

INSTYTUT FIZJOLOGII ROŚLIN
im. Franciszka Górskiego
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

MONOGRAFIE

18

Piotr Waligórski

ROLA POLIAMIN W PROCESACH WZROSTU I ROZWOJU
WYBRANYCH GATUNKÓW ROŚLIN

THE ROLE OF POLYAMINES IN PROCESSES
OF GROWTH AND DEVELOPMENT OF SELECTED PLANT SPECIES

KRAKÓW 2019

Recenzenci

Prof. dr hab. Leszek Jankiewicz

Prof. dr hab. Jan Kępczyński

Redaktor edycji MONOGRAFIE

Prof. dr hab. Franciszek Dubert

Skład i łamanie komputerowe

Zbigniew Szpila

ISBN 978-83-86878-39-0

ISSN 1427-4396

© Copyright by

Instytut Fizjologii Roślin *im. Franciszka Górskiego* PAN
30-239 Kraków, ul. Niezapominajek 21
tel. (12) 425-18-33, fax (12) 425-18-44

Druk i oprawa: NOVA SANDEC
ul. Lwowska 143, 33-300 Nowy Sącz, tel. +48 (18) 547 45 45
e-mail: biuro@novasandec.pl; <http://www.novasandec.pl>
Nakład 250 egz.

Wyrażam serdeczne podziękowania:

Panu Prof. dr hab. Franciszkowi Dubertowi,

*za merytoryczne wsparcie w każdym przypadku kiedy o to poprosilem,
za ciekawe dyskusje naukowe, za optymizm*

Pani Dr Agnieszce Kalandyk,

*za nieocenioną pomoc przy wykonaniu analiz do tej pracy,
oraz przy przetwarzaniu wyników, za entuzjazm*

Panu Prof. dr hab. Franciszkowi Janowiakowi,

*za życzliwość i pomoc na różnych etapach mojej kariery naukowej,
za rozsądek*

*Koleżankom i kolegom z Zakładu Biologii Rozwoju,
oraz wszystkim pracownikom Instytutu Fizjologii Roślin
za wsparcie*

Mojej Rodzinie

za cierpliwość w trakcie pisania pracy

Recenzentom i Redaktorom

za cenne i wnikliwe uwagi

Spis treści

WYKAZ SKRÓTÓW	vii
1. WSTĘP	8
1.1. BUDOWA CHEMICZNA POLIAMIN	8
1.2. MOLEKULARNE WŁAŚCIWOŚCI CZĄSTECZEK POLIAMIN	11
1.3. POWSZECHNOŚĆ WYSTĘPOWANIA POLIAMIN W PRZYRODZIE, A POTENCJALNE FUNKCJE PEŁNIONE W ORGANIZMACH ŻYWYCH...	13
1.4. PRZEMIANY WOLNYCH POLIAMIN.....	14
1.4.1. Biosynteza poliamin	14
1.4.2. Katabolizm poliamin.....	17
1.4.3. Transport poliamin.....	19
1.5. CHARAKTERYSTYCZNE DLA ROŚLIN PROCESY Z UDZIAŁEM POLIAMIN.....	20
1.5.1. Funkcje pełnione przez PA u roślin narażonych na działanie stresu.....	21
1.5.2. Funkcje pełnione przez PA w reakcjach innych niż stresowe.....	22
1.5.3. Współdziałanie poliamin i fitohormonów.....	23
1.5.3.1. Poliaminy i etylen	24
1.5.3.2. Poliaminy i auksyny.....	25
1.5.3.3. Poliaminy i gibereliny	25
1.5.3.4. Poliaminy i cytokininy	26
1.5.3.5. Poliaminy i kwas salicylowy.....	27
1.5.3.6. Poliaminy i kwas abscysynowy	27
1.5.3.7. Poliaminy i kwas jasmonowy	28
1.6. GALASY I ICH ZWIĄZEK Z POLIAMINAMI	29
1.7. OGÓLNY PRZEGLĄD METOD ANALIZY POLIAMIN.....	30
1.8. INTERPRETACJA ZAWARTOŚCI POLIAMIN.....	32
2. CEL I ZAKRES BADAŃ.....	35
3. MATERIAŁ BIOLOGICZNY I METODYKA.....	37
3.1. MATERIAŁ BIOLOGICZNY	37
3.2. PRZYGOTOWANIE I PRZECHOWYWANIE PRÓBEK BIOLOGICZNYCH ...	38
3.3. POMIAR STĘŻENIA POLIAMIN METODĄ HPLC PO DANSYLACJI.....	39
3.4. SCHEMATY PRZEPROWADZONYCH DOŚWIADCZEŃ NA ROŚLI- NACH STRĄCZKOWYCH.....	40
3.4.1. Skład i stężenie poliamin u badanych gatunków roślin	40
3.4.2. Analiza zawartości poliamin w nasionach w zależności od ich stop- nia dojrzałości	41
3.4.3. Zawartość poliamin w kwiatach w zależności od stopnia ich dojrzałości...	42

3.4.4. Zawartość poliamin w kwiatach z wysoką konkurencją o metabolity i w kwiatach z niską konkurencją o metabolity	42
3.4.5. Zawartość poliamin w nasionach poddanych działaniu suszy w różnych stadiach rozwoju nasion	44
3.4.5.1. Wyznaczenie maksymalnej pojemności wodnej gleby (MWC) i traktowanie roślin suszą do założonej wartości MWC	44
3.5. ZAWARTOŚĆ POLIAMIN W GALASACH I LIŚCIACH DĘBU	45
3.6. OPRACOWANIE STATYSTYCZNE WYNIKÓW	46
4. WYNIKI	47
4.1. SKŁAD I STĘŻENIE POLIAMIN U BADANYCH GATUNKÓW ROŚLIN	47
4.1.1. Zawartość poliamin w organach poszczególnych gatunków roślin	47
4.1.2. Porównanie udziału poszczególnych poliamin	50
4.2. ZAWARTOŚĆ POLIAMIN W NASIONACH W ZALEŻNOŚCI OD STOPNIA ICH DOJRZAŁOŚCI	52
4.3. ZAWARTOŚĆ POLIAMIN W KWIATACH W ZALEŻNOŚCI OD STOPNIA ICH DOJRZAŁOŚCI	60
4.4. ZAWARTOŚĆ POLIAMIN W KWIATACH Z WYSOKĄ KONKURENCJĄ O METABOLITY I W KWIATACH Z NISKĄ KONKURENCJĄ O METABOLITY	64
4.5. ZAWARTOŚĆ POLIAMIN W NASIONACH PODDANYCH DZIAŁANIU SUSZY W RÓŻNYCH STADIACH ROZWOJU NASION	69
4.6. ZAWARTOŚĆ POLIAMIN W GALASACH	71
5. DYSKUSJA	76
6. PODSUMOWANIE	86
7. BIBLIOGRAFIA	87
8. STRESZCZENIE	99
9. ABSTRACT	100

Wykaz skrótów

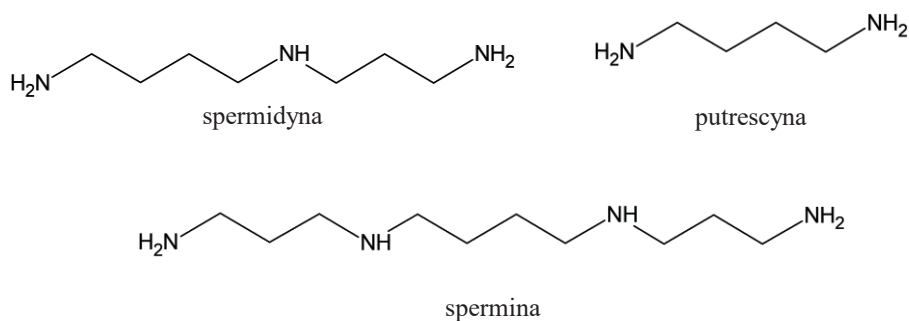
ABA	– fitohormon kwas abscysynowy
ADC	– dekarboksylaza argininy, także szlak syntezy putrescyny rozpoczynający się od argininy
AGI	– Indeks Grup Aminowych (<i>Amine Group Index</i>), wskaźnik wyliczony na podstawie liczby grup aminowych badanych poliamin oraz stężenia tych poliamin
CAT	– enzym katalaza
DAO	– enzym oksydaza diamin
FAD	– dinukleotyd flawinoadeninowy
GA3	– fitohormon kwas giberelinowy
IAA	– fitohormon kwas indolilo-3-octowy
IBA	– fitohormon kwas indolilo-3-masłowy
JA	– fitohormon kwas jasmonowy
MJ	– ester metylowy kwasu jasmonowego, lotna pochodna fitohormonu
MWC	– maksymalna pojemność wodna gleby
OAZ1	– gen i będący efektem jego ekspresji antyzym dekarboksylazy ornityny
ODC	– dekarboksylaza ornityny, także szlak syntezy putrescyny rozpoczynający się od ornityny
PA	– poliamina, poliaminy
PAO	– enzym oksydaza poliamin
PCD	– zjawisko Programowalnej Śmierci Komórki (<i>Programmed Cell Death</i>)
PUT/SPD+SPM	– stosunek stężenia putrescyny do sumy stężeń spermidyny i sperminy
SA	– fitohormon kwas salicylowy
SAM	– S-adenozylometionina
SOD	– enzym dysmutaza ponadtlenkowa

1. WSTĘP

1.1. Budowa chemiczna poliamin

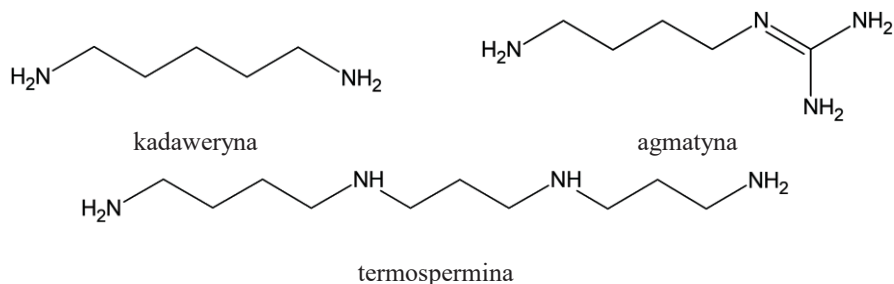
Dużą i ważną grupą związków biologicznie ważnych są aminy biogenne, wśród których znajdziemy między innymi histaminę, serotoninę, czy tyraminę (Costa i in., 2018). Zaliczamy do nich również poliaminy (PA), które w odróżnieniu od wymienionych monoamin zawierają w cząsteczce co najmniej dwie grupy aminowe (Takahashi i Takehi, 2010). Najczęściej używana definicja mówi, że PA są pospolicie występującymi organicznymi związkami alifatycznymi o charakterze polikationów z uwagi na obecność grup aminowych (Miller-Fleming i in., 2015). Niekiedy spotyka się definicję, według której PA mają co najmniej trzy grupy aminowe (Eller i in., 2005), zaś związki chemiczne z dwoma grupami aminowymi wydzielane są w osobną grupę diamin. W prezentowanej pracy stosowana będzie pierwsza, szersza definicja PA.

Najpowszechniej występującymi w organizmach żywych i jednocześnie najczęściej opisywanymi w literaturze naukowej PA są putrescyna, spermina i spermidyna (Miller-Fleming i in., 2015). Są to związki o budowie łańcuchowej, z których najprostsza, putrescyna to diamina 1,4 diaminobutan. Spermina i spermidyna mają bardziej złożoną budowę. Jeśli do cząsteczki putrescyny przyłączymy do jednej z grup aminowych trójwęglowy łańcuch zakończony grupą aminową, otrzymamy spermidynę, zaś gdy do cząsteczki spermidyny przyłączymy kolejny trójwęglowy łańcuch zakończony jeszcze jedną grupą aminową, otrzymamy sperminę. Zarówno spermina, jak i spermidyna, obok terminalnych pierwszorzędowych grup aminowych zawierają w cząsteczce drugorzędowe grupy aminowe.



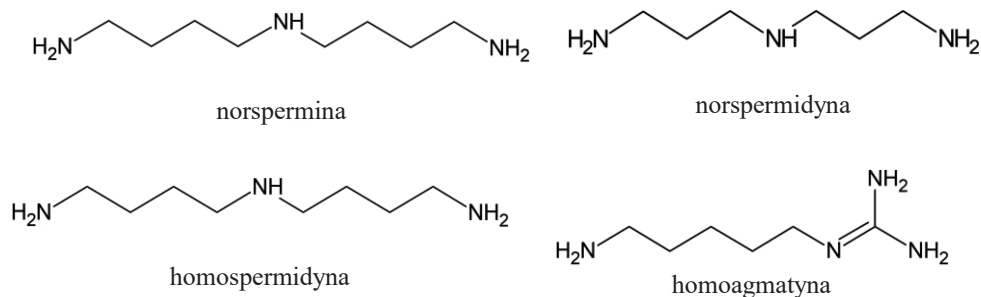
Ryc. 1. Struktury najpowszechniej występujących poliamin: putrescyny, spermidyny i sperminy. Są to cząsteczki o budowie łańcuchowej, zawierające I i II-rzędowe grupy aminowe (Miller-Fleming i in., 2015). Stężenia które osiągają w materiale żywym zazwyczaj znacznie przekraczają stężenia innych poliamin

Obok wymienionych PA, często w materiale biologicznym występują PA takie jak kadaweryna i agmatyna, z których pierwsza jest cząsteczką liniową, druga zaś jest rozgałęziona. W próbkach roślinnych często spotyka się izomer sperminy, termosperminę (Takano i in., 2012).



Ryc. 2. Struktury kolejnych poliamin: kadaweryny, agmatyny i termosperminy (Takano i in., 2012). Zazwyczaj obecne w mniejszych stężeniach od putrescyny, spermidyny i sperminy, w niektórych przypadkach obserwuje się także znaczącą ich akumulację

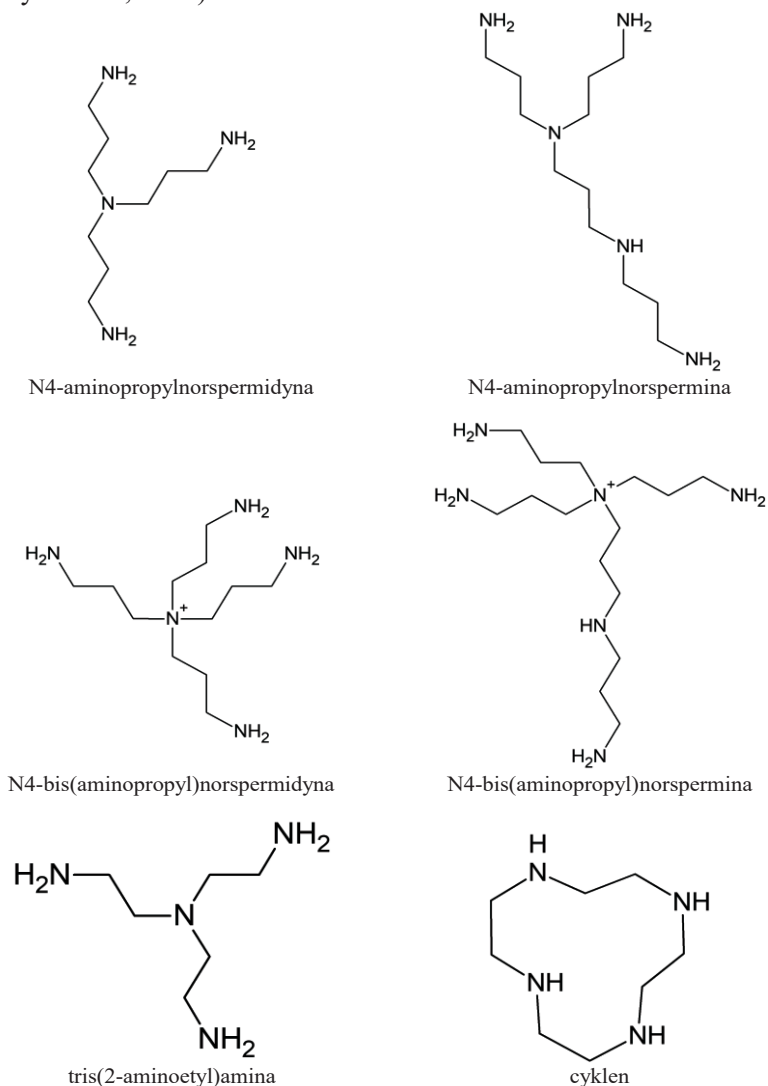
W materiale biologicznym znajdowane są także inne, występujące zazwyczaj w mniejszych stężeniach PA, takie jak norspermina, norspermidyna, homospermidyna i homoagmatyna (Hamana i in., 1996).



Ryc. 3. Mniej rozpowszechnione poliaminy, niekiedy w materiale żywym obserwuje się ich podwyższone stężenia (Hamana i in., 1996)

Rzadziej spotykane są PA, do których należą alifatyczne związki z III i IV-rzędową grupą aminową, oraz związki o budowie cyklicznej. Przykładami takich związków są N4-aminopropyl-norspermidyna, N4-aminopropyl-norspermina,

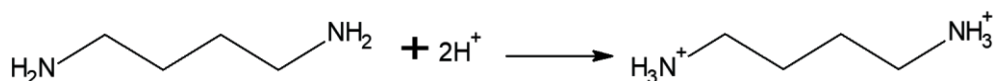
N4-bis(aminopropyl)norspermidyna, N4-bis(aminopropyl)norspermina, tris(2-aminoetyl)amina i cyklen. Część z nich wykryto w organizmach prokariotycznych (Hamana i in., 1994). Rozgałęzione PA są także ważnym substratem w syntezie chemicznej (Brycki i in., 2017).



Ryc. 4. Alifatyczne poliaminy III i IV-rzędowe, oraz poliaminy cykliczne. Powszechność ich występowania w świecie żywym nie jest często badana, dobrze jednak jest udokumentowane występowanie części z nich w organizmach prokariotycznych (Hamana i in., 1994)

1.2. Molekularne właściwości cząsteczek poliamin

Jak już wcześniej wspomniano, PA mają właściwości drobnocząsteczkowych polikationów, których charakterystyka chemiczna zdeterminowana jest przez obecność dwóch, lub więcej grup aminowych w cząsteczce (Miller-Fleming i in., 2015). Obecność kilku dodatnio naładowanych grup aminowych w cząsteczkach nadaje im wysoce polarne właściwości, dzięki którym silnie oddziałują z dipolowymi cząsteczkami wody. Skutkiem wymienionych właściwości cząsteczek PA jest ich doskonała rozpuszczalność w wodzie, oraz zdolność do wiązania dużej liczby cząsteczek wody poprzez formowanie otoczki solwatacyjnej (Gupta i in., 2012). Co ważne, PA wykazują kationowy charakter w warunkach fizjologicznego pH. Ich unikalną cechą jako polikationów jest rozmieszczenie dodatniego ładunku w regularnych odstępach na linearnej cząsteczce. Bez wątplenia wpływa to na kinetykę i specyficzność wiązania do polianionów takich jak DNA, czy RNA, do których PA wykazują silne powinowactwo (Basu i in., 1988). Jednak wiele szczegółów tych procesów pozostaje wciąż niewyjaśnionych lub niedostatecznie poznanych.



Ryc. 5. Powstawanie polikationu z cząsteczki poliaminy na przykładzie putrescyny. Ilustracja autora

Grupą chemiczną której PA zawdzięczają swoje właściwości, jest grupa aminowa, przy czym w cząsteczkach PA znajdują się nie mniej niż dwie takie grupy (Takahashi i Kakehi, 2010). Cząsteczki liniowe PA zawierają dwie terminalne, a więc pierwszorzędowe grupy aminowe, PA rozgałęzione zawierają więcej niż dwie, zaś niektóre PA cykliczne np. cyklen, nie zawierają żadnej. W poniższej tabeli porównano liczbę grup aminowych występujących w pojedynczej cząsteczce wymienionych wcześniej PA.

Innymi biologicznie ważnymi cząsteczkami zdolnymi do wiązania z PA dzięki obecności grup anionowych, są fosfolipidy wchodzące w skład membran biologicznych (Ponappa i in., 1993), oraz białka pełniące rozmaite funkcje (Cohen, 1971): białka błonowe, receptorowe, pompy jonowe, enzymy, białka strukturalne i inne. Struktury biologiczne do których przyłączyły się PA zwiększają swoją stabilność mechaniczną.

PA mogą też wpływać na błony biologiczne poprzez hamowanie wymiany fosfolipidów pomiędzy wewnętrzną a zewnętrzną warstwą błon biologicznych (Bratton, 1994). Obserwowano także stabilizujący wpływ PA na trwałość kompleksów błon tylakoidów w warunkach stresu osmotycznego (Besford i in., 1993).

Tabela 1.

Liczba grup aminowych w cząsteczkach wybranych poliamin

Nazwa poliaminy	Liczba grup aminowych w cząsteczce
putrescyna	2
spermidyna	3
spermina	4
kadaweryna	2
agmatyna	3*
termospermina	4
norspermina	4
norspermidyna	3
homospermidyna	3
N4-aminopropyl-norspermidyna	4
N4-aminopropyl-norspermina	5
N4-bis(aminopropyl)-norspermidyna	5
N4-bis(aminopropyl)-norspermina	6
tris(2-aminoetyl)amina	4
cyklen	4**

* plus jedna grupa iminowa

** wszystkie grupy aminowe są II-rzędowe

Niewielka masa molowa oraz doskonała rozpuszczalność w wodzie skutkują dużą mobilnością cząsteczek PA. Właściwość ta ułatwia transport PA w organizmie. Jest to ważna cecha wszystkich związków chemicznych, które pełnią funkcje regulatorów funkcji fizjologicznych (Müller i Schier, 2011), PA zaś przypisuje się między innymi pełnienie takiej roli.

Obecność polarnej grupy aminowej czyni PA związkami aktywnymi chemicznie. Sama grupa aminowa może tworzyć wiązanie amidowe, którego szczególnym przypadkiem jest wiązanie peptydowe. W przypadku reakcji enzymatycznych, do PA może zostać przyłączona grupa alkilowa, w ten sposób jedne PA przetwarzane są w inne. Specyficzne enzymy mogą też doprowadzić do deaminacji, co z kolei prowadzi do katabolizmu PA.

Obok wolnych PA występują one także w postaci skoniugowanej lub związanej z innymi związkami, do których należą fenole (Goldberg i Perdrizet, 1984), czy białka (K-Sawhney i Applewhite, 1993). Formy molekularne zachowujące rozpuszczalność po takiej reakcji to skoniugowane PA (ang. *conjugated*), formy przyłączone do stałych struktur komórkowych to związane PA (ang. *bound*), które mogą zostać unieruchomione np. w ścianie komórkowej (Hura i in., 2015) i w razie potrzeby uwolnione, bowiem formy związane są nieaktywne. Kontrola stosunku wolnych i związanych form PA może być czynnikiem regulującym ich aktywność (Pfosser i in., 1990).

1.3. Powszechność występowania poliamin w przyrodzie, a potencjalne funkcje pełnione w organizmach żywych

PA znano od bardzo dawna jako produkt rozkładu białek, obecne były zwłaszcza w rozkładającej się materii organicznej, stąd ich pospolita nazwa „*trupie jady*”. O ile dawniej uważano, że PA odpowiadają za toksyczność produktów rozkładu białek, to kolejne badania dowiodły, iż za toksyczność tę odpowiadały w rzeczywistości toksyny bakteryjne (Scheuer i Rodel, 1995). Przez wiele lat badań nad PA ustalono, że prawdopodobnie uczestniczą one w wielu procesach życiowych, a ich zwiększona zawartość w rozkładającej się materii żywej jest jedynie ubocznym efektem degradacji związków zawierających grupę aminową.

PA są obecne we wszystkich eukariotycznych i większości prokariotycznych komórek (Hamana i in., 1985). Szerokie spektrum związków chemicznych do których powinowactwo mają PA determinuje różnorodność struktur komórkowych do których się przyłączają, oraz mnogość procesów fizjologicznych w których mogą brać udział. Stąd postuluje się wiele hipotetycznych funkcji, które PA mogą pełnić w fizjologii organizmów żywych.

PA przypisuje się udział w procesach aktywacji genów, podziałów komórkowych, wzrostu i rozwoju na poziomie komórek, a także całego organizmu, oraz w procesach prowadzących do spoczynku (Galston i Sawhney, 1990). Od dawna znana jest ich zdolność do przyłączania się do ujemnie naładowanych cząsteczek kwasów fenolowych, kwasów nukleinowych, fosfolipidów, czy białek (Cohen, 1971), (Childs i in., 2003), co związane jest z faktem iż kationowe cząsteczki PA przyciągane są przez aniony. PA stabilizują strukturę membran biologicznych (Ballas i Mohandas, 1983), modulują aktywność enzymatyczną, uczestniczą w reakcjach odpowiedzi na stres środowiskowy (Shu i in., 2012).

PA mogą pełnić rolę modulatorów aktywacji genów, ciekawym przykładem mechanizmu odpowiedzialnego za tę funkcję jest zmiana ramki odczytu genów w rybosomach po przyłączeniu PA (Rato i in., 2011). Jednym z genów, którego aktywność regulowana jest w ten sposób jest gen antyzymu dekarboksylazy ornityny,

OAZ1. Produkt jego ekspresji, białko OAZ1 destabilizuje strukturę ODC (Heller i Canellakis, 1981), co prowadzi do jego degradacji, w konsekwencji spadku produkcji putrescyny, w dalszej zaś perspektywie zmniejszenia stężenia innych PA produkowanych z putrescyny.

Kationowy charakter PA i wynikająca z niego zdolność do wiązania się z DNA podobne są do własności białek histonowych. Według niektórych autorów PA mogą działać synergistycznie do tych zasadowych białek, zmieniając strukturę nukleosomów (Matthews, 1993).

O ważności PA dla organizmów żywych świadczy obserwowane zatrzymanie wzrostu komórek w których uniemożliwiono syntezę PA w wyniku traktowania silnymi inhibitorami enzymów produkujących putrescynę: α -difluorometylornityną (DFMO) i α -difluorometyloargininą (DFMA). Zjawisko to znane jest od dawna u mikroorganizmów (Tabor i Tabor, 1984), zwierząt (Mamont i in., 1978) i roślin (Galston, 1986).

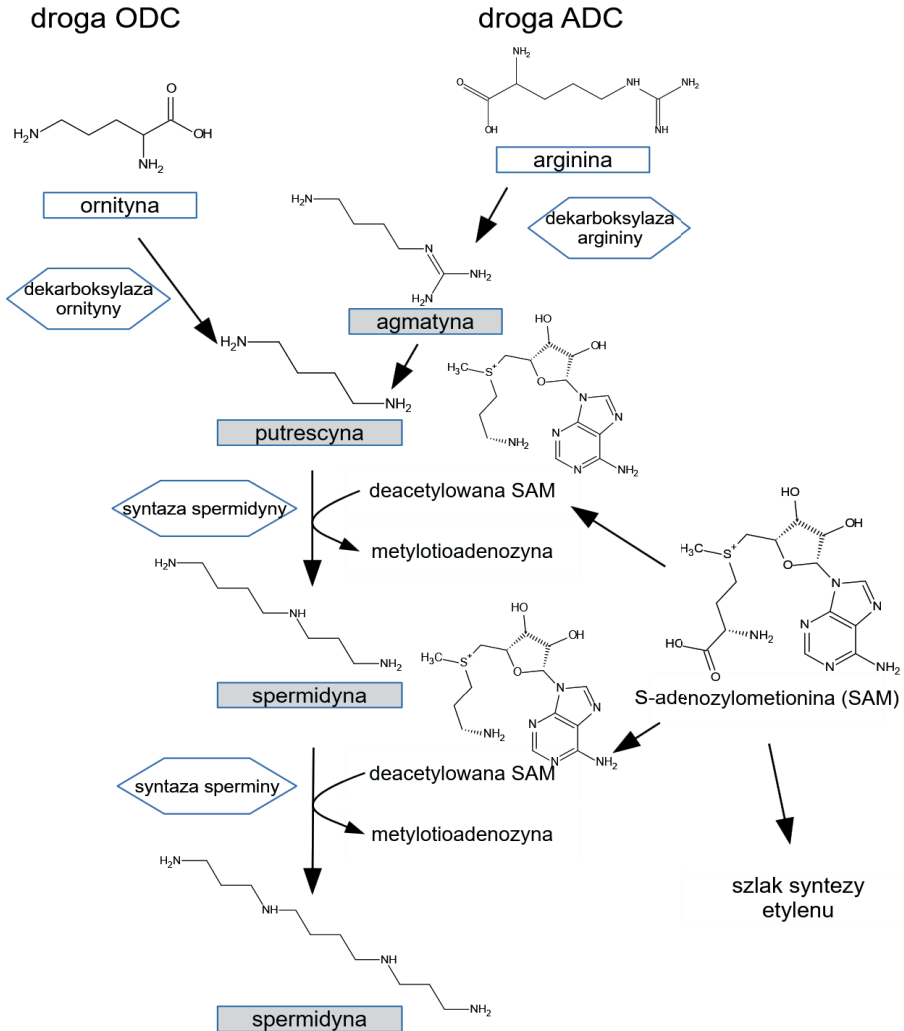
PA regulują aktywność wielu rodzajów kanałów jonowych (Nakajima i in., 2015). PA uczestniczą także w regulacji procesów programowanej śmierci komórki (Moschou i Roubelakis-Angelakis, 2014).

PA są także pulą substancji, gdzie krzyżują się drogi „recyklingu” związków azotowych w komórce, oraz są ważnym elementem mechanizmu ustalenia wewnątrzkomórkowej równowagi azotu do węgla (Moschou i in., 2012). Skoro PA zawierają dużo azotu, niektórzy badacze formułowali hipotezy, iż mogą one stanowić źródło azotu do syntezy aminokwasów, a w przypadku roślin także chlorofilu (Tabor i Tabor, 1972).

1.4. Przemiany wolnych poliamin

1.4.1. Biosynteza poliamin

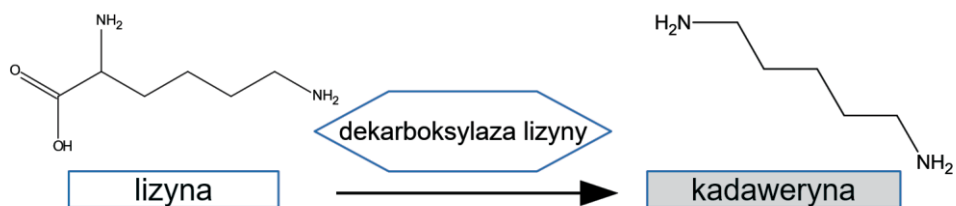
Synteza większości PA rozpoczyna się od powstania putrescyny, która może być syntetyzowana z argininy na dwa sposoby: poprzez ornitynę, oraz poprzez agmatynę (Ryc. 6). Pierwsza droga nazywana jest „ODC” od nazwy pierwszego enzymu w tym szlaku: dekarboksylazy ornityny, czyli ODC (EC 4.1.1.17) (Kern i in., 1999), jest to dominujący sposób syntezy PA u zwierząt. Drugi szlak nazywany jest „ADC” od dekarboksylazy argininy, czyli ADC (EC 4.1.1.19), w ten sposób powstaje większość putrescyny u roślin. U niektórych z nich, w tym u *Arabidopsis thaliana*, gen kodujący ODC nie jest w ogóle obecny (Hanfrey i in., 2001).



Ryc. 6. Schemat biosyntezy ważniejszych poliamin za wyjątkiem kadaweryny, na podstawie Liu i in. (2015). Poliaminy zaznaczono szarymi prostokątami, enzymy sześciokątami. Biosynteza podstawowych poliamin oparta jest o aminokwasy z cyklu mocznikowego: ornitynę i argininę, reakcje te znajdują się więc w centrum mechanizmów przemian azotowych w komórce

Synteza PA (Liu i in., 2015) na drodze ADC rozpoczyna się od dekarboksylacji argininy. Powstała w wyniku tej reakcji agmatyna jest hydrolizowana do putrescyny. W przypadku drogi ODC, pierwszym etapem jest dekarboksylacja ornityny, w wyniku czego produkowana jest od razu putrescyna. Powstała putrescyna, niezależnie od drogi powstania, stanowi substrat dla syntazy spermidyny (EC 2.5.1.19), która katalizuje reakcję powstawania tej PA (Chen i in., 2019). W następnej kolejności ze spermidyny produkowana jest spermina w reakcji katalizowanej przez syntazę sperminy (EC 2.5.1.22). W obydwu tych reakcjach niezbędnym, drugim substratem jest deacetylowana S-adenozylometionina. Warto zwrócić tu uwagę, że jej prekursor, S-adenozylometionina (SAM) jest także niezbędna do syntezy ważnego fitohormonu zaangażowanego w reakcje na stres - etyleny (Roje, 2006), stąd możliwa jest wzajemna interakcja szlaków transdukcji sygnału opartych na PA i etylenie. Zagadnienie to omówiono w dalszej części pracy.

Niezależnie od drogi ADC i ODC powstaje inna powszechnie występująca PA - kadaweryna, która produkowana jest bezpośrednio z lizyny poprzez dekarboksylację (Gamarnik i Frydman, 1991) katalizowaną enzymem dekarboksylazą lizyny (LDC) (Ryc. 7).



Ryc. 7. Biosynteza kadaweryny z lizyny, na podstawie Moschou i in. (2012). Biosynteza tej poliaminy nie jest bezpośrednio powiązana z siecią przemian podstawowych poliamin

Stężenia PA w roślinach podlegają specyficznej homeostazie, dotyczy to zwłaszcza PA o cięższych cząsteczkach, których stężenie nawet przy znacznie podniesionej zawartości putrescyny, zwiększa się bardzo nieznacznie (Majumdar i in., 2013). Zaangażowanie PA w wiele procesów biochemicznych na poziomie komórkowym wymaga najprawdopodobniej utrzymywania tej homeostazy (Moschou i Rubelakis-Angelakis, 2014). Mimo to jednak putrescyna jest kluczową PA, od której zawartości zależy stężenie wielu innych PA. Poziom putrescyny zależy nie tylko od aktywności enzymów odpowiedzialnych za jej syntezę, czyli ACD i ODC, ale także od czynników takich jak: aktywność enzymów syntetyzujących ornitynę i argininę (Majumdar i in., 2015), aktywność enzymów katabolizujących PA, intensywność

konwersji między formą wolną putrescyny, a formami związanymi, oraz intensywność zużywania putrescyny do produkcji spermidyny i sperminy (Pérez-amador i Carbonell, 1995).

Jak już wcześniej wspomniano, PA znajdują się w centrum procesów przemian azotowych, poprzez ornitynę będąc związane z cyklem mocznikowym (Majumdar i in., 2015) mają znaczący udział w przepływie związków azotowych w skali całości przemian biochemicznych w komórce (Moschou i in., 2012).

