

**Dohány (*Nicotiana tabacum*) poliamin-oxidáz gének
szekvenciális és funkcionális jellemzése abiotikus stressz és
fejlődési válaszokban.**

Doktori (Ph.D.) értekezés

Benkő Péter

Témavezetők:

Prof. Dr. Fehér Attila tanszékvezető egyetemi tanár

Pichererné Dr. Gémes Katalin egyetemi adjunktus

Szegedi Biológiai Kutatóközpont Növénybiológiai Intézet Növényi
Fejlődés és Alkalmazkodás Molekuláris Szabályozása Kutatóegység
Növényi Morfogenezis Szabályozása Csoport
Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar
Biológia Doktori Iskola/Növénybiológiai Tanszék

Szeged

2023

1. Tartalomjegyzék

1.	Tartalomjegyzék.....	1
2.	Rövidítések jegyzéke.....	4
3.	Bevezetés.....	6
4.	Irodalmi áttekintés.....	7
4.1.	A Reaktív oxigén formák (ROF) és szerepük növényekben	7
4.1.1.	A növényi ROF tulajdonságai	7
4.1.2.	A növényi ROF képződés folyamata	8
4.1.3.	A NADPH oxidáz (NOX) enzim rövid jellemzése növényekben.....	9
4.2.	A Poliaminok általános jellemzése növényekben	10
4.3.	A poliaminok bioszintézise növényekben	13
4.4.	A poliaminok lebontása növényekben.....	13
4.4.1.	Az amin oxidázok és előfordulásuk növényekben.....	13
4.4.2.	A poliamin-oxidázok biokémiai szerkezete és az általa katalizált reakciók	15
4.4.3.	A poliamin-oxidázok sejten belüli elhelyezkedése (lokalizációja), szubsztrát specifitása és szabályozása.....	17
4.5.	A poliamin-oxidázok szerepe a reaktív oxigén formák (H ₂ O ₂) képzésén keresztül a növények fejlődési, - és stresszválaszaiban.....	19
4.6.	A poliamin oxidáz és NADPH oxidáz kapcsolata a növények fejlődési, - és stresszválaszaiban.....	21
4.6.1.	A PAO működése során képződő H ₂ O ₂ hatása a NADPH oxidáz aktivitásra ...	22
4.6.2.	A NADPH oxidáz ROF-on keresztül befolyásolja a PAO aktivitását	23
4.6.3.	A poliamin metabolizmus kapcsolata a NADPH oxidáz enzimekkel.....	23
4.6.4.	A PAO és a NADPH oxidáz együttműködése a növények fejlődési válaszaiban	24
4.6.5.	A PAO-NADPH oxidáz kölcsönhatása a stressz akklimatizációs folyamatokban	25

4.6.6. A PAO-NADPH oxidáz enzimek együttműködése más jelátviteli útvonalakkal

25

5.	A dohány és lúdfű, mint modellnövények	26
6.	Protoplasztok, mint modellrendszer	26
6.1.	A ROF és a poliaminok szerepe a protoplaszt tenyészetekben.	28
7.	Célkitűzések	30
8.	Anyagok és módszerek.....	31
8.1.	Növénynevelési paraméterek.....	31
8.1.1.	Dohány növények kezelése, mintavétel	31
8.1.2.	Lúdfű növények kezelése, mintavétel	33
8.2.	Protoplasztok izolálása, fenntartása és kezelése dohány növények leveléből.....	34
8.3.	ROF és életképesség meghatározása fluoreszcens mikroszkóp segítségével	35
8.4.	Sztereó mikroszkópos vizsgálatok.....	35
8.5.	Szekvencia in silico elemzések és primer tervezés	35
8.6.	RNS izolálás és valós idejű kvantitatív PCR (Génkifejeződés vizsgálata)	37
8.7.	Statisztika és ábrakészítéshez felhasznált szoftverek.	38
9.	Eredmények.....	39
9.1.	Dohány PAO gének azonosítása és szekvencia analízise.....	39
9.1.1.	Dohány NtPAO gének szerkezete és filogenetikai kapcsolata.....	39
9.2.	Dohány PAO gének kifejeződési mintázata fiziológias körülmények között, valamint különböző stressz és hormonkezelések hatására	44
9.2.1.	A dohány NtPAO gének szervspecifikus kifejeződése	44
9.2.2.	PAO gének expressziós változása abiotikus és oxidatív stressz hatására	45
9.2.3.	A növényi hormonok hatása a PAO gének kifejeződési mintázatára dohányban	
	47	
9.2.4.	A PAO gének kifejeződése protoplasztok izolálása és fenntartása során	49
9.3.	A NADPH oxidáz szerepe a ROF keletkezésében dohány protoplasztok izolálása és fenntartása során.....	51

9.4.	A PAO és a NADPH oxidáz szerepe a ROF keletkezésében a protoplasztok izolálása és fenntartása során	52
9.5.	A PAO és NADPH oxidáz kölcsönhatásának tanulmányozása Arabidopsis növényben	55
10.	Eredmények értékelése.....	61
10.1.	A dohány PAO 1, 2, 4 és 5 gének a kétszikű PAO génekhez hasonlóan három kládba csoportosíthatóak	61
10.2.	A dohány PAO-ok szervspecifikusan fejeződnek ki	63
10.3.	A dohány PAO-ok különböző abiotikus stressz kezelésekre aktiválódnak	64
10.4.	Az NtPAO gének hormonális szabályozás alatt állnak.....	65
10.5.	Dohányban a IV-es kládba tartozó perxiszómális NtPAO-ok fontos szerepet játszanak a protoplaszt kultúra fennmaradásában	66
10.6.	A PAO-ok és a NADPH oxidáz kölcsönhat egymással.....	67
10.7.	AtPAO5 és az AtRBOHD együttműködik az oldalgökérprimordiumok hajtásmerisztémává történő átalakításában	69
11.	Összefoglalás.....	70
12.	Summary	71
13.	Köszönetnyilvánítás	73
14.	Irodalomjegyzék:.....	74
15.	SAJÁT KÖZLEMÉNYEK.....	95
15.1.	Tudományos folyóiratcikkek	95
15.1.1.	A dolgozat alapjául szolgáló közlemény (külföldi kiadású szakfolyóiratban): 95	
15.1.2.	Egyéb közlemények (külföldi kiadású szakfolyóiratban):	95
15.1.3.	Könyvfejezet.....	95
16.	Függelék.....	96

