

XXXI. OTDK Biológia Szekció

Az S-metilmetionin (SMM) hatása kukoricában és paradicsomban hidegstressz esetén

Szerzők: Páldi Katalin és Ludman Márta

Szak, évfolyam: Biológia MSc – 1. és 2. évfolyam

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar

Témavezetők: dr. Rácz Ilona (egyetemi docens) és dr. Rudnóy Szabolcs (egyetemi tanársegéd)

2013. április 2-4.



2013

Tartalomjegyzék:

Összefoglalás.....	3
Summary	4
1. Bevezetés.....	5
2. Célkitűzések	11
3. Anyag és módszer	11
4. Eredmények és megvitatásuk	14
4.1 A növények fiziológiai vizsgálata PAM fluorométerrel.....	14
4.2 Génexpressziós változások hideg és SMM kezelés hatására	16
4.3 Poliaminszint változása paradicsomban SMM-kezelés hatására	22
4.4 Fenoloidok és antociánok mennyiségének változása kukoricában	23
5. Következtetések	25
Köszönetnyilvánítás	27
Irodalomjegyzék:.....	28
Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez	33

A dolgozatban Páldi Katalin munkáját (PK)-val, míg Ludman Márta munkáját (LM)-mel jelöljük.

Összefoglalás

A paradicsom és a kukorica a legjelentősebb gazdasági növényeink közé tartoznak. Trópusi eredetük miatt az alacsony hőmérséklet számos ponton károsíthatja az anyagcsere-folyamataikat, ami csökkenti a növények termőképességét. Az SMM - ami egy természetes, kéntartalmú nem proteinogén aminosav - a korábbi kutatások szerint sikerrel alkalmazható egyes stresszhatások esetén a növényt ért károsodások csökkentésére.

Az SMM a metionin anyagcserével való kapcsolata miatt serkentheti a stresszvédő poliaminok szintézisét és a fenoloidok termelődésére is pozitív hatással lehet. Munkánk során arra kerestük a választ, hogy SMM exogén adagolásával megfigyelhető-e a fotoszintetikus paraméterek javulása, illetve a stresszvédő poliaminok és fenoloidok mennyiségének növekedése. Ehhez fluoreszcencia indukciós méréseket végeztünk, illetve meghatároztuk a kukorica esetében az összes fenoloid és antociántartalmat, míg a paradicsomnál az univerzális poliaminok mennyiségét. Emellett kvantitatív real-time PCR technika alkalmazásával megvizsgáltuk az említett vegyületek szintézisútvonalaihoz tartozó enzimek génexpresszió változásait is.

A hidegkezelt minták esetében mindkét növénynél az exogén SMM hatására jelentősen javult a fotoszintetikus hatékonyság, megnőtt a vizsgált stresszvédő anyagok szintéziséért és azok szabályozásáért felelős gének expressziója, valamint a működésük eredményeként keletkező metabolitok mennyisége is.

Eredményeink alátámasztják, hogy az SMM alkalmas lehet a növényt érő stresszhatások csökkentésére.

Summary

Tomato (*Solanum lycopersicum*) and maize (*Zea mays*) are considered to be among our most important crops. Due to their tropical origin low temperature can damage their metabolical processes on several levels, leading to substantial loss of yield. S-methylmethionine (SMM) is a naturally occurring, sulphur containing, non-proteinogenic amino acid that, based upon previous experiments, can successfully mitigate the damaging effect of different stressors on plant growth and development.

Due to its connection to methionine metabolism SMM can stimulate polyamine synthesis and it has a positive effect on the accumulation of phenoloids, as well. During our work we aimed to examine whether exogeneous SMM can increase the amount of polyamines and phenolic compounds in the plants and exert a positive effect on their physiological state characterized by photosynthetic parameters.

In order to gain better understanding of the protective effects of SMM we used fluorescence induction method to monitor the changes of the photosynthetic parameters, measured its effect on stress protecting compounds, i.e.: phenoloids, anthocyanines and polyamines. To reveal the ribonomic background of these changes we used quantitative Real-Time PCR reaction to determine the changes in the expression of genes connected to the pathways synthesizing the aforementioned compounds.

In plants exposed to low temperatures SMM treatment had a positive effect on photosynthetic activity and resulted in a growth of the expression of genes involved in the synthesis and regulation of stress protective compounds and also increased their amount.

According to our results S-methylmethionine can decrease the damage affected by stress in plants.

1. Bevezetés

A növények a szesszilis életmódjuk következtében érzékenyebbek a környezeti változásokra, mint a mozgásra képes élőlények. Emellett a növények poikilotermek is, vagyis a környezetükkel azonos a hőmérsékletük. Az optimális hőmérsékleti tartomány jelentősen eltérő lehet a különböző növényfajok számára. Ennél az alkalmazkodási tartománynál alacsonyabb hőmérséklet hidegstresszt idéz elő, ami számos, a növény számára káros folyamat megjelenésével jár együtt. Az alacsony hőmérséklet növeli a membránok rigiditását, lassítja az enzimek által katalizált reakciókat, módosítja a lipidek és más makromolekulák konformációját, aminek következtében a legtöbb biológiai folyamatot befolyásolja (Mahajan és Tuteja, 2005). Az, hogy milyen mértékben károsítja az alacsony hőmérséklet a növényt, több tényezőtől is függ, például a növény fejlettségétől, mikor és milyen intenzitással éri a hideg, a lehülés sebességétől, illetve attól, hogy képződnek-e jégkristályok (Beck és mtsi. 2004).

Mindemellett a hideg hatására reaktív oxigénformák jelenhetnek meg a kloroplasztisban a fotoszintetikus apparátus működésének zavara miatt, ami oxidatív stresszt okoz a növényben. Az oxidatív stressz itt másodlagos stresszként jelenik meg a hidegstressz hatására (Kosová és mtsai, 2011). A reaktív oxigéngyökök, például a hidroxilgyök ($\text{OH}^\bullet$), a szuperoxid gyök ($\text{O}_2^{\bullet-}$), a hidrogén-peroxid (H_2O_2) és a szinglet oxigén ($^1\text{O}_2$) az anyagcsere valamennyi szintjén kifejthetik negatív hatásukat. Az általuk módosított molekulák közül a legtöbbet lebontja a sejt, de például a DNS-ben keletkező hibákat értelemszerűen megpróbálja kijavítani. Azok az enzimek, melyek Fe-S centrumot, vagy aktív tiol-csoportot tartalmaznak (mint pl. a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz), rendkívül érzékenyek a reaktív oxigénformákra (Lushchak 2011), mivel azok megváltoztathatják az aktív centrum redoxállapotát.

Az alacsony hőmérséklet által előidézett káros folyamatok miatt egy adott területre jellemző hőmérsékleti értékek szabják meg azt, hogy milyen növények termeszthetők ott gazdaságosan. A magyar termőterületeken többnyire a mérsékelt égöv növényeit termesztik, de vannak trópusi éghajlatról származó növények, köztük a kukorica és a paradicsom is, melyek érzékenyek a hideg időjárásra. Az alacsony hőmérsékleti stressz fiziológiai hatásainak vizsgálata és ismerete, illetve az ellene való védekezés lehetőségeinek kutatása elengedhetetlenül fontos, mivel ez megteremtheti a termőképesség növelésének lehetőségét, ami mezőgazdasági szempontból is jelentős lehet. Az abiotikus stressz, köztük az alacsony

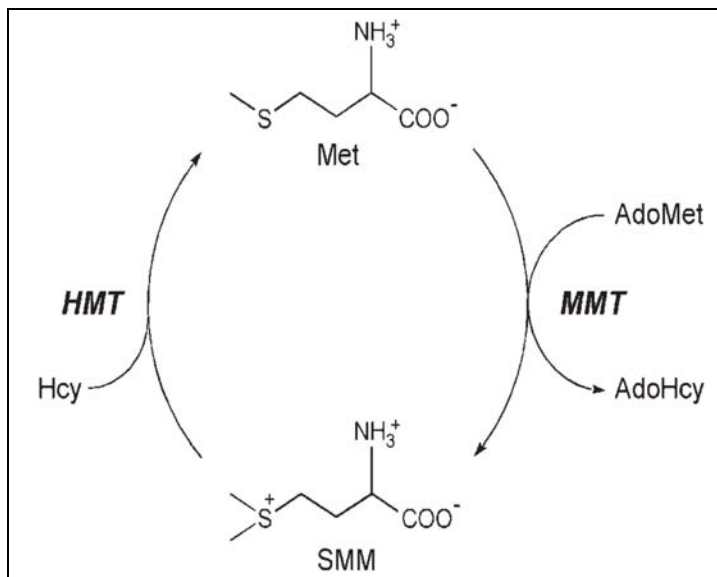
hőmérséklet is az egyik fő oka a mezőgazdaságban tapasztalható jelentős mértékű termésveszteségnek, ami egyes becslések szerint évente akár az 50%-ot is meghaladhatja (Wang és mtsi. 2003).

A növények összetett védekezési mechanizmusokkal rendelkeznek, hogy megbirkózzanak a hidegstressz károsító hatásaival. Az alacsony hőmérséklet hatására a növényekben védekezést szolgáló válaszreakció alakul ki, mely lehetővé teszi a kedvezőtlen körülményekhez való alkalmazkodást (Mandre 2002). A génexpressziós változások hatására olyan anyagcsere-folyamatok kerülnek előtérbe a növényben, melyek a stresszválasz kialakításáért felelős anyagok megjelenését, felszaporodását idézik elő a sejtben. Például megváltozik a membránok lipidösszetétele, a krioprotektáns fehérjék felhalmozódása miatt alacsonyabb lesz a citoplazma fagyáspontja, illetve a növények ozmoprotektáns anyagok szintézisével csökkentik a sejtjeik ozmotikus potenciálját, melynek következtében nő a sejtek vízfeltevő, illetve vízmegtartó képessége (Guy, 1999).

A reaktív oxigénformák felhalmozódása ellen antioxidáns enzimek segítségével védekeznek a növények (Smallwood és Bowles, 2002), melyek aktivitását a poliaminok is befolyásolhatják (Syed Sarfaraz és mtsai., 2011). Egy másik védekezési lehetőség az antioxidáns anyagok termelése. A növényekben a fenoloid típusú vegyületek mennyisége megemelkedik az oxidatív stresszorok jelenlétében (Hernández és mtsai., 2009), köztük a flavonoidok és antocianinok szintje is. Ezek az anyagok a növényi szövetekre káros UV-B sugarak elnyelésében is segítenek, de mindemellett a reaktív oxigéngyökök semlegesítésében is fontos szerepet játszanak (Agati és Tattini, 2010).

A Brassicaceae családba tartozó növényeknél már az 50-es évek derekán felfigyeltek arra, hogy a hideggel szembeni toleranciájuk összefüggésben lehet a magas S-metilmetionin (SMM, U-vitamin) tartalmukkal (Bourgis és mtsai., 1999). Az SMM egy biológiailag aktív természetes vegyület, nem proteinogén kén-tartalmú aminosav, mely minden növényi részben kimutatható a virágos növények körében (Bourgis és mtsai., 1999). Szintézise metioninból indul, melynek átalakulását az S-adenozilmetionin:metionin S-metiltranszferáz enzim katalizálja. A reakcióhoz szükséges metil csoport az S-adenozilmetionintól (AdoMet) származik. Ez egy irreverzibilis reakció, ám egy másik úton az SMM vissza tud alakulni metioninná. A visszaalakulás során az SMM a metildonor, a homociszteint metilálja, 1 mol SMM-ből és 1 mol homociszteinből 2 mol metionin keletkezik. A reakciót az S-metil-

metionin:homocisztein S-metiltranszferáz enzim katalizálja. Ez a ciklikus reakciósor az ún. SMM-ciklus (1. ábra), amely révén az S-metilmetioninnak központi szerepe van az AdoMet és metioninszint-szabályozásban (Szegő és mtsai., 2007).