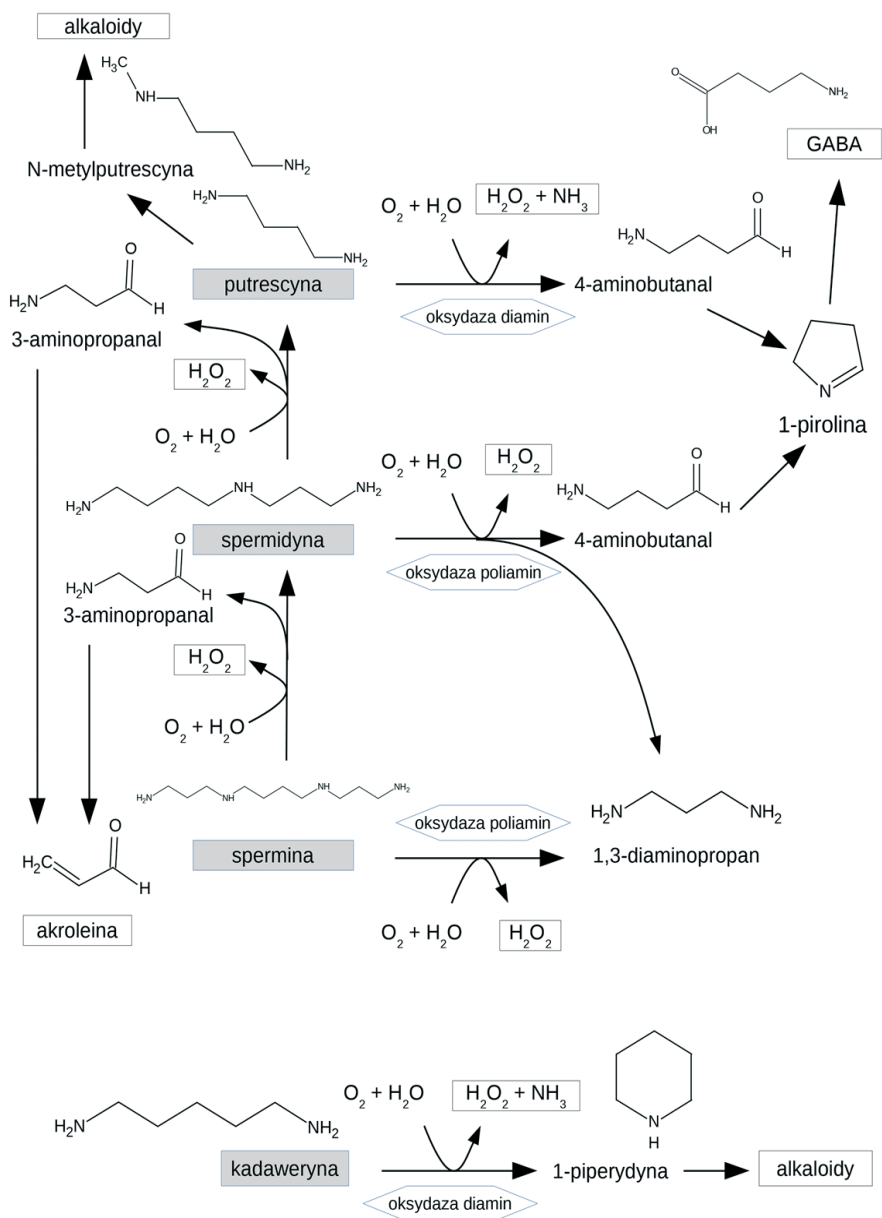
1.4.2. Katabolizm poliamin

Szlak rozkładu cięższych PA rozpoczyna się od ich utlenienia za pomocą zależnej od FAD oksydazy poliamin (EC 1.5.3.11), zwanej w skrócie PAO. Jej substratami są spermina i spermidyna, zaś produktami reakcji odpowiednio: 1,3-diaminopropan i 4-aminobutanal. Enzym ten skraca substrat o grupę aminopropylową wytwarzając dodatkowo nadtlenek wodoru (Cona i in., 2006). Reakcje te zachodzą w peroksosomach i cytoplazmie. Enzym ten występuje w większych stężeniach u roślin jednoliściennych.

Putrescyna podlega degradacji do 4-aminobutanalu, amoniaku i nadtlenu wodoru. Reakcja ta jest katalizowana przez oksydazę diamin (EC 1.4.3.22, dawniej EC 1.4.3.6), w literaturze nazywaną DAO, lub CuAO. Enzym ten jako kofaktor zawiera miedź, zaś jego aktywność zlokalizowana jest głównie w apoplacie. Lokalizacja ta związana jest najprawdopodobniej z faktem, iż jednym z produktów aktywności tego enzymu jest nadtlenek wodoru, który spełnia funkcje sygnałowe i obronne w warunkach stresu biotycznego i abiotycznego (Sujkowska-Rybkowska i Borucki, 2014). Nadtlenek wodoru produkowany w czasie katabolizmu PA może także uczestniczyć w procesach lignifikacji ściany komórkowej, oraz może bezpośrednio niszczyć komórki pasożytów, obydwie te funkcje mają znaczenie w ochronie przed patogenami (Cona i in., 2006). DAO syntetyzowany jest w dużych stężeniach u dwuliściennych, szczególnie u roślin strączkowych.

Dalszymi produktami degradacji PA są: dla putrescyny i spermidyny kwas γ -aminomasłowy (GABA), dla spermidyny i sperminy akroleina (Takano i in., 2012). Warto zwrócić uwagę, iż produkty degradacji PA: nadtlenek wodoru i akroleina są toksyczne, stąd nadmierne stężenie PA wpływa negatywnie na procesy wzrostowe roślin (Kakehi i in., 2008). Co więcej, to właśnie produkcja nadtlenu wodoru i akroleiny odpowiada za toksyczność ostrą PA (Pegg, 2013), jednak nie jest ona specjalnie wysoka, przykładowo LD_{50} dla putrescyny wynosi dla szczura przy doustnym podaniu 463 mg/kg (źródło: MSDS Sigma_Aldrich), dla innych PA jest podobna.

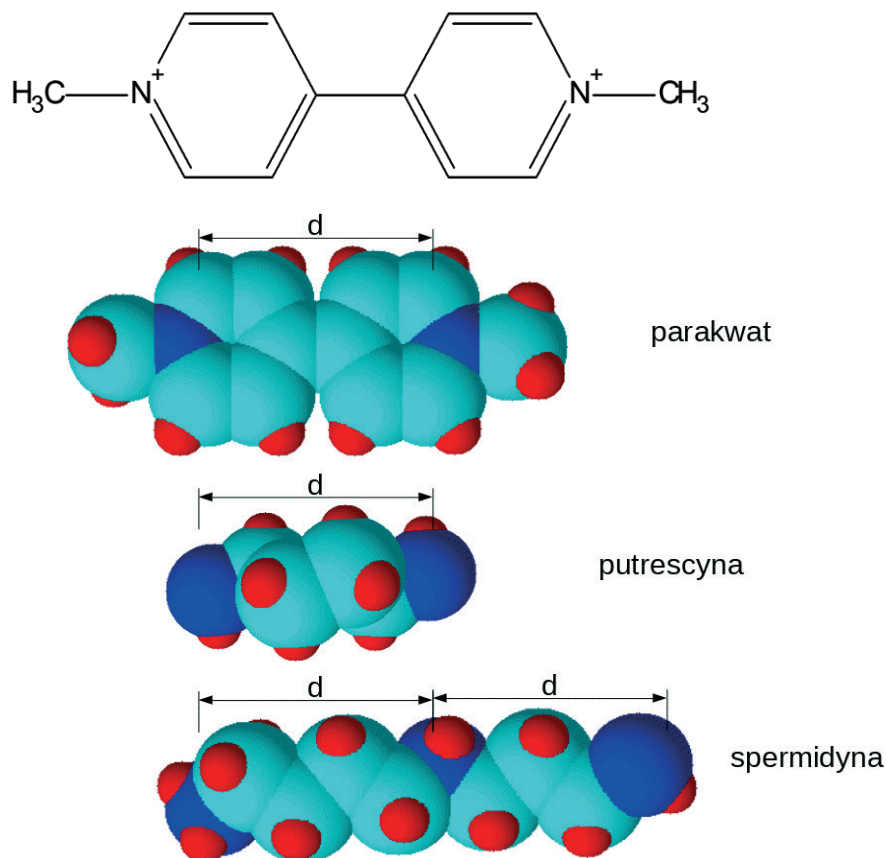
Katabolizm i synteza PA wiążą je z innymi procesami biochemicznymi: syntezą etylenu, syntezą nadtlenu wodoru, oraz z syntezą kilku grup alkaloidów (Moschou i in., 2012).



Ryc. 8. Katabolizm poliamin i związki z nich powstające, na podstawie Moschou i in. (2012). Poliaminy w szarych prostokątach, główne enzymy w sześciokątach, główne metabolity powstające z PA w białych prostokątach

1.4.3. Transport poliamin

Pobieranie PA przez komórki wykazuje wiele podobieństw do procesu pobierania toksycznego herbicydu parakwatu (Gordonsmith i in., 1983), który także współzawodniczy z PA w procesach transportu do komórek. Analiza kinetyki i energetyki tych procesów w warunkach *in vitro* pozwoliła na wskazanie strukturalnych podobieństw między uczestniczącymi w nich związkami chemicznymi. Wszystkie



Ryc. 9. Struktura chemiczna parakwatu oraz trójwymiarowa wizualizacja porównująca tę cząsteczkę do putrescyny i spermidyny. Odległość *d* między naładowanymi atomami azotu jest podobna do spotykanej w poliaminach, stąd parkwat jest transportowany do wnętrza komórki w taki sam sposób jak poliaminy. Kolor błękitny – atomy węgla, granatowy – azotu, czerwony – wodoru. Ilustracje wykonane przez autora za pomocą programu ChemSketch (ACD/Labs)

te związki charakteryzują się obecnością co najmniej dwóch dodatnich ładunków rozdzielonych przez 4-7 atomów węgla w łańcuchu (Fujita i Shinozaki, 2014). Wszystkie znaczące PA spełniają to kryterium (spełnia je również parakwat, dowody zaś wskazują, że jego toksyczność jest uzależniona od sprawności mechanizmów pobierania PA). Należy przypomnieć tutaj, że przestrzenna lokalizacja dodatnich ładunków na linearnej cząsteczce PA odpowiedzialna jest za część biologicznych właściwości PA np. zdolność wiązania się do DNA (Bignon i in., 2017). Ciekawym zbiegiem okoliczności w przypadku parakwatu jest fakt, iż za jego toksyczność odpowiadają podobne mechanizmy jak w przypadku toksyczności PA, czyli produkcja reaktywnych form tlenu.

Komórki zazwyczaj produkują wystarczającą ilość PA aby pokryć swoje zapotrzebowanie (Kakkar i in., 1997), jednak w przypadkach obniżonej dostępności PA uruchamiane są mechanizmy pobierania ich z zewnątrz (Fujita i in., 2012). Autorzy cytowanej pracy podają także wiele szczegółów funkcjonowania mechanizmów pobierania PA przez komórki. Analizowano także szczegóły transportu parakwatu do wnętrza komórek, odnosząc je do PA. Bazując na tych wynikach autorzy wskazują na specyficzny mechanizm transportu PA do komórki oparty o białko transportowe RMV1. Jest to transbłonowe białko zlokalizowane w błonie komórkowej, należy ono do większej grupy białek LAT (ang. *L-type amino acid transporter*), w których obrębie możemy znaleźć więcej białek prawdopodobnie zaangażowanych w transport PA. Przykładowo zlokalizowane w aparacie Golgiego białko AtLAT4 odpowiedzialne jest za akumulację PA w chloroplastach. Bliższe szczegóły funkcjonowania mechanizmu transportu PA na poziomie komórkowym są wciąż niedostatecznie poznane.

PA mogą być też transportowane na dalsze odległości w organizmie roślinnym za pośrednictwem ksylemu (Kakkar i in., 1997), co prawdopodobnie wiąże się z ich wysoką polarnością.

Warto zwrócić uwagę na specyfikę transportu PA w odniesieniu do transportu fitohormonów. W przypadku wielu fitohormonów np. auksyn, transport polarny zależy od ładunku cząsteczki (Jones, 1998), tak więc polikationowe cząsteczki PA mogą mieć tendencję do przemieszczania się w odwrotnym kierunku niż większość fitohormonów, które mają charakter anionowy, za wyjątkiem np. cytokinin, które mają charakter kationowy.

1.5. Charakterystyczne dla roślin procesy z udziałem poliamin

W literaturze naukowej znaleźć można wiele hipotez dotyczących biologicznej roli PA w roślinach. Część z nich pokrywa się z funkcjami pełnionymi u innych organizmów, nie jest więc unikalna dla roślin. Do takich uniwersalnych procesów,

w których udział mogą brać PA należy regulacja replikacji DNA i podziałów komórkowych (Galston i Sawhney, 1990), (Acosta i in., 2005). Specyfiką organizmów roślinnych jest podział roli enzymów syntetyzujących putrescynę. Aktywność pierwszego z nich, dekarboksylazy ornityny (ODC) powiązana jest z intensywnością podziałów komórkowych, enzym ten aktywny jest np. w tkankach merystematycznych. Drugi enzym syntetyzujący putrescynę, dekarboksylaza argininy (ADC), aktywny jest głównie w tkankach nie wykazujących wysokiej aktywności podziałowej, gdzie wzrost dokonuje się na drodze powiększania rozmiarów komórek (Pérez-amador i Carbonell, 1995).

1.5.1. Funkcje pełnione przez PA u roślin narażonych na działanie stresu

Jest wiele przyczyn, dla których procesy stresowe przebiegają u roślin inaczej niż u zwierząt. Rośliny są specyficzną grupą organizmów, ich szczególnymi cechami są osiadły tryb życia, oraz zdolność do autotrofii. Konsekwencją osiadłego trybu życia jest konieczność wykształcenia skutecznych mechanizmów antystresowych, gdyż organizm roślinny nie ma możliwości przemieszczenia celem znalezienia bardziej optymalnych warunków życiowych. Szczególnie ważna jest zdolność do zapobiegania stresowi suszy, nadmierna utrata wody jest bowiem procesem letalnym. Polikationowy charakter PA powoduje iż związki te mogą zapobiegać utracie wody, gdyż zwiększenie zawartości związków jonowych (np. PA) w roztworze znacząco zwiększa energię kinetyczną wymaganą, aby cząsteczka wody przeszła do fazy gazowej. W literaturze naukowej opisywane jest zjawisko akumulacji PA w roślinach w trakcie narażenia na działanie suszy, jednak obserwowano wielką różnorodność reakcji, zależnie od badanego gatunku, organu, oraz szczególnie skali czasowej (Maiale i in., 2004).

U roślin zbożowych ekspozycja na rozmaite czynniki środowiskowe powoduje zwiększenie aktywności dekarboksylazy argininy (ADC) i w konsekwencji znaczące, nawet kilkudziesięciokrotne zwiększenie zawartości putrescyny (Galston i Sawhney, 1990). Zwraca uwagę wspomniana wcześniej specjalizacja funkcji enzymów syntezy putrescyny, gdzie ODC odpowiada za te funkcje PA, które są wspólne dla większości świata ożywionego, zaś ADC uczestniczy w specyficznej dla roślin odpowiedzi na stres środowiskowy.

Wielu autorów opisało łagodzący wpływ PA na przebieg stresu środowiskowego u roślin. Navakoudis i in. (2003) opisali udział putrescyny w zapobieganiu uszkodzeniom roślin tytoniu powodowanym przez ozon, gdzie putrescyna podana roślinom odmiany wrażliwej na ozon zapobiegła degradacji aparatu fotosyntetycznego i tym samym pogorszeniu wskaźników fotosyntezy. Inni autorzy potwierdzili zdolność PA do zmniejszania uszkodzeń aparatu fotosyntetycznego w czasie stresu: u ogórka (Zhang i in., 2009), czy u kolonii glonu *Scenedesmus obliquus* (Demetriou

i in., 2007). Jednocześnie mutanty z obniżoną aktywnością enzymów syntetyzujących PA charakteryzują się obniżoną tolerancją na warunki stresowe, taki efekt zaobserwowano u *Arabidopsis thaliana* (Kasinathan i Wingler, 2004).

Opisano także akumulację putrescyny u pszenicy w efekcie hartowania chłodem (Rącz i in., 1996). Inni badacze opisali (Bouchereau i in., 1999) zdolność putrescyny do wiązania się z enzymami antyoksydacyjnymi, takimi jak dysmutaza ponadtlenkowa, oraz z cząsteczkami drobnocząsteczkowych antyutleniaczy, co ułatwia ich transport w komórkach do miejsc uszkodzeń oksydacyjnych, zjawisko to zaobserwowano u roślin odpornych na działanie chłodu.

PA powodują zamykanie aparatów szparkowych (Liu i in., 2000), tym samym powodując znaczące obniżenie transpiracji (Çavuşoğlu i in., 2008). Pomimo ograniczenia wymiany gazowej na skutek zamknięcia aparatów szparkowych, nie powodują one znaczącego ograniczenia asymilacji CO₂, gdyż zwiększają jednocześnie aktywność RuBisCO ograniczoną w warunkach stresu (Huang i Bie, 2010). Badacze ci zaobserwowali, że egzogenna spermidyna przywraca aktywność RuBisCO, która została obniżona poprzez podanie kwasu cytrynowego, będącego jednym ze związków fenolowych akumulowanych w czasie stresu oksydacyjnego (Singh i in., 2013).

Wspomniano wcześniej o zmiennym wpływie momentu rozpoczęcia i czasu trwania stresu na stopień akumulacji PA. Maiale i in. (2004) zaobserwowali akumulację sperminy u ryżu w warunkach stresu solnego, jednak dotyczyło to stresu trwającego 7 i 14 dni, podczas gdy u roślin wystawionych na stres przez 21 dni nie zaobserwowano różnicy w stosunku do „niestresowanej” kontroli. Co bardziej interesujące: stężenie putrescyny i spermidyny w roślinach rosnących w warunkach stresu solnego było mniejsze w porównaniu do kontroli, w części traktowań zaś nie różniło się od niej. Wyraźną zależność stopnia akumulacji PA od czasu trwania stresu opisali także Zhang i Huang (2013), zmierzili oni stężenie PA u roślin pomidora znajdujących się w stresie suszy wywołanym działaniem glikolu polietylenowego (PEG), w odróżnieniu od cytowanej powyżej pracy próbki pobierane były w znacznie krótszych odstępach czasu: 6, 12, 24, 36 i 48 godzin od początku stresu. Największe stężenie PA (putrescyna, spermidyna i spermina) zmierzono w czasie 12 godzin od wystąpienia stresu, następnie zaś akumulacja PA zmniejszała się w miarę upływu czasu. Tak więc należy podkreślić, iż opisywane w literaturze reakcje akumulacji PA w odpowiedzi na różne rodzaje stresu zależą od czasu trwania stresu oraz momentu pobrania próbek. Takie zależności czasowe nie są zazwyczaj czynnikiem badanym w doświadczeniu, stąd zjawisko to pozostaje słabo zbadane.

1.5.2. Funkcje pełnione przez PA w reakcjach innych niż stresowe

PA pełnią rolę w regulacji procesów starzenia się roślin. Stężenie PA u roślin jest wysokie w tkankach szybko rosnących, w których znajduje się wiele dzielących

się komórek (Sawhney i in., 1985). Odwrotny proces zaobserwowano w liściach starzejących się, gdzie stężenie PA jest znacznie niższe od tego, obserwowanego w liściach młodych, wciąż się rozwijających (Evans i Malmberg, 1989). Zjawisko to jest zbieżne z rolą pełnioną przez PA w innych niż rośliny grupach organizmów np. u zwierząt, gdzie także obserwuje się akumulację PA w tkankach, których komórki intensywnie się dzielą. PA mogą w szybko dzielących się komórkach stabilizować strukturę DNA, który w przypadku zwiększonej aktywności procesów replikacji szczególnie narażony jest na uszkodzenia. Uszkodzenia DNA zwiększają ryzyko wystąpienia mutacji, oraz spowalniają tempo podziałów (Branzei i Foiani, 2009). Co więcej, tkanki szybko dzielące się są najbardziej narażone na uszkodzenia DNA, ale także takie uszkodzenia największe szkody powodują właśnie w tkankach dzielących się najszybciej. Obecność PA zapobiega zaś niektórym uszkodzeniom DNA (Terui i in., 2018).

Aplikacja endogennych PA pozwala w wielu przypadkach na spowolnienie procesów starzenia się organów (Galston i Kaur-Sawhney, 1987), według autorów cytowanej pracy spermina wykazuje tę aktywność w stężeniu 0,1-1 mM. Stężenie to w porównaniu do endogennych stężeń rozmaitych hormonów roślinnych jest więc dużo większe. Za przeciwstarzeniowy efekt aplikacji PA odpowiada najprawdopodobniej będąca jej skutkiem inhibicja produkcji etylenu (Saftner i Baldi, 1990).

Szereg autorów opisało także obecność PA w chloroplastach i etioplastach, gdzie będąc związane są z błonami lipidowymi, stabilizują je. Zmniejszenie zawartości PA w etioplastach w trakcie ich transformacji w chloroplasty może być efektem przemian ciała protolamellarne, którego heksagonalna struktura wiąże dużą ilość PA (Sobieszczyk-Nowicka i in., 2007). Autorzy pracy cytują także interesującą hipotezę, iż PA stanowią źródło azotu dla rozwijającego się chloroplastu (Tabor i Tabor, 1972), co także jest przyczyną zmniejszenia ich zawartości w trakcie tego procesu, zaznaczyć należy, że proces ten zachodzi z udziałem PA związanych z frakcją lipidową.

Zmniejszenie zawartości PA w tkankach starzejących się wynikać może z wycofywania przez roślinę azotu z tkanek, które zostaną odrzucone np. ze starzejących się liści. PA jako niskocząsteczkowe, doskonale rozpuszczalne w wodzie substancje, do tego znajdujące się w samym „sercu” przemian azotowych komórki roślinnej (Moschou i in., 2012), mogą szybko zostać zmobilizowane i wycofane.

1.5.3. Współdziałanie poliamin i fitohormonów

Omówione powyżej hipotezy roli PA jako źródła azotu, oraz stabilizatora błon lipidowych i DNA pozostają w pewnej sprzeczności z hipotezami, według których PA pełnią głównie funkcje sygnalizacyjne. Hipotezy takie są jednak dyskutowane i należy je także omówić. Zresztą współwystępowanie różnorodnych funkcji jest postulowane dla wielu innych związków np. melatoniny (Arnao i Hernández-Ruiz,

2006), możliwe jest więc, że także PA pełnią funkcje o różnorodnym charakterze w zależności od ich stężenia i lokalizacji. Funkcja biologiczna może ulegać zmianie np. pierwotną funkcją PA mogła być rola osmoprotekcyjna i troficzna (jako źródło azotu i węgla), następnie stabilizacyjna, a w końcu regulacyjna. Zmiany stężenia PA wynikłe z przebiegu różnych procesów fizjologicznych mogą stanowić sygnał wyzwalający kolejne procesy.

Efekt fizjologiczny PA, jak każdego związku chemicznego obecnego w komórce, podlega interakcjom z innymi związkami, w tym sygnałowymi. W poniższych podrozdziałach omówiono znane z literatury efekty interakcji pomiędzy PA a fitohormonami.

1.5.3.1. Poliaminy i etylen

Jedną z lepiej udokumentowanych w literaturze naukowej interakcją pomiędzy PA a fitohormonem, jest wspomniana wcześniej inhibicja produkcji etylenu. W doświadczeniu (Saftner i Baldi, 1990) zmierzono zawartość PA w czasie dojrzewania owoców pomidora, obserwując jej spadek w miarę dojrzewania owoców i jednoczesny wzrost zawartości etylenu. Jeden z autorów przytoczonej pracy, wykazał wcześniej, iż podanie egzogennych PA hamuje transport prekursora etylenu, kwasu 1-aminocyklopano-1-karboksylowego (ACC) (Saftner, 1989), co prowadzić musi do obniżenia produkcji etylenu. Alternatywnym mechanizmem interakcji między PA a etylenem jest bezpośrednie współzawodnictwo o S-adenozylometioninę (SAM), będącą prekursorem ACC. SAM jest bowiem jednym z substratów niezbędnych do syntezy PA o dłuższych cząsteczkach (sperminy i spermidyny) (Harpaz-Saad i in., 2012), więc intensywna synteza cięższych PA skutkować może zużyciem SAM niezbędnego także dla syntezy etylenu i w efekcie spadkiem stężenia tego fitohormonu.

Warto tu zauważyć, że w przypadku syntezy spermidyny, drugim niezbędnym substratem jest putrescyna, zaś przy syntezie sperminy zużywana jest z kolei spermidyna (patrz rozdział 1.4.1). Tak więc suma zawartości PA (liczona jako stężenie molowe) nie powinna ulec zmianie podczas tych przemian, natomiast wyraźne różnice obserwowane będą w proporcjach poszczególnych PA. Zwiększy się także całkowita ilość grup aminowych w puli PA, bowiem wraz z wydłużaniem łańcucha PA (od putrescyny, poprzez spermidynę do sperminy) dodawane są także grupy aminowe. Zaangażowanie SAM w szlak syntezy PA stwarza także szereg możliwych interakcji z innymi substancjami syntetyzowanymi z jego udziałem: lipidów, pektyn, alkaloidów, fitosteroli, osmoprotektantów, prekursorów lignin, lignanów, suberyn, kwasu cynamonowego i jego pochodnych, flawonoidów, stilbenów i innych związków aromatycznych, jak również szereg lotnych związków zapachowych (Roje, 2006).

1.5.3.2. Poliaminy i auksyny

Istnieje niewiele prac których autorzy udokumentowali interferencję między auksynami a PA. Jedną z nielicznych jest praca Tonon i in. (2001), której autorzy opisali antagonistyczny efekt aplikacji putrescyny, spermidyny i inhibitorów ich rozkładu, oraz aplikacji kwasu indolilomasłowego (IBA) na procent ukorzeniających się sadzonek jesionu wąskolistnego (*Fraxinus angustifolia* Vahl). Podanie wymienionych PA stymulowało ukorzenie, jednoczesna aplikacja IBA hamowała ten proces, ciekawe jednak było to, że bez podania PA, aplikacja samym IBA powodowała stymulację ukorzenia. Autorzy nie zaproponowali jednak wyjaśnienia tej obserwacji. Wydaje się prawdopodobne, że PA i IBA działają konkurencyjnie względem ukorzenia, wykorzystując odrębne mechanizmy, których jednoczesna stymulacja znosi efekt biologiczny. Innym przykładem powiązań między PA a auksynami, są wyniki otrzymane przez Kyriakidis (1983), gdzie aplikacja kwasu indoliloctowego (IAA) zwiększała aktywność dekarboksylazy ornityny (ODC) u jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.). Enzym ten stanowi jedno z podstawowych ogniw na drodze syntezy PA, stąd można oczekiwać stymulacji produkcji putrescyny, a w konsekwencji także syntetyzowanych z niej PA w odpowiedzi na zwiększone stężenie auksyn. Podanie zaś putrescyny lub spermidyny hamowało aktywność ODC poprzez stymulację białkowego inhibitora ODC (antyzyemu OAZ1) (Heller i Canellakis, 1981).

Efekt aplikacji PA na zawartość auksyn w nasionach opisano w pracy Yang i in. (2016), gdzie poddano nasiona pszenicy działaniu różnych PA i w efekcie zaobserwowano zwiększenie w nich zawartości IAA pod wpływem aplikacji spermidyny i sperminy.

1.5.3.3. Poliaminy i gibereliny

Gibereliny są grupą fitohormonów stymulujących wzrost i rozwój organizmów roślinnych, w działaniu tym są więc synergistyczne w stosunku do PA. Znanym jest wiele prac opisujących zwiększenie zawartości PA w roślinie po podaniu giberelin, najczęściej kwasu giberelinowego (GA_3), przykładowo Kaur i Halliwell (1996) zaobserwowali zwiększenie zawartości PA u grochu w ciągu kilku godzin po podaniu GA_3 . Inna grupa badaczy (Kyriakidis, 1983) zaobserwowała również, podobnie jak w efekcie stymulacji za pomocą IAA opisanej w tej samej pracy, zwiększenie aktywności ODC u jęczmienia w odpowiedzi na stymulację za pomocą GA_3 .

Opisane powyżej mechanizmy prowadzą do zwiększenia stężenia PA w roślinach poprzez aktywację enzymów odpowiedzialnych za ich biosyntezę, drugim potencjalnym sposobem regulacji stężenia jest wpływ na mechanizmy katabolizmu PA. Skoro istnieją dwa przeciwstawne procesy, ostateczny kierunek zmian zależy od

tego, który proces przeważa. Asthir i in. (2004) zbadali aktywność dwóch enzymów rozkładających PA: PAO i DAO po stymulacji GA_3 , aktywność ta zwiększyła się w stosunku do kontroli, jednak zmierzona zawartość PA także uległa zwiększeniu. Świadczy to o tym, iż kontrola stężenia PA nie dokonuje się poprzez regulację aktywności szlaków katabolicznych PA, a poprzez intensyfikację syntezy, zwiększenie zaś katabolizmu PA służy innym celom, prawdopodobnie syntezie nadtlenu wodoru (Cona i in., 2006).

Cytowani wcześniej autorzy (Yang i in., 2016) opisali także stymulujący wpływ aplikacji spermidyny i sperminy na zawartość giberelin w nasionach pszenicy.

1.5.3.4. Poliaminy i cytokininy

Cytokininy i PA, podobnie jak w przypadku giberelin, działają wzajemnie synergistycznie stymulując procesy wzrostowe. Przeprowadzono doświadczenie (Legocka i Zarnowska, 2000) w którym stymulowano liścienie ogórka za pomocą kinetyny, czego skutkiem było zwiększenie aktywności ADC. W rezultacie podwyższonej aktywności tego enzymu, stężenie putrescyny zwiększyło się, zaś poziom sperminy i spermidyny spadł. Kolejne eksperymenty dowiodły, iż o ile dodatek kinetyny wpłynął na tempo wzrostu liścieni (co jest jednym z typowych efektów aplikacji cytokinin), o tyle dodatek egzogennej putrescyny, a także zahamowanie jej syntezy inhibitorem, D-argininą, nie wpłynął na procesy wydłużeniowe liścieni. W pracy tej wykazano jednak możliwy udział spermidyny w procesach w których zaangażowane są cytokininy, gdyż podanie inhibitorów syntezy spermidyny przyspieszało wzrost liścieni. Podobne wyniki uzyskali także Walker i in. (1988). W innej pracy (Legocka i Zarnowska, 1999) działano na kallus ogórka syntetyczną cytokininą, benzyloadeniną (BAP), w efekcie stężenie putrescyny i sperminy spadło, stężenie spermidyny zaś wzrosło, podobne zmiany autorki opisały w zakresie związanych form PA.

Zaobserwowano również, że PA (konkretnie spermidyna i spermina) powoduje zwiększenie stężenia zeatyny i jej rybozydu w kwiatach ryżu (Yang i in., 2008).

Romanov i in. (2004) przeanalizowali interakcję PA z cytokininami z użyciem transgenicznych roślin z genem reporterowym *GUS* pod kontrolą aktywowanego przez cytokininy promotora *ARR5* (Agostino i in., 2000). Rośliny te były traktowane różnymi PA, po czym określano stopień aktywacji genu reporterowego. Każda z badanych PA powodowała supresję genu reporterowego w stopniu zależnym od rodzaju i stężenia PA, aż o 95% wartości wyjściowej w przypadkach skrajnych. Wynik ten oznacza, że zwiększenie stężenia PA powoduje obniżenie ekspresji genów kontrolowanych przez promotor *ARR5*, co oznacza w tym wypadku działanie antagonistyczne pomiędzy PA a cytokininami.

Wynik korespondujący z powyższym otrzymali Yang i in. (2016), którzy opisali zwiększenie zawartości zeatyny i rybozydu zeatyny w nasionach pszenicy po stymulacji egzogenną sperminą i spermidyną. Jeśli bowiem w wyniku zwiększenia stężenia PA nastąpiło obniżenie ekspresji genów kontrolowanych przez zależne od cytokinin sekwencje promotorowe, to dla utrzymania homeostazy konieczne jest zwiększenie stężenia cytokinin. W taki sam sposób można także tłumaczyć opisany wcześniej wpływ aplikacji cytokinin na akumulację PA.

1.5.3.5. Poliaminy i kwas salicylowy

Kwas salicylowy (SA) jest regulatorem wzrostu roślin, którego akumulację obserwuje się w przypadku zarówno stresu biotycznego, jak i abiotycznego (Raskin, 1992). Można więc oczekiwać interakcji między nim, a PA, których akumulację obserwowano w warunkach stresu suszy. W pracy Németh i in. (2002) traktowano SA rośliny rosnące w uprawie hydroponicznej, po czym określano poziom PA. W wyniku traktowania SA poziom putrescyny i spermidyny wzrastał, natomiast poziom sperminy obniżał się. Podobnie, w doświadczeniu opisanym u Szalai i in. (2016) poziom putrescyny w liściach wzrastał u roślin, których nasiona moczo w roztworze SA, poziom spermidyny zaś nieznacznie malał. W tym samym doświadczeniu poziom PA w korzeniach wzrastał u roślin traktowanych SA. Również Szepesi i in. (2009) zaobserwowali wzrost zawartości putrescyny u roślin traktowanych SA w warunkach stresu solnego, poziom zaś sperminy i spermidyny nie zmienił się. We wszystkich opisanych przypadkach wpływ SA polegał na zmianie stosunku względnej zawartości putrescyny do cięższych PA, co może wynikać z obniżenia aktywności enzymów przekształcających putrescynę w cięższe PA.

W pracy Szepesi i in. (2011) opisano doświadczenia nad pomidorem, gdzie poddano rośliny działaniu SA, mierzono zaś zawartość endogennych PA, oraz monitorowano aktywność enzymów rozkładających PA (DAO i PAO), a także enzymów antyoksydacyjnych (SOD i CAT). Opisano akumulację PA po stymulacji SA, a także, w dłuższym okresie czasu, podwyższenie stężenia putrescyny względem innych PA. Aktywność enzymów rozkładających PA, a także enzymów antyoksydacyjnych również uległa podniesieniu w stosunku do kontroli.

1.5.3.6. Poliaminy i kwas abscysynowy

Z uwagi na postulowany udział PA w procesach odpowiedzi na suszę, szczególnie interesujące są interakcje pomiędzy kwasem abscysynowym (ABA), a PA. W cytowanej wcześniej pracy (Yang i in., 2016), autorzy opisali wzrost stężenia ABA w nasionach pszenicy poddanych działaniu PA. Związkiem najsilniej stymulującym wzrost stężenia ABA była putrescyna.

W pracy Nieves i in. (2001) opisano z kolei stymulujący efekt egzogenego ABA na stężenie PA w zarodkach somatycznych trzciny cukrowej poddanych desykcji, również w tej reakcji związkami którego stężenie zwiększyło się najbardziej, była putrescyna.

1.5.3.7. Poliaminy i kwas jasmonowy

Kolejnym, obok ABA fitohormonem zaangażowanym w koordynację reakcji stresowych jest kwas jasmonowy (JA), który uczestniczy przede wszystkim w reakcjach odpowiedzi na stres biotyczny. W pracy Nieves i in. (2001) opisano eksperyment polegający na traktowaniu kallusa trzciny cukrowej egzogenym JA oraz desykcji, a następnie mierzono stężenia PA wywołane tym zabiegiem. Zaobserwowano niewielkie powiększenie stężenia putrescyny.

Podobne do powyższych wyniki uzyskali Walters i in. (2002), z tą różnicą, że zamiast JA użyli jego lotnej pochodnej, metylowego estru kwasu jasmonowego (MJ). W efekcie traktowania liści siewek owsa (*Hordeum vulgare* L.) tym związkiem zawartość putrescyny i sperminy zwiększyła się już pierwszego dnia po zabiegu, zaś czwartego dnia po zabiegu zwiększyła się, obok tych dwóch PA, także zawartość sperminy. Autorzy zbadali również aktywność enzymów zaangażowanych w syntezę PA: ODC, ADC i dekarboksylazę S-adenozylometioniny (Ado-MetDC), których aktywność zwiększyła się po aplikacji MJ. Dzięki zbadaniu aktywności enzymu DAO, można sformułować hipotezę tłumaczącą jaki jest „cel” zwiększania biosyntezy PA, bowiem produktem aktywności DAO jest nadtlenek wodoru, którego działanie cytotoksyczne może być użyteczne w zwalczaniu biogenych czynników stresowych. Co więcej, aktywność DAO zwiększyła się także w liściach które nie były traktowane MJ, co wskazuje na możliwy udział PA w mechanizmach systemicznej odpowiedzi na stres.