2. Rövidítések jegyzéke

ABS - abszcizinsav
ADC - arginin dekarboxiláz
AIH - agmatin imidohidroláz
BC poliamin konverziós enzim reakció
DAO/CuAO - diamine oxidáz
DAP – 1-3diaminopropán
DPI - difenilén-jodónium
FAD - flavin adenin dinukleotid
FDA - fluoreszcein-diacetát
GA₃ - gibberellinsav
GABA - gamma amino vajsav
H₂DCFDA - 2,7-diklorofluoreszcein-diacetát
IES - indol-3-ecetsav
JA - jázmonsav
mRNS - hírvivő RNS
NADPH - nikotinamid-adenin-dinukleotid phosphate
NOX – NADPH oxidáz
ODC - ornitin dekarboxiláz
PA - poliamin
PAO - poliamin oxidáz
PCR - polimeráz láncreakció
put - putreszcin
qPCR - kvantitatív, valós-idejű PCR
RBOH - respiratory burst oxidase homolog
RNS - ribonukleinsav
ROF - reaktív oxigén formák
SAM - S-adenozil-metionin
SAMDC - S-adenozil-metionin dekarboxiláz
SDP - specificitást determináló helyek
SOD – szuperoxid-dizmutáz
spd – spermidin

SPDS – spermidin szintáz

spm – spermin

SPMS – spermin szintáz

TC poliamin terminális katabolizmus enzimreakció

T-spm - termospermin

TSPM – termospermin szintáz

uORF - upstream open reading frame

3. Bevezetés

A poliaminok minden élőlényben megtalálhatóak, szerepük esszenciális. Minden növényi szervben és sejtalkotóban is előforduló, kis molekula tömegű, kationos természetű molekulák. Kémia tulajdonságaik miatt képesek negatívan töltött molekulákhoz, úgymint lipidekhez, DNS-hez, vagy egyes fehérjékhez kötődni és szabályozni működésüket. A poliamin (PA) homeosztázis fenntartása kulcsfontosságú a növények növekedéshez és fejlődéséhez, mind fiziológias körülmények között, mind stressz alatt. A PA szint szabályozás megvalósulhat a PA-ok bioszintézise, lebontása, szállítása és a PA-ok megkötése által. A poliamin oxidázok (PAO), flavin adenin dinukleotid (FAD) függő enzimek, a poliaminok lebontását és átalakítását végzik. Ez történhet a poliaminok terminális lebontása, vagy a poliaminok visszaalakítása által. Mindkét reakció során hidrogén peroxid (H_2O_2) keletkezik, ami befolyásolhatja a növények fejlődési és stressz adaptációs folyamatait. A H_2O_2 nagy koncentrációban oxidatív stresszt okoz, ami sejthalált válthat ki, míg alacsony koncentrációban különböző jelátviteli folyamatok indukálásával aktiválhatja az antioxidáns védelmi mechanizmusokat. A PAO izoenzimeket kódoló gének száma, szöveti lokalizációja, szubsztrátspecifitása, stressz, és fejlődési válaszban betöltött szerepe fajspecifikus bélyeg. A PAO gének azonosítása már számos fajban megtörtént, többek között kukoricában, rizsben, paprikában, narancsban, kamillában és lúdfüben. Ezzel szemben dohányban az egyes PAO izoenzimeket kódoló géneket, azok szöveti/szervi lokalizációját és funkcióit még nem azonosították. Munkám egyik célja volt a dohány PAO gének azonosítása, osztályozása, szekvencia analízise, másik pedig funkcionális jellemzésük egyfelől fiziológias körülmények között, másfelől különböző abiotikus stresszhatásokra, hormonkezelésekre, valamint egyes fejlődési állapotokban.

A plazmamembránban található NADPH oxidáz enzim szintén fontos szerepet játszik a reaktív oxigénformák (ROF) képződésében. Tehát a PAO és a NADPH oxidáz által termeltetett ROF számos esetben ugyanazokat a folyamatokat szabályozhatja a növények életműködése során. Éppen ezért a két enzim egymás hatását is befolyásolhatja a növények fejlődési és stresszválaszaiban.

A sejtfa nélküli növényi sejtek, a protoplasztok jól használhatóak modellrendszerként a különböző jelátviteli, illetve anyagcserefolyamatok, valamint hormonális kölcsönhatások tanulmányozására. Mindemellert az *in vitro* növényregenerálás alapjául is szolgálnak, így biotechnológiai szempontból is jelentősek. A protoplasztálás során ROF keletkezik, aminek

forrása egyaránt lehet a NADPH oxidáz és a PAO is. A keletkező ROF befolyásolhatja a protoplasztok életképességét és regenerációs képességét. Munkám során arra a kérdésre is kerestem a választ, hogy az egyes PAO-ok, illetve a NADPH oxidáz izoenzimeit közül az RBOHD miként befolyásolhatja ezt a folyamatot külön-külön és együtt. A PAO és NADPH oxidáz közötti kapcsolatot a molekuláris modellnövény Arabidopsis-ban is tanulmányoztam, az oldalgökök primordiumok hajtásmerisztémává történő átalakulása során.