1. ábra. Az SMM-ciklus virágos növényekben.

A reakció során SMM-ből és homociszteinből a HMT (S-metilmetionin : homocisztein S-metiltranszferáz) 2 metionin molekulát eredményez. A metionin MMT (S-adenozilmetionin:metionin S-metiltranszferáz) segítségével SMM-mé alakul, míg az AdoMet (S-adenozilmetionin) S-adenozil-homociszteinné alakul. (Bourgis és mtsai., 1999)

Az S-metilmetionin fontos szerepet játszik a kén szállításában és raktározásban. A kénnek két fő transzportformája van a növényekben: a glutation és az SMM. Mérések szerint a floémában az S-metilmetionin a fő kénszállító vegyületforma, amelyet akár mM-os koncentrációban is tartalmazhat a floémnedv (Wirtz és Droux, 2005).

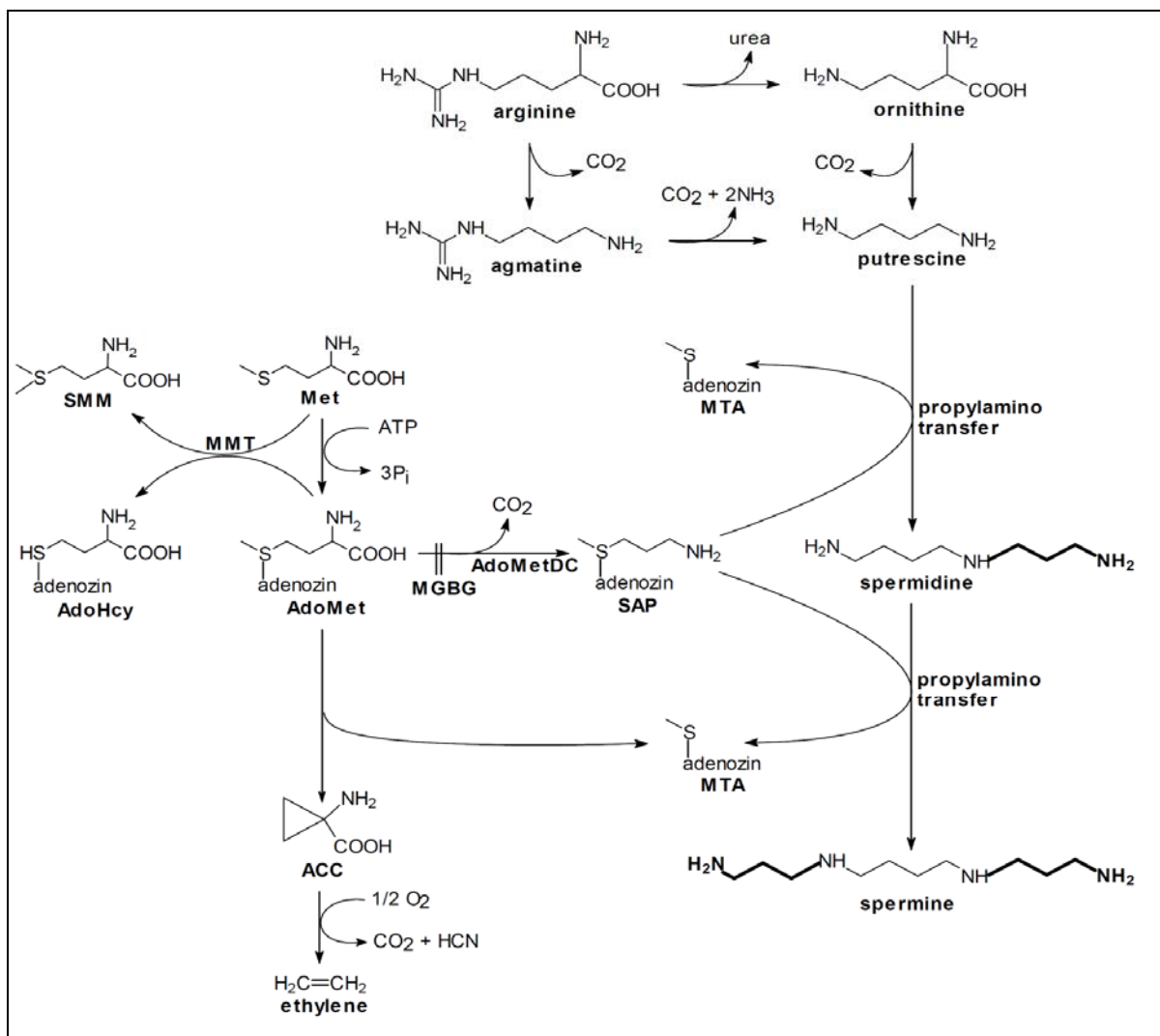
Fontos szerepet játszik a hidegstressz okozta károsodások kivédésében: ozmoprotektánsként működő dimetil-szulfopropionát (DMSP) keletkezik belőle, melynek membránvédő hatása is van (McNeil és mtsai., 1999). Hatással van a hormonok termelésére is a növényekben: pl. az abszizinsav (ABS) mennyiségét megnöveli abiotikus stresszek esetében, míg az etilénszintet ezzel szemben alacsonyan tartja (Fujita és mtsai., 2008). Ezek mellett az SMM és az anyagcseréjéhez tartozó enzimek részt vesznek a szeléntolerancia kialakításában is, a Se detoxifikálásával (Tagmount és mtsai., 2002). Végezetül az SMM hatással van a stresszvédő vegyületekként is funkcionáló poliaminok szintézisére is. A külsőleg adott SMM számos növényben (pl. kukorica, búza, borsó, szója) megnövelte a különböző poliaminok szintjét (Rácz és mtsai., 2008).

A poliaminok (PA) kis molekulású polikationok. Jelen vannak a sejtfalfrakciókban, a vakuolumban, mitokondriumban és kloroplasztisban is (Kaur-Sawhney és mtsai., 2003).

Előfordulhatnak a növényben szabad, illetve kötött formában is pl: fahéjsavhoz, ferulasavhoz, kávésavhoz kötötten (Urano és mtsai., 2004, Takahashi és Kakehi 2010). Esszenciálisak a növekedéshez a pro- és eukariótáknál egyaránt. Fontos szerepük van a morfogenezisben (a poliaminszint hatással van a levélmorfológiára, gyökérnövekedésre, virág kialakulásra), illetve stimulálják a DNS-replikációt, transzkripciót és transzlációt is (Kaur-Sawhney és mtsai., 2003). A PA-ok hatnak a hormonszintézis-útvonalakra is: ezek a vegyületek és az etilén antagonisái lehetnek egymásnak különböző folyamatokban (Kaur-Sawhney és mtsai., 2003). Emellett jelenlétük növeli a különböző abiotikus és biotikus stresszekkel szembeni toleranciát a növényben. Szabadgyök-semlegesítő (pl. sejtmagban), illetve -termelő (apoplastban, a lebontásuk során) funkciót is elláthatnak (Takahashi és Kakehi 2010).

Az SMM poliaminok szintézisében játszott szerepe részben az S-adenozilmetionin (AdoMet) szint szabályozásával is összefügghet. Az AdoMet dekarboxilált származéka szolgáltatja azt a propilamino-csoportot, mely révén a putreszcinnél spermidin, majd a spermidinnél spermin képződik. Az SMM egy ettől független poliaminszintézis utat is biztosít, a propilamino-csoportot közvetlenül szolgáltatva a spermidin és a spermin szintéziséhez.

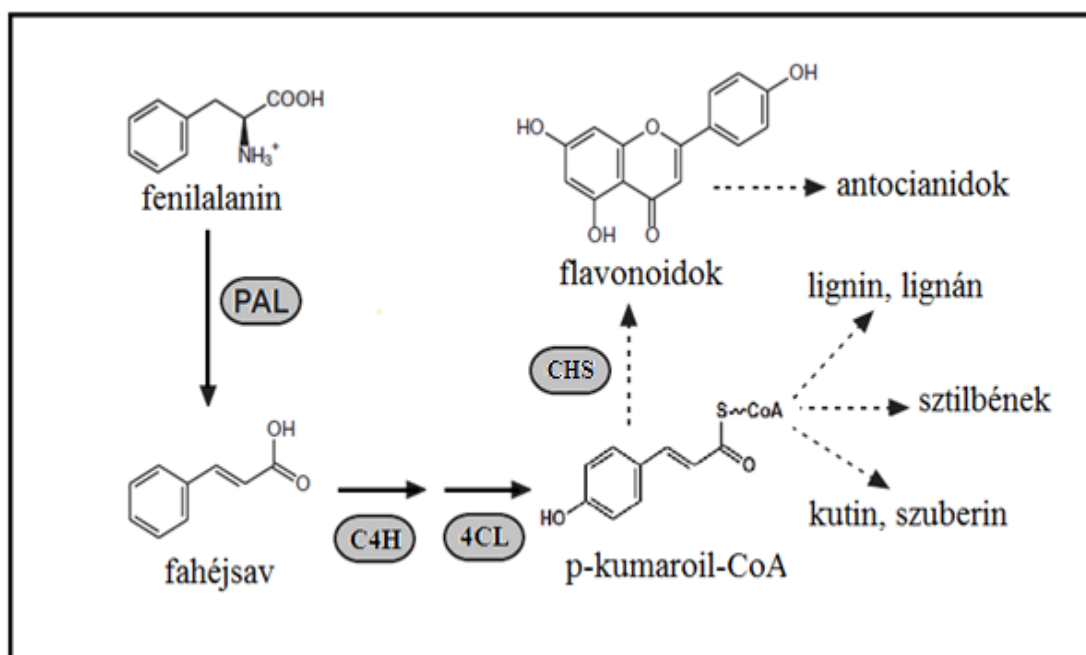
A PA-ok szintézise aminosavakból, argininből, illetve ornitinből indulhat ki. Argininből közvetett úton (agmatinon keresztül), míg ornitinből közvetlenül történik a putreszcinszintézis. A növényekben a közvetett út a meghatározó. A putreszcin újabb propilamino-csoportok bekapcsolódásával spermidinné, majd sperminné alakulhat tovább (Urano és mtsai., 2004). Ezeket a reakciókat az arginin-dekarboxiláz (ADC), ornitin dekarboxiláz (ODC), spermidin-szintáz (SPDS) és spermin-szintáz (SPMS) enzimek katalizálják (2. ábra). Végezetül a poliaminok más anyagcsere-útvonalakkal is kapcsolatban vannak, pl. a putreszcin prekursora piridin és tropán alkaloidoknak (Takahashi és Kakehi, 2010), illetve hatással vannak a fenilpropanoid útra, amely a szintén stresszvédő anyagoknak számító fenoloidok szintéziséért felelős a növényekben (Bassard és mtsai., 2010).