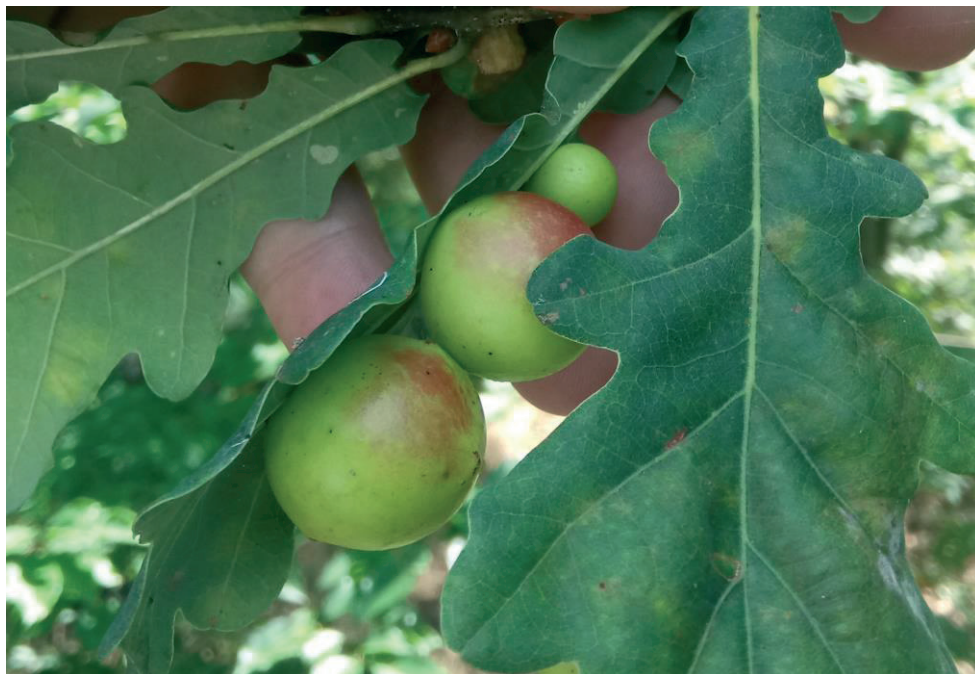
Ozawa i in. (2010) traktowali rośliny fasoli półksiężycowatej (*Phaseolus lunatus* L.) różnymi PA, odkryli iż traktowanie roślin sperminą stymuluje biosyntezę JA. Wspomniane wyżej synergistyczne działanie kwasu jasmonowego i PA w kierunku zwalczania infekcji patogenem prowadzi do wyjaśnienia opisanego efektu. Zwiększone stężenie JA skutkuje zwiększeniem produkcji PA, jak i podwyższenie stężenia PA prowadzi do podwyższenia biosyntezy JA. Istnieją więc warunki do wystąpienia efektu dodatniego sprzężenia zwrotnego w wyniku którego stężenie obydwu związków ulegnie znacznemu zwiększeniu, być może efekt ten rozprzestrzenia się na sąsiadujące obszary, co może doprowadzić do gwałtownej odpowiedzi w skali całego organu, a nawet organizmu rośliny. Taka systemiczna odpowiedź jest często wyzwana w następstwie stresu biotycznego, dzięki zaś zaangażowaniu lotnego MJ reakcja może zostać wyzwolona także u sąsiadujących roślin. Zaznaczyć jednak należy, że udział PA w tym procesie jest czysto hipotetyczny i wymaga weryfikacji.

1.6. Galasy i ich związek z poliaminami

Galasy są specyficznym rodzajem „pseudoorganów” spotykanych niekiedy na roślinach. Są one utworzone z tkanek roślinnych przekształconych w wyniku zainfekowania przez pasożytniczy organizm. Organizmy powodujące powstawanie galasów należą do rozmaitych taksonów, zaliczamy tu głównie owady (Stone i Schönrogge, 2003), ale także roztocza (Soika i Kozak, 2012), nicienie (Riley i in., 1988), oraz bakterie i wirusy (Holsters i in., 1978). Formująca się na roślinie narośl służy jako schronienie i źródło pożywienia organizmom (przez całe życie, bądź w pewnych okresach) je wywołującym. Jednym z częściej spotykanych rodzajów galasa, jest tzw. „jabłuszko dębowe”, będące efektem zainfekowania dębu przez owada, błonkówkę z rodziny galasówkowatych, galasówkę dębiankę (*Cynips quercusfolii* L.) (Wiebes-Rijks, 1981), (Jankiewicz i in., 2017). Powstający na liściu galas różni się od niego fundamentalnie nie tylko na poziomie morfologii, ale także na poziomie komórkowym i biochemicznym. Twór ten zawiera bardzo wysokie stężenie tanin, które powodują denaturację białek, stąd w galasach można spodziewać się występowania wielu specyficznych mechanizmów ochronnych.

„Jabłuszka dębowe” rosną na dolnej powierzchni liści, są to kuliste twory osiągające 2-4 cm średnicy. Niedojrzałe galasy są zazwyczaj koloru zielonego, w czasie dojrzewania czerwienieją. Młode galasy można zaobserwować zazwyczaj w lipcu, dojrzewają we wrześniu. Z zewnątrz galasy te pokryte są twardszą skórką, pod którą znajduje się gąbczasty, miękki miąższ koloru białego. W samym środku zlokalizowane jest twardsze od miąższu gniazdo, wewnątrz którego znajduje się larwa owada. Gniazdo zbudowane jest z tkanki odżywczej która zaspokaja potrzeby troficzne rosnącej larwy.

Od pewnego czasu prowadzone są w Instytucie Fizjologii Roślin PAN w Krakowie badania biochemiczne i proteomiczne na galasach rodzaju „jabłuszko dębowe”. Zaskakującym wynikiem było znalezienie bardzo niskich, w porównaniu do tkanek liścia, stężeń fitohormonów stymulujących wzrost tkanek: auksyn i cytokinin. Przebadano także szereg innych fitohormonów i związków biologicznie ważnych, za każdym razem otrzymując podobny wynik: tkanki galasa są pod względem ich zawartości bardzo ubogie. Jedną z możliwych interpretacji otrzymanych wyników było pozostawanie przez galas w stanie głębokiego stresu, spowodowanym być może potrzebami żyjącego wewnątrz owada, które zaspokajane są poprzez relatywnie niewielką szypułkę, za pomocą której dostarczana jest do galasa woda i składniki odżywcze. Zaznaczyć tu jednak należy, że jeśli chodzi o zawartość wody, to względna jej zawartość w galasie jest jej dużo wyższa niż w liściu, nie aż tyle jednak, aby tłumaczyło to obserwowane zmniejszone stężenie analizowanych fitohormonów. Z uwagi na brak opublikowanych badań nad PA w galasach, zdecydowano się na przeprowadzenie analiz tego interesującego materiału.



Ryc. 10. Galas na liściu dębu wywołany przez larwę *Cynips quercusfolii* L., potocznie zwany "jabłuszkiem dębowym". Twór ten stanowi schronienie, oraz źródło pożywienia dla rozwijającej się wewnątrz larwy. Fotografia autora

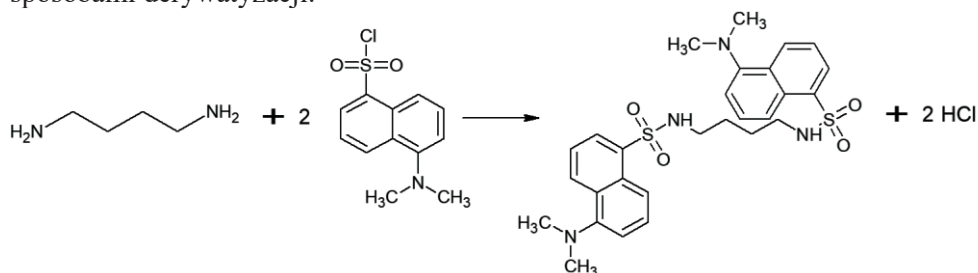
1.7. Ogólny przegląd metod analizy poliamin

Pierwszym etapem analizy PA jest ich ekstrakcja. Próbki po homogenizacji ekstrahowane są najczęściej w roztworze kwasu chlorowego(VII) (HClO_4), po odwirowaniu supernatant jest neutralizowany węglanem sodu, a następnie zawarte w nim PA oznaczane są bezpośrednio lub derywatyzowane (Flores i Galston, 1982).

Najczęściej spotykaną obecnie metodą oznaczenia zawartości poszczególnych PA jest wysokosprawnościowa chromatografia cieczowa (HPLC). Z uwagi jednak na kationowy charakter cząsteczek PA, ich bezpośredni rozdział na kolumnie chromatograficznej pracującej w układzie odwróconych faz (najbardziej wygodny w przypadku oznaczania próbek rozpuszczalnych w wodzie), jest niemożliwy (Magnes i in., 2014). Drugą trudnością w analizie PA jest brak w ich cząsteczkach jakiegokolwiek grup chromoforowych, fluoroforowych, bądź ulegających łatwo reakcjom redoks, co utrudnia bezpośrednią detekcję. W celu rozwiązania tych problemów stosuje się derywatyzację do pochodnych dansylowych, benzylowych, lub

innych. Grupy derywatyżujące po przyłączeniu do cząsteczek PA zwiększają także ich współczynnik retencji, oraz umożliwiają prostą i bezpośrednią detekcję.

Najpopularniejszą od wielu lat metodą derywatyżacji PA jest dansylacja, gdzie wykorzystuje się zdolność chlorku dansylu do tworzenia pochodnej sulfonamidowej z terminalnymi grupami aminowymi PA (Redmond i Tseng, 1979). Po przyłączeniu grupy dansylowej, grupa aminowa traci zdolność do tworzenia kationu, co umożliwia rozdział HPLC w warunkach odwróconych faz, cząsteczka PA zyskuje także zdolność do fluorescencji oraz pochłaniania promieniowania UV. Wysoka trwałość sulfonamidowych pochodnych dansylowych, oraz wysoka czułość detektorów fluorescencyjnych (FLD), spowodowały dominację tej metody nad innymi sposobami derywatyżacji.



Ryc. 11. Dansylacja putrecyny za pomocą chlorku dansylu. Powstała sulfonamidowa pochodna poliaminy jest bardziej hydrofobowa niż związek wyjściowy. Rysunek autora

Ciekawą metodą jest derywatyżacja przy użyciu chloromrówczanu izobutyłu (Magnes i in., 2014). W cytowanej pracy autorzy zautomatyzowali procedurę oczyszczania próbek metodą SPE (ang. *Solid Phase Extraction*) przeprowadzając ją za pomocą analitycznego aparatu HPLC. Zasada działania metody SPE polega na wykorzystaniu kolumny ze złożem adsorbującym oczyszczane związki chemiczne, które następnie wymywane są z tej kolumny przy użyciu odpowiednio dobranego rozpuszczalnika i następnie analizowane. Przy pewnej komplikacji budowy aparatury obejmującej użycie dwóch kolumn (jednej w charakterze kolumny SPE, drugiej jako kolumny analitycznej HPLC), dwóch pomp HPLC, oraz dziesięcioprostopowego zaworu, osiągnięto znaczne uproszczenie i automatyzację preparatyki próbek. Kolejną zaletą proponowanej metody jest szybkość całej procedury, co jest między innymi efektem wybranej metody derywatyżacji. Duża szybkość procedury wynika także z wykorzystania detekcji MS/MS, dzięki czemu można było zastosować krótką kolumnę analityczną (bowiem wysoka selektywność detektora MS/MS kompensuje obniżoną zdolność rozdzielczą krótkiej kolumny chromatograficznej).

W ostatnich latach obserwuje się powrót do benzylacji PA (Redmond i Tseng, 1979), bowiem benzylacja próbek pozwala m.in. na rozdzielenie sperminy od jej

izomeru, termosperminy, co nie jest możliwe w przypadku dansylacji. Próbki benzylowane rozdziela się w układzie faz odwróconych przy użyciu popularnych kolumn C18 (Naka i in., 2010). Istnieją też metody benzylacji PA z użyciem innych reagentów np. chlorku 3,5dinitrobenzylu (Pinto i in., 2014).

Nowszą alternatywą oznaczania PA jest użycie kolumn typu HILIC (ang. *Hydrophilic-interaction liquid chromatography*), gdzie wyeliminowano potrzebę derywatywacji PA, zaś użycie spektrometru mas (MS) umożliwia bezpośrednią detekcję tych związków (Eisenberg i in., 2009). Inną metodą bezpośredniej analizy PA bez potrzeby derywatywacji jest użycie techniki chromatografii par jonowych w powszechnie używanym układzie faz odwróconych z detekcją MS (Sánchez-López i in., 2009). Technika ta jednak niesie ze sobą ryzyko zanieczyszczenia aparatury odczynnikami tworzącym pary jonowe, który jest trudny do usunięcia.

1.8. Interpretacja zawartości poliamin

W niniejszej pracy skupiono się na wolnych PA, pomijając wyniki analiz form skoniugowanych. W opinii autora, skupienie się na wolnych PA, związkach biologicznie aktywnych, daje największe szanse znalezienia zależności fizjologicznych. Związki skoniugowane stanowią formę zmagazynowaną, niekiedy także są elementem mechanizmu katabolizmu PA, tak więc trudniej na podstawie ich stężenia śledzić dynamiczne procesy fizjologiczne. Mimo wszystko, po ograniczeniu się do analizy zawartości form wolnych PA, nadal napotykamy na kilka problemów związanych z przedstawieniem i interpretacją ich stężenia.

Przede wszystkim, rośliny charakteryzują się znacznym zróżnicowaniem zawartości wody, zależy ono m.in. od: rodzaju tkanki, etapu życia rośliny, pory roku i dnia, lokalnych warunków siedliskowych, a nade wszystko od gatunku i odmiany rośliny, stąd precyzyjny pomiar zawartości wody jest kluczowy dla wielu badań z zakresu fizjologii roślin, szczególnie zaś fizjologii stresu (Jones, 2007). O ile więc przedstawienie stężenia badanych związków chemicznych w postaci jednostek masy w świeżej masie tkanki jest najbliższe faktycznym warunkom fizjologicznym, to jest bardzo obciążone zmiennością pochodzącą ze zmienności zawartości wody w badanej tkance. W miarę stopniowej utraty wody następuje bowiem zwiększenie stężenia rozpuszczonych w niej związków, gdyż masa (lub objętość) wody (stanowiąca zazwyczaj 70 - 90% świeżej masy tkanek) jest drugim, obok zawartości badanej substancji, równie ważnym (bo znajdującym się w mianowniku tego samego równania) czynnikiem wpływającym na wyliczone stężenie. W związku z tym przedstawienie stężenia w przeliczeniu na suchą masę rośliny jest bardziej odporne na zmieniającą się zawartość wody i tym samym, wydaje się być lepsze dla przedstawienia relacji między różnymi wskaźnikami biochemicznymi, zwłaszcza w dłuższym okresie

czasu (dni, tygodnie, zamiast minut i godzin) w warunkach polowych, gdzie zawartość wody może się bardzo zmieniać.

Stężenie można przedstawiać w jednostkach masy badanej substancji, bądź w jednostkach liczności materii, czyli molach. W przypadku PA, których aktywność biologiczna związana jest przede wszystkim z obecnością grup aminowych, zaś długość (a tym samym także masa) łańcucha ma mniejsze znaczenie, najbardziej właściwym sposobem wyrażenia stężenia PA jest stężenie molowe. Można jednak rozważać inne sposoby wyrażenia stężenia PA u roślin np. na masę białka, jednak ta metoda obciążona jest zmiennością stężenia białek, które zależą m. in. od gatunku rośliny, rodzaju tkanki, czy wreszcie stadium rozwojowego. Jednak zawartość białka bez wątplenia jest wielkością bardziej stabilną od zawartości wody.

Po rozważeniu wymienionych czynników, zdecydowano, że w pracy tej stężenie PA w tkankach roślinnych będzie wyrażone jako liczba moli w jednostce suchej masy próbki.

W pracy używane będzie także pojęcie sumarycznej zawartości, bądź stężenia PA. Wskaźnik ten będzie wyliczany jako suma stężeń molowych wybranych PA. Rozważano także użycie słowa „całkowity” zamiast „sumaryczny”. Zrezygnowano z tego, gdyż określenie „całkowity” w analityce odnosi się zazwyczaj do sumy stężeń wszystkich związków należących do danej grupy, w prezentowanej zaś pracy nie mierzono stężenia wszystkich PA.

Warto też zaznaczyć, że termin „zawartość” w niniejszej pracy używany jest zamiennie z terminem „stężenie”, w zakresie terminologii analityki chemicznej są to bowiem pojęcia synonimiczne.

W niniejszej pracy zostanie także sprawdzona użyteczność nowego wskaźnika, który nazwano Indekssem Grup Aminowych (AGI – ang. *Amine Group Index*). Wskaźnik ten wyliczany będzie jako suma iloczynów stężeń molowych poszczególnych PA i liczby grup aminowych w cząsteczce. Wskaźnik ten przedstawia wprost stężenie grup aminowych obecnych w cząsteczkach PA, a właśnie te grupy odpowiadają przede wszystkim za właściwości fizyczne, chemiczne i biologiczne PA. Analiza tego wskaźnika pozwoli odpowiedzieć na pytanie, czy PA mogą stanowić pulę azotowych związków zapasowych. Wartość wskaźnika AGI wyliczana jest według poniższego wzoru:

$$AGI = \sum \frac{n_x}{m} \cdot i_x,$$

Gdzie:

- n – liczba moli danej PA w próbce,
- m – sucha masa próbki,
- i – liczba grup aminowych w cząsteczce danej PA

Do obliczeń AGI w niniejszej pracy zdecydowano się wykorzystać stężenia putrescyny, sperminy i spermidyny, gdyż te właśnie PA zdecydowanie dominują w badanych próbkach pod względem stężenia. Jeśli chodzi o interpretację tego współczynnika, to jego zwiększenie oznaczać będzie, że ilość azotu związanego z PA zwiększa się. Wzrost wartości tego współczynnika przy niezmienionej sumie zawartości PA oznaczać zatem będzie akumulację azotu w cięższych PA, przy niezmienionym potencjale osmotycznym pochodzącym od PA. Tego rodzaju wynik będzie przesłanką, że PA pełnią rolę źródła azotu a nie regulatora osmolarności. Współczynnik ten jest obciążony wpływem równowagi między putrescyną, spermidyną i sperminą, bowiem stężenie każdej z tych PA w innym stopniu wpływa na wartość wyliczonego współczynnika.

W przebiegu wielu procesów fizjologicznych u roślin obserwuje się zmiany wzajemnych relacji stężeń poszczególnych PA. Wygodnym sposobem na ich ilościowe ujęcie jest obliczenie stosunku stężenia putrescyny do stężeń cięższych PA. Niekiedy badacze (Shen i Galston, 1985) posługują się stosunkiem stężenia molowego putrescyny do spermidyny, podczas gdy inni (Heloir i in., 1998) używają stosunku stężeń molowych putrescyny do sumy stężeń molowych spermidyny i sperminy. W niniejszej pracy zdecydowano się na drugi wariant. Wskaźnik ten obrazuje zmiany w tempie syntezy putrescyny, jej zużycia celem syntezy sperminy i spermidyny, oraz procesów katabolizmu PA. Jego użyteczność wynika z faktu, że putrescyna, spermina i spermidyna są obecne w tkankach roślinnych w największych stężeniach, o ile jednak putrescyna może być syntetyzowana na co najmniej dwóch drogach (ADC i ODC) z aminokwasów, to spermina i spermidyna syntetyzowane są przede wszystkim z putrescyny, która tym samym stanowi nie tylko substancję biologicznie czynną, ale jest także podstawowym prekursorem kolejnych związków z rodziny. Ten prosty wskaźnik pozwala w prosty sposób ocenić stan równowagi procesów syntezy najważniejszych PA, co ułatwia monitorowanie zmian tej równowagi w trakcie przebiegu procesów fizjologicznych. Jego wzrost świadczy o zwiększeniu udziału putrescyny, względnie zmniejszenia udziałów spermidyny i sperminy w puli PA. Wzrost, bądź spadek wartości tego współczynnika nie są związane z całkowitą zawartością PA, zatem współczynnik ten nie odzwierciedla właściwości osmolarnych.

Wskaźnik ten obliczano według wzoru:

$$x = \frac{n_{put}}{n_{spd} + n_{spm}}$$

gdzie:

- n_{put} – liczba moli putrescyny w próbce,
- n_{spd} – liczba moli spermidyny w próbce,
- n_{spm} – liczba moli sperminy w próbce.

2. CEL I ZAKRES BADAŃ

Poliaminom przypisywane są rozmaite funkcje biologiczne. Obok opisywanej powszechnie akumulacji w tkankach intensywnie dzielących się, związkom tym przypisuje się między innymi udział w reakcji na stres, w szczególności stres suszy. Jak omówiono we Wstępie, wszystkie te hipotezy obejmują bardzo szerokie spektrum procesów fizjologicznych i wymagają uściślenia co do natury obserwowanych zjawisk. Relatywnie mało jest prac badawczych poświęconych PA w warunkach uprawy polowej.

Podjęto więc badania mające na celu weryfikację hipotez biologicznej roli PA w przebiegu procesów stresowych, ze szczególnym naciskiem na warunki polowe. Punktem wyjściowym były hipotetyczne funkcje PA jako hormonalnego przekaźnika sygnału stresu suszy, oraz osmoprotektanta. Hipotezy te zweryfikowano w serii eksperymentów, w których zbadano endogenną zawartość PA w roślinach poddanych działaniu stresów środowiskowych w warunkach uprawy polowej.

Odrębną częścią pracy jest weryfikacja użyteczności badawczej wskaźników: Indeksu Grup Aminowych (AGI), oraz stosunku stężenia putrescyny do sumy stężeń spermidyny i sperminy.

Badania prowadzono głównie na roślinach strączkowych: groch siewny (*Pisum sativum* L.), łąbin biały (*Lupinus albus* L.), łąbin żółty (*Lupinus luteus* L.), łąbin wąskolistny (*Lupinus angustifolius* L.), oraz soja warzywna (*Glycine max* L.).

W wykonanych doświadczeniach zbadano:

- w doświadczeniu 1 stężenie i skład PA u wymienionych powyżej gatunków roślin. Analizowanymi PA były kadaweryna, putrescyna, spermidyna i spermina
- w doświadczeniu 2 zawartość PA w nasionach w zależności od stopnia dojrzałości tych nasion. W tym doświadczeniu i kolejnych (2 – 6) analizowanymi PA były putrescyna, spermidyna i spermina
- w doświadczeniu 3 zawartość PA w kwiatach w zależności od stopnia ich dojrzałości
- w doświadczeniu 4 zawartość PA w kwiatach z wysoką konkurencją o metabolity i w kwiatach z niską konkurencją o metabolity.

W doświadczeniach tych wykorzystano różne odmiany wymienionych powyżej gatunków roślin strączkowych. Nazwy odmian podane są w kolejnym rozdziale.

Kolejne, doświadczenie 5 przeprowadzono wyłącznie na łąbinie wąskolistnym, w którym zbadano zawartość PA w nasionach poddanych działaniu suszy w różnych etapach kwitnienia i dojrzewania nasion.

Większą część pracy poświęcono roślinom strączkowym, jednak interesujące okazały się także badania galasów, zostały one zebrane w doświadczeniu 6. Badania

te przeprowadzono na galasach pochodzących z dębu, zwanymi powszechnie "jabłuszkami dębowymi". Ten rodzaj galasów indukowany jest przez rozwijające się jaja i larwy galasówki dębianki (*Cynips quercusfolii* L.), jest on niezwykle ciekawym przykładem „pseudoorganu” powstałego ze zróżnicowanych tkanek roślinnych rosnących w warunkach stresu biotycznego. Można więc sformułować kolejny cel pracy, jakim jest propagowanie badań nad galasami, które mogą posłużyć jako model m.in. do analizy mechanizmów formowania się organów oraz ich reakcji na stres.

3. MATERIAŁ BIOLOGICZNY I METODYKA

3.1. Materiał biologiczny

Doświadczenia 1 - 5 przeprowadzono na różnych odmianach grochu siewnego (*Pisum sativum* L.), łubinu białego (*Lupinus albus* L.), łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.), łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.), oraz soi warzywnej (*Glycine max* L.). Tabela poniżej przedstawia użyte odmiany, oraz rok w którym przeprowadzono eksperyment:

Tabela 2.

Odmiany użyte w doświadczeniach z użyciem roślin strączkowych, oraz rok ich przeprowadzenia

Doświadczenie	Groch siewny	Łubin biały	Łubin żółty	Łubin wąskolistny	Soja	Rok
1	Brylant	Butan	Parys	Regent	Augusta	2014
2	Brylant Cysterski	Boros Butan	Lord Parys	Graf Regent	Augusta	2015
3	Brylant	Butan	Parys	Regent	Augusta	2016
4	Brylant	Butan	Parys	Regent	Augusta	2016
5	-	-	-	Graf Regent	-	2017

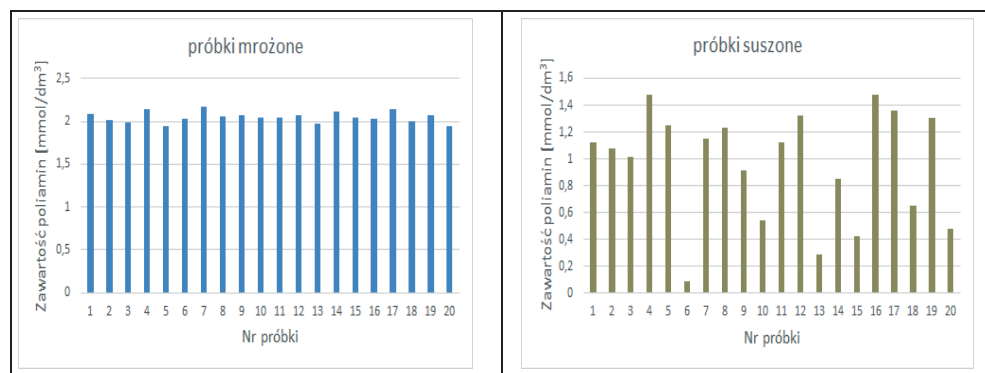
Wszystkie doświadczenia z użyciem roślin strączkowych (1-5) wykonano na poletku doświadczalnym i w półotwartym tunelu foliowym należących do Katedry Fizjologii Roślin Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie, zlokalizowanych w Krakowie-Chelmie (50°04'10"N 19°50'40"E).

Doświadczenie 6 przeprowadzono na galasach, które zbierano z drzew dębu szypułkowego (*Quercus robur* L.) rosnących w naturalnych stanowiskach leśnych w okolicach Skierniewic (51°57'N 20°08'E). Były to galasy wywoływane przez galasówkę dębiankę (*Cynips quercusfolii* L.), tzw. jabłuszka dębowe. Badania nad galasami wykonano w latach 2016 – 2018.

Układ doświadczeń, oraz ilość pobieranych próbek opisano szczegółowo w kolejnych rozdziałach.

3.2. Przygotowanie i przechowywanie próbek biologicznych

Próbki pobierano z losowo wybranych roślin, po czym niezwłocznie zamrażano w ciekłym azocie. Po przyniesieniu z poletek doświadczalnych, zamrożony materiał umieszczano w zamrażarkach w -70°C , gdzie przechowywano go do czasu wykonania analiz (kilkanaście tygodni). Przed rozpoczęciem doświadczeń sprawdzono także możliwość alternatywnego, prostszego sposobu przechowywania próbek polegającego na suszeniu na powietrzu i dalszym przechowywaniu ich w papierowych kopertach. Po 4 miesiącach próbki przechowywane w tych warunkach liofilizowano, a następnie oznaczono zawartość PA. Wyniki jednoznacznie wskazują na duże, średnio 45% straty sumy PA w próbkach suszonych w porównaniu do próbek mrożonych. Straty te charakteryzowały się dużą zmiennością między obiektami (gatunek, odmiana, termin poboru próbek), co przedstawiono na wykresach poniżej na przykładzie soi (Ryc. 12). W przypadku soi odchylenie standardowe wyniosło 0,412 dla próbek suszonych, oraz zaledwie 0,062 dla próbek mrożonych.



Ryc. 12. Powtarzalność pomiaru zawartości badanych poliamin w próbkach tego samego zbioru nasion soi przechowywanych w różnych warunkach: zamrażarka w -70°C i temperatura pokojowa. Przed analizą próbki były liofilizowane (mrożone i suszone)

Z uwagi na tak duże, co gorsza zależne od próbki straty zawartości PA podczas suszenia, zdecydowano się na przechowywanie materiału wyłącznie w postaci zamrożonej, bowiem proces oparty na suszeniu jest źródłem zbyt dużego błędu.

Dane literaturowe (Sánchez-López i in., 2009) dowodzą, iż liofilizacja nie powoduje istotnego zmniejszenia zawartości PA w materiale.

3.3. Pomiar stężenia poliamin metodą HPLC po dansylacji

Analizy PA wykonano według metody opartej na pracach Sarjala i Kaunisto (1993), oraz Witzell i in. (2005), z własnymi modyfikacjami.

I. Homogenizacja i ekstrakcja

Materiał roślinny liofilizowano przez 48h w temperaturze -30°C, po czym rozdrabniano w młynku kulowym Retsch. Do ekstrakcji pobierano około 50 mg suchego materiału. Próbkę ekstrahowano dwukrotnie 5% kwasem chlorowym(VII) (HClO₄), każdorazowo porcją 0,75 ml. Podczas homogenizacji próbkę wytrząsano i „sonikowano” przez 10 min, a następnie materiał odwirowano przez 10 min przy 20 000 g. Zebrano supernatant i połączono obydwie jego porcje.

II. Dansylacja PA

W osobnej probówce umieszczono 200 µl supernatantu, dodano do niego kolejno 10 µl nasyconego roztworu wodorotlenku sodu (NaOH), 400 µl węgla sodu (Na₂CO₃) i 400 µl roztworu chlorku dansylu (3,5 g/200 ml acetonu). Próbkę wymieszano i pozostawiono do następnego dnia w temperaturze pokojowej.

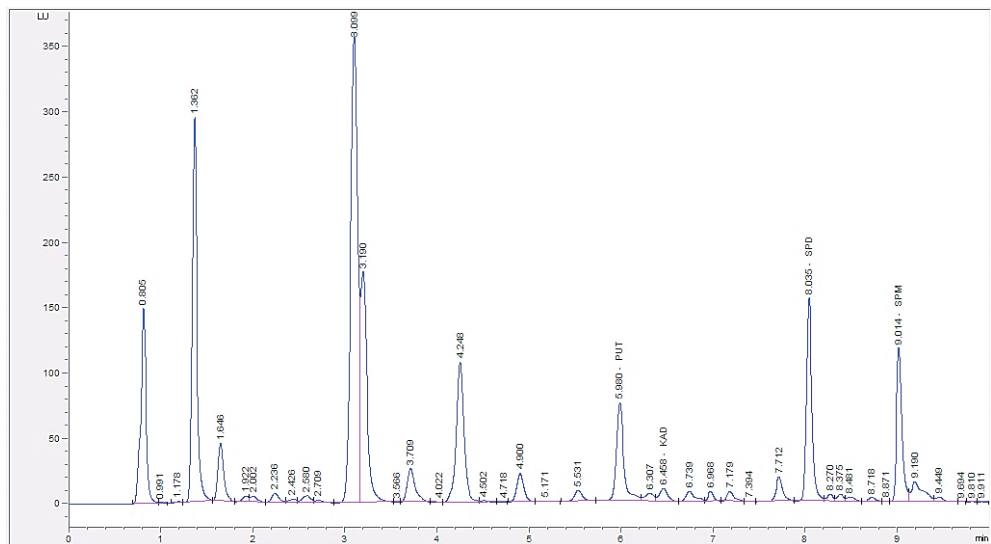
III. Ekstrakcja dansylowanych PA i przygotowanie próbek do HPLC

Po całonocnej inkubacji do każdej próbki dodano 100 µl roztworu proliny (0,25 mg/ml wody), wymieszano i pozostawiono na 30 minut. Próbkę ekstrahowano dwukrotnie toluenem, każdorazowo po 0,75 ml. Zbierano warstwę organiczną (górną) i odparowano do sucha w strumieniu gazowego azotu w temp. 50°C. Suchą pozostałość rozpuszczono w 350 µl metanolu, „sonikowano” przez 10 min, a następnie filtrowano przez filtr 0,22 µm. Tak przygotowane próbki umieszczono w szklanych naczynkach (ang. *vial*) do analiz HPLC.

IV. Analiza HPLC

Do wykonania analiz użyto chromatograf cieczowy Agilent Technologies 1260 series, wyposażony w detektor fluorescencyjny (FLD). Wykorzystano kolumnę HPLC Nucleodur C18 Gravity 3 µm 150x4,6 mm. Jako fazę ruchomą użyto mieszaninę wody (A) i metanolu (B), w warunkach elucji gradientowej o profilu: 0 – 1 min 60% B, 1 - 13 min liniowy wzrost do 95% B, 13 – 18 min 95% B, 18 – 20 min liniowy spadek do 60% B. Cała analiza trwała 20 minut. Analizowane związki wykrywano detektorem fluorescencyjnym przy długości fali promieniowania wzbudzającego 350 nm i długości fali promieniowania emitowanego 510 nm. Analizę każdej próbki wykonywano dwukrotnie, co stanowiło powtórzenia aparaturowe, wyniki te uśredniano. Zebrane wyniki przetwarzano za pomocą programu Agilent Technologies Chemstation B.04.01.

Identyfikację analizowanych związków przeprowadzono na podstawie czasów retencji odpowiednich standardów, kalibrację wykonano metodą wzorca zewnętrznego z pięciopunktową krzywą kalibracyjną. Poniżej przedstawiono przykładowy chromatogram rozdzielu PA z próbki biologicznej.



Ryc. 13. Chromatogram rozdzielu dasyliowanych poliamin wyekstrahowanych z próbki roślinnej. Warunki ekstrakcji, derywatywacji i rozdzielu próbki jak opisano w rozdziale. Podpisy nad „pikami”: PUT – putrecyna, KAD – kadaweryna, SPD – spermidyna, SPM – spermina. Tożsamość pozostałych „pików” nie jest znana, bowiem ich czasy retencji nie są tożsame z czasem retencji żadnego ze sprawdzonych wzorców. Zrzut ekranu z programu Agilent Technologies Chemstation B.04.01

3.4. Schematy przeprowadzonych doświadczeń na roślinach strączkowych

Przeprowadzono szereg doświadczeń wegetacyjnych na wybranych roślinach strączkowych. Wszystkie doświadczenia przeprowadzono w warunkach polowych. Opis i schematy doświadczeń przedstawiono poniżej.

3.4.1. Skład i stężenie poliamin u badanych gatunków roślin

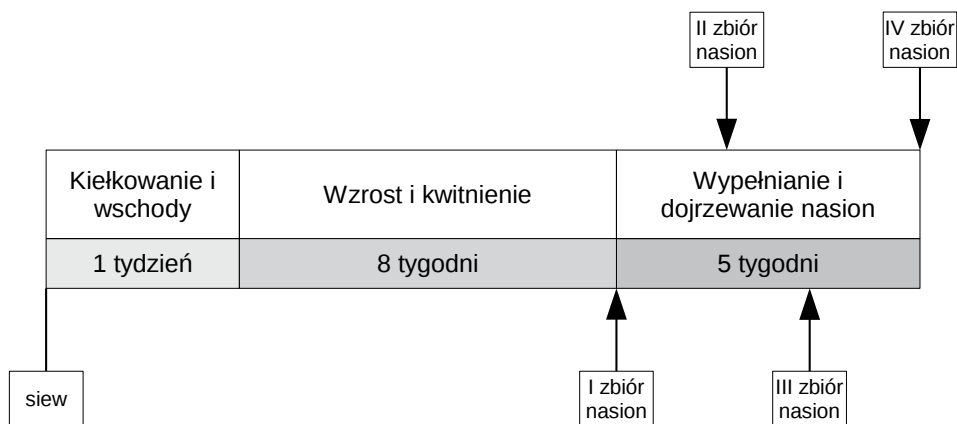
W doświadczeniu 1 użyto odmian następujących gatunków roślin strączkowych: groch siewny odm. Brylant, łubin biały odm. Butan, łubin wąskolistny odm. Regent, łubin żółty odm. Parys i soja odm. Augusta. Nasiona zostały wysiane w optymalnych terminach agrotechnicznych (groch, łubiny - koniec marca, soja - koniec

maja) na poletkach doświadczalnych. Pobrano po 4 losowe próbki w pełni dojrzałych nasion (gotowych do zbioru produkcyjnego), oraz kwiatów 4 dni po ich otwarciu. W materiale tym oznaczono zawartość poszczególnych PA w kontekście organu (kwiat, nasiono) i gatunku badanych roślin.