4. Irodalmi áttekintés

4.1. A Reaktív oxigén formák (ROF) és szerepük növényekben

4.1.1. A növényi ROF tulajdonságai

Reaktív oxigén formáknak (ROF) nevezzük azokat a molekulákat, melyek a molekuláris oxigénnél reakcióképesebb oxigén fajták. A legismertebb növényi ROF molekulák közé tartoznak a párosítatlan elektronnal rendelkező szabadgyökök, úgy mint a szuperoxid gyökion (O₂^{·-}), a hidroxil gyök (OH[·]) és a hidroperoxil gyök (HO₂), valamint a nem szabadgyök molekulák, mint a szinglet oxigén (¹O₂), illetve a hidrogén peroxid (H₂O₂) (Andrés Juan és mtsai., 2021; Mittler és mtsai., 2022; Waszczak és mtsai., 2018) (1. táblázat). Kémiai tulajdonságaik közül a reaktivitás és a féléletidő jelentősen eltér. A hidroxil gyök (OH[·]) és a szinglet oxigén erősen reaktív és rövid féléletidejű (kb. 1 ns) forma, míg a H₂O₂ mérsékelten reaktív és féléletideje is hosszabb (1ms) (Waszczak és mtsai., 2018). Mindemellett az egyes ROF keletkezési dinamikája és sejten belüli lokalizációja is eltérhet a sejt fiziológiai állapotától függően. A ROF keletkezését és eloszlását belső, pl. fejlődési állapot és külső, pl. környezeti tényezők is befolyásolhatják (Turkan, 2018).

A ROF számos fiziológiai, anyagcsere és fejlődési folyamat szabályozásában vesz részt a növényekben, ilyenek a sejt differenciáció, a sejthalál, a hajtás,-és gyökér apikális merisztéma fejlődése, az oldalgökök kialakulása, a gyökérszőrök és a pollencső növekedése (Huang és mtsai., 2019; Singh és mtsai., 2016). A ROF befolyásolja a redukciós- oxidációs folyamatok (redox) egyensúlyát, azaz a sejt redox állapotát, mely egyéb molekulák, pl. enzimek, ioncsatornák, vagy receptorok működését módosíthatja, mindez pedig génexpressziós változáshoz is vezethet (Mittler, 2017; Waszczak és mtsai., 2018).

A H_2O_2 lassú lebomlása és a membránon, aquaporinokon keresztüli transzportálódása miatt alacsony koncentrációban fontos hírvivő molekulaként szolgál, befolyásolhatja különböző gének és enzimek működését (Bienert és mtsai., 2006). A H_2O_2 jelátviteli szerepét a sejten belül és sejtek közötti folyamatokban is igazolták. A pontos molekuláris mechanizmus, ami lehetővé teszi a H_2O_2 számára, hogy növekedési, illetve fejlődési folyamatokban részt vegyen azonban még mindig aktív kutatások tárgyát képezi (Bienert és mtsai., 2006; Turkan 2018; Hasanuzzaman és mtsai., 2020; Mittler és mtsai., 2022; Niu és Liao, 2016).

4.1.2. A növényi ROF képződés folyamata

A ROF keletkezése természetes, fiziológias körülmények között is megvalósul, a növények életének/metabolizmusának normál része. A ROF a sejten belül, illetve azon kívül az apoptotikus térben, spontán és enzimatis úton is keletkezhet (1. táblázat). A $\text{O}_2\cdot^-$ képződhet a fotoszintetikus elektrontranszportlánc, a mitokondriális elektrontranszportlánc, vagy a plazmamembránban található NADPH oxidáz enzim működése által (Mittler és mtsai., 2022). Később a $\text{O}_2\cdot^-$ a szuperoxid dizmutáz (SOD) enzim működése által a növény valamennyi sejt-kompartimentumában H_2O_2 -á alakulhat (Turkan 2018). A H_2O_2 további forrásai lehetnek az aminosav-oxidázok, az oxalát-oxidázok, a III-as típusú peroxidázok és egyéb oxidázok (1. táblázat). A hidrogén-peroxid képződését leírták valamennyi sejt-kompartimentumban, úgy mint a peroxisómában, citoplazmában, endoplazmás-retikulumban, vakuólumban, mitokondriumban, kloroplastban, apoptotikus térben és a sejtfalban is (Mittler és mtsai., 2022).

A növényeket számos környezeti hatás éri, melyek, ha a növény számára optimális tartományon kívül esnek, a növény számára károsak lehetnek. A szélsőséges hőmérsékletváltozás, a talaj szennyezettsége, sótartalma, a szárazság, egy optimális tartományon túl stresszt okozhat. A stressz pedig egy olyan fiziológiai állapot, amelyben a növények növekedése, fejlődése és szaporodási képessége elmarad attól, amit a genetikai adottságai lehetővé tennének (Szigeti, 2018). A stresszfolyamatokban ROF keletkezik, ami kis koncentrációban fontos szerepet játszik a különböző védelmi mechanizmusok aktiválásában (Czarnocka és Karpiński, 2018; Hasanuzzaman és mtsai., 2020; Mittler, 2017). Nagy koncentrációban felhalmozódva azonban káros hatást fejt ki a sejt építőköveire, a fehérjékre, a membrán-lipidekre és a nukleinsavakra (Andrés Juan és mtsai., 2021; Schieber és Chandel, 2014), végső soron pedig sejthalál kialakulásához vezethet (Lin és mtsai., 2006). Mindezek végett fontos, hogy a ROF szintje szabályozott legyen a sejtekben, ami többféle módon

valósulhat meg. Ilyenek a különböző enzimatis és nem enzimatis antioxidánsok, melyek képesek semlegesíteni a különböző folyamatokban keletkezett ROF-kat (Mittler és mtsai., 2022) (1.táblázat).