2. ábra. A poliaminok és az etilén bioszintézise. A spermidin és a spermin képletében a propilamino-csoport meg van vastagítva. SMM = S-metilmetionin, Met = metionin, AdoHcy = S-adenozilhomocisztein, AdoMet = S-adenozilmetionin, MMT = S-adenozilmetionin : metionin S-metiltranszferáz, MGBG = metilglyoxal-bis-guanyl hidrazon, AdoMetDC = AdoMet dekarboxiláz, SAP = S-adenozil-metiltio-propilamin, MTA = 5'-metiltioadenozin, ACC = 1-aminociklopromán-1-karbonsav. (Szegő és mtsai., 2007)

A fenoloid típusú vegyületek számos funkcióval rendelkeznek, például mikrobák és gombák elleni védekezésben játszanak szerepet, védelmet nyújthatnak az UV-sugarak ellen, illetve színyanyagok, nehézfém kelátorok és antioxidáns vegyületek is tartoznak közéjük (Stevenson és Hurst, 2007). A fenoloidok szintézise fenilalaninból indul, ez az aromás aminosav a sikimisav út végterméke (tirozin és triptofán mellett). A fenilalanin a kiindulópontja a fenilpropanoid útvonalnak, melyből számos fenoloid típusú vegyülethez tartozó reakcióút ágazik ki, például a kumarinok, sztilbének, tanninok, ligninek, lignánok, kutin, szuberin, flavonoidok és antocianinek képzése felé (Solecka, 1997). Ennek az útvonalnak az első enzime a fahéjsavat előállító *fenilalanin-ammónialiáz* (PAL). Következő lépésben a *fahéjsav-*

4-hidroxiláz (C4H) alakítja át a fahéjsavat p-kumársavvá, majd ezt követően a *p-kumaroil-CoA ligáz* (4CL) p-kumaroil-CoA-t szintetizál belőle (Fraser és Chapple, 2011). Ebből a vegyületből három malonil-CoA egység hozzákapcsolásával a *kalkon-szintáz* (CHS) tetrahidroxikalkont állít elő, melyből a különböző flavonoidok és antocianinok szintézise történik (Dixon és Paiva, 1995), melyek a növényben talán a legfontosabb stresszvédő molekuláknak számítanak (3. ábra).



3. ábra. A fenilpropanoid útvonal első három lépése és az abból kiágazó útvonalak egy része. PAL: fenilalanin-ammónialáz; C4H: fahéjsav-4-hidroxiláz; 4CL: *p-kumaroil-CoA* ligáz; CHS: kalkon szintáz. Dixon és Paiva (1995) ábrája alapján.

Az S-metilmethionin és a fenilpropanoid útvonal közötti kapcsolat még csak elméletben létezik, kísérletesen még nem bizonyították. Mindenesetre számos kutatás eredménye arra enged következtetni, hogy az SMM hatással van a különböző fenoloid típusú vegyületek képződésére. Kósa (2011) az SMM hatását vizsgálta meg a kukorica fotoszintetikus apparátusára hidegstressz esetében. Fluoreszcencia-leképezéssel végzett kísérletei azt mutatják, hogy a különböző flavonoidok és antocianinok mennyisége megnőtt a növények leveleiben a hideg hatására, de ha emellett exogén S-metilmethionint is kaptak a növények, akkor ez a növekedés még jelentősebb volt. A fenilpropanoid útvonalhoz való másik kapcsolódás lehetősége a fenolamidokon keresztül valósul meg. A fenolamidok közé különböző poliaminok és fenoloid típusú vegyületek konjugátumai tartoznak és ezek a vegyületek szintén fontos szerepet játszanak a különböző stresszorok elleni védekezésben (Bassard és mtsai., 2010).

Mivel az SMM több ponton képes befolyásolni mind a stresszvédelemben szerepet játszó hormonok, mind pedig stresszvédő anyagok keletkezését, számos kutatóban felmerült a kérdés, hogy ha melegkedvelő növényeket exogén SMM-mel kezelnek, megnő-e a hideggel szembeni ellenálló-képességük?

2. Célkitűzések

Munkánk során arra kerestük a választ, hogy exogén S-metilmetioninos kezelés hatására milyen változások lépnek fel a kukorica (PK) és a paradicsom (LM) hidegstressz elleni védekezésében. A kérdés általánosabb jellegű megválaszolása érdekében egy egyszikű és kétszikű növényt is választottunk a kísérletünk tárgyául, melyek mindegyike mezőgazdaságilag is igen jelentős. Az SMM hatását élettani, génexpressziós és anyagcsere szinten is megvizsgáltuk.

Fiziológiai szint: A növények fiziológiai állapotának változására a fotoszintetikus hatékonyság mérésével követtettünk. Ennek a vizsgálatnak a segítségével általános képet alkothatunk az SMM által előidézett változásokról.

Génexpressziós szint: Kísérleteinkkel meg akartuk ismerni, hogy milyen mértékben változtatja meg az exogén SMM a fenoloidok és a poliaminok szintézisében szerepet játszó egyes enzimek génjeinek kifejeződését.

Anyagcsere szint: A különböző stresszvédő anyagok mennyiségének meghatározásával az S-metilmetionin anyagcsere-folyamatokra tett hatását is megvizsgáltuk.

3. Anyag és módszer

Növények csíráztatása és nevelése

A csíráztatás során a kukorica (*Zea mays* L., *hibrid Norma*) és a paradicsom (*Solanum lycopersicum* cv Kecskeméti-3 F1) magokat 6%-os H₂O₂ oldatban áztattuk egy órán keresztül, majd desztillált vízzel mostuk egy újabb órán át. Ezt követően a magokat nedves papírvattával és szűrőpapírral bélelt tálcán csíráztattuk, majd 3 nap elteltével rácsra ültettük és ¼-es

Hoagland tápoldaton neveltük tovább. A nevelés körülményei: 14 óra megvilágított ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) / 10 óra sötét periódus, 23°C állandó hőmérséklet, ~75% relatív páratartalom.

A kukorica csíranövényeket 9 napos korukban SMM tartalmú (0,01 g/l) tápoldattal kezeltük 24 órán keresztül, majd 10 naposan normál tápoldatra tettük és $6-8^\circ\text{C}$ -os hőmérsékletű helyiségbe helyeztük át őket különböző időre (hidegkezelés). A mintát mindig a második levélből vettük.

A paradicsom növények a csírázástól számított harmadik héten különböző kezeléseket kaptak. A kontrollokat $\frac{1}{4}$ -es Hoagland oldaton neveltük tovább csakúgy, mint az alacsony hőmérsékleti stressznek kitett növényeket, ezek azonban különböző ideig $6-8^\circ\text{C}$ -ra kerültek. Az SMM kezelték 0,1 g/l SMM tartalmú oldatot kaptak a hidegkezeléssel megegyező ideig, az SMM+hideg kezelték pedig a hidegkezelést megelőzően 24 órára SMM tartalmú tápoldatra kerültek.

Vizsgálati eredményeinket a kukorica esetében 3 biológiai és 3 technikai, míg a paradicsom esetében 2 biológiai és 2 technikai ismétlés összevetésével közöljük.

Fluoreszcencia indukció (PAM)

A fluoreszcencia indukciós módszer egy nem-invazív, gyors és könnyen alkalmazható technika, melynek segítségével a növény fotoszintetikus apparátusának hatékonyságáról kaphatunk információt. A PAM-fluorométerrel (PAM-2000, Walz, Effeltrich, Németország) meghatározható F_v/F_m érték megmutatja, hogy mekkora mennyiségű fényenergiát tud hatékonyan hasznosítani a növény (PSII maximális kvantumhatékonysága). Ebből a növény általános fiziológiai állapotára következtethetünk, minél magasabb az F_v/F_m érték, annál egészségesebb a növény (Lazár, 1999). A mintákat mindkét növény esetében a második levélből vettük és 20 perces sötét adaptáció után mértük meg a fluoreszcenciás paramétereiket. A kísérlet Kooten és Snel (1990) által írt előírásokat követte.

Génexpressziós változások vizsgálata kvantitatív Real-Time PCR technika alkalmazásával

A reakcióhoz használt templát DNS-t a következőképpen állítottuk elő: kukorica illetve a paradicsom csíranövény második leveléből (0,15 g) mRNS-t izoláltunk a *Genoprep mRNA*

Beads Kit által meghatározott módon, majd egy DNázos emésztést követően cDNS-t szintetizáltunk 500ng RNS-ből kiindulva *RevertAid™ M-MuLV* reverz transzkriptáz (Fermentas/Thermo) segítségével.

A real-time polimerizációs láncreakció különlegessége, hogy ciklusról ciklusra nyomon lehet követni az amplifikálódó DNS termék mennyiségének a növekedését, amiből később következtetni lehet a vizsgált gének kifejeződésének mértékére a különböző mintákban (Pfaffl, 2001). A Real-Time PCR (RT-PCR) reakció során a reakcióelegyhez adott fluoreszcens DNS festék (SYBR Green) a kettős szálú DNS molekulába beépülve lehetővé teszi annak fluorometriás detektálását, a PCR termék mennyiségének növekedése a ciklusok során arányos a fluoreszcens jel erősségének emelkedésével (Wong és Medrano, 2005). A fluoreszcens jel változását a RT-PCR készülék detektálja, majd a ciklusok függvényében ábrázolja a növekedését. Elméletileg a polimerizációs láncreakció során egy ciklus alatt megkétszereződik a termékek száma, de ez a gyakorlatban csak egy bizonyos ideig valósul meg. Azt a ciklusszámot, ahol az exponenciális növekedés elkezdődik, Ct ciklusnak nevezzük. Minél kisebb egy minta Ct értéke annál gyorsabban jelent meg benne a reakció során az exponenciális növekedési fázis, vagyis annál több templátot tartalmazott. A vizsgált gének Ct értékeiből lehet következtetni azok mennyiségi arányaira a különböző kezelésű mintákban. Mi az arányok meghatározására a Pfaffl (kukorica) illetve a $\Delta\Delta C_t$ (paradicsom) módszert alkalmaztuk (Pfaffl, 2001; Schmittgen és Livak, 2008). Mindkét növénynél két referencia gén mértani közepére normáltuk a Ct értékeket (Vandesompele és mtsai.,2002).

Poliaminok és fenoloidok mennyiségének meghatározása

Fenoloidok meghatározása: A kukorica esetében a növény összes fenoloid és antocián tartalmát vizsgáltuk meg. A kinyeréshez többféle technika létezik és a különböző oldószereket (metanol, sósav, acetone, dietil-éter, stb.) más-más arányokban szokták alkalmazni (Naczki és Shahidi, 2004; Dai és Mumper, 2010). Mi metanol, sósav és víz 79:20:1 arányú keverékét használtuk, ami egy módosított technika. A növények szárából és leveléből 0,5-0,5 g-ot vettünk mintaként a kinyeréshez és a vizsgált anyagok mennyiségét spektrofotométerrel határoztuk meg. A fenoloidokat 254, 270, 290, 300 és 330 nm-en, míg az antociántartalmat 530 nm-en mértük. A fenoloidok mennyiségét μM galluszsav-ekvivalensben (GAE) adtuk meg, ahogy a szakirodalomban elfogadott.

Poliaminok meghatározása: A poliaminok mennyiségének meghatározása Martonvásáron a Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági Intézetében nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (HPLC) segítségével történt Szegő és mtsai, 2009 cikkében leírt módszerrel. Az eredmények $\mu\text{g/g}$ friss tömegben kerültek meghatározásra.