3.4.2. Analiza zawartości poliamin w nasionach w zależności od ich stopnia dojrzałości

W doświadczeniu 2 wykorzystano materiał roślinny: groch siewny odm. Brylant i Cysterski, łubin biały odm. Boros i Butan, łubin wąskolistny odm. Graf i Regent, łubin żółty odm. Lord i Parys, oraz soja odm. Augusta. Rośliny, po wysianiu we właściwych terminach agrotechnicznych (groch, łubiny - koniec marca, soja - koniec maja), rosły na poletkach doświadczalnych, pobierano po 4 losowe próbki nasion na różnych stopniach dojrzałości strąków:

- I. Faza grubiejących, wciąż zielonych strąków
- II. Faza żółknięcia strąków
- III. Faza żółknięcia liści
- IV. Faza dojrzałych strąków, gotowych do zbioru produkcyjnego



Ryc. 14. Schemat doświadczenia 2 w którym oznaczano zawartość poliamin w nasionach w zależności od stopnia ich dojrzałości. Doświadczenie wykonano w warunkach polowych

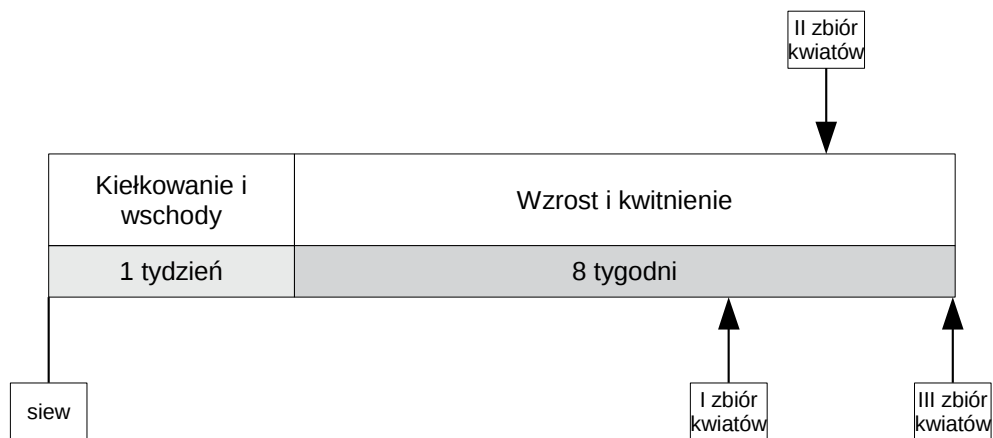
Materiał ze wszystkich odmian pobierano w odpowiadających sobie terminach fenologicznych. W doświadczeniu zbadano akumulację PA w zależności od fazy dojrzałości nasion.

3.4.3. Zawartość poliamin w kwiatach w zależności od stopnia ich dojrzałości

W doświadczeniu 3 użyto odmian następujących gatunków roślin strączkowych: groch siewny odm. Brylant, łubin biały odm. Butan, łubin wąskolistny odm. Regent, łubin żółty odm. Parys i soja odm. Augusta. Wysiane w optymalnych terminach agrotechnicznych rośliny rosły na poletkach doświadczalnych, pobierano po 4 losowe próbki kwiataw na różnych stopniach dojrzałości:

- I. Początek kwitnienia (otwarcie kwiatu)
- II. 4 dni po otwarciu kwiatu
- III. 7 dni po otwarciu kwiatu

Materiał dla wszystkich odmian pobierano w odpowiadających sobie terminach fenologicznych. W doświadczeniu zbadano akumulację PA w kwiatach po ich otwarciu, w trzech terminach różniących się stopniem dojrzałości kwiatu.



Ryc. 15. Schemat doświadczenia 3 w którym oznaczano zawartość poliamin w kwiatach w różnym czasie od ich otwarcia. Doświadczenie wykonano w warunkach polowych

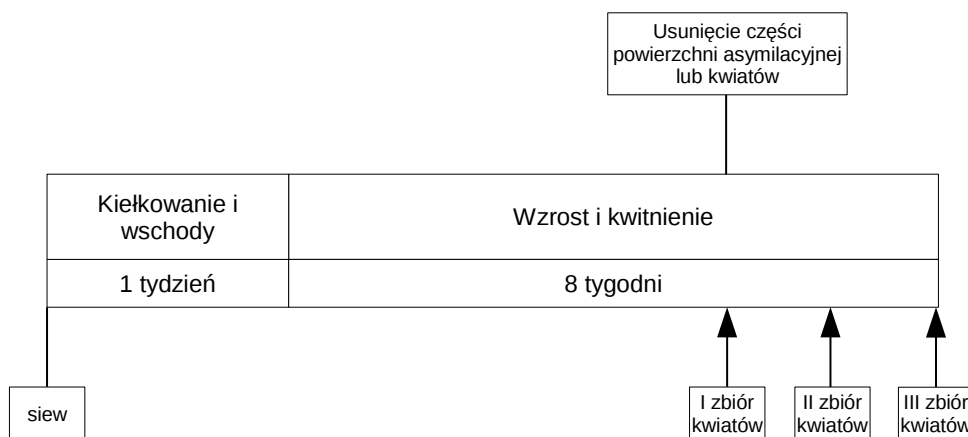
3.4.4. Zawartość poliamin w kwiatach z wysoką konkurencją o metabolity i w kwiatach z niską konkurencją o metabolity

Doświadczenie 4 przeprowadzono na odmianach następujących gatunków i odmian: groch siewny odm. Brylant, łubin biały odm. Butan, łubin wąskolistny odm. Regent, łubin żółty odm. Parys i soja odm. Augusta. Doświadczenie wykonano w warunkach polowych.

Rośliny pozbawiono części liści, tak spowodowany niedobór asymilatów nasila konkurencję między kwiatami o metabolity i stymuluje procesy aborcji kwiatów (Arathi, 2011). Odwrotnie, pozbawienie roślin części rozwijających się kwiatów znacząco zmniejsza konkurencję pozostałych kwiatów o metabolity i stąd odsetek odrzucanych kwiatów ulega zmniejszeniu. Dodatkowo, dla pogłębienia niedoboru asymilatów, u części roślin, obok usuniętych liści, usunięto także dodatkową powierzchnię asymilacyjną, jaką stanowią u łubinów boczne odgałęzienia, a u grochów wąsy. Zabiegi te przeprowadzono w pierwszym dniu kwitnienia danego gatunku, jednocześnie dokonano poboru materiału do analiz (I termin). Materiał analityczny, który stanowiły kwiaty, pobierano w 4 losowych próbkach w następujących terminach:

- I. Początek kwitnienia (otwarcie kwiatu)
- II. 4 dni po otwarciu kwiatu
- III. 7 dni po otwarciu kwiatu

W przypadku części badanych gatunków, na skutek niekorzystnych warunków pogodowych (bardzo gorący i suchy czerwiec), nie udało się zebrać materiału w terminie III, czyli 7 dni po kwitnieniu. W zebranych materiale zbadano zawartość PA w kwiatach z wysoką konkurencją o metabolity i w kwiatach z niską konkurencją o metabolity.



Ryc. 16. Schemat doświadczenia 4 w którym zbadano zawartość poliamin w kwiatach z wysoką konkurencją o metabolity i w kwiatach z niską konkurencją o metabolity. Zabieg doświadczalny polegał na usunięciu kwiatów, bądź części powierzchni asymilacyjnej, co prowadziło do znaczących zmian w dostępności metabolitów dla kwiatów pozostałych na roślinie. Doświadczenie wykonano w warunkach polowych

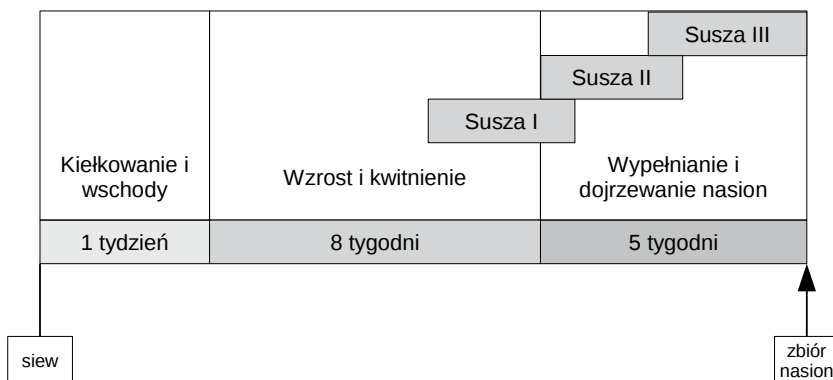
3.4.5. Zawartość poliamin w nasionach poddanych działaniu suszy w różnych stadiach rozwoju nasion

Doświadczenie 5 przeprowadzono na dwóch odmianach łubinu wąskolistnego: Graf i Regent. Rośliny rosły w otwartym tunelu foliowym, na stołach o wysokości 1 m. Nasiona zostały wysiane pojedynczo do wazonów o pojemności 8 dm³, wypełnionych ziemią ogrodniczą (Hollas, Pasłek). Oznaczono maksymalną pojemność wodną (MWC) gleby, rośliny podlewano do 70% MWC, po rozpoczęciu okresu suszy podlewanie zmniejszono do 20% MWC.

Rośliny podzielono na 4 grupy:

- 0. kontrola (nawadnianie optymalne) – 5 roślin
- I. susza od początku kwitnienia, długość 3 tygodnie – 5 roślin
- II. susza od początku wypełniania nasion, długość 3 tygodnie – 5 roślin
- III. susza od początku zasychania nasion, długość 3 tygodnie – 5 roślin

Do analizy zawartości PA pobrano po 5 losowych próbek w pełni dojrzałych nasion.



Ryc. 17. Schemat doświadczenia 5 w którym badano wpływ suszy na rośliny łubinu wąskolistnego w trzech różnych fazach rozwoju roślin. Doświadczenie wykonano w tunelu otwartym, w wazonach. Na końcu doświadczenia zebrano próbki dojrzałych nasion i oznaczono w nich zawartość poliamin

3.4.5.1 Wyznaczenie maksymalnej pojemności wodnej gleby (MWC) i traktowanie roślin suszą do założonej wartości MWC

Protokół wyznaczenia MWC opracowano na podstawie (Hillel i van Bavel, 1976), celem procedury było określenie maksymalnej objętości wody (100% MWC), która może być zatrzymana przez glebę. Przygotowano 3 wazony po 8 dm³ objętości, wypełniono je po 1,5 kg suchej gleby i przez 24 godziny nawadniano, po czym pozwolono nadmiarowi wody wypłynąć. Następnie zważono masę mokrej

gleby i suszono ją w 105 °C przez 3 dni. Wysuszoną glebę zważono ponownie. 100% MWC obliczono odejmując masę wysuszonej gleby od masy gleby suchej. Pomiar przeprowadzono niezależnie w trzech wazonach i wynik uśredniono.

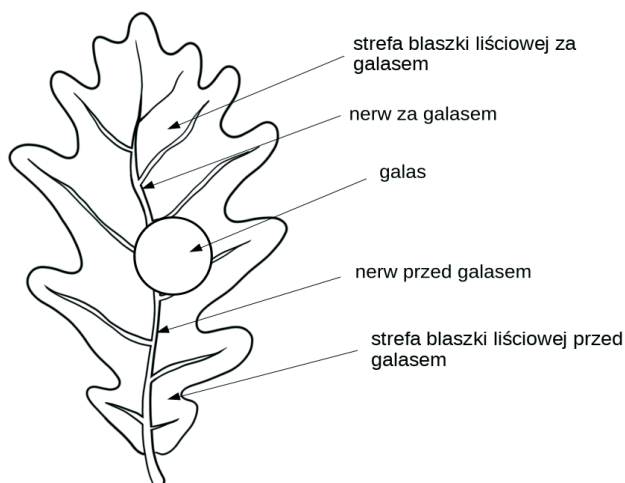
Podczas prowadzenia doświadczeń wazonowych, ustalono optymalne nawadnianie jako 70% MWC i warunki suszy jako 20% MWC. Rośliny podlewano codziennie, ważono każdy wazon i dolewano wodę do osiągnięcia wyliczonej masy założonego % MWC.

3.5. Zawartość poliamin w galasach i liściach dębu

Doświadczenie 6 przeprowadzono na galasach, które zbierano z drzew dębu szypułkowego (*Quercus robur* L.) rosnących w lasach w okolicach Skierniewic (51°57'N 20°08'E). Były to galasy wywoływane przez galasówkę dębiankę (*Cynips quercusfolii* L.), tzw. jabłuszka dębowe.

Galasy młode zbierano w drugiej połowie lipca, galasy dojrzałe w drugiej połowie sierpnia, w tym czasie zebrano także próbki liści. Niezwłocznie po zbiorze galasy i liście zamrożono w suchym lodzie. Wybrano różne części galasa celem ekstrakcji i dalszego określenia zawartości PA.

Porównano stężenie PA w galasach, ze stężeniem w różnych częściach liści na których rosły, oraz ze stężeniem PA w liściach kontrolnych, czyli wolnych od galasów. Ryc. 18 przedstawia miejsca pobierania próbek na liściu z galasem. Pobierano próbki z 4 losowo wybranych galasów i liści.



Ryc. 18. Schemat liścia dębu z rosnącym na nim galasem, oraz miejsca w których mierzono zawartość poliamin. Autor rysunku: Anna Waligórska

3.6. Opracowanie statystyczne wyników

Do podstawowych obliczeń wykorzystano arkusz kalkulacyjny LibreOffice Calc 5.2.7 (LibreOffice contributors), obliczenia statystyczne wykonano za pomocą pakietu Statistica 13.1 (StatSoft). Opis użytych metod statystycznych zamieszczono pod każdym wykresem z wynikami.

W przypadku większości doświadczeń i pomiarów pobierano po 4 niezależne próbki z różnych roślin, będące powtórzeniami biologicznymi. Wyjątkiem było doświadczenie 5 zatytułowane „Zawartość poliamin w nasionach poddanych działaniu suszy w różnych etapach kwitnienia i dojrzewania nasion”, w którym pobierano po 5 niezależnych próbek. Każdą analizę chromatograficzną wykonano dwukrotnie i otrzymany wynik uśredniono, co stanowiło jeden pomiar w rozumieniu powtórzenia biologicznego.

4. WYNIKI

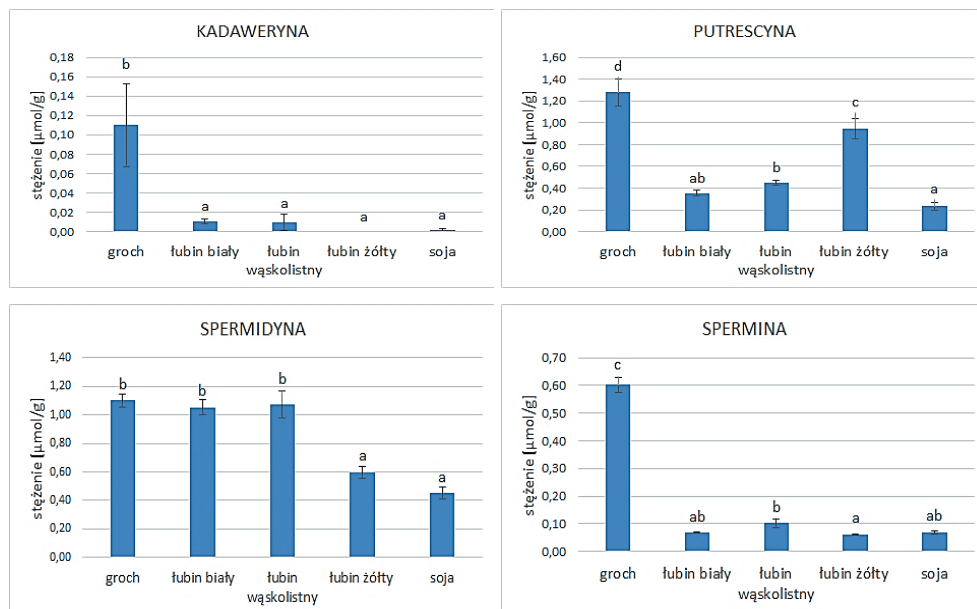
4.1. Skład i stężenie poliamin u badanych gatunków roślin

W poniższych podrozdziałach (4.1.1 i 4.1.2) przedstawiono wyniki analiz składu i stężenia badanych PA w organach badanych roślin. Badania te przeprowadzono na następujących odmianach roślin: groch Brylant, łubin biały Butan, łubin żółty Parys, łubin wąskolistny Regent i soja Augusta.

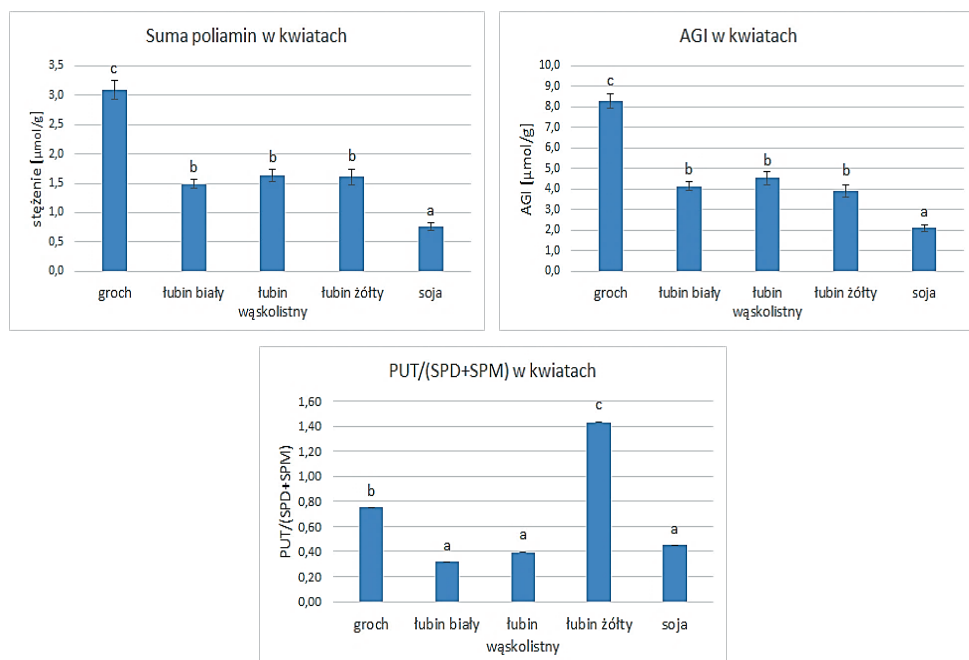
4.1.1. Zawartość poliamin w organach poszczególnych gatunków roślin

Analizowany materiał biologiczny różnił się pod względem zawartości PA, zarówno między gatunkami, jak i między organami badanych roślin. Poniżej przedstawiono zawartość poszczególnych PA w różnych organach badanych roślin.

Pierwsza grupa wykresów (Ryc. 19) przedstawia porównanie zawartości analizowanych PA (kadaweryna, putrescyna, spermidyna i spermina) w kwiatach poszczególnych gatunków *Fabaceae*:

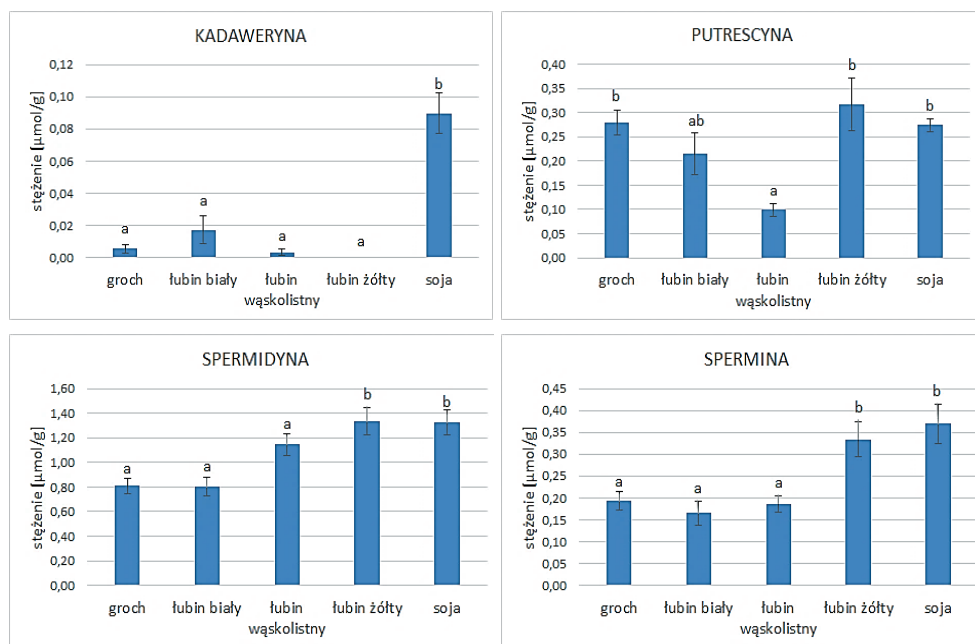


Ryc. 19. Zawartość poszczególnych poliamin w kwiatach (4 dni po otwarciu) badanych gatunków roślin strączkowych. Różne litery wskazują statystycznie istotne różnice dla $p < 0,05$ wg testu Duncana (w obrębie odmiany), słupki błędów przedstawiają zakres błędu standardowego średniej



Ryc. 20. Suma zawartości analizowanych poliamin (putrescyna, kadaweryna, spermidyna, spermina), Indeks Grup Aminowych (AGI), oraz stosunek stężeń putrescyny do sumy stężeń spermidyny i sperminy w kwiatach (4 dni po otwarciu) badanych gatunków roślin strączkowych. Różne litery wskazują statystycznie istotne różnice dla $p < 0,05$ wg testu Duncana (w obrębie odmiany), słupki błędów przedstawiają zakres błędu standardowego średniej

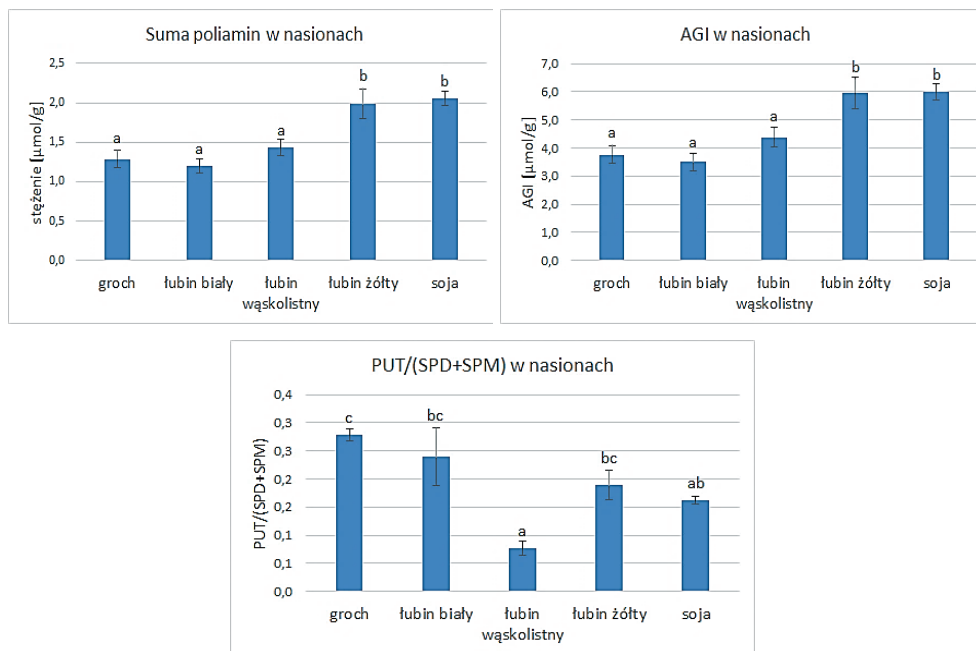
Największą zawartość wszystkich badanych PA, czyli kadaweryny, putrescyny, sperminy i spermidyny stwierdzono w grochu. Znacząco wyższe stężenie spermidyny stwierdzono także w łubinie białym i wąskolistnym. Zawartość kadaweryny była zdecydowanie najniższa pośród wszystkich badanych PA, wśród badanych roślin największą jej zawartość zarejestrowano w grochu.



Ryc. 21. Zawartość poszczególnych poliamin w nasionach badanych gatunków roślin strączkowych. Różne litery wskazują statystycznie istotne różnice dla $p < 0,05$ wg testu Duncana (w obrębie odmiany), słupki błędów przedstawiają zakres błędu standardowego średniej

Zawartość PA w nasionach była odmienna niż w kwiatach, największą zawartością cechowały się nasiona łubinu żółtego i soi. W przypadku putrescyny najniższą zawartość zmierzono w łubinie wąskolistnym (około $0,1 \mu\text{mol/g s.m.}$), najwyższą zaś w łubinie żółtym, gdzie była ponad trzykrotnie większa. Najwięcej spermidyny i sperminy stwierdzono w nasionach soi i łubinu żółtego ($1,30 \mu\text{mol/g s.m.}$ dla spermidyny, $0,35 \mu\text{mol/g s.m.}$ dla sperminy), najmniej zaś w grochu i łubinie białym.

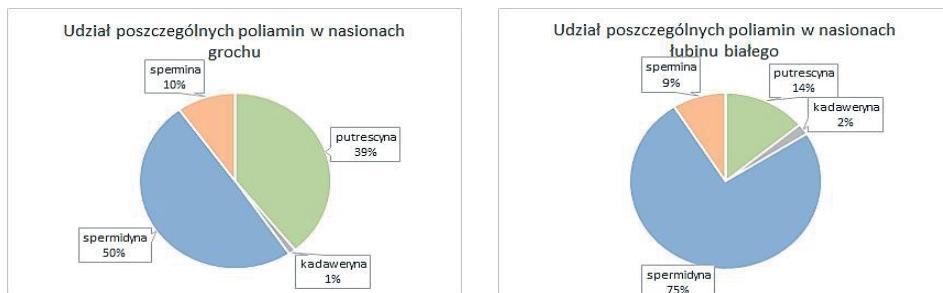
Nie porównywano zawartości PA w kwiatach w terminach innych niż 4 dni po otwarciu kwiatu, uznano, że najbardziej reprezentatywne jest przedstawienie wyników dla terminu pośrodku badanego procesu, czyli 4 dni po otwarciu kwiatu.

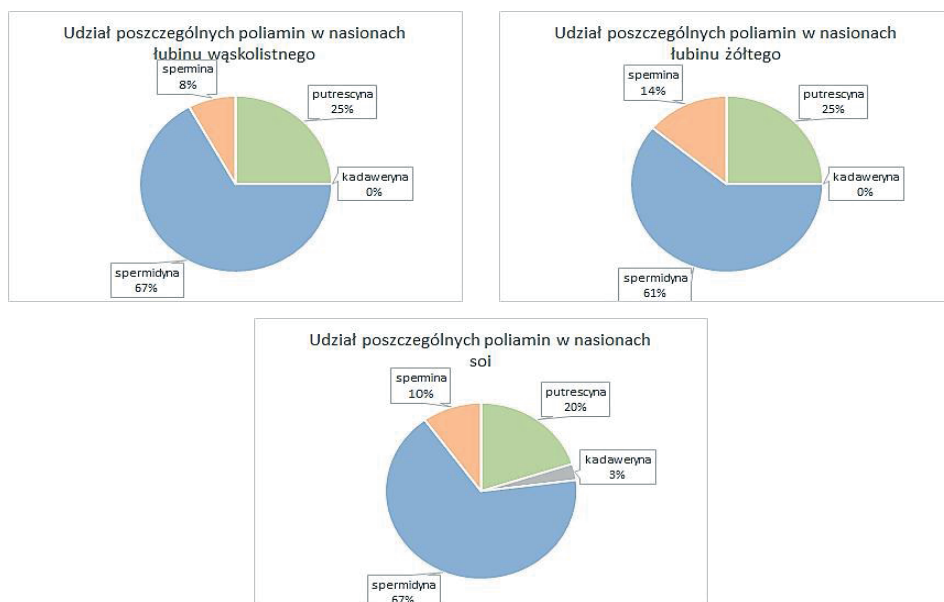


Ryc. 22. Suma zawartości analizowanych poliamin (putrescyna, kadaweryna, spermidyna, spermina), Indeks Grup Aminowych (AGI), oraz stosunek stężeń putrescyny do sumy stężeń spermidyny i sperminy w nasionach badanych gatunków roślin strączkowych. Różne litery wskazują statystycznie istotne różnice dla $p < 0,05$ wg testu Duncana (w obrębie odmiany), słupki błędów przedstawiają zakres błędu standardowego średniej

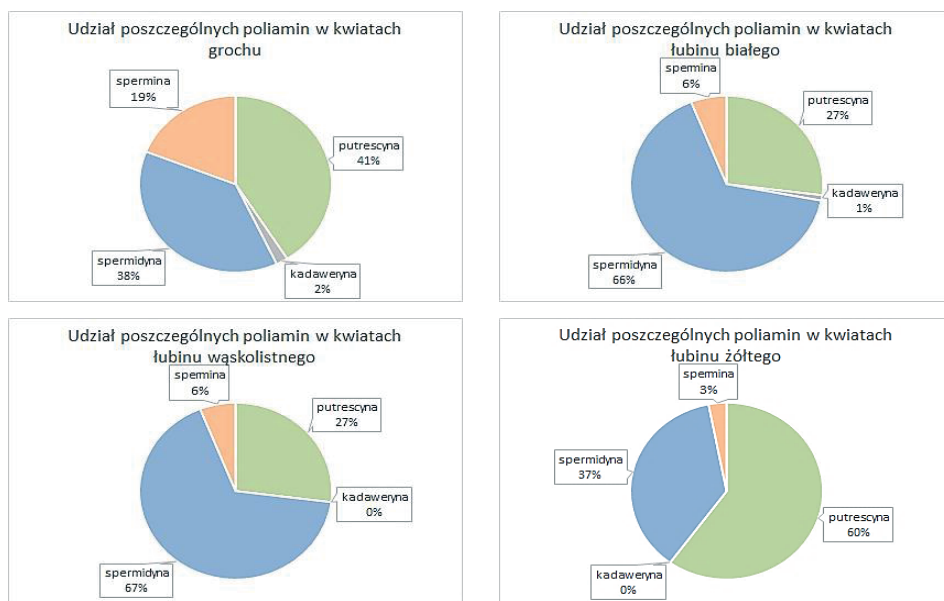
4.1.2. Porównanie udziału poszczególnych poliamin

Poniżej pokazano udział poszczególnych PA w puli badanych związków. Przedstawiono porównanie zawartości PA w dojrzałych nasionach, oraz w kwiatach badanych roślin.





Ryc. 23. Procent molowy poszczególnych poliamin w puli wszystkich analizowanych poliamin (putrescyna, kadaweryna, spermidyna, spermina) w nasionach badanych gatunków



Ryc. 24. Procent molowy poszczególnych poliamin w puli wszystkich analizowanych (putrescyna, kadaweryna, spermidyna, spermina) w kwiatach badanych gatunków

W kwiatach badanych roślin, spośród badanych PA najwięcej było spermidyny, następnie sperminy, putrescyny, na kadawerynie skończywszy. W nasionach stwierdzono podobny rozkład zawartości PA, z wyjątkiem łubinu żółtego, gdzie najwięcej było putrescyny, następnie spermidyny, sperminy i śladowe ilości kadaweryny. W przypadku kadaweryny największy udział molowy stwierdzono w nasionach soi, stanowił on jednak zaledwie 3%. Kadawerynę znaleziono także u grochu i łubinu białego w nasionach i kwiatach, jednak w każdym przypadku udział ten był mniejszy niż 3% u soi.

Obecność w badanym materiale roślinnym wielu związków aminowych skutkowała dużą ilością niewielkich, często nakładających się na siebie, pików na chromatogramach. W przypadku analiz danylowanych PA nie było możliwe odróżnienie analizowanych związków na podstawie właściwości spektralnych, bowiem wszystkie one reprezentowały wyłącznie właściwości przyłączonej grupy danylowej. W takiej sytuacji analizowanie niewielkich pików obciążone jest poważnym ryzykiem błędnej identyfikacji i w konsekwencji całkowicie błędnego wniosku.

Z uwagi na znikomy udział kadaweryny (oraz kilku innych PA) w puli PA, oraz problemy z prawidłową identyfikacją i integracją części chromatogramów, zrezygnowano w dalszych badaniach z oznaczania tego związku. Skupiono się na analizie zawartości putrescyny, spermidyny i sperminy, których identyfikacja i kwantyfikacja nie pozostawiała wątpliwości.

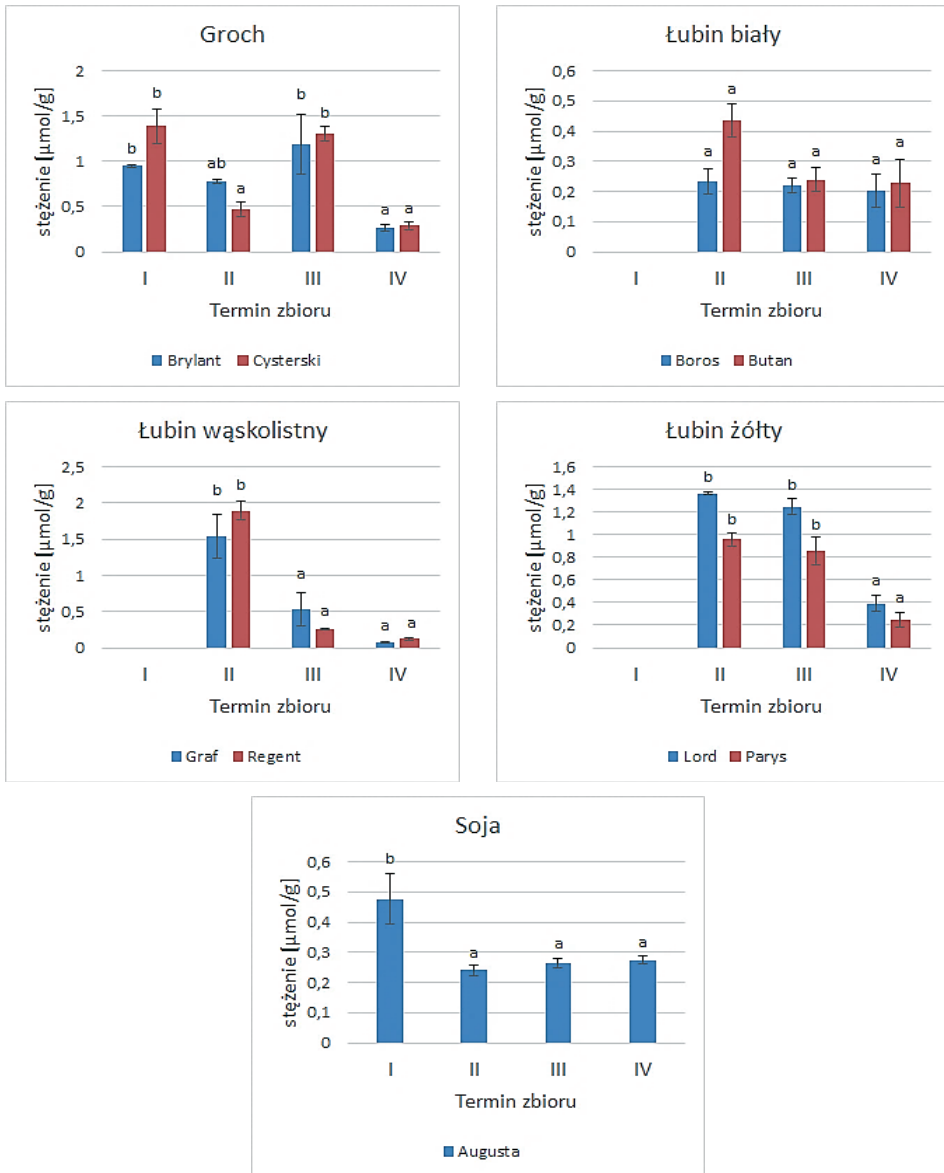
4.2. Zawartość poliamin w nasionach w zależności od stopnia ich dojrzałości

Zmierzono zawartość PA w czasie dojrzewania organów generatywnych u badanych odmian roślin strączkowych. Materiał pobierano w czterech fazach dojrzałości organów generatywnych:

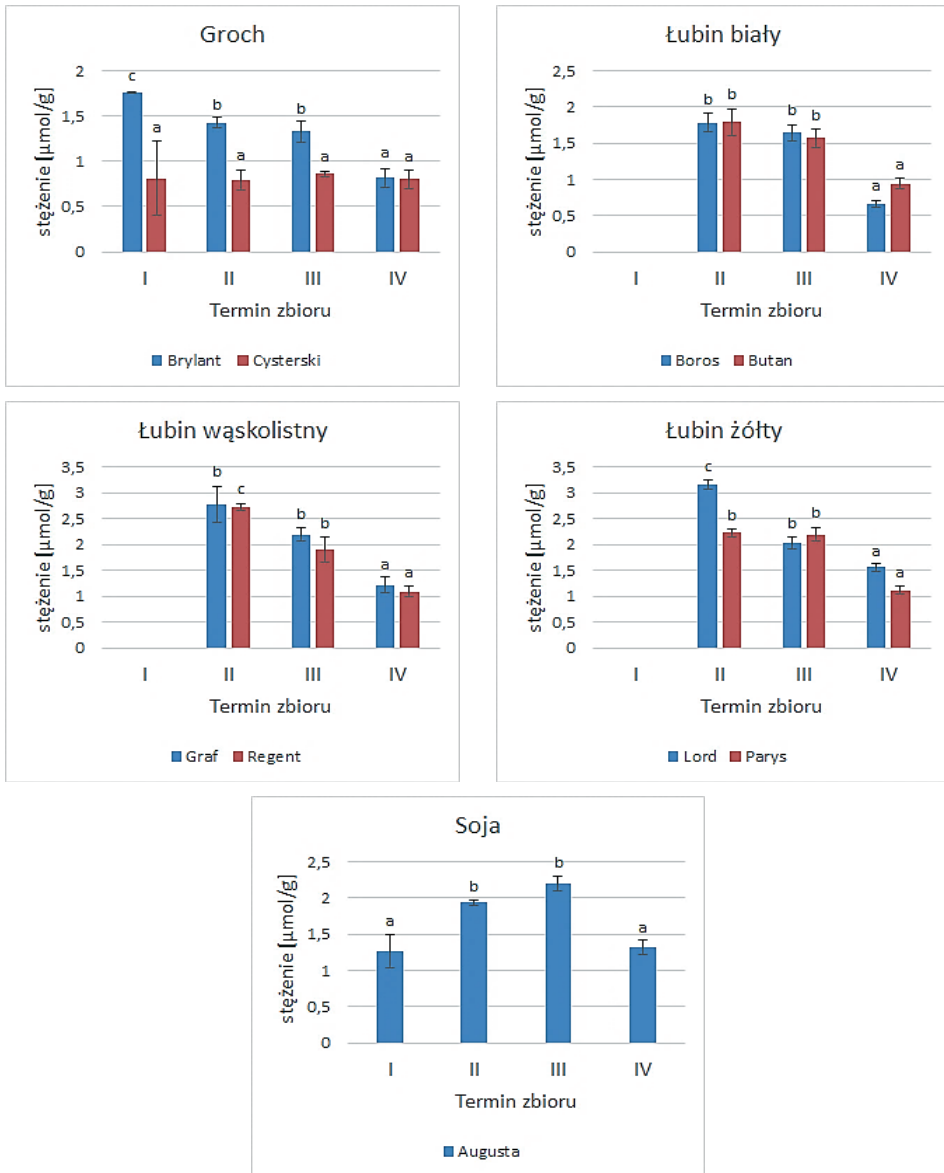
- I. Faza grubiejących, wciąż zielonych strąków
- II. Faza żółknięcia strąków
- III. Faza żółknięcia liści
- IV. Faza dojrzałych strąków, gotowych do zbioru produkcyjnego

Materiał był pobierany w tych samych fazach fenologicznych, z uwagi więc na różny czasowy przebieg tych faz u badanych gatunków, materiał był pobierany w różnych terminach kalendarzowych, specyficznych dla każdego gatunku.