ROF		Migráció a membránon keresztül	Típus	Életidő	Reaktivitás	Forrás	Kioltás	Lokalizáció
Szinglet oxigén	$^1\text{O}_2$	nem	nem szabadgyök	1-4 μs	fehérjéket, lipideket DNS-t oxidál	kloroplasztisz, elektrontranszport-lánc PSII	karotinoidok prolin; glutation	Chl
Szuperoxid gyökkanion	$\text{O}_2^{\cdot-}$	nem	szabadgyök	1-4 μs	Fe-S reagál; H_2O_2 -á alakul	kloroplasztisz elektrontranszport lánc PSI, PSII; Ferredoxin; Mitokondriális elektrontranszport-lánc NADPH oxidáz; III-típusú peroxidáz	III-típusú-peroxidáz, szuperoxid-dizmutáz	Chl Mit Ap CW Per
Hidrogén-peroxid	H_2O_2	Aquaporinok segítségével	nem szabadgyök	> 1 ms	fehérjéket; DNS-t oxidál	Acyl-CoA-oxidáz; aldehyd-oxidáz; peroxidáz; III-típusú peroxidáz; diamin-oxidáz; ER-oxidoreduktin; poliamin-oxidáz; glikolát-oxidáz; L-aszpartát-oxidáz; oxalát-oxidáz; szarkozin-oxidáz; szulfít-oxidáz; urát-oxidáz; xanthin-oxidáz; szuper oxid dizmutáz	III-típusú-peroxidáz; aszkorbát-peroxidáz; kataláz; glutation-peroxidáz; peroxiredoxin; peroxidáz; tioredoxin-peroxidáz; aszkorbinsav flavonoidok; glutation	Per Cyt ER Vac Mit Chl Ap CW
Hidroxiil-gyök	OH^{\cdot}	nem	szabadgyök	1 ns	nagyon reaktív DNS-t; RNS-t; fehérjéket; és lipideket támadja	Haber-Weiss reakció; Fenton reakció III-típusú peroxidáz; UV (254 nm)	prolin; aszkorbát; glutation	Ap Chl Mit Cyt Per
Hidroperoxid-gyök	HO_2^{\cdot}	igen	szabadgyök	1 sec	zsírsavakat oxidál	kardiolipin		Mit Cyt

1. táblázat Növényekben előforduló reaktív oxigénformák (ROF) és tulajdonságaik; forrásuk és kioltásuk a növényi sejtekben. Per: peroxiszóma; Cyt: citoplazma; ER: endoplazmatikus retikulum; Vac: vakuólum; Mit: mitokondrium; Chl: kloroplasztisz; Ap: apoplaszt; CW: sejtfa (Mittler és mtsai., 2022 alapján)

4.1.3. A NADPH oxidáz (NOX) enzim rövid jellemzése növényekben

Az emlős NADPH oxidáz 2 (NOX2) enzim gp91phox alegységével homológ RBOHA-t növényekben először rizsben (*Oryza sativa*) írták le (Groom és mtsai., 1996). Növényekben respiratory burst oxidase homolog (RBOH) enzimnek is nevezik. Az azóta eltelt több mint két évtizedben már számos növényben jellemezték, így többek között paradicsomban, dohányban,

lúdfűben és burgonyában is (Amicucci és mtsai., 1999; Chapman és mtsai., 2019; Sagi és Fluhr, 2006; Simon-Plas és mtsai., 2002).

Mind állatokban, mind növényekben valamennyi NOX transzmembrán enzim, elektronokat juttat át a membránon a citoszolban levő NADPH/NADH-ról az apoplasztikus molekuláris oxigénre és szuperoxid gyökianionná redukálja azt (Hu és mtsai., 2020). Ez egy későbbi reakció során hidrogén-peroxiddá alakul a SOD enzim működése által (Chapman és mtsai., 2019; Kaur és mtsai., 2017; Qu és mtsai., 2017). Az enzim szerkezeti felépítésére jellemző, hogy hat transzmembrán domménel rendelkezik. A fehérje N terminális végén két Ca^{2+} kötő hely (EF kar), illetve számos foszforilációs hely, míg a C terminális szakaszon NADPH (Nikotinamid-adenin-dinukleotid) és FAD (Flavin-adenin-dinukleotid) kötő domén található. Az enzim aktivitásának szabályozása a Ca^{2+} ion kötődésén és az enzim foszforilációján keresztül valósul meg (Kadota és mtsai., 2015). A NADPH oxidáz fontos szerepet játszik a növények számos életfolyamatában, a fejlődési, a különböző stressz és hormonális jelátviteli mechanizmusok szabályozásában (Hu és mtsai., 2020). Az RBOH enzimet kódoló izoenzimek száma növényenként eltér. Arabidopsisban az RBOH család 10 tagból áll (*AtRBOH A-J*) (Sagi és Fluhr, 2006), dohányban pedig 20 izoenzimet kódoló gént (*NtRBOH A-T*) azonosítottak (Yu és mtsai., 2020). Ezeknek a kifejeződése és a funkciója is különbözik az egyes fejlődési és stresszfolyamatokban (Hu és mtsai., 2020). Arabidopsisban a különböző stresszválaszokban az egyes izoenzimek közül leginkább az *AtRBOHD* és *F* vesznek részt (Chapman és mtsai., 2019; Chen és Yang, 2019; Hu és mtsai., 2020). Ezek az izoenzimek (*AtRBOHD* és *F*) az abszcizinsav által közvetített sztómazáródás szabályozásban is fontos szerepet játszanak (Kwak, 2003). A többi *AtRBOH* gén elsősorban a fejlődési folyamatok szabályozásában vesz részt. Az *AtRBOHH* és *AtRBOHJ* a pollencső növekedésben, az *AtRBOHB* pedig a mag érésében játszik szerepet (Chapman és mtsai., 2019; Kaya és mtsai., 2019). Dohányban az *NtRBOHD* és *NtRBOHF* szintén fontos szerepet játszik az abiotikus stresszfolyamatok, többek között a sóstressz szabályozásában (Gémes és mtsai., 2017; Hu és mtsai., 2020). Ugyanakkor az *NtRBOHD*-t fejlődési folyamatok, úm. a pollencső növekedésének szabályozásában is kimutatták (Hu és mtsai., 2020).