Statisztikai elemzés

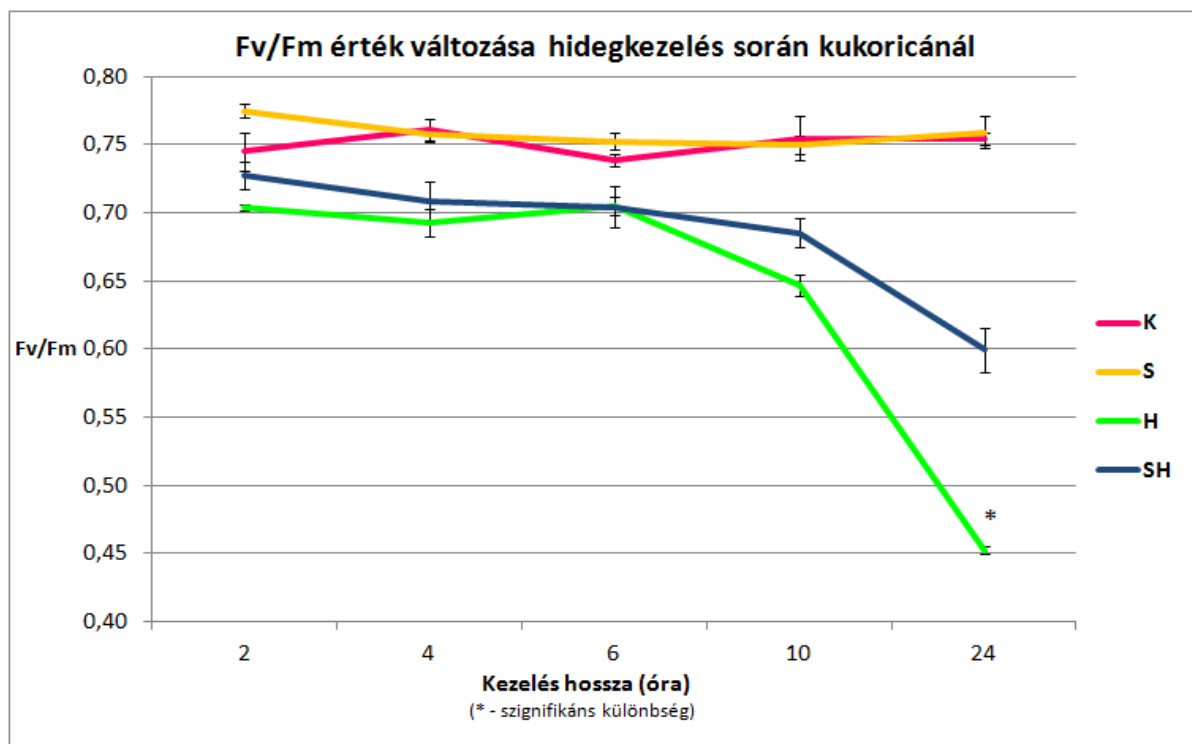
A fluorometriás méréseknél mindkét növény esetében a minták közti különbségek szignifikanciaszintjét Student-féle t próbával döntöttük el. A t -próba alkalmazása előtt megvizsgáltuk a minták varianciáját f -próba segítségével. Az Excel 2010 statisztikai programjait használtuk.

4. Eredmények és megvitatásuk

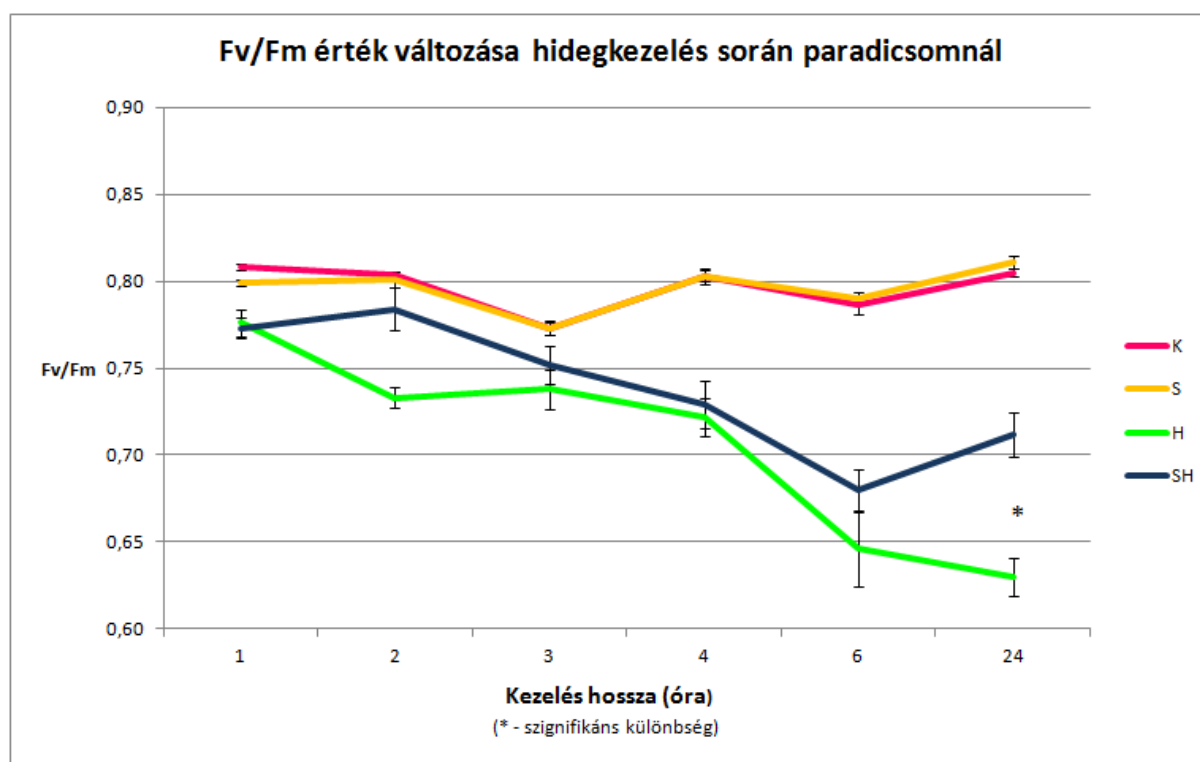
Kísérleteink során mindketten négy különböző kezelést végeztünk a kukorica és paradicsom csíranövényeken, és a mintákat a kezelések szerint neveztük el: **kontroll (K)**, **SMM (S)**, **hideg (H)** és **SMM+hideg (SH)**. A hidegkezelések hossza a kukoricánál 2, 4, 6, 10 és 24, míg a paradicsomnál 1, 2, 3, 4, 6, 24 óra volt.

4.1 A növények fiziológiai vizsgálata PAM fluorométerrel

Az F_v/F_m hányados a PSII működésének hatékonyságát mutatja, minél alacsonyabb ez az érték annál rosszabb a fotoszintetikus aktivitás. A grafikonokról (4. és 5. ábra) leolvasható, hogy míg a K és az S növények F_v/F_m értékei szinte teljesen együtt mozognak, úgy a H és SH növényeknél a kontrollokhoz képest fokozatosan csökkenni kezd ez az érték. Mindkét növény esetében szignifikáns különbséget tapasztaltunk a 24 órás H és SH kezelésű növények között, ahol az SMM-es előkezelést kapott növényeknél kaptunk magasabb értéket.



4. ábra. Fv/Fm értékek változása kukoricánál a különböző kezelések hatására. Kontroll (K), SMM (S), hidegkezelés (H), SMM és hideg (SH).



5. ábra. Fv/Fm értékek változása paradicsomnál a különböző kezelések hatására. Kontroll (K), SMM (S), hidegkezelés (H), SMM és hideg (SH).

Fontos megemlíteni, hogy a kontroll és hidegkezelt minták esetében mindkét növénynél már az első hidegkezelések (paradicsomnál 1 órás, kukoricánál 2 órás) alkalmával is szignifikáns

különbséget mértünk (ezt az ábrákon nem jelöltük, hogy könnyebben értelmezhetőek lehessenek). A szignifikáns különbség végig megmaradt, sőt, egyre növekedett, amiből látszik, hogy az alacsony hőmérséklet milyen erős hatással van a növények élettani folyamataira.

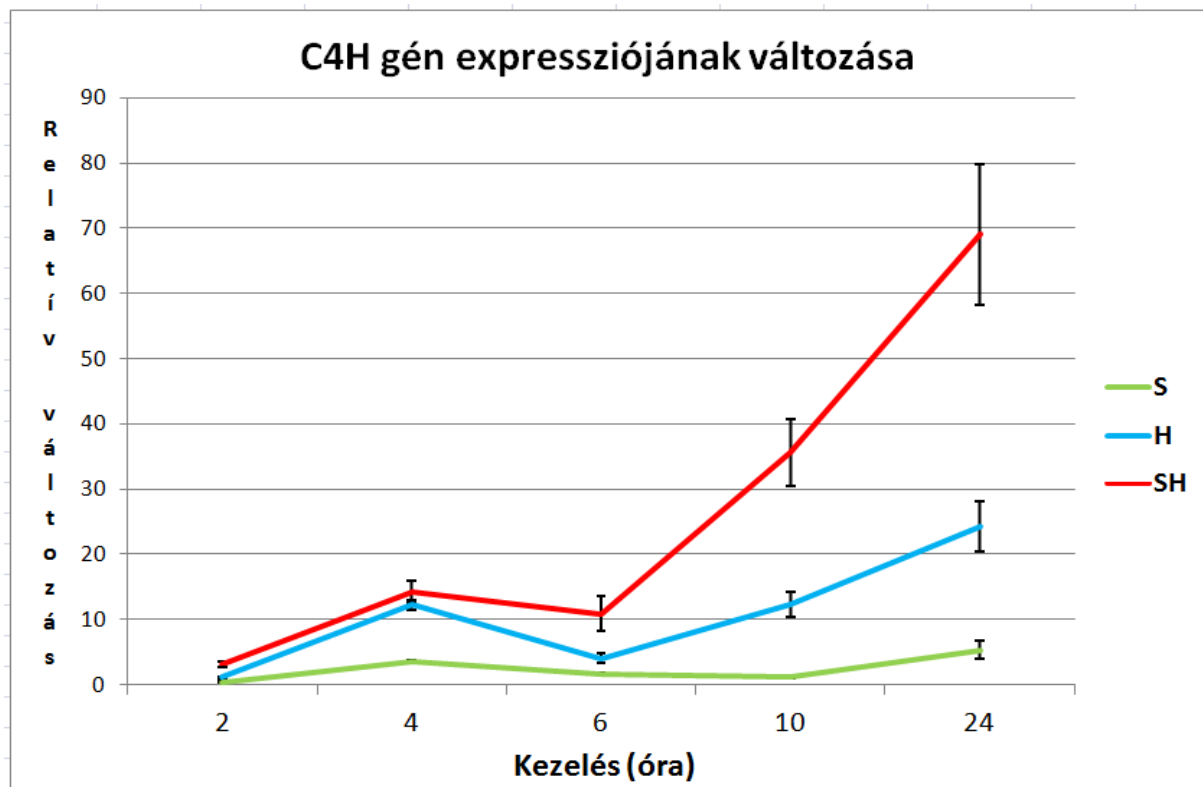
Az eredményeink jól mutatják, hogy exogén S-metilmethionin hatására a hidegkezelés ellenére is jelentősen lassult az *Fv/Fm* érték csökkenése, ami bizonyítja az SMM pozitív hatását a növények fiziológiai állapotára hidegstressz fennállásakor. A kukorica esetében Szegő (2009) és Kósa (2011) is ugyanezt tapasztalta, amit azzal magyaráznak, hogy az SMM serkenti a poliaminok, fenoloidok és egyéb antioxidáns vegyületek szintézisét és ezzel segíti a fotoszintetikus rendszert erősen károsító ROS elleni védekezést.