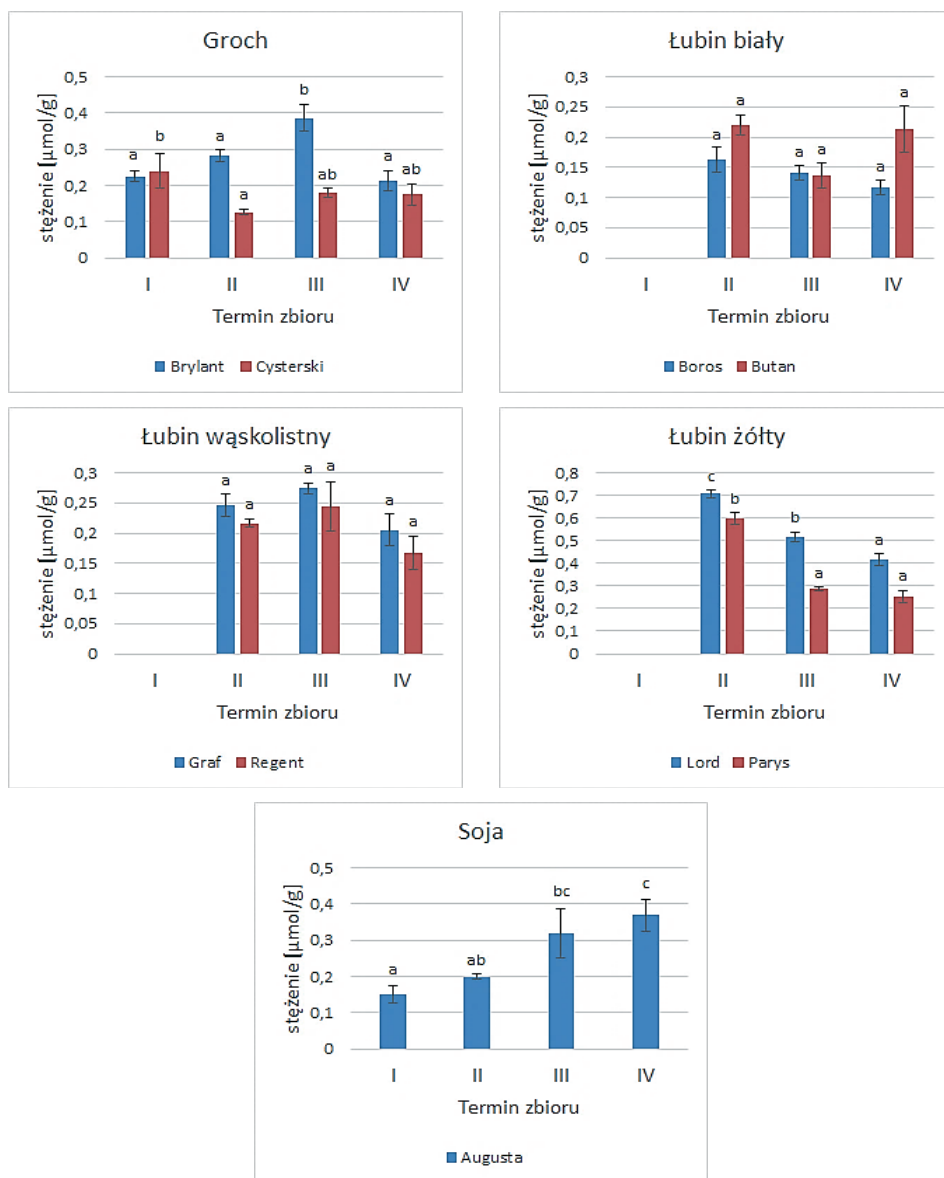
Zawartość putrescyny w nasionach badanych roślin zmieniała się znacząco, u większości roślin była ona najwyższa w nasionach w pierwszym etapie dojrzewania. Wyjątkiem był łubin biały odmiany Boros, gdzie zmian stężenia putrescyny nie stwierdzono, oraz obie odmiany grochu, gdzie stężenie putrescyny było wysokie na I i III etapie dojrzewania nasion, na II i IV etapie dojrzewania nasion zmierzone stężenia były niższe.



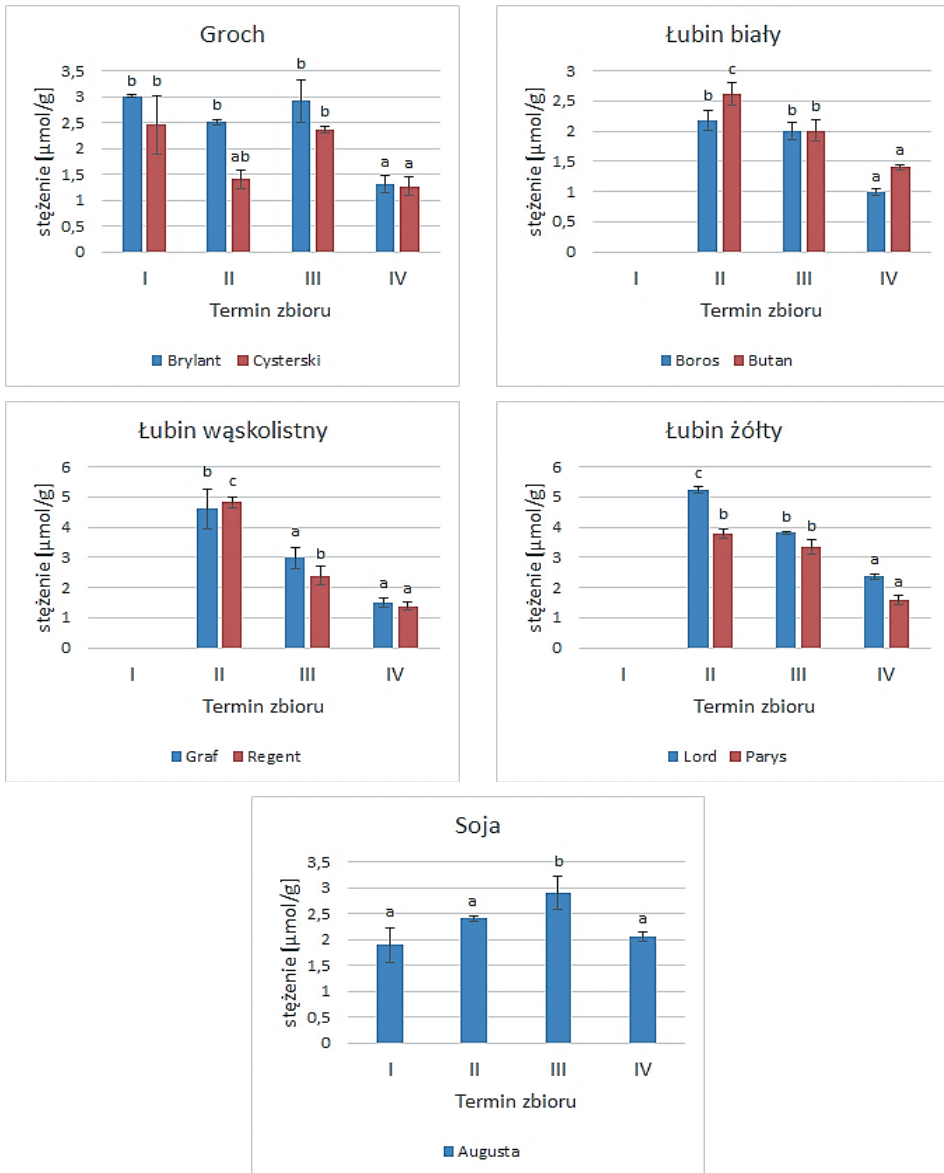
Ryc. 25. Zawartość putrecyny w nasionach na różnych etapach ich dojrzwania: I - faza grubiejących, wciąż zielonych strąków, II - faza żółknięcia strąków, III - faza żółknięcia liści, IV - faza dojrzałych strąków, gotowych do zbioru produkcyjnego. Różne litery wskazują statystycznie istotne różnice dla $p < 0,05$ wg testu Duncana (w obrębie odmiany), słupki błędów reprezentują błąd standardowy średniej



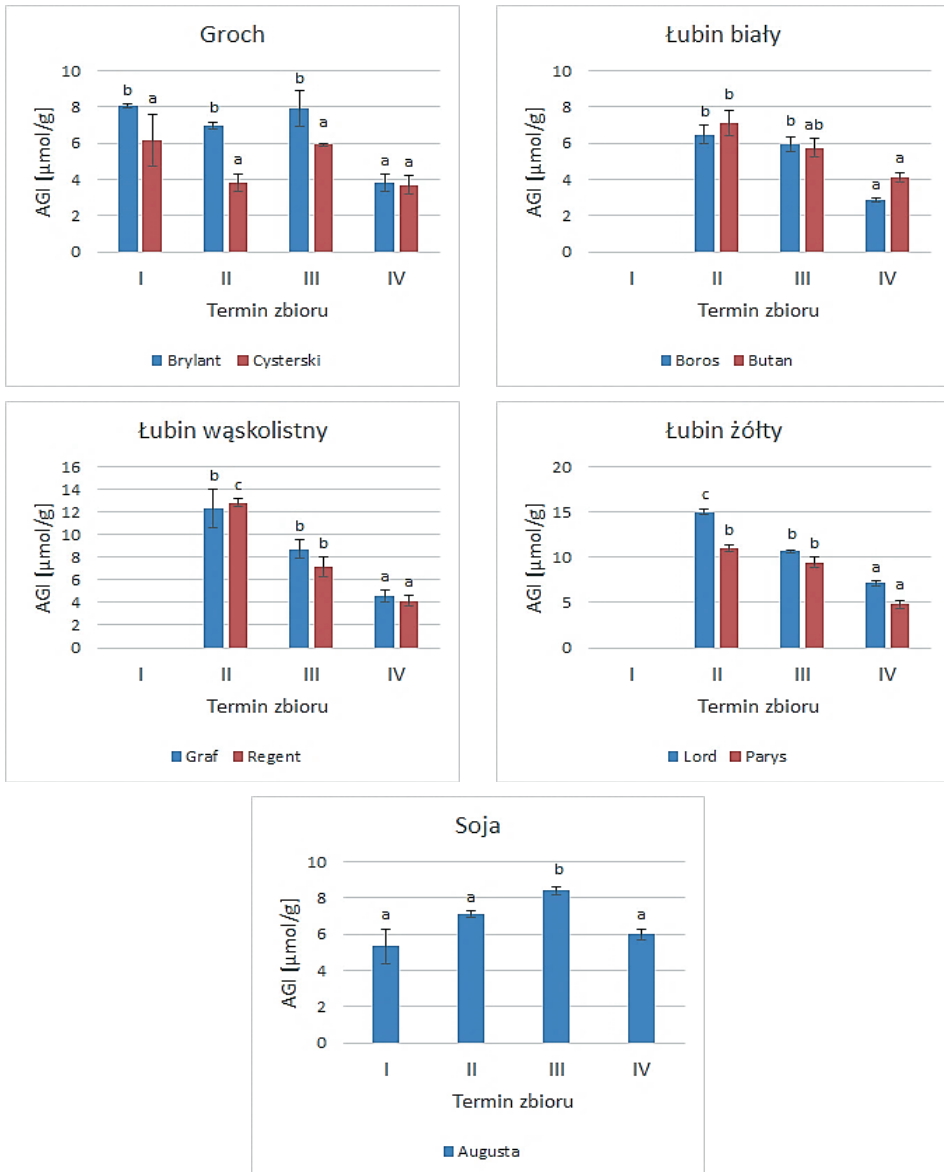
Ryc. 26. Zawartość spermidyny w nasionach na różnych etapach ich dojrzewania: I - faza grubiejących, wciąż zielonych strąków, II - faza żółknięcia strąków, III - faza żółknięcia liści, IV - faza dojrzałych strąków, gotowych do zbioru produkcyjnego. Różne litery wskazują statystycznie istotne różnice dla $p < 0,05$ wg testu Duncana (w obrębie odmiany), słupki błędów reprezentują błąd standardowy średniej



Ryc. 27. Zawartość sperminy w nasionach na różnych etapach ich dojrzwania: I - faza grubiejących, wciąż zielonych strąków, II - faza żółknięcia strąków, III - faza żółknięcia liści, IV - faza dojrzałych strąków, gotowych do zbioru produkcyjnego. Różne litery wskazują statystycznie istotne różnice dla $p < 0,05$ wg testu Duncana (w obrębie odmiany), słupki błędów reprezentują błąd standardowy średniej



Ryc. 28. Sumaryczna zawartość PA (putrescyny, spermidyny i sperminy) w nasionach na różnych etapach ich dojrzewania: I - faza grubiejących, wciąż zielonych strąków, II - faza żółknięcia strąków, III - faza żółknięcia liści, IV - faza dojrzałych strąków, gotowych do zbioru produkcyjnego. Różne litery wskazują statystycznie istotne różnice dla $p < 0,05$ wg testu Duncana (w obrębie odmiany), słupki błędów reprezentują błąd standardowy średniej



Ryc. 29. Indeks Grup Aminowych (AGI) w nasionach na różnych etapach ich dojrzwania: I - faza grubiejących, wciąż zielonych strąków, II - faza żółknięcia strąków, III - faza żółknięcia liści, IV - faza dojrzałych strąków, gotowych do zbioru produkcyjnego. Wskaźnik wyliczony na podstawie stężeń putrescyny, spermidyny i sperminy. Różne litery wskazują statystycznie istotne różnice dla $p < 0,05$ wg testu Duncana (w obrębie odmiany), słupki błędów reprezentują błąd standardowy średniej

Stężenie spermidyny wykazywało niewielki, aczkolwiek statystycznie znaczący spadek w miarę dojrzewania nasion większości badanych gatunków. Wyjątkiem była soja, gdzie stopniowo rosło od etapu I do III, zaś w terminie IV spadło do poziomu z etapu I, oraz groch odmiany Cysterski, gdzie zmian stężenia spermidyny nie stwierdzono.

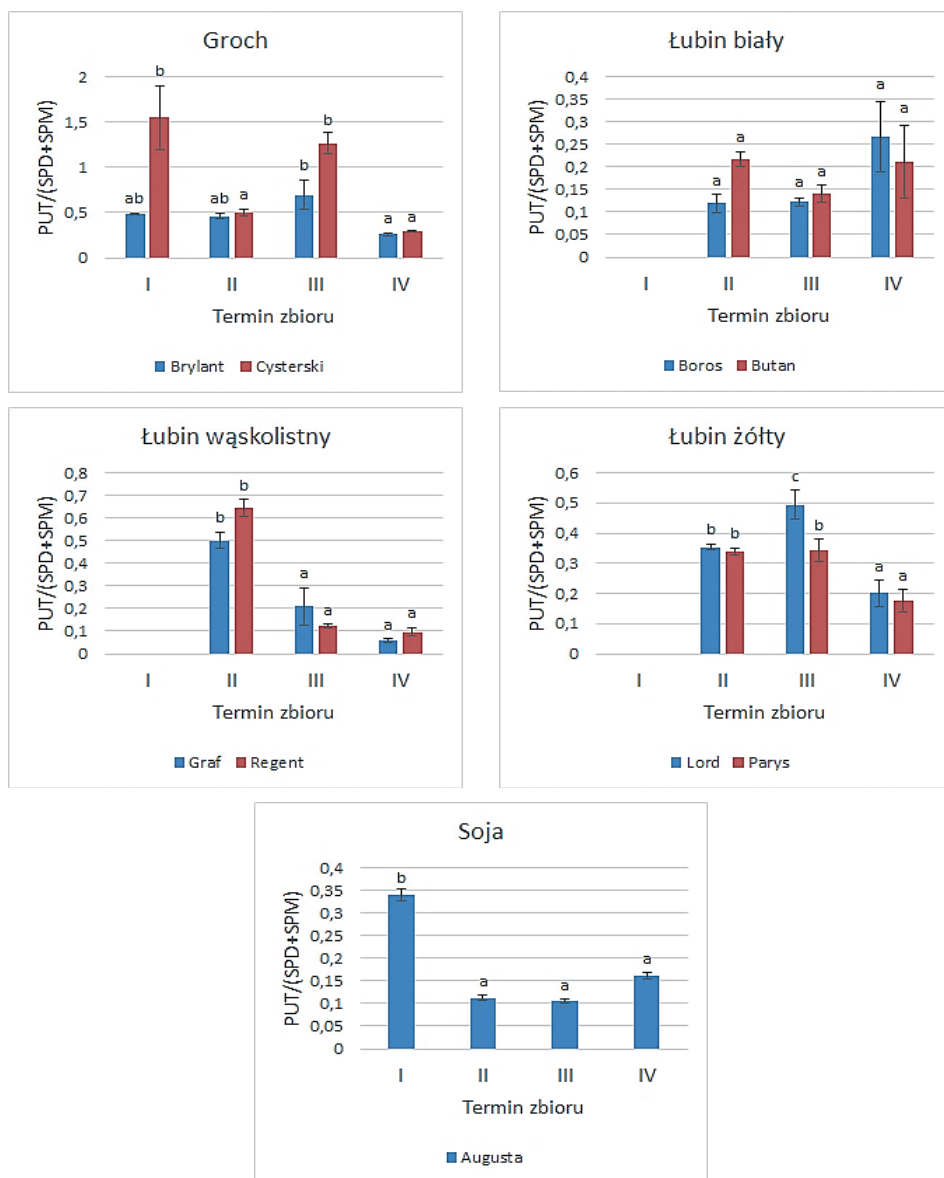
Stężenie sperminy zmieniało się w zróżnicowany sposób, zależnie od gatunku i odmiany. W przypadku grochu zmiany były chaotyczne, w łubinie białym i wąskolistnym nie było istotnych statystycznie różnic, u łubinu żółtego zaobserwowano istotne statystycznie, konsekwentne obniżanie stężenia w miarę dojrzewania nasion, zaś u soi stały wzrost stężenia w trakcie dojrzewania nasion.

Sumaryczna zawartość PA u grochu wykazywała tendencję spadkową w miarę dojrzewania nasion, z niewielkim zwiększeniem jej na III etapie, u łubinów zawartość ta malała w miarę dojrzewania roślin, u soi rosła od etapu I do III, na IV etapie spadła do zawartości z etapu I. Dynamika zmian najbardziej przypominała dynamikę zmian stężenia spermidyny, gdyż stężenie spermidyny jest największe wśród badanych PA.

Indeks Grup Aminowych swoją dynamiką przypomina sumaryczną zawartość PA, oraz zawartość spermidyny. Spada w miarę dojrzewania nasion u łubinów, rośnie u soi za wyjątkiem terminu IV, oraz fluktuuje u grochów. Rozkład AGI odzwierciedla zmiany w całkowitej zawartości PA, jego spadek w miarę dojrzewania nasion wynika ze zmniejszającej się sumarycznej zawartości PA, nie wykazując przy tym specyficznej dynamiki.

Stosunek putrescyny do sumy stężeń spermidyny i sperminy wykazuje duże zróżnicowanie w obrębie poszczególnych odmian, największe wartości osiąga u grochów, zwłaszcza u odmiany Cysterski, osiągając w I i III terminie wartości rzędu 1,5. W odmianie Brylant w terminach I, II i III wartości osiąmane przez ten wskaźnik oscylowały w okolicach 0,5, a w terminie IV jego wartość spadła. U łubinu białego nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic, u łubinów żółtego i wąskolistnego, oraz soi wskaźnik ten osiągał największe wartości na wcześniejszych etapach dojrzewania nasion, potem spadał.

Całość zaobserwowanych zmian świadczy o zmniejszającej się zawartości PA w nasionach w trakcie ich dojrzewania, zmiany te dotyczą głównie lżejszych PA: putrescyny i spermidyny, podczas gdy zmiany zawartości najcięższej spośród badanych PA - sperminy zachodzą inaczej u każdego gatunku. Z uwagi na fakt, iż spermidyna stanowi dominującą PA, zmiany całkowitej zawartości PA są podobne jak u spermidyny. Współczynnik AGI spada w czasie dojrzewania nasion, jednak równolegle spada także sumaryczna zawartość PA, jest jednak ona zdecydowanie za niska, aby PA mogły pełnić funkcję efektywnego osmoprotektanta. Bez wątpienia spada ilość azotu zawartego w PA, możliwe że azot ten zużywany jest do syntezy białek zapasowych w nasionach. Wysoka akumulacja białek zapasowych w nasionach roślin strączkowych jest ich szczególną cechą w porównaniu do wielu innych grup roślin, jest bardzo prawdopodobne, że jest to jedna z przyczyn obserwowanego zmniejszania się zawartości PA w trakcie dojrzewania nasion.



Ryc. 30. Stosunek stężeń putrescyny do sumy stężeń spermidyny i sperminy w nasionach na różnych etapach ich dojrzewania: I - faza grubiejących, wciąż zielonych strąków, II - faza żółknięcia strąków, III - faza żółknięcia liści, IV - faza dojrzałych strąków, gotowych do zbioru produkcyjnego. Wskaźnik wyliczony na podstawie stężeń putrescyny, spermidyny i sperminy. Różne litery wskazują statystycznie istotne różnice dla $p < 0,05$ wg testu Duncana (w obrębie odmiany), słupki błędów reprezentują błąd standardowy średniej

4.3. Zawartość poliamin w kwiatach w zależności od stopnia ich dojrzałości

Zmierzono zawartość PA w kwiatach w różnych etapach ich rozwoju:

- I. Początek kwitnienia (otwarcie kwiatu)
- II. 4 dni po otwarciu kwiatu
- III. 7 dni po otwarciu kwiatu

Materiał był pobierany w tych samych fazach fenologicznych, z uwagi więc na różny czasowy przebieg tych faz u badanych gatunków, próbki były pobierane w różnych terminach, specyficznych dla każdego gatunku.

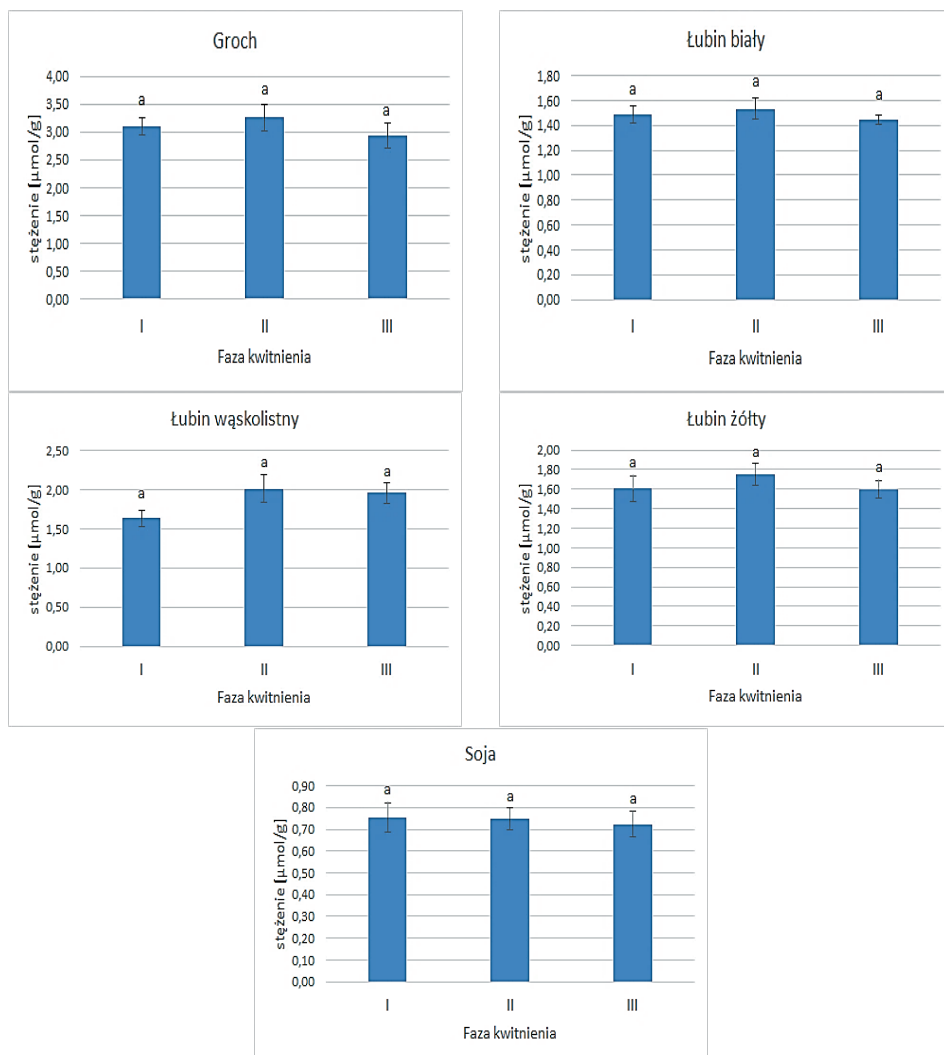
Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w sumarycznej zawartości PA pomiędzy badanymi fazami kwitnienia. Można zaryzykować tezę, iż w porównaniu do dynamicznych zmian obserwowanych w trakcie dojrzewania nasion, stężenie PA w kwiatach zachowuje stan homeostazy.

Na poniższych wykresach przedstawiono wyliczone na podstawie stężeń PA współczynniki: Indeks Grup Aminowych (AGI), oraz stosunek Put/(Spd+Spm) w kwiatach badanych gatunków roślin strączkowych w różnych etapach rozwoju.

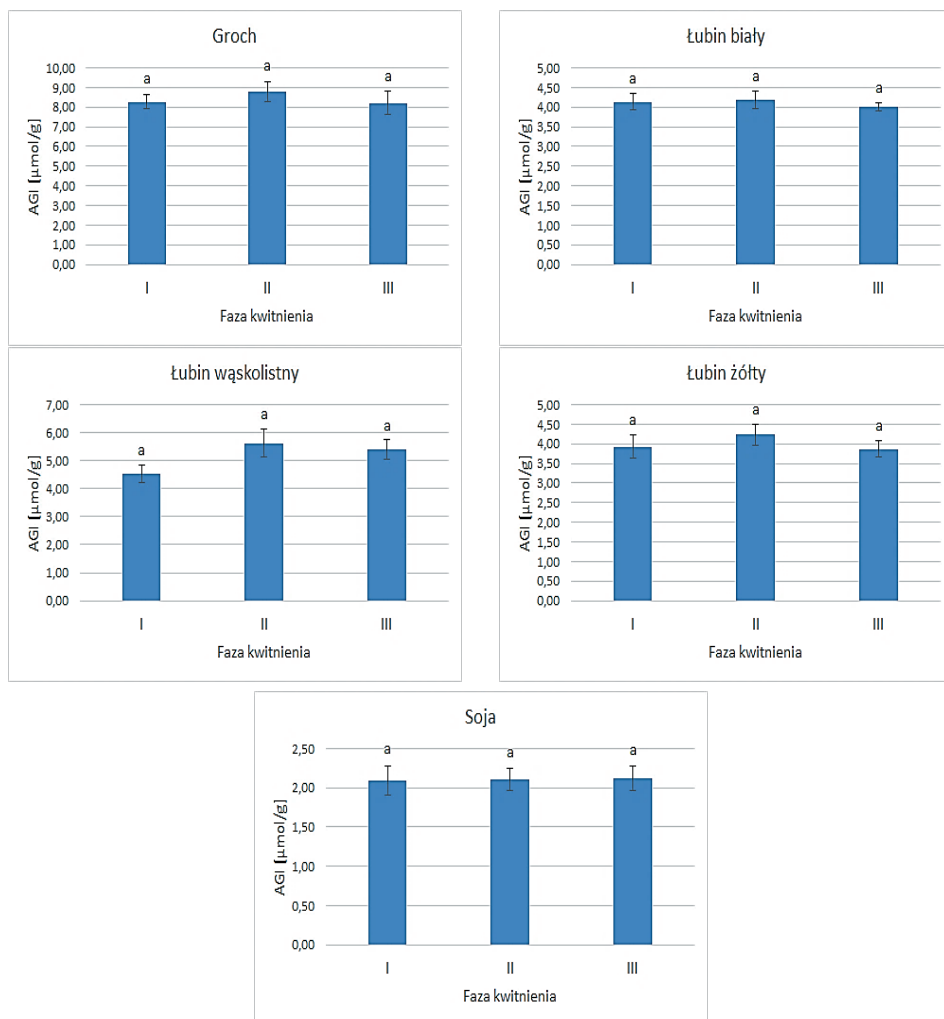
Wyliczony na podstawie stężeń putrescyny, spermidyny i sperminy Indeks Grup Aminowych również nie wykazywał istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi fazami kwitnienia.

Podobnie jak w przypadku poprzednich wyników, również stosunek stężeń putrescyny do sumy stężeń spermidyny i sperminy nie wykazywał różnic pomiędzy badanymi fazami kwitnienia.

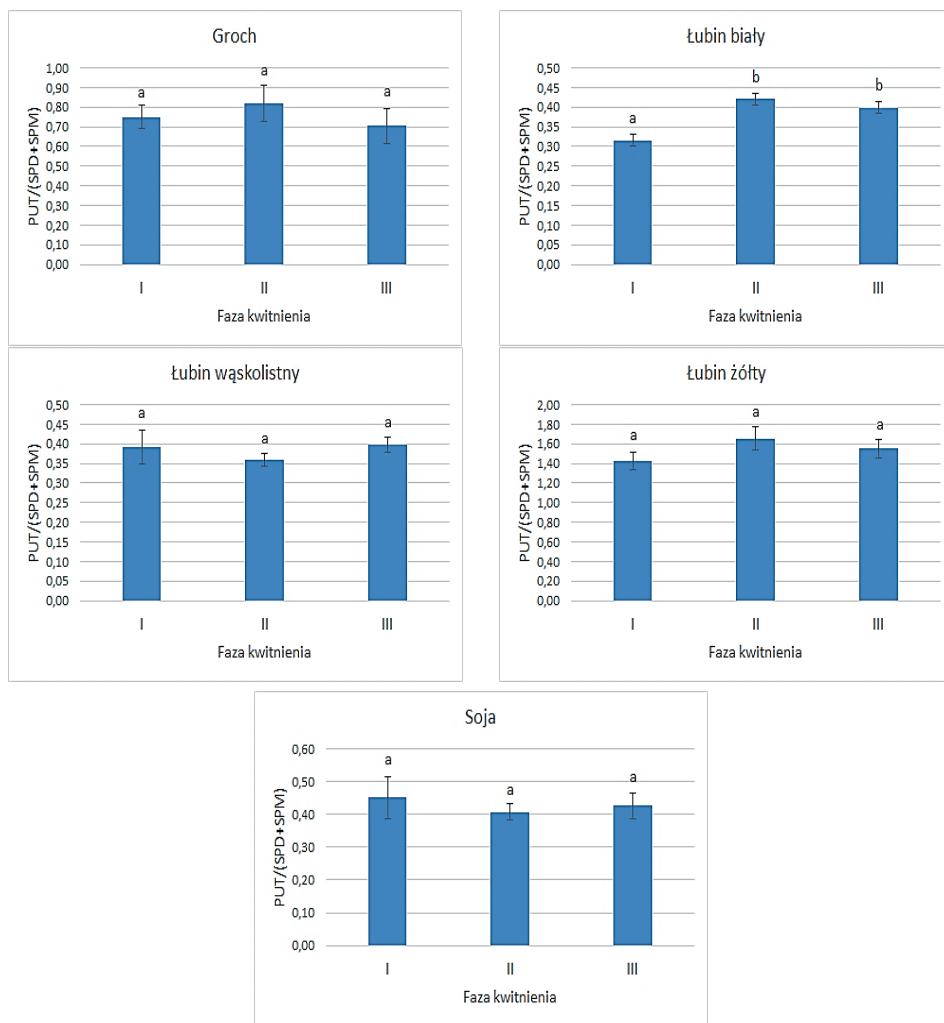
Brak istotnych różnic w obrębie zawartości PA, oraz wyliczonych wskaźników pozwala stwierdzić, iż putrescyna, spermidyna i spermina nie biorą istotnego udziału w dynamice procesów rozwoju kwiatów, co należy rozumieć jako stały, niezmienny w czasie rozwoju kwiatu udział PA w tych procesach.