4.2. A Poliaminok általános jellemzése növényekben

Bár nem az ókori görögöktől indul a poliaminok kutatása, mégis a modern tudomány szempontjából nagyon régre vezethető vissza. Antoni Van Leeuwenhoek 1678-ban fedezte fel

kristályos molekulákat spermában, amit később spermin-nek neveztek el. Ezt követően a szerkezeti meghatározást először 1924-ben Rosenheim végezte el (Rosenheim, 1924).

A poliaminok két, három, vagy négy amino csoportot tartalmazó molekulák, melyek baktériumokban, gombákban, állatokban és növényekben is megtalálhatóak. A legáltalánosabb növényi szabad poliaminok közé tartozik a diamin putreszcin (Put) a triamin spermidin (Spd) és a tetramin spermin (Spm) (Bouchereau és mtsai., 1999; Hussain és mtsai., 2011), de poliamin szerű molekulának tekinthető a lizinből képződő kadaverin is (Jancewicz és mtsai., 2016; Verhage, 2021). A növények életében betöltött szerepük esszenciális. Minden növényi szervben és sejtalkotóban előfordulnak, kis molekula tömegű, kationos természetű molekulák (Pál és mtsai., 2021). Fiziológias pH-án pozitív töltéssel rendelkeznek, ami által szorosán kötődhetnek negatívan töltött molekulákhoz, mint például nukleinsavakhoz, savas foszfolipidekhez, illetve különböző fehérjékhez (Bouchereau és mtsai., 1999). A növényekben szabad, kovalensen kötött, vagy nem kovalensen kötött formában találhatóak meg. (Chen és mtsai., 2019). A PA-ok megoszlása szerv- és szövetspecifikus mintázatot mutat (Chen és mtsai., 2019; Pál és mtsai., 2021; Takahashi és mtsai., 2018), de ez a kor előrehaladtával, a fiziológiai állapottól függően, vagy stressz hatásra is változhat (Liu és mtsai., 2015; Paschalidis és Roubelakis-Angelakis, 2005).

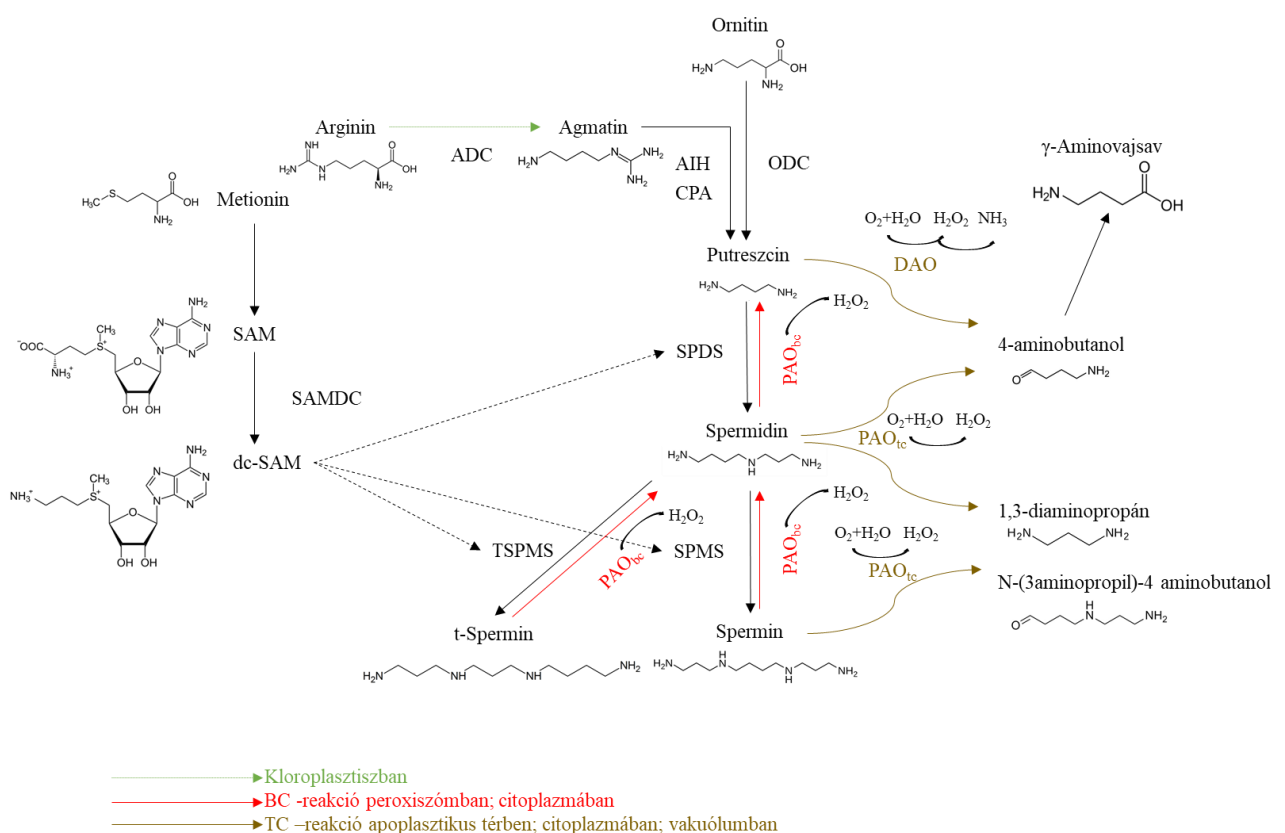
A poliaminok fontos szerepet töltenek be a növények fejlődési és stressz adaptációs folyamataiban (Alcázar és mtsai., 2020; Chen és mtsai., 2019; Romero és mtsai., 2018; Tiburcio és mtsai., 2014). Szerepüket leírták többek között a sejtosztódási folyamatok, a szervfejlődés, a növényi regenerációs folyamatok (Chen és mtsai., 2019; Kaszler és mtsai., 2021; Shoeb és mtsai., 2001; Tiburcio és mtsai., 2014), az öregedés (szenescencia) (Mattoo és Sobieszczyk-Nowicka, 2018), a programozott sejthalál (Cai és mtsai., 2015) és a pollentömlő fejlődésének szabályozásában (Benkő és mtsai., 2020).