4.2 Génexpressziós változások hideg és SMM kezelés hatására

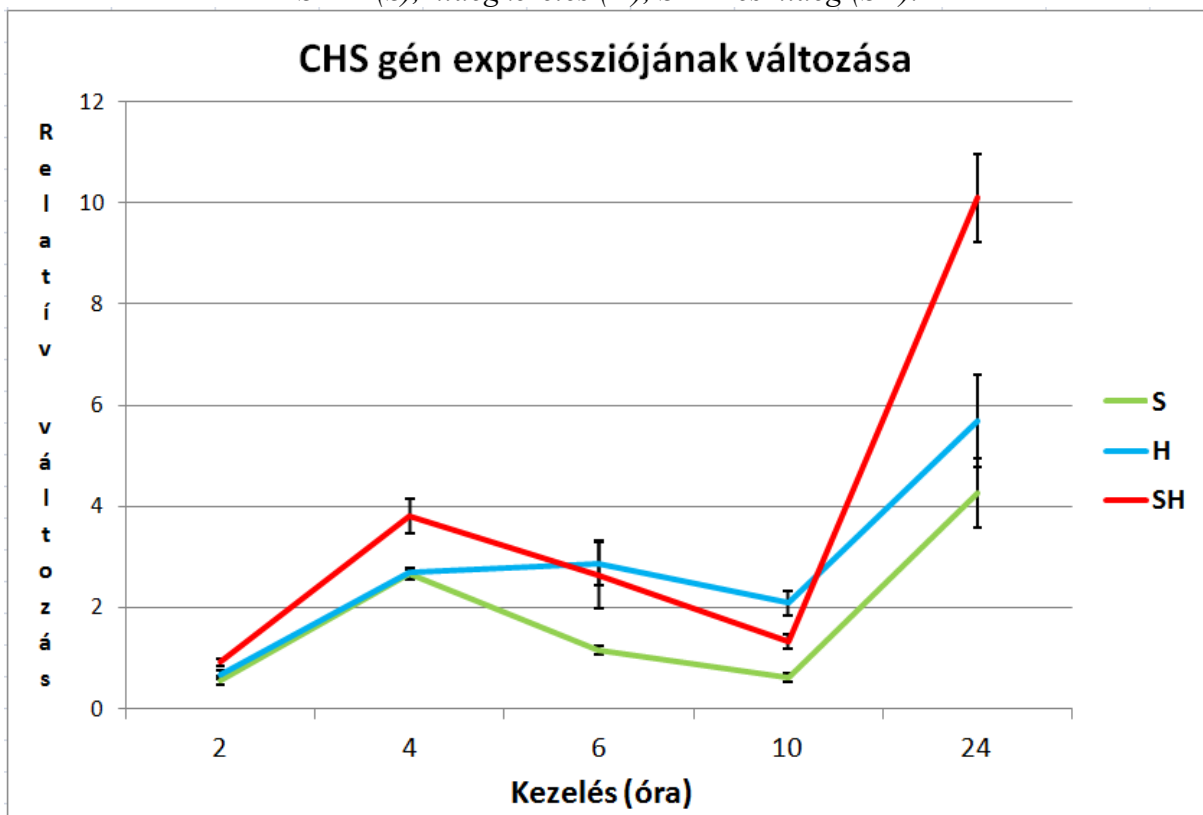
(PK) Génexpressziós változások kukoricánál

A stresszvédelemben szerepet játszó anyagok szintéziséért felelős fenilpropanoid útvonalhoz tartozó két gén, a *fahéjsav-4-hidroxiláz* (C4H) és a *kalkon-szintáz* (CHS) expressziójának változását vizsgáltam meg RT-PCR technika alkalmazásával.

A kiértékeléshez Pfaffl módszerét alkalmaztam (Pfaffl, 2001), aminek a segítségével a vizsgált gének mennyiségének egymáshoz viszonyított változását tudjuk prezentálni. A módszer egy belső és egy külső kontroll alkalmazását is igényli. Belső kontrollként ebben az esetben a konstitutívan expresszáldó aktin (A) és PB1A10.07c membrán fehérje (MEP) géneket használtam fel, mivel ezek mennyisége nem változik a kezelések hatására sem (Guy, 1999; Manoli és mtsai., 2012), míg a külső kontrollt a K kezelésű növények értékei szolgáltatták (ezáltal ezek a grafikonokon sincsenek feltüntetve). A Pfaffl módszer figyelembe veszi az alkalmazott primerpárok hatékonyságát is, amik ebben az esetben a következők voltak: aktin/98,3%; MEP/99,4%; C4H/98,6% és végül CHS/99,0%.



6. ábra. C4H génexpressziós változása kukoricában a hidegkezelés hatására. A 24 h hidegkezelt növényeknél az SMM jelentősen növelte a C4H mennyiségét. SMM (S), hidegkezelés (H), SMM és hideg (SH).



7. ábra. CHS génexpressziós változása kukoricában a hidegkezelés hatására. A 24 h hidegkezelt növényeknél az SMM hatására nőtt a CHS mennyisége. SMM (S), hidegkezelés (H), SMM és hideg (SH).

Eredményeim azt mutatják, hogy a hideg hatására jelentős mértékben fokozódott mindkét vizsgált gén expressziója a csíranövényekben, továbbá azt is megfigyelhető, hogy az SMM-mel előkezelt növényeknél még szembetűnőbb növekedés mutatkozott (6. és 7. ábra). A legnagyobb különbséget a 24 órás H és SH között kaptam, ami alapján arra lehet következtetni, hogy az SMM hosszú távon jelenthet hatásvédelmet a hideg ellen. A C4H gén expressziója nagyobb mértékben nőtt meg, valószínűleg mivel az általa kódolt *fahéjsav-hidroxiláz* enzim a fenilporpanoid bioszintézisútvonal kezdeti szakaszában jelenik meg és ott alapvető funkciót tölt be (Fraser és Chapple, 2011). Emellett megfigyelhető a 4 órás kezeléseknél is egy kisebb növekedés. Itt szintén a kombinált kezelésű mintáknál kaptam a legmagasabb értékeket, vagyis az S-metilmetonin nem sokkal a hidegstressz kialakulása után is képes kifejteni pozitív hatását a növény védekezésére. Az S csoport görbéje szinte nem is változott, ami arra utal, hogy az SMM-es kezelés önmagában alig befolyásolja a gének expresszióját. *Arabidopsisban* is leírták, hogy az alacsony hőmérséklet által megnő a PAL és CHS génekről átíródott mRNS-ek mennyisége (Leyva, 1995).

(LM) *Génexpressziós változások paradicsomnál*

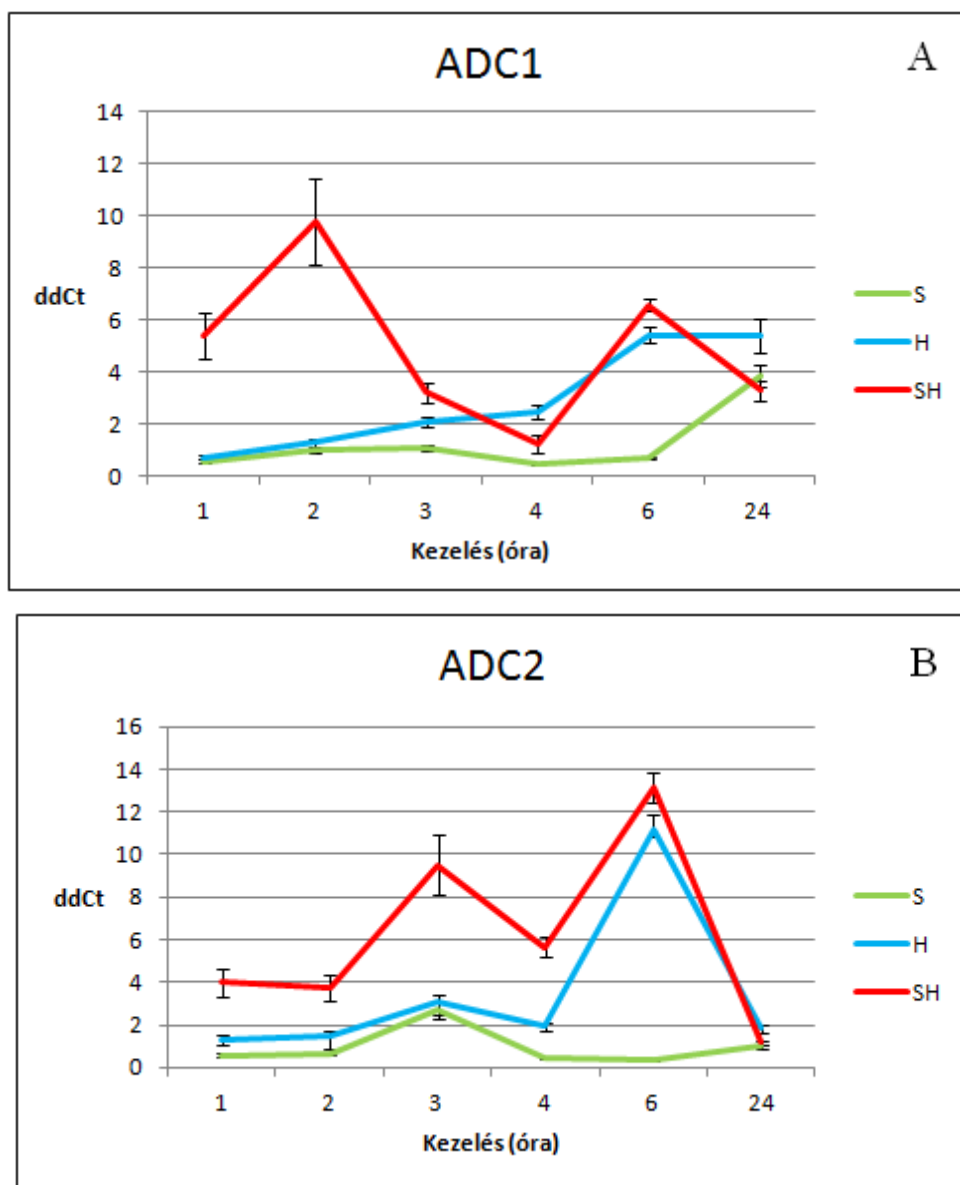
A génexpressziós vizsgálat során három gén változását követtem nyomon, két poliamin bioszintézis úton szereplő enzimét (ADC, ODC) és egy transzkripciós faktorét (C-repeat binding factor, CBF), mely számos gén transzkripciójánál tölt be szabályozó funkciót. Referenciagénként az aktint (A) és a riboszóma protein L2-t (RPL2) használtam a normáláshoz (Lovdal és Lillo, 2009).