Ryc. 31. Sumaryczna zawartość poliamin w kwiatach w różnych terminach kwitnienia. I - 1szy dzień kwitnienia, II - 4ty dzień kwitnienia, III - 7my dzień kwitnienia. Różne litery wskazują statystycznie istotne różnice dla $p < 0,05$ wg testu Duncana (w obrębie odmiany), słupki błędów reprezentują błąd standardowy średniej



Ryc. 32. Indeks Grup Aminowych (AGI) w kwiatach badanych gatunków roślin strączkowych w różnych terminach kwitnienia. I - 1szy dzień kwitnienia, II - 4ty dzień kwitnienia, III - 7my dzień kwitnienia. Wskaźnik wyliczony na podstawie stężeń putrescyny, spermidyny i sperminy. Różne litery wskazują statystycznie istotne różnice dla $p < 0,05$ wg testu Duncana (w obrębie odmiany), słupki błędów reprezentują błąd standardowy średniej



Ryc. 33. Stosunek stężenia putrescyny do sumy stężeń spermidyny i sperminy w kwiatach badanych gatunków roślin strączkowych w różnych terminach kwitnienia. I - 1szy dzień kwitnienia, II - 4ty dzień kwitnienia, III - 7my dzień kwitnienia. Różne litery wskazują statystycznie istotne różnice dla $p < 0,05$ wg testu Duncana (w obrębie odmiany), słupki błędów reprezentują błąd standardowy średniej

4.4. Zawartość poliamin w kwiatach z wysoką konkurencją o metabolity i w kwiatach z niską konkurencją o metabolity

W doświadczeniu zbadano zawartość PA w kwiatach które rosły w warunkach wysokiej konkurencji o metabolity, oraz w kwiatach rosnących w warunkach niskiej konkurencji o metabolity. Zróznicowanie to osiągnięto poprzez usunięcie połowy liści, co prowadzi do niedoboru dostępnych asymilatów, a w konsekwencji skutkuje aborcją kwiatów, alternatywnym zabiegiem było usunięcie połowy kwiatów, co prowadzi do wysokiej dostępności asymilatów oraz hamuje odrzucanie pozostałych kwiatów. Dodatkowym wariantem doświadczenia było usunięcie dodatkowej powierzchni asymilacyjnej, jaką są u łubinów boczne rozgałęzienia, a w przypadku grochu wąsy.

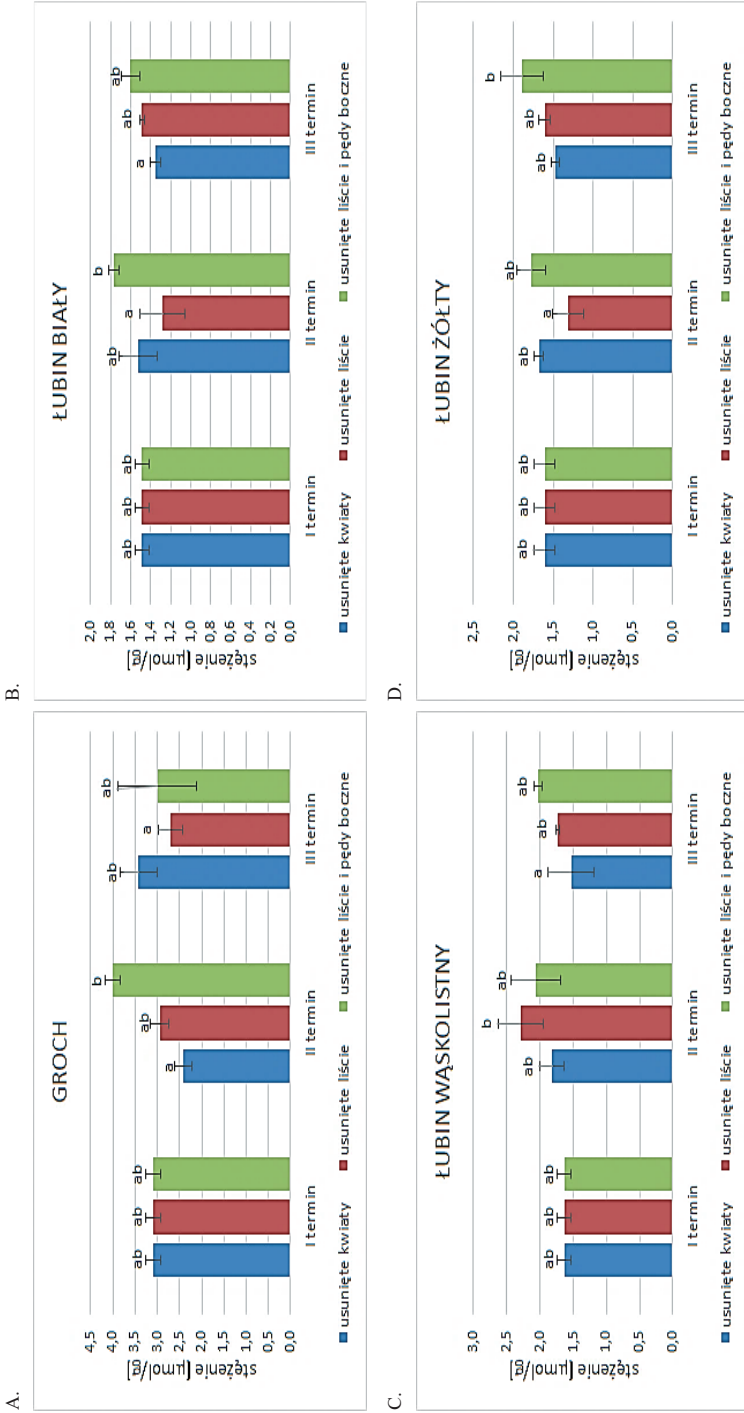
W opisanym doświadczeniu w nielicznych przypadkach stwierdzono istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi obiektami, jednak w każdym prawie przypadku zaobserwowano powtarzającą się zależność między wynikami, co najprawdopodobniej związane jest z rzeczywistym przebiegiem badanych procesów. Zdecydowano się więc na przedstawienie zamieszczonej poniżej interpretacji otrzymanych wyników, z pełną jednak świadomością autora i czytelników, że opiera się ona na wynikach o istotności gorszej niż standardowe $p < 0,05$.

Dla każdego obiektu, w jednym z terminów badania, najwyższe sumaryczne stężenie PA stwierdzono u roślin z usuniętymi liśćmi i pędami bocznymi, niższe u roślin z usuniętymi liśćmi, najniższe zaś u roślin z usuniętą częścią kwiatów. Ciekawe, że obok tego powtarzającego się schematu, powtarza się również inny schemat gdzie sumaryczne stężenie PA dla obiektów z usuniętymi liśćmi osiąga wartość najniższą, wyższe dla roślin z usuniętymi kwiatami, najwyższe zaś u roślin z usuniętymi liśćmi i pędami bocznymi. Gdy w jednym z terminów stężenia układały się według pierwszego schematu, to w kolejnym według drugiego, wyjątkiem był łubin wąskolistny, gdzie drugi schemat się nie powtórzył. To zróznicowanie można tłumaczyć udziałem pędów bocznych, gdzie w zależności od fazy rozwojowej i zależnej od niej równowagi pomiędzy łodygą i liśćmi rozgałęzienia, mogą one stanowić raz donor, a raz akceptor asymilatów. W takim przypadku usunięcie pędu bocznego i liści eliminuje ten dodatkowy, zależny od fazy rozwojowej, czynnik, stąd zawartość PA była zawsze najwyższa u roślin z usuniętymi liśćmi i pędami bocznymi, a w przypadku usunięcia tylko liści efekt był zmienny, bo zależny od pozostawionych pędów bocznych. Według tej interpretacji najwięcej PA występowało w kwiatach w warunkach najwyższej konkurencji o metabolity, najmniej zaś, gdy dostęp do metabolitów był najlepszy. Jest to zrozumiałe, gdyż asymilaty produkowane przez roślinę w procesie fotosyntezy to związki węgla (przede wszystkim w postaci sacharozy), nie zawierające azotu. Gdy są one dostępne, to czynnikiem ograniczającym syntezę PA jest dostępność azotu, który musi być zużywany przede wszystkim na potrzeby syntezy aminokwasów, alkaloidów, czy innych biologicznie ważnych

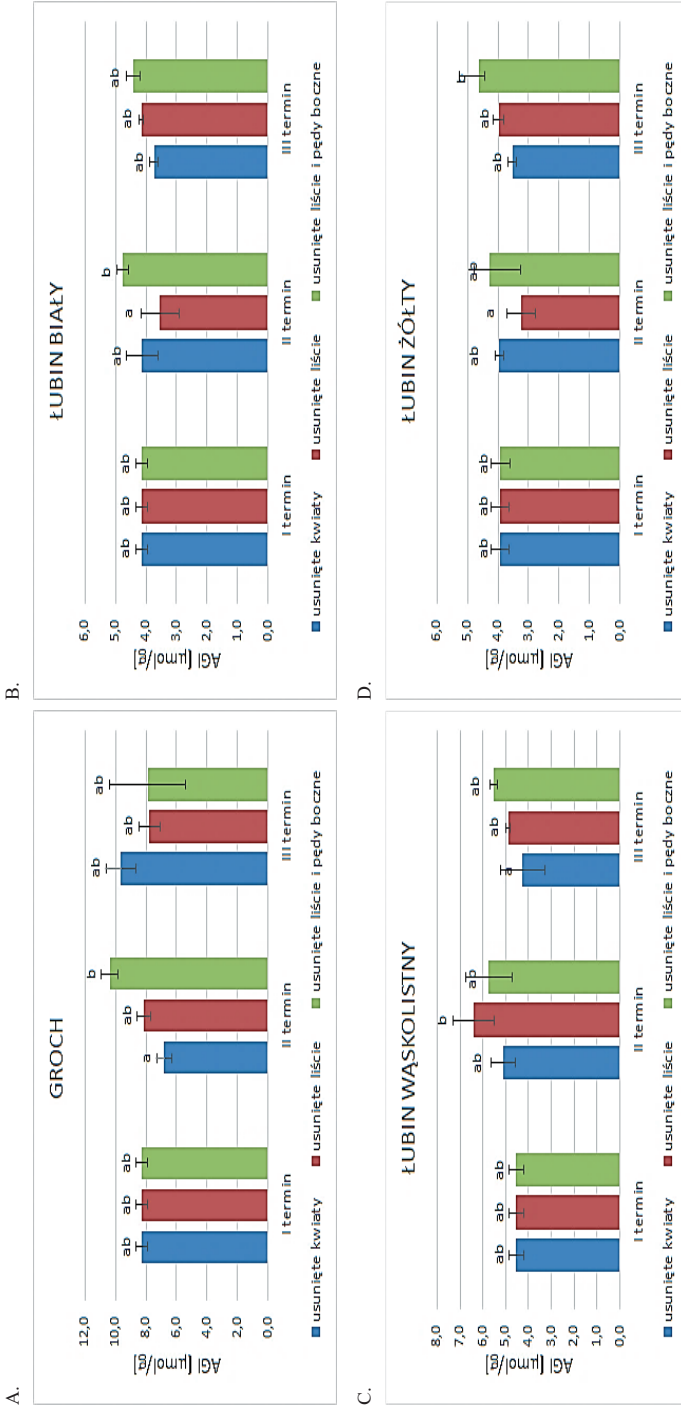
związków zawierających azot. W warunkach natomiast ograniczonej dostępności do asymilatów, azot nie będzie tak intensywnie zużywany (nie bowiem wtedy czynnikiem ograniczającym), stąd może być łatwiej dostępny na potrzeby syntezy PA.

Na wykresach (Ryc. 35) przedstawiono wyliczone na podstawie stężeń PA współczynniki: Indeks Grup Aminowych (AGI), oraz stosunek Put/(Spd+Spm) dla badanych gatunków roślin strączkowych. Wyliczony Indeks Grup Aminowych przedstawia dokładnie ten sam rozkład co sumaryczne stężenie PA. Podsumowując, zaobserwowano zarówno zmiany potencjału osmotycznego PA, którego miarą jest całkowita zawartość PA, jak i zmiany współczynnika AGI. Jednak zaobserwowane względne zmiany współczynnika AGI były takie same co zmiany sumarycznej zawartości PA, co przeczy hipotezie wyłącznej funkcji PA jako źródła azotu, bowiem w takiej sytuacji zmiany AGI powinny być znacząco większe. Oczywiście, nie można wykluczyć funkcji PA jako magazynu azotu, jednak są one tylko jedną z grup związków które mogłyby pełnić taką funkcję. Jeśli zaś chodzi o osmoprotekcyjne właściwości PA, to z uwagi na osiągane niskie stężenia, nie mogą one pełnić funkcji efektywnego osmoprotektanta. Zaobserwowane zmiany zgodne są również z przedstawionym wcześniej mechanizmem wpływu pędów bocznych na zawartość PA.

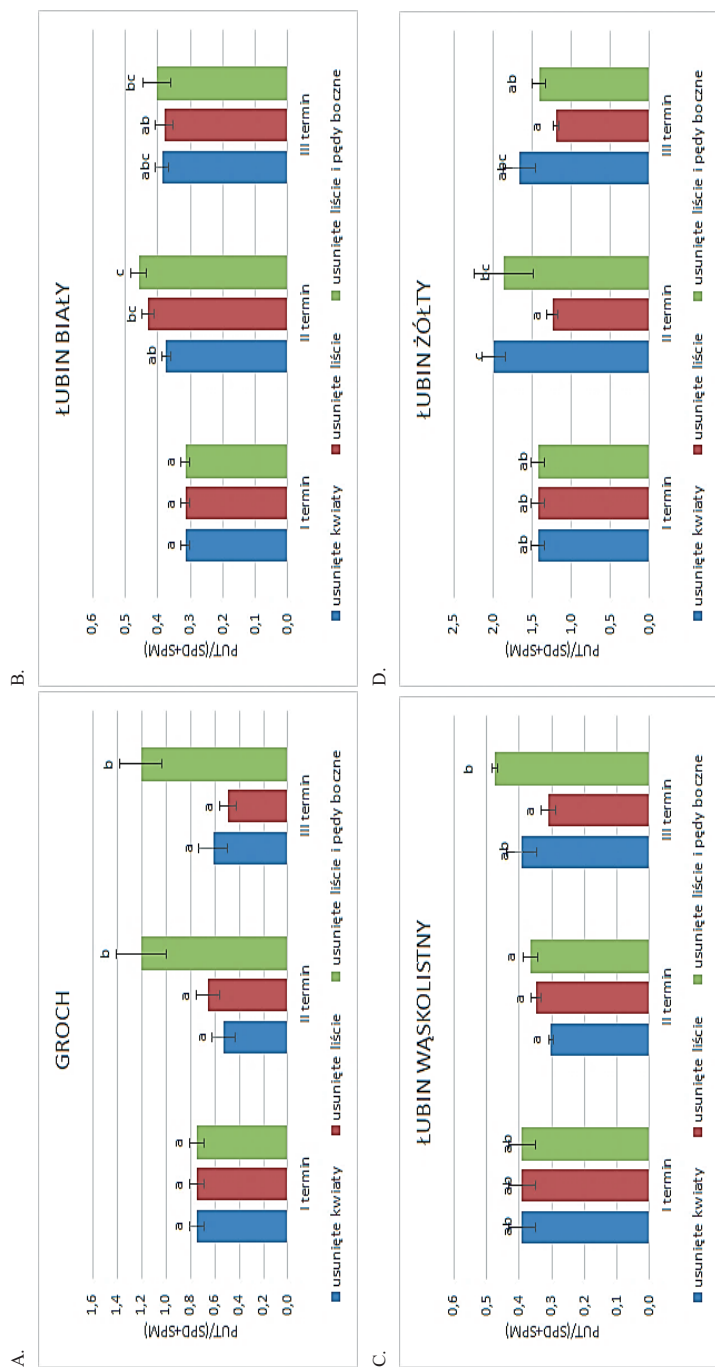
Kolejne wykresy (Ryc. 36) przedstawiają stosunek stężenia putrescyny do sumy stężeń spermidyny i sperminy w kwiatach badanych gatunków roślin strączkowych. Stosunek stężenia putrescyny do sumy stężeń spermidyny i sperminy u grochu, łubinu białego i wąskolistnego w czwartym dniu po otwarciu kwiatu był najniższy u roślin z usuniętymi kwiatami, wyższy u roślin z usuniętymi liśćmi, najwyższy zaś u roślin z usuniętymi liśćmi i pędami bocznymi. 7 dni po otwarciu kwiatu współczynnik ten najniższy był u roślin z usuniętymi liśćmi, wyższy u roślin z usuniętymi kwiatami, najwyższy u tych z usuniętymi liśćmi i pędami bocznymi. W przypadku łubinu żółtego, w obu terminach poboru materiału zaobserwowano najwyższą wartość współczynnika u roślin z usuniętymi kwiatami, najniższą u tych z usuniętymi liśćmi, pośrednią zaś u roślin z usuniętymi liśćmi i pędami bocznymi. W części wyników zwraca uwagę podobieństwo kształtu wykresu dla sumy PA, współczynnika AGI, oraz stosunku PUT/(SPD+SPM). Podobieństwo to wynika z faktu, iż wzrost zawartości PA nastąpił dzięki zwiększeniu syntezy putrescyny, przy braku jednoczesnej stymulacji syntezy spermidyny i sperminy.



Ryc. 34. Sumaryczna zawartość poliamin w kwiatach z wysoką dostępnością metabolitów (usunięte kwiaty) i w kwiatach z utrudnionym dostępem do metabolitów (usunięte liście), oraz w kwiatach rosnących na roślinie z usuniętymi liśćmi i pędami bocznymi. Materiał pobierano w I - początek kwitnienia (otwarcie kwiatu), II - 4 dni po otwarciu kwiatu, III - 7 dni po otwarciu kwiatu. Różne litery wskazują statystycznie istotne różnice dla $p < 0,05$ wg testu Duncan (w obrębie odmiany), słupki błędów reprezentują błąd standardowy średniej



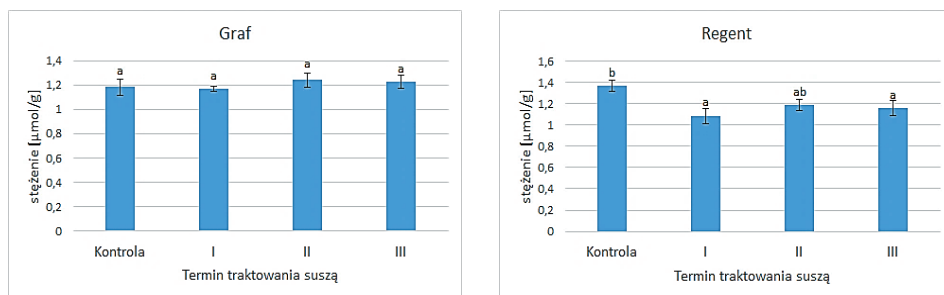
Ryc. 35. Indeks Grup Aminowych (AGI) w kwiatach z utrudnionym dostępem do metabolitów i w kwiatach z wysoką dostępnością metabolitów, oraz w kwiatach rosnących na roślinie z usuniętymi liśćmi i pędami bocznymi. Rośliny poddano zabiegom usuwania części kwiatów, liści, bądź pędów bocznych. Wskaźnik wyliczony na podstawie stężeń putrescyny, spermidyny i sperminy. Materiał pobierano w I - początku kwitnienia (otwarcie kwiatu), II- 4 dni po otwarciu kwiatu, III - 7 dni po otwarciu kwiatu. Różne litery wskazują statystycznie istotne różnice dla $p < 0,05$ wg testu Duncana (w obrębie odmiany), słupki błędów reprezentują błąd standardowy średniej



Ryc. 36. Stosunek stężenia putrescyny do sumy stężeń spermidyny i sperminy w kwiatach badanych gatunków roślin strączkowych. Rośliny poddano zabiegom usuwania części kwiatów, liści, bądź pędów bocznych. Materiał pobierano w I - początek kwitnienia (otwarcie kwiatu), II- 4 dni po otwarciu kwiatu, III - 7 dni po otwarciu kwiatu. Różne litery wskazują statystycznie istotne różnice dla $p < 0,05$ wg testu Duncana (w obrębie odmiany), słupki błędów reprezentują błąd standardowy średniej

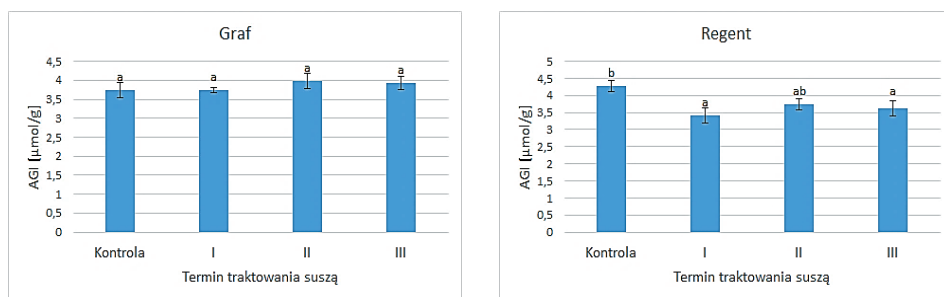
4.5. Zawartość poliamin w nasionach poddanych działaniu suszy w różnych stadiach rozwoju nasion

W doświadczeniu zbadano, jak susza działająca na różnych etapach kwitnienia, a później dojrzewania nasion, wpływa na akumulację PA w dojrzałych nasionach łąbinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.). Wyniki przedstawiono na poniższych wykresach.



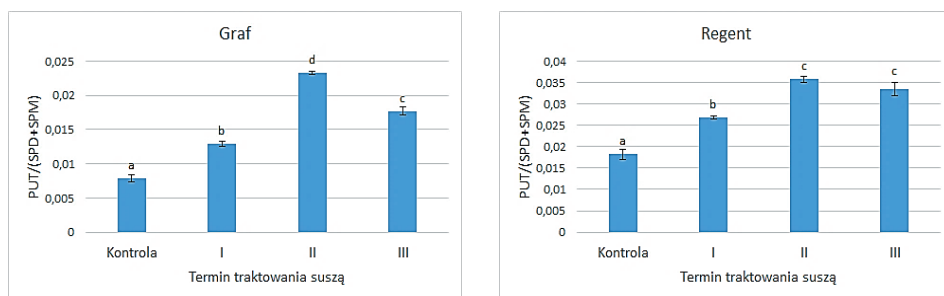
Ryc. 37. Suma zawartości badanych poliamin w nasionach badanych odmian łąbinu wąskolistnego. Kontrola była podlewana przez cały czas optymalnie (70% MWC), 3-tygodniową głęboką suszą (20% MWC) utrzymywano: (I) od początku kwitnienia, (II) od początku wypełniania nasion, (III) od początku zasychania nasion, czyli w momencie zakończenia suszy (III). Różne litery wskazują statystycznie istotne różnice dla $p < 0,05$ wg testu Duncana (w obrębie odmiany), słupki błędów reprezentują błąd standardowy średniej

Susza glebowa nie spowodowała bardzo znaczących różnic między kontrolą a roślinami poddanymi jej działaniu. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic u odmiany Graf, u drugiej zaś badanej odmiany, Regent, takie różnice były, jednak wahały się one w granicach 13,3% (susza II) a 20,6% (susza I), w przypadku suszy II były jednak nieistotne statystycznie. U obydwu odmian różnice polegały na spadku zawartości PA w stosunku do kontroli, w żadnym ze zbadanych obiektów nie zaobserwowano zwiększonej akumulacji PA w warunkach suszy glebowej.



Ryc. 38. AGI badanych poliamin w nasionach badanych odmian łubinu wąskolistnego. Kontrola była podlewana przez cały czas optymalnie (70% MWC), 3-tygodniową głęboką suszę (20% MWC) utrzymywano: (I) od początku kwitnienia, (II) od początku wypełniania nasion, (III) od początku zasychania nasion. Nasiona były zbierane po zakończeniu zasychania nasion, czyli w momencie zakończenia suszy (III). Różne litery wskazują statystycznie istotne różnice dla $p < 0,05$ wg testu Duncana (w obrębie odmiany), słupki błędów reprezentują błąd standardowy średniej

Analizując współczynnik AGI stwierdzono tendencje i istotności statystyczne bardzo podobne jak w przypadku sumy PA. Podobnie jak w poprzednich doświadczeniach, wynik ten świadczy przeciwko hipotetycznej roli PA jako długoterminowego magazynu i transportera związków azotu w komórce, brak zaś jakiegokolwiek akumulacji PA w warunkach suszy glebowej kwestionuje rolę PA jako znaczących osmoprotektantów.



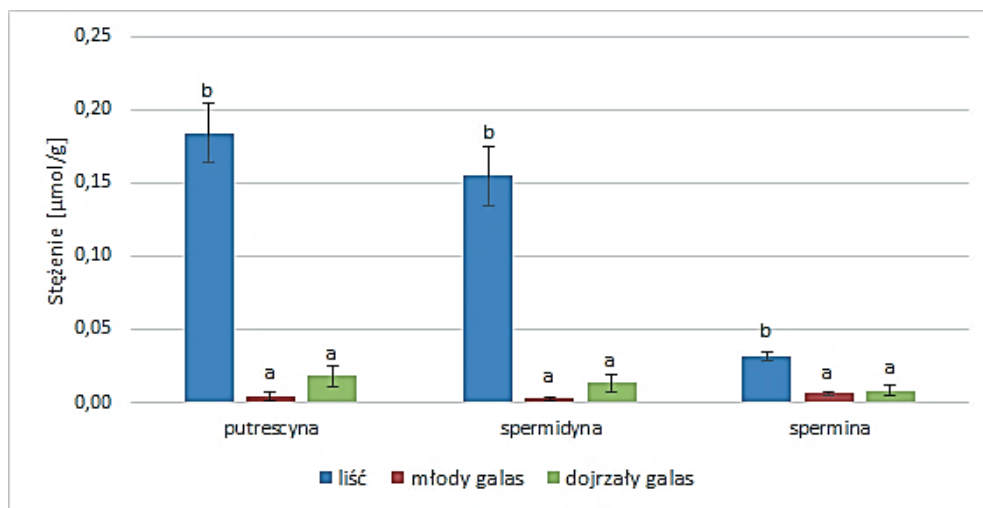
Ryc. 39. Stosunek stężenia putrescyny do sumy stężeń spermidyny i sperminy w nasionach badanych odmian łubinu wąskolistnego. Kontrola była podlewana przez cały czas optymalnie (70% MWC), 3-tygodniową głęboką suszę (20% MWC) utrzymywano: (I) od początku kwitnienia, (II) od początku wypełniania nasion, (III) od początku zasychania nasion. Nasiona były zbierane po zakończeniu zasychania nasion, czyli w momencie zakończenia suszy (III). Różne litery wskazują statystycznie istotne różnice dla $p < 0,05$ wg testu Duncana (w obrębie odmiany), słupki błędów reprezentują błąd standardowy średniej

Analiza stosunku stężenia putrescyny do sumy stężeń sperminy i spermidyny wskazuje na duże zróżnicowanie i wyraźny, powtarzalny dla obu odmian, trend. Stosunek ten był najmniejszy dla roślin kontrolnych, każde zaś traktowanie suszą spowodowało jego znaczące powiększenie, najbardziej dla II terminu suszy. Dla terminów I i III stosunek ten był mniejszy, ale nadal znacząco większy od kontroli. Fakt, że współczynnik ten najmniej różnił się od kontroli u roślin poddanych działaniu suszy w okresie kwitnienia wynika najprawdopodobniej z tego, iż susza na tym etapie rozwojowym dotyka głównie kwiaty, powodując zwiększoną ich aborcję, dostateczne zaś nawodnienie później, w czasie wypełniania nasion, skutkuje niewielkim wpływem suszy na skład nasion. Najsilniejszy wpływ suszy zaobserwowano gdy poddano jej działaniu rośliny w czasie wypełniania nasion, co potwierdza, że wpływ stresu na ich skład jest najsilniejszy, gdy działa on w czasie ich formowania. W trzecim terminie suszy, która działała na zasychające nasiona, wpływ ten był mniejszy, gdyż nasiono wchodząc w stan spoczynku znacząco zmniejsza dynamikę swoich procesów fizjologicznych, a fizjologiczny stan rośliny na której rosną nie wpływa na nie znacząco. Obserwowane zwiększenie zawartości putrescyny w stosunku do cięższych PA pozostaje w sprzeczności z opisywanymi w literaturze reakcjami (Franceschetti i in., 2004), gdzie w trakcie działania suszy zaobserwowano zmniejszenie tego stosunku. Wy tłumaczeniem może być fakt, że prezentowane tu obserwacje przeprowadzono na nasionach roślin strączkowych, inaczej niż w cytowanej pracy, gdzie materiałem były liście tytoniu. Nasiona roślin strączkowych w trakcie dojrzewania i zasychania pozostają w fizjologicznym stanie, gdzie zasuszenie jest wymagane dla dalszego rozwoju, podczas gdy wegetatywne części roślin np. liście muszą być chronione przed dalszą utratą wody, bowiem jest to dla nich letalne. Przebieg i znaczenie procesów utraty wody w liściach i nasionach bardzo się od siebie różnią.

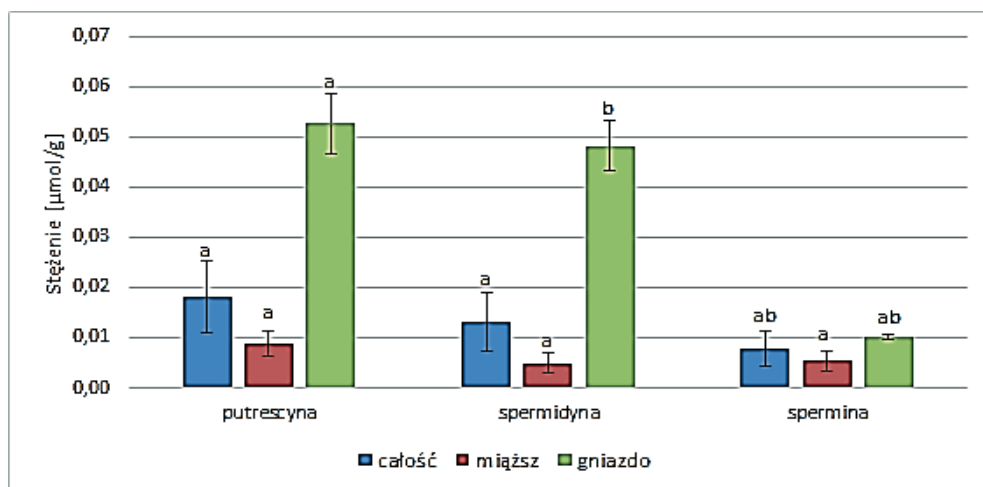
4.6. Zawartość poliamin w galasach

W opisanym doświadczeniu zbadano zawartość PA w różnych częściach galasów oraz w liściach dębu na których rosły.

Każda z trzech oznaczanych PA występowała w galasach w stężeniu dużo niższym niż w liściach, stężenie PA w galasach młodych nie różniło się statystycznie istotnie od stężenia w galasach dojrzałych, można jednak zauważyć tendencję, iż w galasach dojrzałych było nieznacznie więcej PA niż w młodych galasach.

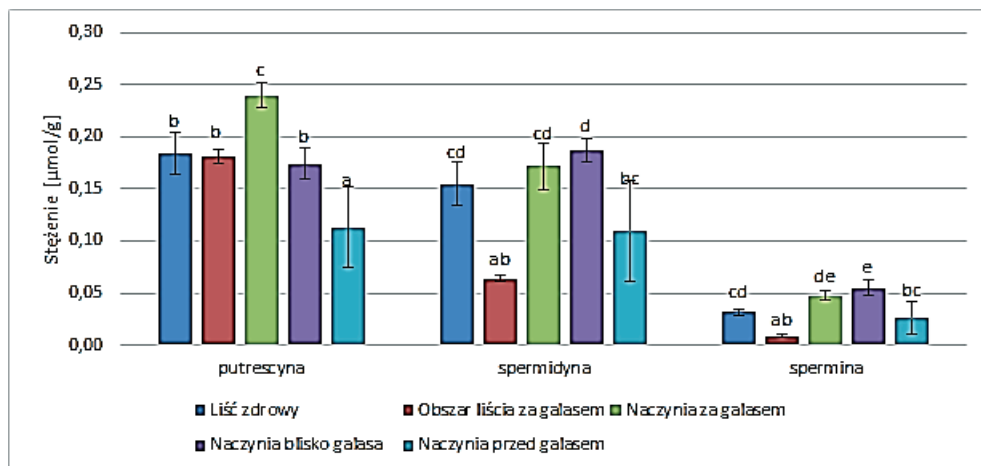


Ryc. 40. Zawartość poliamin w galasach w zależności od ich stopnia dojrzałości. Różne litery wskazują statystycznie istotne różnice dla $p < 0,05$ wg testu Duncana, słupki błędów reprezentują błąd standardowy średniej. Dla poszczególnych poliamin wykonano osobne analizy statystyczne



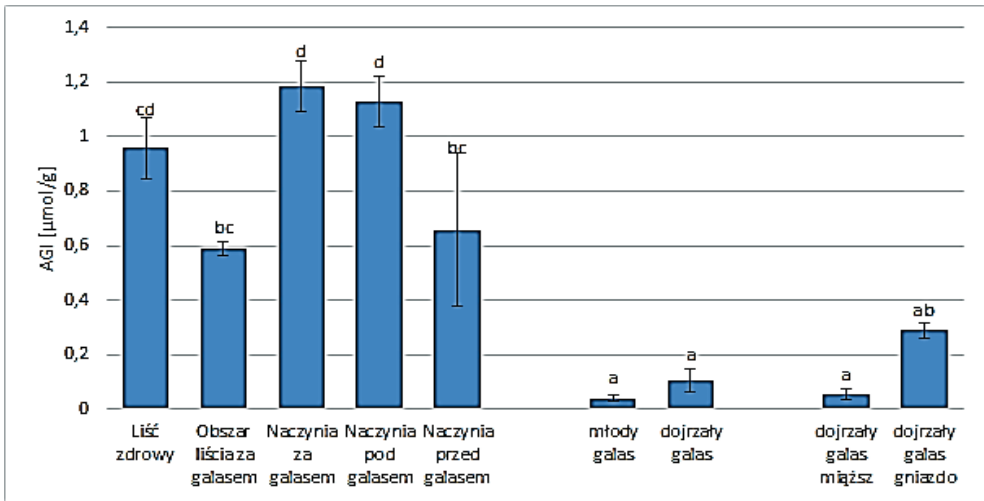
Ryc. 41. Zawartość poliamin w różnych częściach galasa. Różne litery wskazują statystycznie istotne różnice dla $p < 0,05$ wg testu Duncana, słupki błędów reprezentują błąd standardowy średniej. Dla poszczególnych poliamin wykonano osobne analizy statystyczne

Stężenia badanych PA nie różniły się istotnie między sobą, jednak można zauważyć tendencję, że w gnieździe było ich więcej niż w pozostałych częściach galasa.

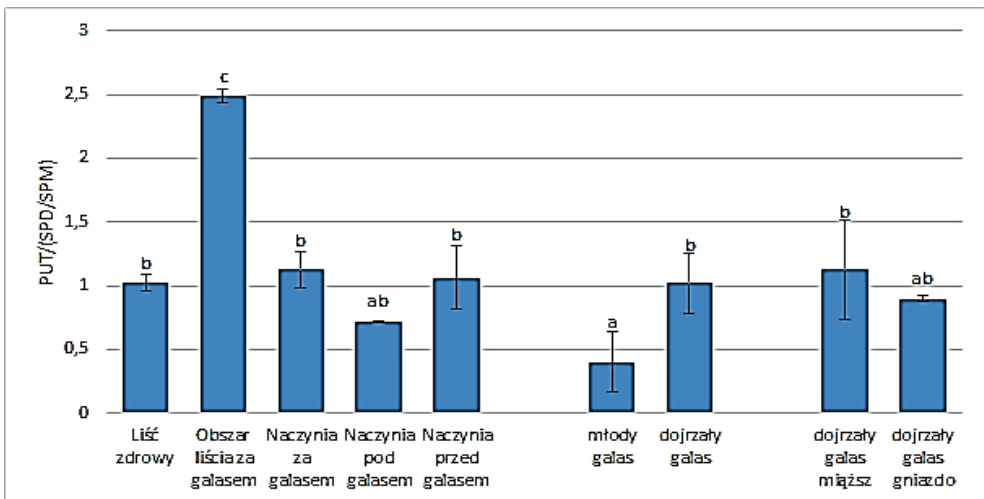


Ryc. 42. Zawartość poliamin w różnych częściach liścia względem rosnącego na nim galasa. Umieszczenie „za galasem” i „przed galasem” określone jest w stosunku do ogonka liściowego. Różne litery wskazują statystycznie istotne różnice dla $p < 0,05$ wg testu Duncana, słupki błędów reprezentują błąd standardowy średniej. Osobne analizy statystyczne wykonano dla poszczególnych poliamin

Stwierdzono, że w liściach na których rósł galas znajduje się więcej PA niż w zdrowych liściach. W obrębie liścia z galasem zaobserwowano istotne statystycznie zmniejszenie zawartości spermidyny i sperminy we fragmentach liści położonych za galasem (w stosunku do ogonka liściowego). Mniejsze stężenie PA zaobserwowano także w naczyniach przed galasem, dotyczyło ono putrescyny, spermidyny i sperminy. Możliwe jest, że zaobserwowane zmniejszenie zawartości PA w obszarach położonych dystalnie w stosunku do ogonka liściowego jest wynikiem potrzeb troficznych rosnącego na liściu galasa.