A stressztolerancia kialakításában többféle módon is részt vehetnek. Kompatibilis ozmotikumként, közvetlenül kölcsönhathatnak és védelmet nyújthatnak a makromolekulák és a sejtmembránok számára. Részt vehetnek a keletkező szabadgyök molekulák kioltásában, ugyanakkor lebontásukkal hozzájárulhatnak a H_2O_2 keletkezéséhez, ami kis koncentrációban, jelátvivő molekulaként hozzájárulhat az antioxidáns enzimek aktiválásához, valamint szabályozhatja a nitrogén monoxid keletkezését, illetve az egyes ionszatórnák működését, de hatással lehet különböző anyagcsere-folyamatokra is (Alcázar és mtsai., 2020; Cvikrová és mtsai., 2013; Groppa és Benavides, 2008; Minocha és mtsai., 2014).

A külső PA kezelés gyakran nagyobb stressztoleranciát eredményez, ugyanakkor az optimálisnál nagyobb szint toxikus lehet (Alcázar és mtsai., 2020). A túl alacsony PA-szinttel

rendelkező mutáns növények azonban érzékenyebbek a stresszhatásokra. Kimutatták, hogy azok az Arabidopsis növények, amelyek nem képesek spermin előállítására érzékenyebbek lettek a sóstresszre (Yamaguchi és mtsai., 2006). A spermin mellett a Put és a Spd fontosságát is igazolták sóstressz alatt (Gémes és mtsai., 2017, 2016, 2011; Szepesi és mtsai., 2009).

A PA-homeosztázis fenntartása tehát kulcsfontosságú a növények növekedéshez és fejlődéséhez mind fiziológias körülmények között, mind pedig stressz alatt. Ez a homeosztázis, bonyolult, sokrétűen szabályozott folyamatok eredménye, melynek több szintje különíthető el. A PA szint szabályzás megvalósulhat a PA-ok bioszintézise, lebontása, szállítása, illetve a PA-ok megkötése által (Pál és mtsai., 2021).



1. ábra Poliamin bioszintézis és lebontás útvonalak növényekben. TC: terminális katabolizmus, BC:PA visszaalakítás, (ADC) arginin dekarboxiláz, (AIH) agmatin iminohidroláz, (ODC) ornitin dekarboxiláz, (SPDS) spermidin szintáz, (SPMS) spermin, szintáz, (TSPMS) termospermin szintáz, (dcSAM) dekarboxilált S-adenozil-metionint, (SAMDC) S-adenozil-metionin dekarboxiláz enzim (Gholizadeh F. és Mirzaghaderi G. 2020 alapján)

4.3. A poliaminok bioszintézise növényekben

Növényekben a poliamin bioszintézis két útvonala ismert. Az egyik az argininből kiindulva a kloroplasztiszban található arginin dekarboxiláz (ADC) (EC 4.1.1.19) enzim agmatint szintetizál. Az ezt követő lépések a citoplazmában zajlanak. Ennek első lépéseként az agmatinból az agmatin iminohidroláz (AIH) (EC 3.5.3.12) enzim működésével N-karbamoil-putreszcin, majd abból az N-karbamoil putreszcin amidohidroláz (CPA) (EC 3.5.1.53) enzim működésének eredményeképpen ammónia (NH₃) és putreszcin keletkezik (Shi és Chan, 2014).

Néhány növényfajban az ornitinből is képződik putreszcin az ornitin dekarboxiláz (ODC) (EC 4.1.1.17) enzim segítségével az ornitin úton. Az Arabidopsis nem rendelkezik ODC-vel, így csak az arginin úton képes Put előállítására (Hanfrey és mtsai., 2001), míg például a paradicsom vagy a dohány esetében mindkét útvonal lehetséges (Heimer és Mizrahit, 1982). A putreszcin további átalakítását a spermidin szintáz (SPDS) (EC 2.5.1.16) enzim katalizálja, aminek eredményeképpen Spd keletkezik. A Spd egy későbbi enzimreakció, a spermin szintáz (SPMS) (EC 2.5.1.22) működése által képes sperminné alakulni (Shi és Chan, 2014).

A növényekben mindemellett a spermidinből egy speciálisan módosított poliamin, termospermin (T-Spm) is keletkezhet, a termospermin szintáz (TSPMS) másnéven ACAULIS5 (ACL5) enzim működésének eredményeképpen (Takano és mtsai., 2012). Az SPDS és SPMS valamint az ACL5 enzimek működésükhöz dekarboxilált S-adenozil-metionint (dcSAM) használnak fel, ami az S-adenozil-L-metioninból (SAM) keletkezik az S-adenozil-metionin dekarboxiláz enzim (SAMDC) (EC 4.1.1.50) működése által (Chen és mtsai., 2019)(1. ábra). A néhány fajban megtalálható kadaverin szintézise lizinből történik, egy teljesen független bioszintetikus úton, az ornitin/lizin dekarboxiláz enzim működésének az eredményeképpen (O/LDC) (Jancewicz és mtsai., 2016).