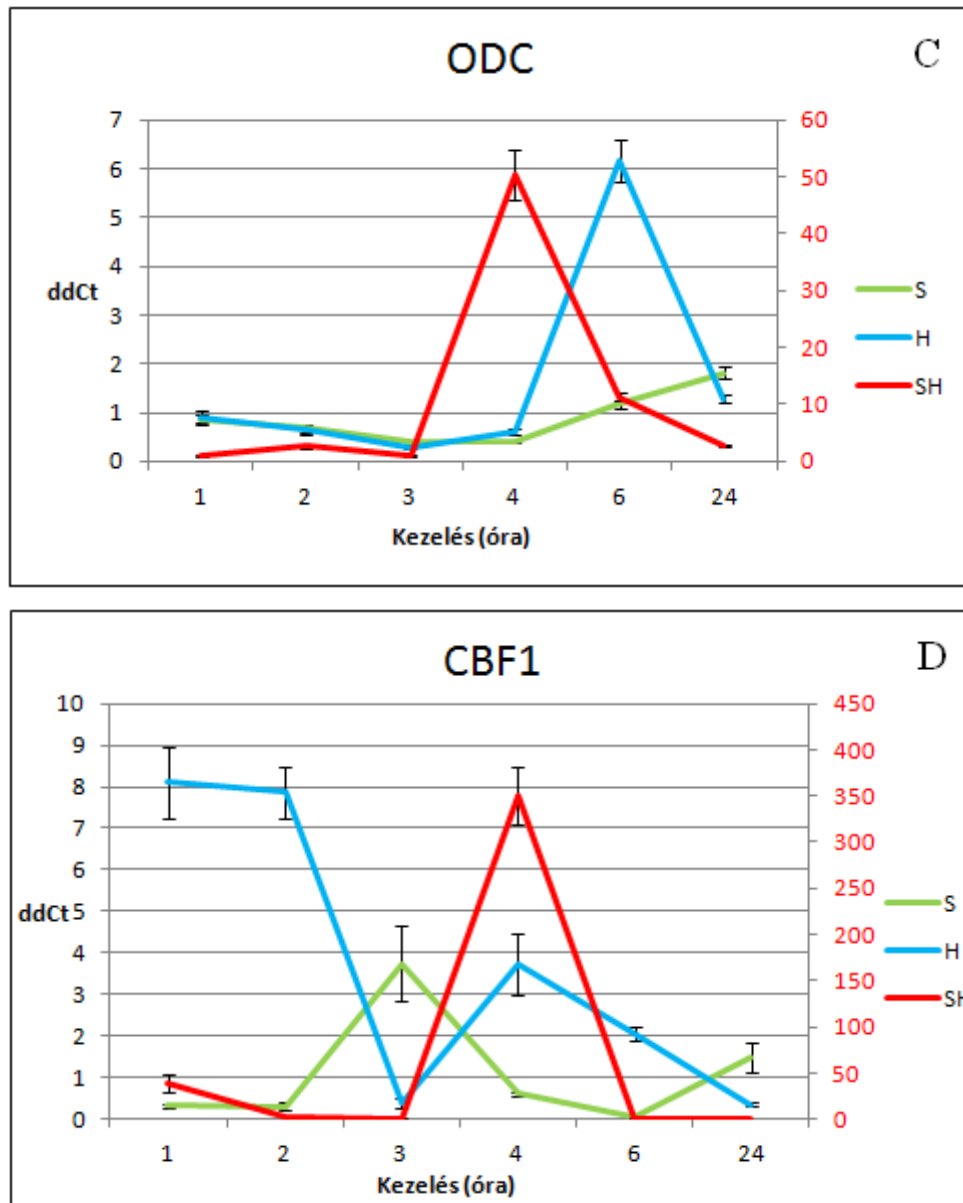
Az ADC az arginin agmatinon keresztül történő átalakulását, míg az ODC az ornitinből induló putreszcinszintézist katalizálja. Növények esetében, szemben az állatoknál megfigyelttel, az ADC katalizálta út a jelentősebb, stressz hatására is ez indukálódik korábban. Az ADC enzimet két gén kódolja a legtöbb növényben, az ADC1 és ADC2. Az ADC1 konstitutívan jelen van minden szövetben, az ADC2 expressziója abiotikus stressz hatására nő meg (Takahashi és Kakehi 2010).

A CBF egy az AP2/ERF családba tartozó transzkripciós faktor. Paradicsomban három CBF gént találtak, amelyek közül hideghatásra a CBF1 indukálódik (Zhang és mtsai., 2004). Az aktin egy jól ismert és széles körben használt „háztartási gén”. Referenciaként jól

alkalmazható, mert expressziója nem változik a vizsgált fajon belül, adott szövetben különböző kezelések hatására. Az RPL2 gén egy nem régóta használt referenciagén, amely a hidegkezelés során az egyik legstabilabbnak mutatkozott (Lovdal és Lillo, 2009).

A kiértékeléshez $\Delta\Delta C_t$ módszer alkalmaztam, ahol először a belső kontroll gének C_t értékeire normáltam a vizsgált gének C_t értékeit (ΔC_t), hogy megkapjam az expresszióváltozás tényleges mértékét. Majd a kezelt növények (S, H, SH) ΔC_t értékeit hasonlítottam össze a kezeletlen növényével (K), hogy megtudjam a kezelés milyen mértékben változtatta meg a vizsgált gén kifejeződését (Schmittgen és Livak, 2008).





8. ábra. Génexpressziós változások paradicsomban. A: ADC1, B: ADC2, C: ODC, D: CBF1 gének időbeli változása kezelésenként. A C és D ábrarészekben a második y tengely (piros skála) az SH grafikonhoz tartozó értékeket mutatja. SMM (S), hidegkezelés (H), SMM és hideg (SH).

A diagramokon (8. ábra) a különböző gének $\Delta\Delta Ct$ érték változása látszik a kezelések idejének függvényében. Az ADC1 és ADC2 géneknél (8/A, 8/B ábra) korai expressziónövekedést tapasztaltam az SMM és hidegkezelés együttes alkalmazásánál 2 illetve 3 órás hidegkezelésnél, majd egy újabb csúcs mutatkozott 6 órás hidegkezelésnél, ahol már a csak hidegkezelést kapott növények ADC expressziója is jelentősen megnőtt. A csak SMM kezelést kapott növények génexpressziója kevésbé változott meg és minden esetben a csak hidegkezelést kapott minták görbéje alatt maradt, az értéke 1 körül mozog. Ez jól mutatja,

hogy az S-metilmethionin önmagában nem befolyásolja jelentősen a vizsgált gének expresszióját.

Mivel az ADC1 egy adott szinten konstitutívan expresszálódik és jelen van a szövetekben, a kezelések hatására gyorsabban megváltozik a mennyisége, mint az ADC2-nek. A hosszabb időtartamú hidegkezelés viszont már az ADC2 esetében okoz nagyobb emelkedést, mind a kombinált kezelést kapott, mind a csak hidegkezelt mintáknál.

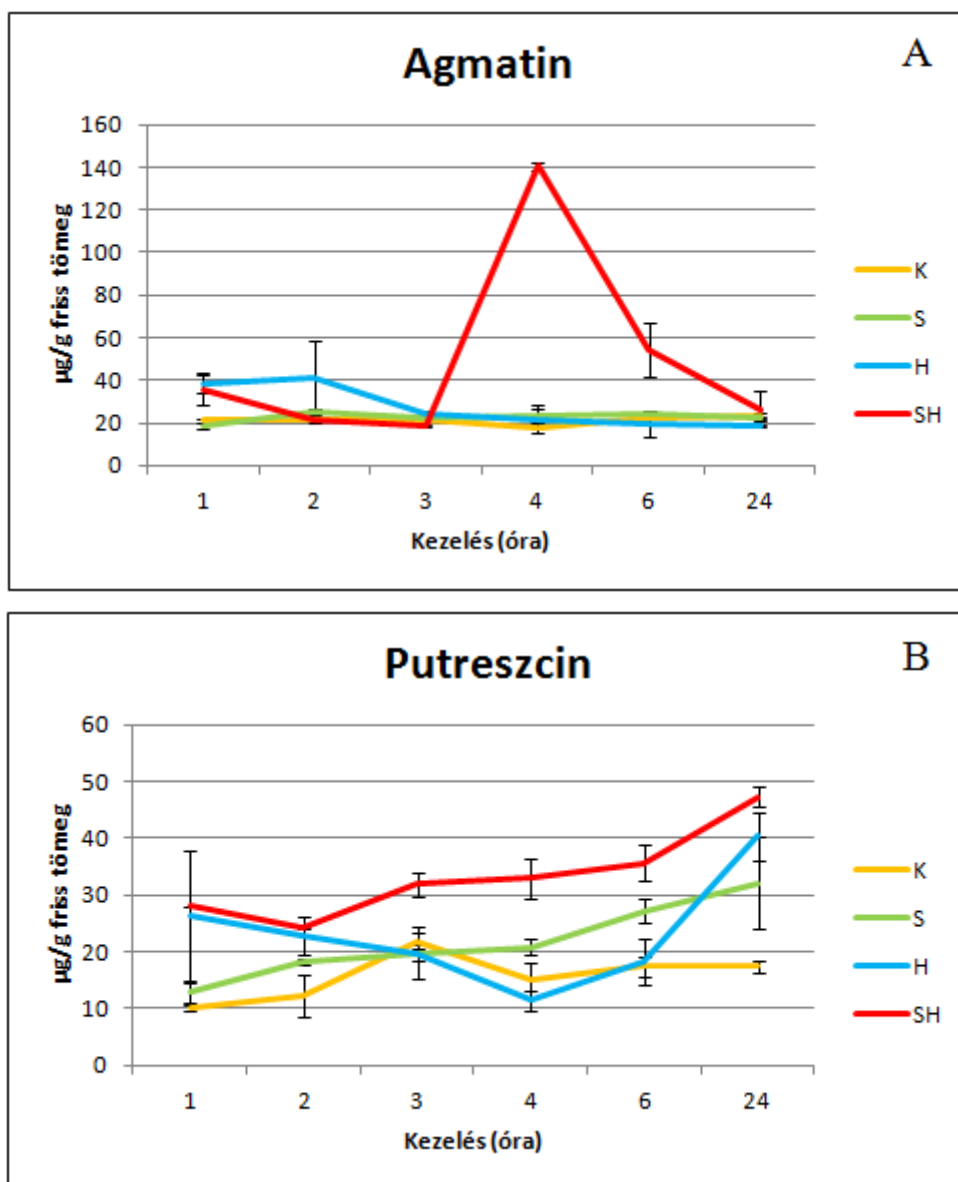
Az ODC (8/C ábra) és CBF1 (8/D ábra) gének esetében 4 órás kezelésnél tapasztaltam a legnagyobb expresszióváltozást SMM és hidegkezelt növényeknél. Ezeknél a géneknél a növekedés jóval nagyobb, mint amit az ADC gének esetében láthattunk. Az ODC gén expressziója kombinált kezelés hatására közel 50-szeresre emelkedett, míg a csak hidegkezelést kapott növények esetében nagyobb növekedést 6 órás hidegkezelés során tapasztaltam, ami mindössze 6-szoros volt. A csak SMM-mel kezelt növények ODC génexpressziója kismértékben változott a kezelés hosszának növekedésével.