Ryc. 43. Indeks Grup Aminowych (AGI) w różnych częściach liścia i rosnącego na nim galasa. Wskaźnik wyliczony na podstawie stężeń putrescyny, spermidyny i sperminy. Różne litery wskazują statystycznie istotne różnice dla $p < 0,05$ wg testu Duncana, słupki błędów reprezentują błąd standardowy średniej. Dla wszystkich obiektów wykonano wspólną analizę statystyczną.



Ryc. 44. Stosunek stężeń putrescyny do sumy stężeń spermidyny i sperminy w różnych częściach liścia i rosnącego na nim galasa. Różne litery wskazują statystycznie istotne różnice dla $p < 0,05$ wg testu Duncana, słupki błędów reprezentują błąd standardowy średniej. Dla wszystkich obiektów wykonano wspólną analizę statystyczną.

Indeks Grup Aminowych przedstawia bardzo podobne tendencje co sumaryczna zawartość PA. Nie zaobserwowano różnic pomiędzy młodymi a dojrzałymi galasami, oraz pomiędzy miąższem, a gniazdem galasa.

Stosunek stężeń putrescyny do sumy stężeń spermidyny i sperminy najwyższy był w obszarze liścia za galasem, pozostałe części liścia nie różniły się statystycznie między sobą. Takie różnice najprawdopodobniej świadczą o zwiększonym tempie syntezy putrescyny, podczas gdy tempo syntezy spermidyny i sperminy nie rosło tak dynamicznie. W dojrzałym galasie współczynnik ten jest znacząco wyższy niż w młodym, w przypadku miąższu i gniazda galasa różnic nie stwierdzono.

5. Dyskusja

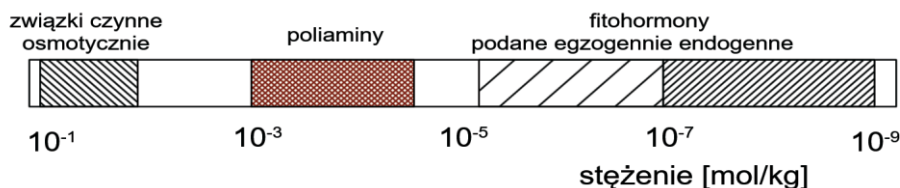
W momencie planowania doświadczeń do prezentowanej pracy, przyjęto założenia bazujące na teorii biologicznej roli PA jako biochemicznego przekaźnika sygnału suszy, oraz składnika układu osmotycznego dostosowania roślin (Bouchereau i in., 1999), (Kasinathan i Wingler, 2004). Jednak otrzymane wyniki świadczą o zupełnie innej roli PA, przynajmniej u roślin strączkowych.

Jednym z najważniejszych czynników, związanych z biologiczną rolą PA, jest stężenie i profil PA. Poziom stężen zmierzony w prezentowanych doświadczeniach (Ryc. 19, 21) porównywalny jest z danymi literaturowymi (Balestrasse i in., 2005), (López-Gómez i in., 2014) i wynosi do 1,2 mmol/kg suchej masy dla putrescyny i spermidyny, zaś poziom sperminy jest niższy, mieszcząc się w granicach 0,1 mmol/kg suchej masy (za wyjątkiem grochu, gdzie jest kilkukrotnie wyższy).

Jedną z postulowanych w literaturze funkcji, którą PA mogą pełnić u roślin w aspekcie tolerancji na stres środowiskowy, jest funkcja związku osmotycznie czynnego chroniącego przed nadmierną utratą wody. Osmolalność jest wielkością będącą skumulowanym efektem osmotycznym wywieranym przez każdy rozpuszczony w roztworze związek chemiczny. Na podstawie zmierzonych stężeń PA można bezpiecznie założyć, że skoro putrescyna, spermidyna i spermina są głównymi związkami należącymi do PA, to osmolalność pochodząca od PA nie przekracza 5 mOsm/kg. Jeśli o chodzi o inne związki chemiczne, to osmolalność samych soli mineralnych w roślinach jest rzędu 0,5 – 1 Osm/kg (Fricke i in., 1994). W organizmie rośliny obecnych jest wiele innych związków o takim charakterze, jak na przykład cukry rozpuszczalne, których osmolalność w roślinach tubinu wynosi około 0,2 Osm/kg (dane własne). Znając stężenia głównych związków osmotycznie czynnych, takich jak rozpuszczalne cukry, sole mineralne, czy wolne aminokwasy, możemy oszacować więc, że osmolalność roślin jest nie mniejsza od 1 Osm/kg i sięgać może zapewne kilku Osm/kg. Osmolalność pochodząca od PA, która wynosić może 0,005 Osm/kg, w porównaniu do tych wartości jest niewielka. Tak więc wkład PA w całkowitą osmolalność jest ponad 100 razy mniejszy od wkładu wnoszonego przez inne związki osmotycznie czynne, nie stanowią więc one istotnego wkładu w ciśnienie osmotyczne. Jest ono bowiem własnością koligatywną roztworów, czyli nie zależy od własności chemicznych substancji, a jedynie od ich stężenia, w najlepszym zatem wypadku PA zwiększą osmolalność o kilka procent. Aby więc wzrost stężenia PA spowodował znaczące zwiększenie osmolalności, musiałyby to być wzrost 100 – 1000-krotny. Tak wysoka akumulacja nie jest obserwowana (Li i in., 2015), (Xiong i in., 2010), (Yang i in., 2007), często wręcz obserwuje się spadek stężenia PA w trakcie stresu suszy, co niejednokrotnie zaobserwowano w wynikach analiz wykonanych przez autora w prezentowanej pracy (Ryc. 37) i wcześniejszych (Juzoń i in., 2017), (Marcińska i in., 2013).

Odrębną ewentualnością jest możliwość lokalnej, znacznie większej akumulacji PA w izolowanych miejscach w komórce np. w pobliżu błon lipidowych, albo w specyficznym miejscu w roślinie np. w osi zarodkowej (Lin i in., 1984). Tego rodzaju badania nie były jednak prowadzone w ramach prezentowanej pracy, trudno więc prowadzić dyskusję w tym kierunku.

Po omówieniu roli PA u roślin jako osmoprotektantów, kolejną hipotetyczną funkcją fizjologiczną wymagającą omówienia jest możliwość pełnienia przez PA roli fitohormonów. Jedną z charakterystycznych cech fitohormonów jest wykazywanie specyficznej aktywności biologicznej w niskim stężeniu, które, zależnie od rodzaju związku, gatunku rośliny i warunków wzrostu, mieści się najczęściej w zakresie dziesiątek, rzadziej setek nmol/dm^3 (Grzyb i in., 2017). Całkowite stężenie PA zawiera się pomiędzy 1 a 10 mmol/dm^3 , jest więc nawet milion razy większe. Należy oczywiście tutaj wspomnieć, że szereg fitohormonów ma bardzo szeroki zakres aktywności fizjologicznej, znacznie przewyższających poziom endogennej. Do takich hormonów można zaliczyć auksyny, w wysokich stężeniach używane jako herbicyd, czy kwas giberelinowy, wydzielany przez grzyba *Gibberella fujikuroi* w trakcie wzrostu na roślinie gospodarza, jednak zakres ich stężeń w przypadku produkcji endogennej w roślinie jest znacznie niższy.



Ryc. 45. Porównanie zakresów stężeń poliamin do związków osmotycznie czynnych i fitohormonów. Zakres stężeń związków osmotycznie czynnych oznacza stężenia dla których mają one istotny wkład w osmolarność. Rysunek autora

Według klasycznej definicji, fitohormony są to naturalnie występujące, organiczne substancje wpływające w niskich stężeniach na procesy fizjologiczne (Davies, 2010). Często do tej definicji dodaje się właściwość zapożyczoną z definicji hormonów u zwierząt, że są one transportowane w obrębie organizmu i po syntezie w jednej jego części, oddziałują na kompetentne komórki w innej części organizmu. Pozostaje kwestią dyskusyjną, czy obserwowane stężenia endogennych PA są „wystarczająco niskie”, jednak w przypadku PA należy także zwrócić uwagę, że według dostępnej literatury są one produkowane w praktycznie każdej komórce organizmu, jak również zdają się wykazywać aktywność biologiczną wobec wszystkich komórek. O ile więc transport na dalsze odległości jest możliwy, to jednak powszechność

ich występowania zdaje się wskazywać na sposób sygnalizacji parakrynej, lub autokrynej. W opinii autora tej pracy, PA należy więc wykluczyć z grupy „klasycznych” fitohormonów z uwagi na zbyt wysoką akumulację w roślinach, oraz brak wyraźnej specyficzności w zakresie miejsc syntezy i miejsc gdzie wywierają efekt biologiczny. Znany podręcznik poświęcony fitohormonom, *Plant Hormones* pod redakcją Petera J. Daviesa, został w swym najnowszym wydaniu (Revised 3rd edition z roku 2010) pozbawiony osobnego rozdziału poświęconego PA. O ile autorzy podręcznika tłumaczą swą decyzję niewielkim postępowaniem badań PA, to jednak przyczyną mogą być także rodzące się wątpliwości co do zasadności zaliczania PA do fitohormonów. Podsumowując, o ile PA mogą pełnić funkcje związków sygnałowych i regulacyjnych, to jednak nie spełniają ścisłej definicji fitohormonu. Podobny wniosek wyciągnęli również autorzy pracy przeglądowej (Evans i Malmberg, 1989).

Wiele interesujących wniosków można sformułować porównując stężenia poszczególnych PA w różnych organach roślinnych, oraz na różnych etapach rozwoju. Porównując stężenie PA w kwiatach i nasionach (Ryc. 20 i 22) okazuje się, iż jest ono mniej więcej podobne, z wyjątkiem grochu, gdzie jest większe w kwiatach, oraz soi, gdzie jest większe w nasionach. Dominującą PA jest spermidyna (Ryc. 23 i 24), co pozostaje w zgodności z danymi literaturowymi (Hamana i in., 2015), wyjątkiem są kwiaty łubinu żółtego gdzie było więcej putrescyny.

Sumaryczna zawartość PA w nasionach badanych roślin strączkowych spada w trakcie ich dojrzewania. Zwraca też uwagę większa niż w pozostałym materiale zawartość kadaweryny w nasionach, szczególnie w soi. Wynik ten koresponduje z literaturą (Lin i in., 1984), gdzie zawartość kadaweryny w osi zarodkowej u soi była większa od innych PA. Należy zaznaczyć, że w prowadząc przedstawione tu doświadczenia mierzono zawartość PA w całych nasionach, gdzie oś zarodkowa stanowi drobny ułamek masy całego nasiona (ok. 2%), tak więc dużo wyższa zawartość kadaweryny w osi zarodkowej przełożyła się na mniejszą, jednak wciąż znaczącą, bo kilkuprocentową w puli PA zawartość tego związku.

Zawartość putrescyny w nasionach wykazuje tendencję spadkową w miarę dojrzewania nasion (Ryc. 25), za wyjątkiem łubinu białego odmiany Boros, oraz soi odmiany Augusta. Podobnie zawartość spermidyny ulega zmniejszeniu (Ryc. 26), za wyjątkiem grochu odmiany Cysterski, oraz soi odmiany Augusta. Zawartość sperminy nie wykazuje ogólnej tendencji spadkowej pośród większości badanych odmian (Ryc. 27), gdzie wyjątkiem jest łubin żółty obydwu badanych odmian (Lord i Parys), oraz soja, u której uwidoczniła się wyraźna tendencja wzrostowa zawartości. Analizując dynamikę sumarycznej zawartości PA w trakcie dojrzewania nasion (Ryc. 28), to u badanych odmian grochu tendencja wzrostowa nie jest wyraźna, jednak zawartość stwierdzona w ostatnim stadium dojrzałości (IV) jest znacząco statystycznie niższa niż we wcześniejszych stadiach. U wszystkich badanych łubinów zaznaczyła się wyraźna tendencja spadkowa w miarę dojrzewania nasion. U soi zaś nie wystąpiły zmiany stężenia, za wyjątkiem stadium III z większą niż w innych

stadiach sumaryczną zawartością PA. Wyliczone wartości współczynnika AGI (Ryc. 29) przedstawiają bardzo podobne tendencje zmian jak sumaryczna zawartość PA. Zupełnie odmiennie wygląda zróżnicowanie stosunku stężeń putrescyny do sumy stężeń spermidyny i sperminy (PUT/SPD+SPM), gdzie u grochu i łubinu białego zmiany te nie były istotne statystycznie, natomiast u łubinu wąskolistnego i żółtego oraz soi współczynnik ten w stadium IV przyjmował najniższe wartości (Ryc. 30). Szczególnie widoczne jest to u łubinu wąskolistnego, gdzie stosunek ten uległ bardzo dużemu obniżeniu. Zaobserwowane zmiany wynikają zapewne ze zmniejszającej się aktywności podziałowej komórek w miarę dojrzewania nasion, tkanka nie tylko zaprzestaje podziałów komórkowych, ale także znacząco traci wodę (Peske i in., 2004), co prowadzi także do obniżenia aktywności metabolicznej. Obniżenie się wartości współczynnika PUT/SPD+SPM także związane jest ze zmniejszającą się aktywnością mitotyczną (Papadakis i in., 2005). Zmiany te są zapewne skutkiem przygotowania nasion do okresu spoczynku.

Zmniejszanie się zawartości PA w trakcie dojrzewania nasion, wyrażone poprzez obniżającą się sumaryczną zawartość PA, oraz obniżający się współczynnik AGI prowadzą także do konkluzji, że PA nie pełnią w badanych roślinach strączkowych istotnej funkcji osmoprotekcyjnej, skoro w warunkach bardzo dużej utraty wody ich zawartość maleje. Oczywiście, można argumentować, że w warunkach fizjologicznego dojrzewania nasion taka ochrona nie jest potrzebna i rolę taką pełnią inne związki, jednak gdyby PA stanowiły w roślinach istotny element ochrony przed skutkami utraty wody, wtedy ich akumulacja w dojrzewających nasionach byłaby zapewne obserwowana. Można też zadać pytanie, czy w trakcie przechodzenia w okres spoczynku, nasiono istotnie potrzebuje zwiększać stężenie osmoprotektantów. Jest to alternatywne wyjaśnienie obserwowanego zjawiska, jednak brak akumulacji PA w trakcie suszy glebowej w kolejnym doświadczeniu nie jest przesłanką ku takiemu wyjaśnieniu. Jednoczesny spadek współczynników AGI, sumy PA, oraz put/spd+spm nie potwierdza roli osmotycznej PA. Najbardziej prawdopodobną przyczyną jest wycofywanie azotu zawartego w PA do innych związków, przede wszystkim białek, które pełnią w nasionach badanych roślin funkcje zapasowe i których zawartość może sięgać 30% suchej masy w przypadku soi i łubinów, stąd zapotrzebowanie na azot w czasie dojrzewania nasion roślin strączkowych jest wysokie.

Wykonano eksperyment polegający na zbadaniu wpływu suszy glebowej na zawartość PA w nasionach łubinu wąskolistnego (rozdział 4.5). U jednej z odmian (Regent) stwierdzono istotne różnice w stosunku do kontroli, jednak był to w każdym przypadku spadek stężenia sumy PA (Ryc. 37). U drugiej odmiany (Graf) stwierdzono brak różnic. Wyniki te potwierdzają, że susza glebowa nie powoduje w długiej perspektywie akumulacji PA, zatem nie pełnią one znaczącej roli osmoprotekcyjnej. Gdy jednak wziąć pod uwagę stosunek PUT/(SPD+SPM), okaże się, że

był on najmniejszy dla kontroli, znacząco większy w pierwszym terminie traktowania suszą, największy w drugim terminie, w trzecim zaś nieznacznie mniejszy niż w drugim. Świadczy to o przesunięciu równowagi w stronę produkcji putrescyny i zahamowaniu jej zużycia dla potrzeb produkcji spermidyny i sperminy, co nie jest powszechnie opisywanym efektem, najczęściej bowiem obserwuje się w warunkach stresu osmotycznego przesunięcie równowagi w stronę syntezy cięższych PA (Legocka i Kluk, 2005). Efekt przesunięcia równowagi w stronę putrescyny może wynikać ze współzawodnictwa o SAM niezbędną do syntezy zarówno spermidyny i sperminy, jak i etylenu. Etylen zaś produkowany jest w dojrzewających nasionach (Yang i Hoffman, 1984), zaznaczyć jednak należy, że rola pełniona przez etylen w czasie stresu suszy nie jest ani dobrze poznana, ani jednoznaczna. O ile często obserwowana jest inhibicja produkcji etylenu przez ABA, to jednak niektórzy autorzy opisują wzrost syntezy etylenu w warunkach stresu suszy (Arraes i in., 2015).

Szereg autorów opisuje udział PA w kwitnieniu roślin dokumentując go zaburzeniami procesów kwitnienia u mutantów z uszkodzonymi szlakami syntezy PA, bądź po zastosowaniu inhibitorów syntezy PA (Casas i in., 1990). W opisanych w niniejszej pracy doświadczeniach nie stwierdzono zmian w zawartości PA w kwiatach po ich otwarciu, jak również w obrębie wszystkich wyliczonych współczynników. Prawdopodobna wydaje się interpretacja, iż PA biorą udział w kwitnieniu przede wszystkim jako stymulator podziałów komórkowych i procesów rozwojowych, bez specyficznego wpływu regulacyjnego na procesy kwitnienia, co pozostaje w zgodności z wynikami doświadczeń opisywanych w literaturze. Można przywołać tutaj sformułowaną wcześniej hipotezę, że PA stanowią rezerwuar azotu zdolny do szybkiego uruchomienia w razie potrzeby (dobrą analogią jest rola glikogenu u człowieka, który jest rezerwuarem glukozy gotowym do bardzo szybkiej mobilizacji).

Ciekawym zjawiskiem spotykanym także u roślin strączkowych jest zjawisko aborcji kwiatów, polegające na odrzucaniu przez roślinę części kwiatów, zjawisko to spowodowane może być m.in. przez niedobór asymilatów (Arathi, 2011). Zaprojektowano doświadczenie mające wykazać, czy zawartość PA zmienia się w trakcie tych procesów. Główną tezę postawioną w tym doświadczeniu było, iż kwiaty które zostaną przez roślinę odrzucone będą charakteryzować się zmniejszoną zawartością PA spowodowaną przez obniżenie intensywności procesów rozwojowych. Stymulowano tu aborcję kwiatów poprzez usuwanie części powierzchni asymilacyjnej, odwrotny zaś efekt uzyskano usuwając część pąków kwiatowych. Uzyskano w pierwszym przypadku kwiaty, które w razie dalszego rozwoju na roślinie uległyby aborcji, oraz w drugim przypadku takie, które pozostałyby na roślinie. Porównywano między sobą te kwiaty, bez zastosowania obiektu kontrolnego, bowiem losowy charakter aborcji uniemożliwiłyby jasne określenie dalszych losów kwiatów rosnących na roślinach nie poddanych żadnemu zabiegowi. Zaobserwowano, że u każdego z bada-

nych gatunków, w jednym z badanych terminów, kwiaty mające odpaść (czyli rosnące na roślinach z usuniętą częścią powierzchni asymilacyjnej) miały większą zawartość PA od kwiatów mających pozostać na roślinie (rosnące na roślinie z usuniętą częścią kwiatów), najwyższa zaś zawartość PA była obserwowana w kwiatach roślin gdzie usunięto jeszcze większą powierzchnię asymilacyjną, a więc zarówno kwiaty, jak i pędy boczne. Interesujące jest, iż zależność tę zaobserwowano u grochu w drugim terminie, u łubinów zaś w trzecim.

Większa zawartość PA w kwiatach mających odpaść jest zaskakująca w świetle teorii o podstawowej roli PA jako stabilizatorów stabilności DNA, czy związków sygnalizacyjnych, bowiem tkanki o niskiej aktywności podziałowej zawierają mało PA, podczas gdy w tych kwiatach stwierdzono znacząco więcej PA niż w kwiatach które mają pozostać na roślinie. Powszechnie akceptowaną przyczyną aborcji kwiatów u bobowatych (*Fabaceae* Lindl.) jest niedobór asymilatów (Arathi, 2011), jednak molekularne podstawy przebiegu tego zjawiska nie są jasne. Jedną z możliwości jest apoptoza, bądź inne drogi Programowanej Śmierci Komórki (PCD, ang. *Programmed Cell Death*), jednak dowody są bardzo skąpe (Rogers, 2006). Co więcej, udokumentowane związki między apoptozą a PA u roślin są również bardzo nieliczne (Moschou i Roubelakis-Angelakis, 2014), znacząco więcej powiązań między PA a apoptozą wykazano u zwierząt. Związki pomiędzy PA a apoptozą są niejasne, część doniesień wskazuje na możliwość udziału PA w tych procesach, jednak dobrze udokumentowana obfitość PA w tkankach młodych, o dużej aktywności podziałowej, pozostaje w sprzeczności z postulowanym związkiem z procesami apoptozy. Z drugiej jednak strony wiele substancji biologicznie aktywnych całkowicie zmienia aktywność w zależności od ich stężenia, czasu aplikacji, bądź na skutek interakcji z innymi substancjami. Analiza stosunku stężenia putrescyny do cięższych PA (Ryc. 35) pokazuje, że również dla tego wskaźnika, w większości przypadków zaobserwowano względnie najwyższą zawartość putrescyny w kwiatach które miały odpaść. Powiększenie stosunku putrescyny do innych PA jest także uznawane za charakterystyczne dla tkanek młodych, dzielących się (Pérez-amador i Carbonell, 1995), (Papadakis i in., 2005).

Wróćmy do zaskakującej zależności, gdzie zawartość PA w kwiatach roślin z usuniętymi liśćmi raz jest większa, a raz mniejsza (zależnie od terminu pomiaru) w porównaniu do zawartości PA w roślinach z usuniętymi liśćmi i pędami bocznymi. Warto zwrócić uwagę, że o ile zależność ta wydaje się być na pierwszy rzut oka losowa, to jednak zawartość PA w kwiatach roślin z usuniętymi liśćmi jest zawsze mniejsza niż w kwiatach roślin z usuniętymi liśćmi i pędami bocznymi. Zjawisko to można wytłumaczyć wspomnianym wcześniej wpływem architektury rośliny z rozgałęzieniami bocznymi, bowiem rozgałęzienia te, mogą raz być donorem (gdy mają relatywnie dużą powierzchnię liści), a raz akceptorem (gdy w fazie szybkiego wzrostu mają względnie małą powierzchnię liści) asymilatów, stąd pozornie losowy efekt

ich obecności. Bowiern w przypadku dużej dostępności asymilatów roślina syntetyzuje w dużej ilości związki zawierające azot, takie jak białka, czy alkaloidy, to dla PA może wtedy brakować azotu, który nie jest dostarczany przez procesy fotosyntezy. Skoro więc azot nie jest pobierany z użyciem liści, to w warunkach dużej ich powierzchni może dochodzić do jego niedoborów, a wtedy nie tylko, że PA nie mogą być syntetyzowane, a będą wręcz zużywane dla odzyskania zawartego w nich azotu i wykorzystania do syntezy innych związków.

Podsumowując, kompleksowym wyjaśnieniem wyników doświadczeń przeprowadzonych na roślinach strączkowych jest przyjęcie roli PA jako rezerwuaru związków azotowych celem ich szybkiej mobilizacji. Oczywiście nie wyklucza to pełnienia jednocześnie roli stabilizacyjnej dla struktur komórkowych, osmoprotekcyjnej, zwłaszcza w specyficznych miejscach organizmu rośliny, czy roli sygnalizacyjnej.

Zbadano także zawartość PA w galasach dębowych. Galasy są ciekawym modelem badawczym, gdzie obserwuje się silny wzrost tkanek, który przebiega jednak zupełnie odmiennie niż w tkankach w których galas został zaindukowany (Jankiewicz i in., 2017), w szczególności komórki galasa są o wiele większe niż komórki liścia, na którym galas ten zastał zaindukowany, zawierają też więcej wody. W przeprowadzonych wcześniej przez autora badaniach wykazano, iż w galasach znajduje się dużo mniej fitohormonów o działaniu indukującym wzrost niż w liściach na których te galasy rosły. Wśród badanych fitohormonów znalazły się kwas indoliloocetowy, kwas indolilomasłowy, oraz cytokiny: cis i trans zeatyna, kinetyna, ich rybozydy, izopentenyladenina, oraz orto- i metatopolina. Spodziewano się, że gwałtowny wzrost galasa będzie spowodowany podwyższonym stężeniem jednego z fitohormonów o charakterze stymulatorów wzrostu, podobnie jak w pracach innych autorów (Yamaguchi i in., 2012), (Tooker i Helms, 2014), jednak wśród badanych związków takiego efektu nie zaobserwowano. Zdecydowano się na analizę PA, celem rozszerzenia spektrum badanych związków, bowiem PA znane są z występowania w tkankach o nasilonej aktywności mitotycznej. Podobnie jak w przypadku fitohormonów, w tkankach galasów zaobserwowano dużo mniejszą zawartość PA w porównaniu do liścia. Wynik ten świadczyć może, że PA nie pełnią żadnej aktywnej roli w fizjologii galasów. Co ciekawe, w młodych, rozwijających się galasach PA jest mniej niż w galasach dojrzałych, czyli tkanka rozwijająca się zawiera ich mniej od tkanki przygotowującej się do spoczynku. Prawdopodobnym wydaje się, iż galasy mogą się charakteryzować odrębnym od innych tkanek roślinnych wzorcem stymulacji hormonalnej. Nie można także wykluczyć podwyższonego stężenia PA w galasach, jednak musiałyby to być rzadziej spotykane PA, można jednak wykluczyć termosperminę, której udział w fizjologii roślin jest ostatnio szeroko omawiany. W przypadku bowiem dansylowanych próbek jest ona nierozróżnialna od sperminy (Takano i in., 2012), w otrzymanych zaś wynikach, gdzie posłużono się

dansylacją, nie stwierdzono podwyższonego stężenia sperminy, a więc także i termosperminy.

Jeżeli porównamy rozmieszczenie PA w obrębie galasa (Ryc. 41), to najmniejsza zawartość zmierzona została w miąższu, który generalnie jest ubogi w substancje biologicznie ważne. Nieznacznie wyższą zawartość PA zaobserwowano w zewnętrznych tkankach galasa, związane jest to zapewne z wystawieniem na czynniki środowiskowe, jest to tkanka zielona gdzie odbywa się fotosynteza, PA mogą zapobiegać oksydacyjnym uszkodzeniom aparatu fotosyntetycznego (Navakoudis i in., 2003). Najwięcej zaś PA zlokalizowanych jest w centralnej części, w tzw. gnieździe, gdzie rozwija się larwa owada. Takie rozmieszczenie może wynikać z faktu iż larwa jest konsumentem substancji transportowanych do galasa i transportowane tam PA mogą stanowić łatwo przyswajalne źródło azotu (Bagni i in., 1978), (Moschou i in., 2012), należy pamiętać, że jedynym celem istnienia galasa jest zapewnienie schronienia i wyżywienia znajdującej się w środku larwie owada, temu służy zarówno specyficzna anatomia, jak i biochemia galasa.

Wyniki analizy zawartości PA w różnych częściach liścia względem miejsca przyczepienia galasa (Ryc. 40) są szczególnie interesujące. Wśród obszarów liścia, gdzie zmierzono zawartość PA, zwraca uwagę znacząco zmniejszona zawartość sperminy i spermidyny, zawartość zaś putrescyny jest zwiększona. Efektem tego jest ponad dwukrotnie powiększony stosunek stężeń putrescyny do sumy stężeń spermidyny i sperminy (Ryc. 44) w obszarze liścia za galasem. Podniesienie tego stosunku może być efektem intensywnych procesów wzrostowych i rozwojowych (Shen i Galston, 1985), jednak w pełni rozwinięty, dojrzały liść ma tę fazę rozwoju za sobą. Rosnący na liściu galas jest silnym akceptorem metabolitów (ang. *sink*) (Larson i Whitham, 1991), gdzie obserwuje się zubażanie otaczających go tkanek z produktów asymilacji, tak więc obserwowane zmniejszenie stężenia PA w tkankach liścia leżących dalej od ogonka liściowego niż galas może być tłumaczone tym procesem, przy założeniu, że następuje pobieranie PA w charakterze źródła azotu i/lub węgla. W świetle tej teorii problematyczne wydaje się wybiórcze zużywanie sperminy i spermidyny przez galas, bowiem dostępne źródła (Bagni i in., 1978) wskazują, że to głównie putrescyna może być użyta w tym charakterze, spermina i spermidyna nie. Warto zwrócić uwagę, że jednak praca ta była prowadzona w warunkach *in vitro* i dotyczyła eksplantatów bulw topinambura (*Helianthus tuberosus* L.), których fizjologia bez wątpienia odbiega od galasa i żyjącej w nim larwy owada. Nie mniej jednak rozstrzygnięcie tej kwestii wymaga dalszych badań.

Podstawowym wnioskiem wynikającym z przeprowadzonych eksperymentów jest, jak wcześniej wspomniano, postulowana podstawowa rola PA jako rezerwuaru azotu zdolnego do szybkiej mobilizacji. W przypadku potrzeby akumulacji azotu do celów zapasowych na dłuższy czas np. w nasionach, u roślin strączkowych następuje prawdopodobnie przesunięcie azotu do białek.

Wydaje się także prawdopodobna rola PA w transporcie azotu na dalsze odległości, zwłaszcza w tak specyficznym przypadku jak galasy. Jest to jednak wciąż teza kontrowersyjna i wymaga dalszych, szczegółowych badań.

Zakwestionowano rolę PA jako ważnego osmoprotektanta w skali całego organizmu rośliny. Możliwym jest, że PA pełnią tę rolę w ograniczonym czasie, jako jeden z wielu związków osmotycznie czynnych, oraz w konkretnych częściach i organach rośliny np. w osi zarodka. Zaznaczyć należy, iż powyższe wnioski odnoszą się specyficznie do badanych roślin z grupy bobowatych, zupełnie prawdopodobne jest, że u innych grup roślin pełniona rola jest inna. Wyniki (Legocka i Kluk, 2005) sugerują, iż PA mogą odgrywać rolę ochronną w czasie działania stresu osmotycznego, jednak jest to reakcja szybko się pojawiająca, bo akumulację PA obserwowano już w 4h od wystąpienia stresu, i szybko zastępowana przez inne mechanizmy, gdyż po 24h akumulacja ta nie była już tak duża. Prezentowane w tej pracy eksperymenty były prowadzone w o wiele dłuższych skalach czasowych, susza glebowa trwała bowiem 3 tygodnie, tak więc akumulacji PA nie zaobserwowano.

Nie należy także zapomnieć o możliwości, iż powyższe wyniki są charakterystyczne, wręcz unikalne dla wielkonasiennych strączkowych, do których zaliczają się wszystkie (za wyjątkiem doświadczeń na galasach) badane tu gatunki. Kład roślin nasiennych jest niezwykle zróżnicowany, typowa zaś dla roślin mnogość reakcji związanych ze związkami metabolizmu wtórnego czyni tę biochemiczną różnorodność wyjątkową w porównaniu do innych grup organizmów.

Przeprowadzane przez wielu badaczy eksperymenty potwierdzają obecność PA w młodych tkankach o wysokiej aktywności mitotycznej. Nie jest jasna rola jaką PA mogą pełnić w tych tkankach, prawdopodobnie rola ta związana jest ze zdolnością PA do wiązania się z DNA, gdzie mogą pełnić funkcję komplementarną do białek histonowych.

Zastanawia brak akumulacji PA w warunkach długotrwałej suszy glebowej, podczas gdy istnieje wiele publikacji naukowych opisujących to zjawisko w krótkiej skali czasowej. Rozwiązaniem tego dylematu może być przyjęcie tezy, że biologiczna rola PA u organizmów żywych podlegała ewolucji w trakcie rozwoju życia na Ziemi. Analiza roli pełnionej przez PA w fizjologii roślin strączkowych pozwala na nakreślenie możliwej ewolucji tych funkcji, gdzie pierwszą byłaby powszechna w świecie żywym rola ochrony DNA przed uszkodzeniami. Późniejszą, w rozumieniu ewolucyjnym byłaby funkcja wiązania wody w czasie stresu suszy, co jest obserwowane u szeregu roślin. Znaczącym wyjątkiem są rośliny strączkowe, gdzie zapotrzebowanie na azot spowodowane jego akumulacją w białkach zapasowych w trakcie dojrzewania nasion skutkuje brakiem takiej reakcji na stres suszy. U tych roślin PA pełnią rolę związków zapasowych do szybkiego wykorzystania azotu. Ostatnią możliwą funkcją jest rola związków sygnałowych, gdyż każdy związek, którego stężenie zmienia się pod wpływem bodźców zewnętrznych, może pełnić rolę

sygnalizatora wystąpienia danego bodźca. Ten kierunek badań wymaga jednak odrębnych, szczegółowych badań obejmujących m.in. potencjalne receptory białkowe i szczegóły wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału.

Tak więc, jeśli chodzi o badania nad PA istnieje wiele obszarów badań, które będą prowadzone w przyszłości. O ile bowiem wiele już wiadomo, to o wiele więcej jeszcze faktów czeka na swoich odkrywców.

6. PODSUMOWANIE

W prezentowanej pracy przedstawiono i przedyskutowano obecność oraz potencjalne funkcje pełnione przez poliaminy (PA) u roślin strączkowych w trakcie formowania i rozwoju organów generatywnych, oraz w odrębnym modelu badawczym, jakim są galasy. W świetle prezentowanych wyników główną hipotezą biologicznej roli PA w warunkach polowych, jest ich powiązanie z procesami rozwoju i wzrostu w młodych organach roślinnych. Rola ta polega na krótkotrwałym przechowywaniu i dostarczaniu azotu do miejsc, gdzie jest on potrzebny np. w nasionach w trakcie ich dojrzewania, o czym świadczy zmniejszająca się zawartość PA w trakcie tego procesu, a pochodzący z PA azot deponowany jest w białkach zapasowych.

Z uwagi na brak akumulacji PA u roślin poddanych działaniu stresu suszy glebowej teza, że PA pełnią rolę systemowego osmoprotektanta nie jest bardzo prawdopodobna. W świetle wszystkich przedstawionych wyników trudno jest więc rozstrzygnąć, czy PA pełnią istotną rolę w procesach ochrony roślin strączkowych przed stresami środowiskowymi, zwłaszcza przed stresem suszy. Zdaniem autora pracy ten aspekt biologicznej roli PA jest mniej istotny, przynajmniej u roślin strączkowych, zaś opisywane w literaturze zmiany w stężeniach PA w trakcie działania stresu u tych roślin nie wynikają z pełnionej przez nie roli ochronnej, tylko są skutkiem wywołanych przez stres zmian w równowadze związków azotowych.

Jeżeli chodzi o ocenę zastosowanych w pracy współczynników: AGI i stosunku stężeń putrescyny do sumy stężeń spermidyny i sperminy, ten pierwszy, zorientowany na oszacowanie sumarycznych właściwości osmotycznych PA, analizowany w połączeniu z całkowitą zawartością PA, pozwala na badania procesów związanych z akumulacją azotu w PA. Natomiast stosunek stężeń putrescyny do sumy stężeń spermidyny i sperminy, pokazuje interesujące zależności związane z fizjologiczną dojrzałością badanej tkanki, gdyż jego wartość jest najwyższa u tkanek młodych, intensywnie dzielących się, zaś w miarę dojrzewania tkanki wartość ta spada.

Analiza roli pełnionej przez PA w fizjologii roślin strączkowych pozwala na nakreślenie możliwej ewolucji tych funkcji, począwszy prawdopodobnie od ochrony DNA przed uszkodzeniami, poprzez funkcje osmoprotekcyjne, następnie funkcję magazynu azotu, na funkcjach sygnalizacyjnych skończywszy. W różnych roślinach funkcje te mogą być pełnione równocześnie.