4.4. A poliaminok lebontása növényekben

4.4.1. Az amin oxidázok és előfordulásuk növényekben

Eddigi ismereteink szerint kétféle enzim felelős a poliaminok lebontásáért. A réz és piridoxál foszfát kofaktorrallal működő diamin oxidázok (DAO) (EC 1.4.3.6) és a flavin adenin dinukleotidot (FAD) tartalmazó poliamin oxidázok (PAO) (EC 1.5.3.3) (Angelini és mtsai., 2010). A DAO (CuAO) putreszcin és kadaverint oxidál az első aminocsoport melletti

szénatomon, melynek eredményeképpen ammónia, aminoaldehid és H₂O₂ keletkezik. Arabidopsisban 10 DAO gén található, melyek szövetspecifikus kifejeződési mintázatot mutatnak, a sejten belül pedig különböző kompartmentumokban lokalizálódhatnak, úgy mint az apoplasztban, a peroxiszómában, vagy a vakuólumban (Fraudentali és mtsai., 2021; Tavladoraki és mtsai., 2016).

A poliamin oxidázok szintén szövet specifikus kifejeződési mintázatot mutatnak. Attól függően, hogy miként vesznek részt a PA-ok lebontásában, két csoportjuk különíthető el. Az első csoportba tartozó PAO-ok a poliaminok terminális katabolizmusáért (angol rövidítés alapján terminal catabolism, TC útvonal) felelősek. A második csoportba tartozó PAO-ok a PA-ok visszaalakításában (angol rövidítés alapján backconversion, BC útvonal) játszanak szerepet, a Spm-t Spd-né, a Spd-t pedig Put-né alakítják vissza. A TC útvonal általában extracellulárisan, míg a BC útvonal intracellulárisan, a citoplazmában vagy a peroxiszómában történik meg (Wang és mtsai., 2019). A PAO-ok eltérő szubsztrát és szövetspecifitással rendelkeznek (Fincato és mtsai., 2012; Kim és mtsai., 2014). Sejten belüli lokalizációjuk alapján apoplasztikus, citoszólikus és peroxiszómális PAO-ok különböztethetőek meg (Moschou és mtsai., 2012; Tavladoraki és mtsai., 2016). Ez ideáig a PAO géneket már számos egy-, -és kétszikű növényben sikerült azonosítani (Salvi és Tavladoraki, 2020; Yu és mtsai., 2019). A legjobban tanulmányozott és jellemzett PAO a kukorica apoplasztikus ZmPAO1 (Cona és mtsai., 2006; Tavladoraki és mtsai., 1998). Arabidopsisban 5 (*AtPAO1-5*) (Fincato és mtsai., 2011; Takahashi és mtsai., 2010) paradicsomban és rizsben hét (*SIPAO1-7*; *OsPAO1-7*) (Hao és mtsai., 2018; Ono és mtsai., 2012; Sagor és mtsai., 2021), kukoricában pedig kilenc (*ZmPAO1-9*) (Xi és mtsai., 2022) PAO izoenzimet kódoló gén található.

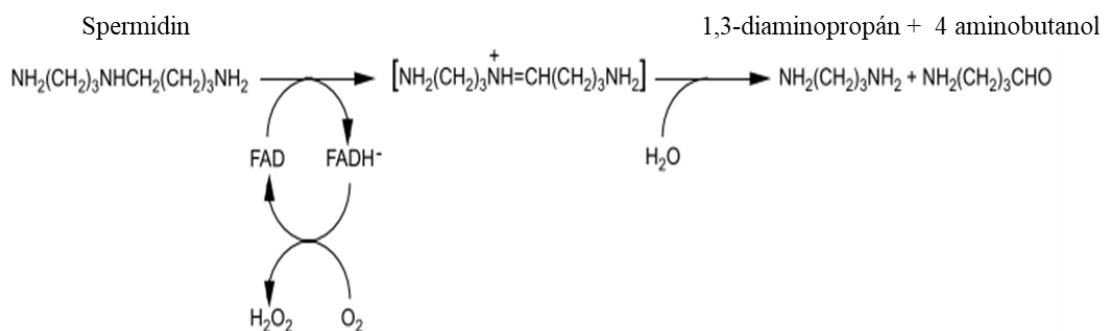
Filogenetikai analízis alapján a növényi PAO-ok 5 kládba sorolhatóak, I, II, III, IV és V (Bordenave és mtsai., 2019; Salvi és Tavladoraki, 2020). Az I-es kládba tartozik az Arabidopsis *AtPAO1* és a paradicsom *SIPAO1*, ezek citoplazmatikus elhelyezkedésűek és a poliaminok visszaalakításában (BC útvonal) vesznek részt (Takahashi és mtsai., 2010; Hao és mtsai., 2018). A III-as kládba az Arabidopsis *AtPAO5* és a paradicsom *SIPAO6* és *SIPAO7*, a IV-es kládba az Arabidopsis *AtPAO2*, *AtPAO3*, *AtPAO4*, a paradicsom *SIPAO2*, *SIPAO3*, *SIPAO4*, *SIPAO5* és a rizs *OsPAO3*, *OsPAO4*, *OsPAO5*, míg az V-ös kládba, ami a III-as egy leágazása egyetlen PAO, a rizs *OsPAO1* tartozik (Takahashi és mtsai., 2010; Ono és mtsai., 2012; Hao és mtsai., 2018). A III-as és V-ös kládba tartozó PAO-ok citoplazmatikus, míg a IV-es kládba tartozók peroxiszómális elhelyezkedésűek és az I-es kládhoz hasonlóan, a poliaminok katabolizmusában a BC útvonalon vesznek részt (Bordenave és mtsai., 2019). Az *AtPAO5* és feltehetően valamennyi III-as klád tag a T-Spm-t részesíti előnyben szubsztrátként és a T-Spm