A CBF1 gén esetében tapasztaltam a legnagyobb génexpressziós változást SMM és hidegkezelés együttes alkalmazásánál, illetve ebben az esetben volt a legszembetűnőbb a génexpresszió ingadozása a különböző kezeléseknél. A kombinált kezelés hatására 4 órás kezelésnél kiugróan magas mintegy 350-szeres növekedés látható. Ezzel szemben a csak hidegkezelést kapott mintáknál a legnagyobb génexpressziós változás 1 órás hidegkezelés hatására következett be, ez azonban mindössze 8-szoros volt. Ennek a génnek a vizsgálatakor a csak S-metilmethionin kezelt növények génexpressziója is kismértékben megváltozott. A kapott eredmények jól tükrözik, hogy a CBF egy transzkripciós faktor, amelynek génexpressziója érzékenyen és gyorsan reagál a körülmények változására.

A legnagyobb génexpressziós változást minden gén esetében az SMM-et és hidegkezelést is kapott növények mutatták. A csak hidegkezelést kapó, illetve csak SMM-mel kezelt növények génexpressziója kevésbé változott meg. Az eredmények az S-metilmethioninnak egyfajta priming hatását mutatják, melynek következtében gyorsabban és hatékonyabban tud a növény védekezni. A kapott adatok jól összevethetőek Szegő és mtsai (2009) által kukoricánál megfigyelt génexpresszióváltozás tendenciákkal.

4.3 Poliaminszint változása paradicsomban SMM-kezelés hatására

(LM) Korábbi, kukoricával végzett vizsgálatok alátámasztották azt a feltevést, hogy a külsőleg adott SMM képes megnövelni a különböző poliaminok mennyiségét, így az agmatinét, putreszcint, spermidint és sperminet (Rácz és mtsai., 2008). Az SMM hatása a kezelést követően hidegstressznek is kitett növényeknél bizonyult a legnagyobb mértékűnek. Paradicsommal végzett jelen vizsgálataim eredményei alátámasztják a kukoricánál megfigyelt változásokat.



9.ábra. A: agmatin és B: putreszcín tartalom változása paradicsomban. Kontroll (K), SMM (S), hidegkezelés (H), illetve SMM és hidegkezelés (SH).

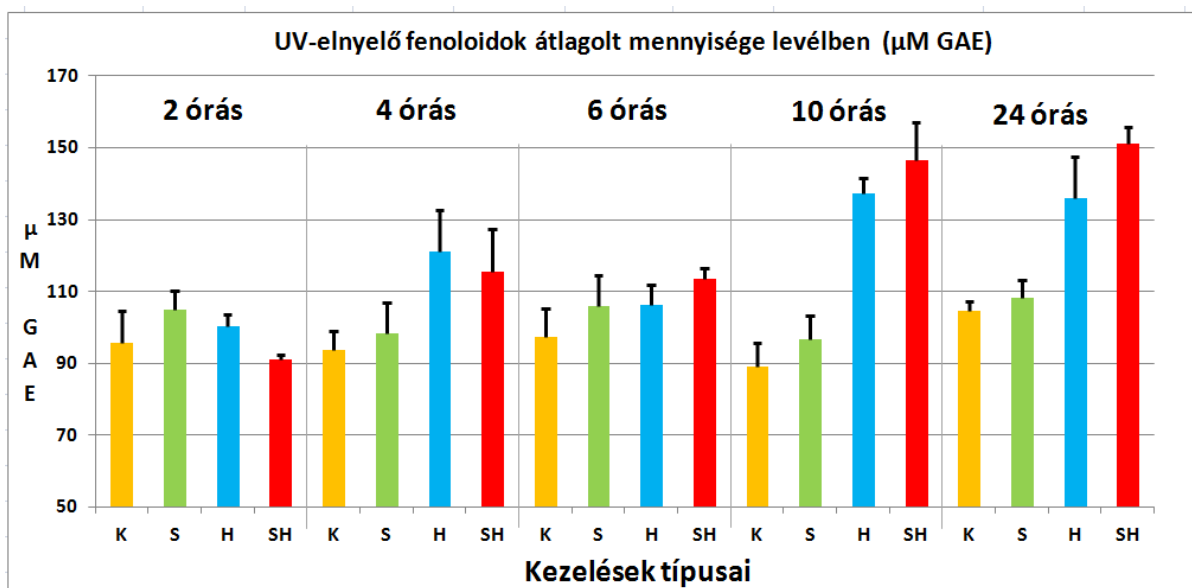
Kísérleteim során az agmatin és a putreszcin mennyiségének változását vizsgáltam, amelyek a poliamin bioszintézis út első termékei (9. ábra). A putreszcin két úton is keletkezhet: ornitinből közvetlenül az ornitin-dekarboxiláz segítségével, illetve argininből többlépcsős reakcióban, melyet az arginin-dekarboxiláz enzim katalizál. Az argininből kiinduló szintézis intermediere az agmatin, amely vegyület mennyiségének változása az argininből kiinduló putreszcin-szintézis szintézisút növekedését támasztja alá.

Az SMM- és hidegkezelt minták agmatintartalma 4 órás hidegkezelésnél változik meg nagymértékben, a kiindulási mennyiség 7-szeresére (9/A ábra), míg a putreszcintartalom (9/B ábra) minden kezelés hatására emelkedik. A csak hideg-, illetve csak SMM-kezelés nem befolyásolja jelentősen az agmatintartalmat. Putreszcin esetében a csak hidegkezelést kapott növények görbéje minden esetben a kombinált kezelésűek görbéje alatt marad.

Ezek az eredmények szoros összefüggésben vannak a katalizáló enzimek génexpressziós változásaival. Az ADC gén 2, illetve 3 órás hidegkezelésnél mutattak nagyobb expressziót, míg az ODC gén 4 órás hidegkezelésnél SMM- és hidegkezelés együttes alkalmazásánál. A putreszcintartalom fokozatos emelkedésének oka lehet, hogy mind argininből, mind ornitinből képződhet. Stressz esetén növényekben az ADC katalizált átalakulás indukálódik korábban. A kezdeti putreszcinszint emelkedés ezen az útvonalon történik, majd bekapcsolódik az ODC út is. Emellett a putreszcin tartalom emelkedésének kisebb mértéke azzal magyarázható, hogy a putreszcin egyben kiinduló vegyülete a spermidin és a spermin bioszintézisének.

4.4 Fenoloidok és antociánok mennyiségének változása kukoricában

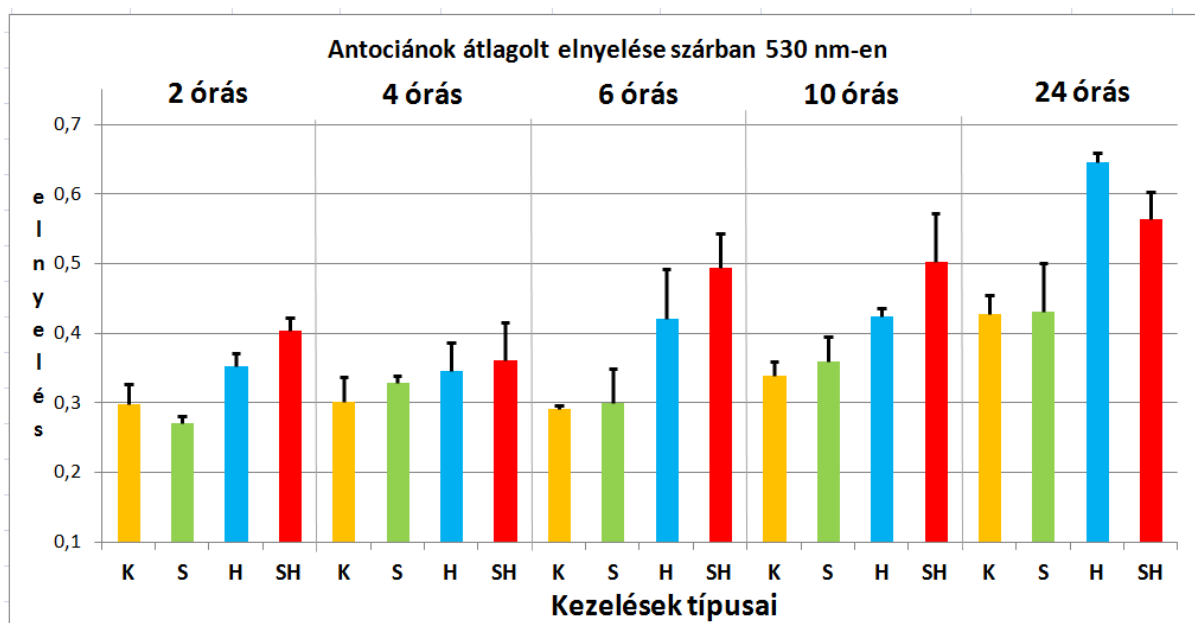
(PK) Kísérleteim során az S-metilmethioninnak és a hidegkezelésnek a fenilpropanoid anyagcsereút stresszvédő vegyületeinek szintézisére gyakorolt hatását, valamint az SMM kezelést követő hidegstressz során megmutatkozó együttes hatást tanulmányoztam. A 10. ábrán megfigyelhetjük, hogy a hidegkezelés időtartamának növekedésével a stresszválaszban is sokszor szerepet játszó fenoloidok mennyisége egyre növekszik (10. ábra).



10. ábra. Összes fenoloid mennyiség kukorica levélben a különböző kezelések mellett. A hidegkezelések hosszának növekedésével egyre magasabb fenoloid szinteket láthatunk. Kontroll (K), SMM (S), hidegkezelés (H), SMM és hideg (SH).

Feltűnő, hogy a 4 órás hidegkezelte mintáknál megfigyelhető magas fenoloidszint mennyire hasonlít a RT-PCR mérések során tapasztaltakra, ahol a C4H és a CHS gének mennyiségben is egy kisebb növekedést mutattam ki ugyanennél az időpontnál. Ugyanakkor az is megfigyelhető, hogy a 10 és 24 órás kezeléseknél a kombinált kezelésű növényekben mindig magasabb fenoloid értékeket láthatunk, mint a csak hidegkezeltek esetében.

A kukorica antociántartalmát vizsgálva látszik (11. ábra), hogy a hidegkezelés hatására nő a mennyiségük. Pietrini és Massacci (1998) is megfigyelte, hogy kukoricában már enyhe hidegstressz (18°C) hatására is jelentősen megemelkedik az antocianin-tartalom. Bár a legtöbb hidegkezelési időtartam esetében a kombinált kezelésű minták antociánszintje a legmagasabb, a H és SH minták között mérhető különbség nem olyan jellegzetes, mint a fenoloidok esetében.



11. ábra. Összes antocián mennyisége kukorica szárában a különböző kezelések függvényében. Kontroll (K), SMM (S), hidegkezelés (H), SMM és hideg (SH).

Megállapítható, hogy az SMM-es előkezelés fokozza a hidegstressz hatására bekövetkező, de kisebb mértékben jelentkező válaszreakciókat, köztük az UV-elnyelő fenoloidok és az antocianinok bioszintézisét. Ez a hatás a hosszabb idejű kezeléseknél jelentkezik elsősorban. Emellett számtalan más növényben megfigyelték már, hogy a különböző stresszek hatására megnő a fenoloid és antocianin típusú vegyületek mennyisége (Dixon és Paiva, 1995; Solecka, 1997), köztük a kukoricában is az alacsony hőmérsékleti stressz hatására (Christie és mtsai., 1994; Kósa, 2011).

5. Következtetések

Munkánk során egy biológiailag aktív természetes vegyület, az S-metilmethionin stresszvédő hatását tanulmányoztuk mezőgazdasági szempontból jelentős, hidegstresszre érzékeny egyszikű és kétszikű növények, a kukorica és a paradicsom stressztűrő képességére.