8. BIBLIOGRAFIA

- ACOSTA, C., PÉREZ-AMADOR, M.A., CARBONELL, J., GRANELL, A., 2005. The two ways to produce putrescine in tomato are cell-specific during normal development. *Plant Sci.* 168, 1053–1057. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.12.006>
- AGOSTINO, I.B.D., DERUE, J., KIEBER, J.J., CAROLINA, N., HILL, C., D, N.C.J., 2000. Characterization of the Response of the Arabidopsis Response Regulator Gene Family to Cytokinin. *Plant Physiol.* 124, 1706–1717.
- ARATHI, H.S., 2011. Selective embryo abortion in a perennial tree-legume: A case for maternal advantage of reduced seed number per fruit. *J. Plant Res.* 124, 675–681. <https://doi.org/10.1007/s10265-010-0400-z>
- ARNAO, M.B., HERNÁNDEZ-RUIZ, J., 2006. The physiological function of melatonin in plants. *Plant Signal. Behav.* 1, 88–95. <https://doi.org/10.4161/psb.1.3.2640>
- ARRAES, F.B.M., BENEVENTI, M.A., LISEI DE SA, M.E., PAIXAO, J.F.R., ALBUQUERQUE, E.V.S., MARIN, S.R.R., PURGATTO, E., NEPOMUCENO, A.L., GROSSI-DE-SA, M.F., 2015. Implications of ethylene biosynthesis and signaling in soybean drought stress tolerance. *BMC Plant Biol.* 15, 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0597-z>
- ASTHIR, B., DUFFUS, C.M., SPOOR, W., 2004. Correlation of gibberellin-induced growth, polyamine levels and amine oxidases in epicotyl, root and leaf blade of barley seedlings. *Plant Growth Regul.* 42, 193–201. <https://doi.org/10.1023/B:GROW.0000026546.38671.1e>
- BAGNI, N., CALZONI, G.L., SPERANZA, A., 1978. Polyamines as sole nitrogen source for *Halianthus tuberosus* explants in vitro. *New Phytol.* 80, 317–323.
- BALESTRASSE, K.B., GALLEGRO, S.M., BENAVIDES, M.P., TOMARO, M.L., 2005. Polyamines and proline are affected by cadmium stress in nodules and roots of soybean plants. *Plant Soil* 270, 343–353. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-1792-0>
- BALLAS, S., MOHANDAS, N., 1983. Stabilization of erythrocyte membranes by polyamines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 1942–1946. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.7.1942>
- BASU, H.S., FEUERSTEIN, B.G., ZARLING, D.A., SHAFER, R.H., MARTON, L.J., 1988. Recognition of z-rna and z-dna determinants by polyamines in solution: Experimental and theoretical studies. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 6, 299–309. <https://doi.org/10.1080/07391102.1988.10507714>
- BESFORD, R.T., RICHARDSON, C.M., CAMPOS, J.L., TIBURCIO, A.F., 1993. Effect of polyamines on stabilization of molecular complexes in thylakoid membranes of osmotically stressed oat leaves. *Planta* 189, 201–206. <https://doi.org/10.1007/BF00195077>

- BIGNON, E., CHAN, C.H., MORELL, C., MONARI, A., RAVANAT, J.L., DUMONT, E., 2017. Molecular Dynamics Insights into Polyamine–DNA Binding Modes: Implications for Cross-Link Selectivity. *Chem. - A Eur. J.* 23, 12845–12852. <https://doi.org/10.1002/chem.201702065>
- BOUCHEREAU, A., AZIZ, A., LARHER, F., MARTIN-TANGUY, J., 1999. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci.* 140, 103–125.
- BRANZEI, D., FOIANI, M., 2009. The checkpoint response to replication stress. *DNA Repair (Amst.)* 8, 1038–1046. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.04.014>
- BRATTON, D.L., 1994. Polyamine inhibition of transbilayer movement of plasma membrane phospholipids in the erythrocyte ghost. *J. Biol. Chem.* 269, 22517–22523.
- BRYCKI, B., KOWALCZYK, I., WERNER, J., POSPIESZNY, T., KOZIROG, A., 2017. Synthesis and Structural Analysis of Novel Norspermidine Derivatives. *Int. J. Org. Chem.* 07, 106–139. <https://doi.org/10.4236/ijoc.2017.72010>
- CASAS, J.L., ACOSTA, M., DEL RIO, J.A., SABATER, F., 1990. Ethylene evolution during ripening of detached tomato fruit: Its relation with polyamine metabolism. *Plant Growth Regul.* 9, 89–96. <https://doi.org/10.1007/BF00027436>
- ÇAVUŞOĞLU, K., KILIÇ, S., KABAR, K., 2008. Effects of some plant growth regulators on stem anatomy of radish seedlings grown under saline (NaCl) conditions. *Plant, Soil Environ.* 54, 428–433.
- CHEN, D., SHAO, Q., YIN, L., YOUNIS, A., ZHENG, B., 2019. Polyamine Function in Plants: Metabolism, Regulation on Development, and Roles in Abiotic Stress Responses. *Front. Plant Sci.* 9, 1945. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01945>
- CHILDS, A.C., MEHTA, D.J., GERNER, E.W., 2003. Polyamine-dependent gene expression. *Cell. Mol. Life Sci.* <https://doi.org/10.1007/s00018-003-2332-4>
- COHEN, S.S., 1971. Introduction to the polyamines. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.12.009>
- COSTA, M.P., RODRIGUES, B.L., FRASAO, B.S., CONTE-JUNIOR, C.A., 2018. Biogenic Amines as Food Quality Index and Chemical Risk for Human Consumption, w: Handbook of Food Bioengineering. ss. 75–108.
- DAVIES, P.J., 2010. The plant hormones: their nature, occurrence and function., w: Davies, P.J. (Red.), *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Springer, Dordrecht, ss. 1–15.
- DEMETRIOU, G., NEONAKI, C., NAVAKOUDIS, E., KOTZABASIS, K., 2007. Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus-The protective role of polyamines. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1767, 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.02.020>

- EISENBERG, T., KNAUER, H., SCHAUER, A., BÜTTNER, S., RUCKENSTUHL, C., CARMONA-GUTIERREZ, D., RING, J., SCHROEDER, S., MAGNES, C., ANTONACCI, L., FUSSI, H., DESZCZ, L., HARTL, R., SCHRAML, E., CRIOLLO, A., MEGALOU, E., WEISKOPF, D., LAUN, P., HEEREN, G., BREITENBACH, M., GRUBECK-LOEBENSTEIN, B., HERKER, E., FAHRENKROG, B., FRÖHLICH, K.U., SINNER, F., TAVERNARAKIS, N., MINOIS, N., KROEMER, G., MADEO, F., 2009. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat. Cell Biol.* 11, 1305–1314. <https://doi.org/10.1038/ncb1975>
- ELLER, K., HENKES, E., ROSSBACHER, R., HÖKE, H., 2005. Amines, Aliphatic, w: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. https://doi.org/10.1002/14356007.a02_001
- EVANS, P.T., MALMBERG, R.L., 1989. Do Polyamines Have Roles In Plant Development? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40, 235–269.
- FLORES, H.E., GALSTON, A.W., 1982. Analysis of Polyamines in Higher Plants by High Performance Liquid Chromatography. *Plant Physiol.* 69, 701–706. <https://doi.org/10.1104/pp.69.3.701>
- FRANCESCHETTI, M., FORMALÈ, S., TASSONI, A., ZUCCHERELLI, K., MAYER, M.J., BAGNI, N., 2004. Effects of spermidine synthase overexpression on polyamine biosynthetic pathway in tobacco plants. *J. Plant Physiol.* 161, 989–1001. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.02.004>
- Fricke, W., Leigh, R.A., Deri Tomos, A., 1994. EPIDERMAL SOLUTE CONCENTRATIONS AND osmolality in barley leaves studied at the single-cell level - Changes along the leaf blade, during leaf ageing and NaCl stress. *Planta* 192, 317–323. <https://doi.org/10.1007/BF00198566>
- FUJITA, M., FUJITA, Y., IUCHI, S., YAMADA, K., KOBAYASHI, Y., URANO, K., KOBAYASHI, M., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K., 2012. Natural variation in a polyamine transporter determines paraquat tolerance in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 6343–6347. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121406109>
- FUJITA, M., SHINOZAKI, K., 2014. Identification of Polyamine Transporters in Plants: Paraquat Transport Provides Crucial Clues. *Plant Cell Physiol.* 55, 855–861. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu032>
- GALSTON, A.W., 1986. Plant morphogenesis, w: McGraw-Hill yearbook of science & technology. McGraw-Hill, New York, ss. 351–354.
- GALSTON, A.W., KAUR-SAWHNEY, R., 1987. Polyamines and senescence in plants, w: Thomson, W.W., Nothnagel, E.A., Huffaker, R.C. (Red.), *Plant Senescence: Its Biochemistry and Physiology*. American Society of Plant Physiologists.
- GALSTON, A.W., SAWHNEY, R.K., 1990. Polyamines in plant physiology. *Plant Physiol.* 94, 406–410. <https://doi.org/10.1104/pp.94.2.406>

- GAMARNIK, A., FRYDMAN, R.B., 1991. Cadaverine, an Essential Diamine for the Normal Root Development of Germinating Soybean (*Glycine max*) Seeds. *Plant Physiol.* 97, 778–785. <https://doi.org/10.1104/pp.97.2.778>
- GOLDBERG, R., PERDRIZET, E., 1984. Ratio of free to bound polyamines during maturation in mung-bean hypocotyl cells. *Planta* 161, 531–535.
- GORDONSMITH, R.H., BROOKE-TAYLOR, S., SMITH, L.L., COHEN, G.M., 1983. Structural requirements of compounds to inhibit pulmonary diamine accumulation. *Biochem. Pharmacol.* 32, 3701–3709. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(83\)90138-7](https://doi.org/10.1016/0006-2952(83)90138-7)
- GRZYP, M., KALANDYK, A., WALIGÓRSKI, P., MIKUŁA, A., 2017. The content of endogenous hormones and sugars in the process of early somatic embryogenesis in the tree fern *Cyathea delgadii* Sternb. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 129, 387–397. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1185-8>
- GUPTA, M., DA SILVA, E.F., SVENDSEN, H.F., 2012. Computational study of thermodynamics of polyamines with regard to CO₂ capture. *Energy Procedia* 23, 140–150. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2012.06.076>
- HAMANA, K., HAMANA, H., NIITSU, M., SAMEJIMA, K., SAKANE, T., YOKOTA, A., 1994. Occurrence of tertiary and quaternary branched polyamines in thermophilic archaeobacteria. *Microbios* 79, 109–119.
- HAMANA, K., HAYASHI, H., NIITSU, M., 2015. Polyamines in Different Organs of Brassica Crop Plants with or without Clubroot Disease. *Plant Prod. Sci.* 18, 476–480. <https://doi.org/10.1626/pps.18.476>
- HAMANA, K., KAMEKURA, M., ONISHI, H., AKAZAWA, T., MATSUZAKI, S., 1985. Polyamines in photosynthetic eubacteria and extreme-halophilic archaeobacteria. *J. Biochem.* 97, 1653–1658. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a135223>
- HAMANA, K., NIITSU, M., SAMEJIMA, K., 1996. Further polyamine analyses of leguminous seeds and seedlings: the occurrence of novel linear, tertiary branched and quaternary branched pentaamines. *Can. J. Bot.* 74, 1766–1772. <https://doi.org/10.1139/b96-213>
- HANFREY, C., SOMMER, S., MAYER, M.J., BURTIN, D., MICHAEL, A.J., 2001. Arabidopsis polyamine biosynthesis: Absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. *Plant J.* 27, 551–560. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01100.x>
- HARPAZ-SAAD, S., YOON, G.M., MATTOO, A.K., KIEBER, J.J., 2012. The Formation of ACC and Competition Between Polyamines and Ethylene for SAM, w: The Plant Hormone Ethylene. ss. 53–81. <https://doi.org/10.1002/9781118223086.ch3>
- HELLER, J.S., CANELLAKIS, E.S., 1981. Cellular control of ornithine decarboxylase activity by its antizyme. *J. Cell. Physiol.* 107, 209–217. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041070206>

- HELOIR, M.C., FOURNIOUX, J.C., BARBIER, M., JEANDET, P., BESSIS, R., 1998. Endogenous polyamine concentrations in juvenile, adult and micropropagated grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir). *Vitis* 37, 61–62.
- HILLEL, D., VAN BAVEL, C., 1976. Simulation of Profile Water Storage as Related to Soil Hydraulic Properties. *Crop Sci. Soc. Am. J.* 40, 807–815.
- HOLSTERS, M., WAELE, D. DE, DEPICKER, A., MESSENS, E., MONTAGU, M. VAN, SCHELL, J., 1978. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molec. gen. Genet.* 163, 181–187.
- HUANG, X., BIE, Z., 2010. Cinnamic acid-inhibited ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity is mediated through decreased spermine and changes in the ratio of polyamines in cowpea. *J. Plant Physiol.* 167, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.07.002>
- HURA, T., DZIURKA, M., HURA, K., OSTROWSKA, A., DZIURKA, K., 2015. Free and cell wall-bound polyamines under long-term water stress applied at different growth stages of ×triticosecale Wittm. *PLoS One* 10, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135002>
- JANKIEWICZ, L.S., DYKI, B., MACHLAŃSKA, A., DUBERT, F., 2017. Oak leaf galls: *Neuroterus numismalis* and *Cynips quercusfolii*, their structure and ultrastructure. *Acta Soc. Bot. Pol.* 86. <https://doi.org/10.5586/asbp.3537>
- JONES, A.M., 1998. Auxin transport: Down and out and up again. *Science* (80-.). <https://doi.org/10.1126/science.282.5397.2201>
- JONES, H.G., 2007. Monitoring plant and soil water status: Established and novel methods revisited and their relevance to studies of drought tolerance. *J. Exp. Bot.* 58, 119–130. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl118>
- JUZOŃ, K., CZYCYŁO-MYSZA, I., MARCIŃSKA, I., DZIURKA, M., WALIGÓRSKI, P., SKRZYPEK, E., 2017. Polyamines in yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) tolerance to soil drought. *Acta Physiol. Plant.* 39, 155–165. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2500-z>
- K-SAWHNEY, R., APPLEWHITE, P.B., 1993. Endogenous protein-bound polyamines: correlation with regions of cell division in tobacco leaves, internodes and ovaries. *Plant Growth Regul.* 12, 223–227. <https://doi.org/10.1007/BF00027202>
- KAKEHI, J.I., KUWASHIRO, Y., NIITSU, M., TAKAHASHI, T., 2008. Thermospermine is Required for Stem Elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 49, 1342–1349. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn109>
- KAKKAR, R.K., RAI, V.K., NAGAR, P.K., 1997. Polyamine uptake and translocation in plants. *Biol. Plant.* 40, 481–491. <https://doi.org/10.1023/A:1001763515490>
- KASINATHAN, V., WINGLER, A., 2004. Effect of reduced arginine decarboxylase activity on salt tolerance and on polyamine formation during salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 121, 101–107. <https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.00309.x>

- KAUR, H., HALLIWELL, B., 1996. Measurement of oxidized and methylated DNA bases by HPLC with electrochemical detection. *Biochem. J.* 318 (Pt 1, 21–3.
- KERN, A.D., OLIVEIRA, M.A., COFFINO, P., HACKERT, M.L., 1999. Structure of mammalian ornithine decarboxylase at 1.6 Å resolution: Stereochemical implications of PLP-dependent amino acid decarboxylases. *Structure* 7, 567–581. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80073-2](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80073-2)
- KYRIAKIDIS, D.A., 1983. Effect of plant growth hormones and polyamines on ornithine decarboxylase activity during the germination of barley seeds. *Physiol. Plant.* 57, 499–504.
- LARSON, K.C., WHITHAM, T.G., 1991. Manipulation of food resources by a gall-forming aphid: the physiology of sink-source interactions. *Oecologia* 88, 15–21. <https://doi.org/10.1007/BF00328398>
- LEGOCKA, J., KLUK, A., 2005. Effect of salt and osmotic stress on changes in polyamine content and arginine decarboxylase activity in *Lupinus luteus* seedlings. *J. Plant Physiol.* 162, 662–8. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.08.009>
- LEGOCKA, J., ZARNOWSKA, A., 2000. Role of polyamines in the cytokinin-dependent physiological processes II. Modulation of polyamine levels during cytokinin-stimulated expansion of cucumber cotyledons. *Acta Physiol. Plant.* 22, 395–401. <https://doi.org/10.1007/s11738-000-0079-1>
- LEGOCKA, J., ZARNOWSKA, A., 1999. Role of polyamines in the cytokinin-dependent physiological processes. I. Effect of benzyladenine on polyamine levels during chloroplast differentiation in the tissue culture of *Dianthus caryophyllus*. *Acta Physiol. Plant.* 21, 349–354. <https://doi.org/10.1007/s11738-999-0006-z>
- LI, Z., ZHANG, Y., PENG, D., WANG, X., PENG, Y., HE, X., ZHANG, X., MA, X., HUANG, L., YAN, Y., 2015. Polyamine regulates tolerance to water stress in leaves of white clover associated with antioxidant defense and dehydrin genes via involvement in calcium messenger system and hydrogen peroxide signaling. *Front. Physiol.* 6, 280. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00280>
- LIN, P.P., EGLI, D.B., LI, G.M., MECKEL, L., 1984. Polyamine Titer in the Embryonic Axis and Cotyledons of *Glycine max* (L.) during Seed Growth and Maturation. *Plant Physiol.* 76, 366–371. <https://doi.org/10.1104/pp.76.2.366>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00827>
- LIU, K., FU, H., BEI, Q., LUAN, S., 2000. Inward potassium channel in guard cells as a target for polyamine regulation of stomatal movements. *Plant Physiol* 124, 1315–1326. <https://doi.org/10.1104/pp.124.3.1315>

- LÓPEZ-GÓMEZ, M., COBOS-PORRAS, L., HIDALGO-CASTELLANOS, J., LLUCH, C., 2014. Occurrence of polyamines in root nodules of *Phaseolus vulgaris* in symbiosis with *Rhizobium tropici* in response to salt stress. *Phytochemistry* 107, 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.08.017>
- MAGNES, C., FAULAND, A., GANDER, E., NARATH, S., RATZER, M., EISENBERG, T., MADEO, F., PIEBER, T., SINNER, F., 2014. Polyamines in biological samples: Rapid and robust quantification by solid-phase extraction online-coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1331, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.12.061>
- MAIALE, S., SÁNCHEZ, D.H., GUIRADO, A., VIDAL, A., RUIZ, O. A., 2004. Spermine accumulation under salt stress. *J. Plant Physiol.* 161, 35–42. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01167>
- MAJUMDAR, R., MINOCHA, R., MINOCHA, S.C., 2015. Ornithine: at the crossroads of multiple paths to amino acids and polyamines., w: *Amino acids in higher plants*. ss. 156–176.
- MAJUMDAR, R., SHAO, L., MINOCHA, R., LONG, S., MINOCHA, S.C., 2013. Ornithine: The overlooked molecule in the regulation of polyamine metabolism. *Plant Cell Physiol.* 54, 990–1004. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct053>
- MAMONT, P.S., DUCHESNE, M.C., GROVE, J., BEY, P., 1978. Anti-proliferative properties of DL- α -difluoromethyl ornithine in cultured cells. A consequence of the irreversible inhibition of ornithine decarboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81, 58–66. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(78\)91630-3](https://doi.org/10.1016/0006-291X(78)91630-3)
- MARCIŃSKA, I., CZYCYŁO-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, 13171–93. <https://doi.org/10.3390/ijms140713171>
- MATTHEWS, H.R., 1993. My favourite molecule: Polyamines, chromatin structure and transcription. *BioEssays*. <https://doi.org/10.1002/bies.950150811>
- MILLER-FLEMING, L., OLIN-SANDOVAL, V., CAMPBELL, K., RALSER, M., 2015. Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. *J. Mol. Biol.* 427, 3389–3406. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.06.020>
- MOSCHOU, P.N., ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A., 2014. Polyamines and programmed cell death. *J. Exp. Bot.* 65, 1285–1296. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert373>
- MOSCHOU, P.N., WU, J., CONA, A., TAVLADORAKI, P., ANGELINI, R., ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A., 2012. The polyamines and their catabolic products are significant players in the turnover of nitrogenous molecules in plants. *J. Exp. Bot.* 63, 5003–5015. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers202>
- MÜLLER, P., SCHIER, A.F., 2011. Extracellular Movement of Signaling Molecules. *Dev. Cell* 21, 145–158. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.001>

- NAKA, Y., WATANABE, K., SAGOR, G.H.M., NIITSU, M., PILLAI, M.A., KUSANO, T., TAKAHASHI, Y., 2010. Quantitative analysis of plant polyamines including thermospermine during growth and salinity stress. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 527–533. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.01.013>
- NAKAJIMA, K.I., ZHU, K., SUN, Y.H., HEGYI, B., ZENG, Q., MURPHY, C.J., SMALL, J.V., CHEN-IZU, Y., IZUMIYA, Y., PENNINGER, J.M., ZHAO, M., 2015. KCNJ15/Kir4.2 couples with polyamines to sense weak extracellular electric fields in galvanotaxis. *Nat. Commun.* 6, 8532. <https://doi.org/10.1038/ncomms9532>
- NAVAKOUDIS, E., LÜTZ, C., LANGEBARTELS, C., LÜTZ-MEINDL, U., KOTZABASIS, K., 2003. Ozone impact on the photosynthetic apparatus and the protective role of polyamines. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1621, 160–169. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(03\)00056-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(03)00056-4)
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00593-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00593-3)
- NIEVES, N., MARTINEZ, M.-E., CASTILLO, R., BLANCO, M.-A., GONZALEZ-OLMEDO, J.-L., 2001. Effect of abscisic acid and jasmonic acid on partila desiccation of encapsulated somatic embryos of sugarcane, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 65, 15–21.
- OZAWA, R., BERTEA, C.M., FOTI, M., NARAYANA, R., ARIMURA, G.I., MUROI, A., MAFFEI, M.E., TAKABAYASHI, J., 2010. Polyamines and jasmonic acid induce plasma membrane potential variations in lima bean. *Plant Signal. Behav.* 5, 308–310. <https://doi.org/10.4161/psb.5.3.10848>
- PAPADAKIS, A.K., PASCHALIDIS, K.A., ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A., 2005. Biosynthesis profile and endogenous titers of polyamines differ in totipotent and recalcitrant plant protoplasts. *Physiol. Plant.* 125, 10–20. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00550.x>
- PEGG, A.E., 2013. Toxicity of polyamines and their metabolic products. *Chem. Res. Toxicol.* 26, 1782–1800. <https://doi.org/10.1021/tx400316s>
- PÉREZ-AMADOR, M.A., CARBONELL, J., 1995. Arginine Decarboxylase and Putrescine Oxidase in Ovaries of *Pisum sativum*. *Plant Physiol.* 107, 865–872.
- PESKE, S.T., HÖFS, A., HAMER, E., 2004. Seed Moisture Range in a Soybean Plant. *Rev. Bras. Sementes* 26, 120–124.
- PFOSSER, M., KÖNIGSHOFER, H., KANDELER, R., 1990. Free, Conjugated, and Bound Polyamines during the Cell Cycle of Synchronized Cell Suspension Cultures of *Nicotiana tabacum*. *J. Plant Physiol.* 136, 574–579. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)80216-6](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80216-6)

- PINTO, E., MELO, A., FERREIRA, I.M.P.L.V.O., 2014. Sensitive quantitation of polyamines in plant foods by ultrasound-assisted benzylation and dispersive liquid-liquid microextraction with the aid of experimental designs. *J. Agric. Food Chem.* 62, 4276–4284. <https://doi.org/10.1021/jf500959g>
- PONAPPA, T., SCHEERENS, J.C., MILLER, A.R., 1993. Vacuum Infiltration of Polyamines Increases Firmness of Strawberry Slices Under Various Storage Conditions. *J. Food Sci.* 58, 361–364. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb04275.x>
- RÁCZ, I., KOVÁCS, M., LASZTITY, D., VEISZ, O., SZALAI, G., PÁLDI, E., 1996. Effect of Short-term and Long-term Low Temperature Stress on Polyamine Biosynthesis in Wheat Genotypes with Varying Degrees of Frost Tolerance. *J. Plant Physiol.* 148, 368–373. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(96\)80267-7](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(96)80267-7)
- RASKIN, I., 1992. Role of Salicylic Acid in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 439–463.
- RATO, C., AMIROVA, S.R., BATES, D.G., STANSFIELD, I., WALLACE, H.M., 2011. Translational recoding as a feedback controller: Systems approaches reveal polyamine-specific effects on the antizyme ribosomal frameshift. *Nucleic Acids Res.* 39, 4587–4597. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1349>
- REDMOND, J.W., TSENG, A., 1979. High-pressure liquid chromatographic determination of putrescine, cadaverine, spermidine and spermine. *J. Chromatogr. A* 707, 479–481. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)95481-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)95481-5)
- RILEY, I.T., RILEY, I.T., RILEY, I.T., REARDON, T.B., MCKAY, A.C., 1988. Electrophoretic Resolution of Species Boundaries in Seed-Gall Nematodes, *Anguina* Spp. (Nematoda: Anguinidae), from Some Graminaceous Hosts in Australia and New Zealand. *Nematologica*. https://doi.org/10.1163/002825_988X00369
- ROGERS, H.J., 2006. Programmed cell death in floral organs: How and why do flowers die? *Ann. Bot.* 97, 309–315. <https://doi.org/10.1093/aob/mcj051>
- ROJE, S., 2006. S-Adenosyl-l-methionine: Beyond the universal methyl group donor. *Phytochemistry* 67, 1686–1698. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.04.019>
- ROMANOV, G.A., RAKOVA, N.Y., VANYUSHIN, B.F., 2004. Polyamines suppress expression of the cytokinin-dependent transgene in *Arabidopsis*. *Dokl. Biochem. Biophys.* 398, 288–290. <https://doi.org/10.1023/B:DOBI.0000046639.36776.f7>
- SAFTNER, R., 1989. Effects of organic amines on α -aminoisobutyric acid uptake into the vacuole and on ethylene production by tomato pericarp slices. *Physiol. Plant.* 75, 485–491.
- SAFTNER, R., BALDI, B., 1990. Polyamine levels and tomato fruit development: possible interaction with ethylene. *Plant Physiol.* 92, 547–550. <https://doi.org/10.1104/pp.92.2.547>

- SÁNCHEZ-LÓPEZ, J., CAMAÑES, G., FLORS, V., VICENT, C., PASTOR, V., VICEDO, B., CERZO, M., GARCÍA-AGUSTÍN, P., 2009. Underivatized polyamine analysis in plant samples by ion pair LC coupled with electrospray tandem mass spectrometry. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 592–598. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.02.006>
- SARJALA, T., KAUNISTO, S., 1993. Needle polyamine concentrations and potassium nutrition in Scots pine. *Tree Physiol.* 13, 87–96.
- SAWHNEY, R.K., SHEKHAWAT, N.S., GALSTON, A.W., 1985. Polyamine levels as related to growth, differentiation and senescence in protoplast-derived cultures of *Vigna aconitifolia* and *Avena sativa*. *Plant Growth Regul.* 3, 329–337. <https://doi.org/10.1007/BF00117590>
- SCHEUER, R., RODEL, W., 1995. Determination of biogenic-amines In Fermented meat-products. *Fleischwirtschaft* 75, 73–75.
- SHEN, H.J., GALSTON, A.W., 1985. Correlations between polyamine ratios and growth patterns in seedling roots. *Plant Growth Regul.* 3, 353–363. <https://doi.org/10.1007/BF00117592>
- SHU, S., GUO, S.-R., YUAN, L.-Y., 2012. A Review: Polyamines and Photosynthesis, w: Najafpour, M.M. (Red.), *Advances in Photosynthesis - Fundamental Aspects*. Intech, ss. 439–464.
- SINGH, P.K., SINGH, R., SINGH, S., 2013. Cinnamic acid induced changes in reactive oxygen species scavenging enzymes and protein profile in maize (*Zea mays* L.) plants grown under salt stress. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 19, 53–59. <https://doi.org/10.1007/s12298-012-0126-6>
- SOBIESZCZUK-NOWICKA, E., DI SANDRO, A., DEL DUCA, S., SERAFINI-FRACASSINI, D., LEGOCKA, J., 2007. Plastid-membrane-associated polyamines and thylakoid transglutaminases during etioplast-to-chloroplast transformation stimulated by kinetin. *Physiol. Plant.* 130, 590–600. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00922.x>
- SOIKA, G., KOZAK, M., 2012. Population dynamics of gall-inducing eriophyoid mites and seasonal variations in the gall density on linden trees. *Int. J. Acarol.* <https://doi.org/10.1080/01647954.2012.726275>
- STONE, G.N., SCHÖNRÖGGE, K., 2003. The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends Ecol. Evol.* [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00247-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00247-7)
- SUJKOWSKA-RYBKOWSKA, M., BORUCKI, W., 2014. Localization of hydrogen peroxide accumulation and diamine oxidase activity in pea root nodules under aluminum stress. *Micron* 57, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2013.09.007>
- SZALAI, G., PÁL, M., ÁRENDÁS, T., JANDA, T., 2016. Priming seed with salicylic acid increases grain yield and modifies polyamine levels in maize. *Cereal Res. Commun.* 44, 537–548. <https://doi.org/10.1556/0806.44.2016.038>

- SZEPESI, Á., CSISZÁR, J., GÉMES, K., HORVÁTH, E., HORVÁTH, F., SIMON, M.L., TARI, I., 2009. Salicylic acid improves acclimation to salt stress by stimulating abscisic aldehyde oxidase activity and abscisic acid accumulation, and increases Na⁺ content in leaves without toxicity symptoms in *Solanum lycopersicum* L. *J. Plant Physiol.* 166, 914–925. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.11.012>
- 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. <https://doi.org/10.07/s00726-009-0322-z>
- TABOR, C.W., TABOR, H., 1984. Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 749–790. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.53.070184.003533>
- TABOR, H., TABOR, C.W., 1972. Biosynthesis and Metabolism of 1,4-diaminobutane, Spermidine, Spermine, and Related Amines, w: Meister, A. (Red.), *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* vol. 36. ss. 203–268. <https://doi.org/10.1002/9780470122815.ch7>
- TAKAHASHI, T., KAKEHI, J.I., 2010. Polyamines: Ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Ann. Bot.* 105, 1–6. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp259>
- TAKANO, A., KAKEHI, J.I., TAKAHASHI, T., 2012. Thermospermine is not a minor polyamine in the plant kingdom. *Plant Cell Physiol.* 53, 606–616. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs019>
- TERUI, Y., YOSHIDA, T., SAKAMOTO, A., SAITO, D., OSHIMA, T., KAWAZOE, M., YOKOYAMA, S., IGARASHI, K., KASHIWAGI, K., 2018. Polyamines protect nucleic acids against depurination. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 99, 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.04.008>
- TONON, G., KEVERS, C., GASPAR, T., 2001. Changes in polyamines, auxins and peroxidase activity during in vitro rooting of *Fraxinus angustifolia* shoots: An auxin-independent rooting model. *Tree Physiol.* 21, 655–663. <https://doi.org/10.1093/treephys/21.10.655>
- TOOKER, J.F., HELMS, A.M., 2014. Phytohormone Dynamics Associated with Gall Insects, and their Potential Role in the Evolution of the Gall-Inducing Habit. *J. Chem. Ecol.* 40, 742–753. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0457-6>
- WALKER, M.A., ROBERTS, D.R., DUMBROFF, E.B., 1988. Effects of Cytokinin and Light on Polyamines during the Greening Response of Cucumber Cotyledons. *Plant Cell Physiol.* 21, 201–205.
- WALTERS, D., COWLEY, T., MITCHELL, A., 2002. Methyl jasmonate alters polyamine metabolism and induces systemic protection against powdery mildew infection in barley seedlings. *J. Exp. Bot.* 53, 747–756. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.369.747>

- WIEBES-RIJKS, A.A., 1981. Early Parasitism of Oak-Apple Galls (*Cynips Quercusfolii* L., Hymenoptera). *Netherlands J. Zool.* 32, 112–116. <https://doi.org/10.1163/002829682X00085>
- WITZELL, J., KUUSELA, T., SARJALA, T., 2005. Polyamine profiles of healthy and parasite-infected *Vaccinium myrtillus* plants under nitrogen enrichment. *J. Chem. Ecol.* 31, 561–575. <https://doi.org/10.1007/s10886-005-2041-6>
- XIONG, X.-J., WANG, H., RAO, W.-B., GUO, X.-F., ZHANG, H.-S., 2010. 1,3,5,7-Tetramethyl-8-aminozide-difluoroboradiaza-s-indacene as a new fluorescent labeling reagent for the determination of aliphatic aldehydes in serum with high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1217, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.003>
- YAMAGUCHI, H., TANAKA, H., HASEGAWA, M., TOKUDA, M., ASAMI, T., SUZUKI, Y., 2012. Phytohormones and willow gall induction by a gall-inducing sawfly. *New Phytol.* 196, 586–595. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04264.x>
- YANG, J., YUNYING, C., ZHANG, H., LIU, L., ZHANG, J., 2008. Involvement of polyamines in the post-anthesis development of inferior and superior spikelets in rice. *Planta* 228, 137–149. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0725-1>
- 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. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm032>
- YANG, L., HONG, H., XIAO-XIA, W., YUN-CHENG, L., 2016. Effect of polyamine on seed germination of wheat under drought stress is related to changes in hormones and carbohydrates. *J. Integr. Agric.* 15, 2759–2774. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61366-7](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61366-7)
- YANG, S.F., HOFFMAN, N.E., 1984. Ethylene Biosynthesis and its Regulation in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35, 155–189. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.35.060184.001103>
- ZHANG, C., HUANG, Z., 2013. Effects of endogenous abscisic acid, jasmonic acid, polyamines, and polyamine oxidase activity in tomato seedlings under drought stress. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 159, 172–177. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.05.013>
- ZHANG, R.H., LI, J., GUO, S.R., TEZUKA, T., 2009. Effects of exogenous putrescine on gas-exchange characteristics and chlorophyll fluorescence of NaCl-stressed cucumber seedlings. *Photosynth. Res.* 100, 155–162. <https://doi.org/10.1007/s11120-009-9441-3>

8. STRESZCZENIE

Rola poliamin w procesach wzrostu i rozwoju wybranych gatunków roślin

Poliaminy są grupą alifatycznych związków zawierających co najmniej dwie grupy aminowe. Występują powszechnie w organizmach żywych, niekiedy osiągając znaczące stężenia. Mimo, iż znane są od wielu lat, pełnione przez nie fizjologiczne funkcje, zwłaszcza u roślin, nie są wyjaśnione.

Praca koncentruje się na badaniach udziału poliamin w fizjologii roślin. Przeprowadzono szereg doświadczeń polowych analizując zmienność zawartości poliamin w różnych organach roślinnych pod wpływem naturalnych stresów środowiskowych. Większość doświadczeń przeprowadzono na roślinach strączkowych: grochu siewnym, łubinie białym, łubinie żółtym, łubinie wąskolistnym i soi. Zamieszczono także niewielki rozdział poświęcony badaniom poliamin w galasach dębowych.

W pracy przedyskutowano hipotetyczną rolę poliamin jako fitohormonów, jako związków osmotycznie czynnych chroniących przed następstwami stresu suszy, oraz jako źródło azotu dla potrzeb przemian biochemicznych. Otrzymane wyniki czynią prawdopodobną tę ostatnią hipotezę.

9. ABSTRACT

The role of polyamines in processes of growth and development of selected plant species

Polyamines are a group of aliphatic compounds that contain at least two amine groups. They are common in living organisms sometimes reaching significant levels of concentration. Although they have been known for many years their physiological functions, especially in plants, they have yet to be explained.

The work is focused on research on the role of polyamines in plant physiology. A number of field experiments were conducted analyzing the variability of polyamine content in various plant organs under natural environmental stress. Most of the experiments were carried out on legumes: peas, white lupine, yellow lupine, narrow-leaved lupine and soybean. A small chapter was also devoted to the study of polyamines in oak galls.

The paper discusses the hypothetical role of polyamines as phytohormones, osmotically active compounds that protect against the effects of drought stress, and as a source of nitrogen needed for biochemical changes. The results obtained make this last hypothesis likely.