kSA Gy	szPUT L	kPUT L	szPUT Gy	kPUT Gy	szSPD L	kSPD L	szSPD Gy	kSPD Gy	szSPM L	kSPM L	szSPM Gy	kSPM Gy
szSA L	1															
szSA Gy	-0,040	1														
kSA L	0,706	0,024	1													
kSA Gy	0,086	0,378	0,450	1												
szPUT L	0,689	0,478	0,523	0,046	1											
kPUT L	0,539	0,620	0,506	0,167	0,961	1										
szPUT Gy	-0,219	-0,025	0,049	-0,104	0,215	0,263	1									
kPUT Gy	-0,378	0,004	-0,064	-0,169	0,128	0,185	0,982	1								
szSPD L	0,544	0,266	0,307	-0,369	0,885	0,776	0,227	0,190	1							
kSPD L	0,146	0,111	0,066	-0,243	0,560	0,499	0,614	0,615	0,620	1						
szSPD Gy	0,355	0,606	0,550	0,693	0,549	0,623	-0,120	-0,177	0,247	-0,022	1					
kSPD Gy	0,439	0,375	0,599	0,618	0,513	0,535	-0,137	-0,203	0,264	0,007	0,957	1				
szSPM L	0,563	0,473	0,666	0,648	0,707	0,738	0,107	0,007	0,392	0,215	0,932	0,920	1			
kSPM L	0,459	0,546	0,634	0,687	0,668	0,729	0,109	0,024	0,345	0,188	0,956	0,923	0,992	1		
szSPM Gy	0,622	-0,007	0,569	0,386	0,387	0,312	-0,435	-0,520	0,236	-0,139	0,717	0,859	0,695	0,654	1	
kSPM Gy	0,328	0,765	0,453	0,362	0,781	0,857	-0,017	-0,042	0,590	0,233	0,863	0,770	0,808	0,839	0,5	1

Függelék 9. táblázat A poliaminok (putreszcin: PUT, spermidin: SPD, spermin: SPM) szabad (sz), konjugált (k) formában, illetve a szabad és kötött szalicilsav-tartalom (szSA és kSA) értékeinek korreláció elemzése 7 napos, 0,5 mM putreszcin-, spermidine- és spermin-kezelés követően kukoricanövények levelében (L) és gyökerében (Gy). A szignifikáns korrelációs kapcsolatok $P \leq 0,05$ szignifikancia szinten vastagon kijelölve.

	<i>szSA L</i>	<i>szSA Gy</i>	<i>kSA L</i>	<i>kSA Gy</i>	<i>szPUT L</i>	<i>kPUT L</i>	<i>szPUT Gy</i>	<i>kPUT Gy</i>	<i>szSPD L</i>	<i>kSPD L</i>	<i>szSPD Gy</i>	<i>kSPD Gy</i>	<i>szSPM L</i>	<i>kSPM L</i>	<i>szSPM Gy</i>	<i>kSPM Gy</i>
<i>szSA L</i>	1															
<i>szSA Gy</i>	0,885	1														
<i>kSA L</i>	0,861	0,875	1													
<i>kSA Gy</i>	0,335	0,152	0,262	1												
<i>szPUT L</i>	0,922	0,823	0,934	0,594	1											
<i>kPUT L</i>	0,941	0,857	0,937	0,247	0,993	1										
<i>szPUT Gy</i>	0,365	0,253	0,322	0,790	0,754	0,296	1									
<i>kPUT Gy</i>	0,699	0,806	0,761	0,559	0,747	0,743	0,963	1								
<i>szSPD L</i>	0,437	0,466	0,498	0,388	0,589	0,489	0,652	0,807	1							
<i>kSPD L</i>	-0,291	-0,298	-0,412	-0,261	-0,438	-0,338	-0,132	-0,086	0,271	1						
<i>szSPD Gy</i>	0,632	0,725	0,693	0,596	0,828	0,654	0,785	0,929	0,710	-0,1	1					
<i>kSPD Gy</i>	0,449	0,674	0,537	0,502	0,622	0,437	0,701	0,841	0,632	0,097	0,929	1				
<i>szSPM L</i>	0,043	0,137	0,047	0,579	0,232	-0,017	0,817	0,720	0,591	0,231	0,665	0,731	1			
<i>kSPM L</i>	-0,206	-0,177	-0,237	0,188	-0,129	-0,188	0,337	0,037	0,058	0,31	0,309	0,397	0,658	1		
<i>szSPM Gy</i>	0,672	0,272	0,603	0,436	0,853	0,714	0,406	0,504	0,353	-0,497	0,357	0,039	-0,06	-0,25	1	
<i>kSPM Gy</i>	0,706	0,328	0,609	0,445	0,891	0,711	0,39	0,515	0,414	-0,438	0,32	0,02	-0,07	-0,372	0,974	1

Függelék 10. táblázat A poliamin- (putreszcin: PUT, spermidin: SPD, spermin: SPM), az abszcizinsav- (ABA), 1,3-diaminopropán- (DAP) és prolintartalom, a diamin-oxidáz (DAO) és poliamin-oxidáz (PAO) enzim aktivitásainak, valamint a poliamin-szintézis enzim gének (ODC: ornitin dekarboxiláz, ADC: arginin dekarboxiláz, SPDS: spermidin szintáz, SAMDC: S-adenilmetionin dekarboxiláz), a prolinszintézis enzim gének (*P5CS*: pirrolin-5-karboxilát szintáz, *OAT*: ornitin aminotranszferáz) és a peroxisómális poliamin oxidáz enzim (*perPAO*) gének expressziós szintjének értékeinek korreláció elemzése abszcizinsav, putreszcin, polietilén-glikol, illetve ezek kombinációjával történt kezelések után búzanövényekben. A szignifikáns korrelációs kapcsolatok $P \leq 0,05$ szignifikancia szinten vastagon kijelölve.

	PUT	SPD	SPM	DAP	DAO	apoPAO	ADC	ODC	SPDS	SAMDC	perPAO	ABA	NCED	prolin	P5CS	OAT
PUT	1															
SPD	-0,445	1														
SPM	-0,104	0,112	1													
DAP	0,216	0,221	-0,411	1												
DAO	0,047	-0,118	0,114	-0,325	1											
apoPAO	0,0005	0,409	-0,14	0,245	-0,434	1										
ADC	0,073	0,124	-0,499	0,746	-0,436	0,287	1									
ODC	0,203	-0,183	-0,08	-0,261	0,619	-0,269	-0,384	1								
SPDS	0,489	-0,115	-0,379	0,225	0,028	0,073	0,046	0,312	1							
SAMDC	-0,065	0,154	-0,667	0,666	-0,44	0,334	0,641	-0,355	0,017	1						
perPAO	0,649	-0,526	0,19	0,115	0,147	-0,366	-0,249	0,403	0,536	-0,312	1					
ABA	0,478	-0,526	-0,493	0,412	-0,331	0,196	0,578	-0,079	0,193	0,555	0,221	1				
NCED	0,447	-0,236	-0,216	0,128	0,1	0,135	0,126	0,153	-0,018	0,185	0,118	0,315	1			
prolin	0,467	-0,653	-0,058	0,175	0,238	-0,233	0,199	0,248	-0,015	-0,087	0,487	0,513	0,134	1		
P5CS	0,071	0,061	-0,572	0,69	-0,138	0,333	0,749	-0,085	0,039	0,783	-0,112	0,523	0,535	0,181	1	
OAT	0,259	-0,291	-0,731	0,128	-0,238	0,425	0,389	-0,078	0,269	0,423	-0,236	0,727	0,102	0,078	0,222	1