Mindkét növény esetében több szinten vizsgáltuk meg (fiziológiai, metabolomikai és a génexpressziós), hogy az S-metilmethionin hogyan befolyásolja a növényekben kialakuló védekezési folyamatokat, illetve milyen hatással van az általános fiziológiai állapotukra a stressz fennállása során. A fotoszintetikus rendszer hatékonyságát - és ezáltal a növény fiziológiai állapotát - jellemző Fv/Fm értékekből egyértelműen láttuk, hogy az SMM-es előkezelés javítja a fotoszintézis aktivitását a hidegstressz során. A természetes védekező

reakciók során megfigyelhető és a védelmi potenciál kialakításában szerepet játszó metabolitok mennyiségének növekedése, így kukoricánál a stresszvédő fenoloidok és antocianinok, míg a paradicsomnál a poliaminok mennyisége is megnőtt a hidegkezelés hatására. Ha emellett SMM-es előkezelést is kaptak a növények, akkor még jelentősebb volt a növekedés, ami arra utal, hogy az SMM mindkét növényben fokozza ezeknek az anyagoknak a termelődését, ezáltal jelentősen hozzájárulva a stressztűrő-képesség növekedéséhez. Ezt a génexpressziós szinten bekövetkező változások is alátámasztják, ahol a vizsgált szintézisútvonalakhoz tartozó gének termékeinek mennyisége is megemelkedett.

Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy az S-metilmethionin alkalmas lehet a hidegstressz miatt kialakult káros folyamatok hatásának csökkentésére a kukoricában és a paradicsomban, mivel mindkét növényben fokozza a védőanyagok mennyiségét és az azok szintéziséért felelős enzimek kifejeződését.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnénk köszönetet mondani dr. Szigeti Zoltánnak, a Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék korábbi, valamint dr. Fodor Ferencnek, a jelenlegi tanszékvezetőjének, hogy lehetővé tették számunkra a munkát. Témavezetőinknek, dr. Rác Ilonának és dr. Rudnó Szabolcsnak is köszönettel tartozunk türelmes, támogató és inspiráló vezetésükért. Köszönjük a technikai segítséget Balogh Györgyinek és végül, de nem utolsón sorban szeretnénk megköszönni dr. Lásztity Demeternek szakmai támogatását és együttműködését.

Irodalomjegyzék:

- Agati, G.; Tattini M.: Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytologist* (2010) **186**: 786–793.
- Bassard, J-E.; Ullmann, P.; Bernier, F.; Werck-Reichhart, D.: Phenolamides: Bridging polyamines to the phenolic metabolism. *Phytochemistry* (2010) **71**: 1808–1824.
- Beck E. H., Heim R., Hansen J.: Plant resistance to cold stress: Mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening. *J. Biosci.* (2004), **29**: 449–459.
- Bourgis, F.; Roje, S.; Nuccio, M. L.; Fisher, D. B.; Tarczynski, M.C.; Li, C.; Herschbach, C.; Rennenberg, H.; Pimenta, M. J.; Shen, T-L.; Gage, D. A.; Hanson A. D.: S-Methylmethionine Plays a Major Role in Phloem Sulfur Transport and Is Synthesized by a Novel Type of Methyltransferase. *The Plant Cell* (1999) **11**: 1485-1497.
- Christie, P. J.; Alfenito, M. R.; Walbot, V.: Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta* (1994) **194**:541-549.
- Dai, J.; Mumper, R. J.: Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* (2010) **15**: 7313-7352.
- Dixon, R. A.; Paiva, N. L.: Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *The Plant Cell* (1995) **7**: 1085-1097.
- Dusán, L.: Chlorophyll *a* fluorescence induction. *Biochimica et Biophysica Acta* (1999) **1412**: 1-28.
- Fraser, C. M.; Chapple, C.: The Phenylpropanoid Pathway in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book* (2011) **9**.

- Fujita, M.; Fujita, Y.; Noutoshi, Y.; Takahashi, F.; Narusaka, Y.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K.: Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* (2006) **9**: 436–442
- Guy, C.: Molecular Responses of Plants to Cold Shock and Cold Acclimation. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* (1999) **1(2)**: 231-242.
- Hernández, I.; Alegre, L.; Breusegem, F. V.; Munne, S.: How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends in Plant Science* (2008) **14**: 125-132.
- Hussain, S. S.; Ali, M.; Ahmad, M.; Siddique, K. H. M.: Polyamines: Natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnology Advances* (2011) **29**: 300–311.
- Kaur-Sawhney, R.; Tiburcio, A. F.; Altabella, T.; Galston, A. W.: Polyamines in plants: An overview. *Journal of Cell and Molecular Biology* (2003) **2**: 1-12
- Kooten, van O.; Snel, F. H. J.: The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress biology. *Photosynthesis Research* (1990) **25/3**: 147-150.
- Kosová, K.; Vitámvás, P.; Prásil, I. T.; Renaut, J.: Plant proteome changes under abiotic stress - Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics* (2011) **74(8)**: 1301-1322.
- Kósa, E.; Szegő, D.; Horváth, E.; Rácz, I.; Szigeti, Z.; Lásztity, D.; Páldi, E.: Effect of S-methylmethionine on the photosynthesis in maize at different chilling temperatures. *Cent. Eur. J. Biol.* (2011) **6(1)**: 75–83.
- Lazár, D.: Chlorophyll a fluorescence induction. Review. *Biochimica et Biophysica Acta* (1999) **1412**: 1-28.
- Leyva, A.; Jarillo, J. A.; Salinas, J.; Martinez-Zapater, J. M.: Low Temperature Induces the Accumulation of *Phenylalanine Ammonia-Lyase* and *Chalcone Synthase* mRNAs of

- Arabidopsis thaliana* in a Light-Dependent Manner'. *Plant Physiol.* (1995) **108**: 39-46.
- Lovdal, T.; Lillo, C.: Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. *Analytical Biochemistry* (2009) **387**: 238–242.
- Lushchak, Volodymyr I.: Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* (2011), **153**: 175–190.
- Mahajan, S.; Tuteja, N.: Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (2005) **444**: 139–158.
- Mandre, M.. Stress concepts and plants. *Forestry Studies / Metsanduslikud uurimused* (2002) **XXXVI**: 1406-9954.
- Manoli, A.; Sturaro, A.; Trevisan, S.; Quaggiotti, S.; Nonis, A.: Evaluation of candidate reference genes for qPCR in maize. *Journal of Plant Physiology* (2012) 169(8): 807-815.
- McNeil S. D., Nuccio M. L., Hanson A. D.: Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance. *Plant Physiology* (1999) **120**: 945-949.
- Naczek, M.; Shahidi, F.: Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*. (2004) **1054**: 95–111.
- Pfaffl, M. W.: A new mathematical model for quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Research* (2001) **29**: 2004-2007.
- Pietrini, F.; Massacci, A.: Leaf anthocyanin content changes in *Zea mays* L. grown at low temperature: Significance for the relationship between the quantum yield of PS II and the apparent quantum yield of CO₂ assimilation. *Photosynthesis Research* (1998) **58**: 213–219.

- Rácz, I.; Páldi, E., Szalai, G.; Janda T.; Pál, M.; Lásztity, D.: S-methylmethionine reduces cell membrane damage in higher plants exposed to low-temperature stress. *Journal of Plant Physiology* (2008) **165**: 1483-1490.
- Schapendonk, A.H.C.M.; Dolstra, O.; van Kooten, O.: The use of chlorophyll fluorescence as a screening method for cold tolerance in maize. *Photosynthesis Research* (1989) **20**: 235-247.
- Schmittgen, T. D.; Livak, K. J.: Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* (2008) **3**: 1101-1108.
- Smallwood, M.; Bowles, D. J.: Plants in a cold climate. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* (2002) **357**: 831-847.
- Solecka, D.: Role of phenylpropanoid compounds in plant responses to different stress factors. *Acta Physiologiae Plantarum* (1997) **19**: 257-268.
- Stevenson, D. E.; Hurst, R. D.: Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more? *Cell. Mol. Life Sci.* (2007) **64**: 2900–2916.
- Syed Sarfraz, H.; Muhammad, A.; Maqbool, A.; Kadambot H.M. S.: Polyamines: Natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnology Advances* (2011) **29**: 300 – 301.
- Szegő, D.; Kósa, E.; Horváth, E.: Role of S-methylmethionine in the plant metabolism. *Acta Agronomica Hungarica* (2007) **55**: (4)
- Szegő, D.; Lőrinczi, V.; Páldi, E.; Visnovitzi, T.; Bratek, Z.; Lásztity, D.; Szigeti, Z.; Rácz, I.: Protective Effect of the Naturally Occurring, Biologically Active Compound S-Methylmethionine in Maize Seedlings Exposed to a Short Period of Cold. *Cereal Research Communications* (2009) **37**: 419–429.
- Tagmount, A.; Berken, A.; Terry, N.: An Essential Role of S-Adenosyl-L-Methionine:LMethionine S-Methyltransferase in Selenium Volatilization by Plants.

- Methylation of Selenomethionine to Selenium-Methyl-L-Selenium- Methionine, the Precursor of Volatile Selenium. *Plant Physiology* (2002) **130**: 847–856.
- Takahashi, T.; Kakehi, J-I.: Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Annals of Botany* (2010) **105**: 1–6.
- Urano, K.; Yoshiba, Y.; Nanjo, T.; Ito T.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K.: Arabidopsis stress-inducible gene for arginine decarboxylase AtADC2 is required for accumulation of putrescine in salt tolerance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2004) **313**: 369–375.
- Vandensompele, J.; de Preter, K. Pattyn, F.; Poppe, B.; van Roy, N; de Paepe, A.; Speleman, F.: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* (2002) **3**(7).
- Wang W., Vinocur B., Altman A.: Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* (2003), **218**: 1 - 14.
- Wirtz, M.; Droux, M.: Synthesis of the sulfur amino acids: cysteine and methionine. *Photosynthesis Research* (2005) **86**: 345–362.
- Wong, M. L.; Medrano, J. F.: Real-time PCR for mRNA quantitation. *Bio Techniques* (2005) **39**: 1-11.
- Zhang, X.; Fowler, S. G.; Cheng, H.; Lou, Y.; Rhee, S. Y.; Stockinger, E. J.; Thomashow, M. F.: Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant Arabidopsis. *The Plant Journal* (2004) **39**: 905–919.

Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Alulírott, Páldi Katalin a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

a kukoricák csíráztatását és nevelését,
az Fv/Fm értékek mérését PAM készüléken,
mRNS kinyerést,
DNázos emésztést,
cDNS szintézist,
primerpárok tervezését,
primerpárok tesztelését: PCR-es felszaporítás és gélelektroforézis,
real-time PCR reakciót,
fenoloid és antociántartalom mérését,
és az eredmények számítógépes kiértékelését

végeztem el.

.....
aláírás

Budapest, 2013. január 9.

Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Alulírott, Ludman Márta a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

paradicsom növények csíráztatását és nevelését,
Fv/Fm értékek mérését PAM készüléken,
S-metilmetioninos és hidegkezelést,
mRNS kinyerést,
cDNS szintézist,
primerpárok tervezését és tesztelését,
real-time PCR reakciót,
és az eredmények számítógépes kiértékelését

végeztem el.

.....

aláírás

Budapest, 2013. január 9.