Spd-né történő visszaalakítását katalizálja (Takahashi és mtsai., 2010; Kim és mtsai., 2014). A II-es kládba tartozó PAO-ok a többi klád PAO-ival ellentétben a PA-ok terminális lebontását (TC útvonal) végzik és vagy az apoplastban, vagy a vakuólumban helyezkednek el. Három rizs PAO (OsPAO2, OsPAO6, OsPAO7) és egy kukorica PAO (ZmPAO1) tartozik ebbe a kládba (Cona és mtsai., 2006; Ono és mtsai., 2012; Takahashi és mtsai., 2010).

4.4.2. A poliamin-oxidázok biokémiai szerkezete és az általa katalizált reakciók

A PAO-ok a flavoenzimek családjába tartoznak. Strukturális felépítésükre jellemző egy FAD kötő, valamint amin-oxidáz domén (Šebela és mtsai., 2001; Tavladoraki és mtsai., 1998). Monomer enzimek, melyek nem kovalensen kötik a FAD-ot. Kristályos szerkezetét a kukoricában (*Zea mays*), a sarjadzó élesztőben (*S. cerevisiae*) és a házi egérben (*M. musculus*) is ismerjük. A PAO-ok szerkezetét *Zea mays* és *M. musculus* fehérje szerkezet alapján sikerült modellezni (Bordenave és mtsai., 2019) (3. ábra). A ZmPAO egy 53 kDa méretű monomer enzim, 13 α -hélixből és 19 β -redőből áll. Rendelkezik egy 3 nm hosszú ún. katalitikus U csatornával, ami a poliaminok lebontásáért felelős (Binda és mtsai., 1999).

A poliaminok PAO általi enzimatis leontása két félreakcióból áll. Az első lépésben a FAD redukálódik, a poliamin pedig oxidálódik. Ezt követően a FAD visszaoxidálódik, amihez az elektront a molekuláris oxigén szolgáltatja és aminek eredményeképpen H₂O₂ keletkezik. A reakció vizet is igényel az oxidált spermidin hidrolíziséhez (2. ábra) (Binda és mtsai., 1999).



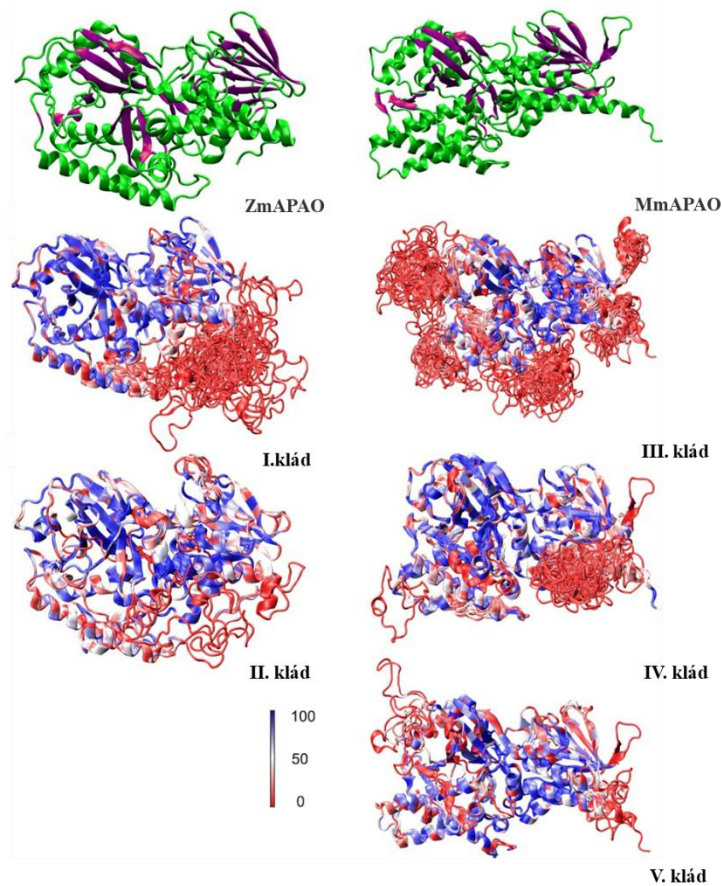
2. ábra A poliaminok terminális katabolizmusa (TC útvonal). A spermidin oxidációja és a keletkezett imino-csoport hidrolízise, mely során 1,3-diaminopropán és 4-aminobutanol keletkezik. A flavin adenin dinukleotid (FAD) reoxidációja során hidrogén-peroxid (H₂O₂) keletkezik (Šebela és mtsai., 2001 alapján).

A PAO-ok csoportosíthatók funkcionális tulajdonságaik, pl. az általuk katalizált reakció alapján is. Amikor a poliaminok PAO általi oxidációjának eredménye a poliaminok végleges

lebontása, terminális katabolizmusról beszélünk (TC útvonal). A másik útvonal a poliaminok visszaalakítása eggyel kevesebb amin csoportot tartalmazó poliaminná (BC útvonal). Ez utóbbi útvonal tulajdonképpen a PA bioszintézis fordított útvonala (Spm → Spd → Put). A terminális katabolizmust végző enzimek képesek oxidálni a Spd-t, a Spm-t és az acetilált formáikat. A folyamat során a Spd és/vagy a Spm N5 pozíciójú nitrogénjének belső oldalán található szénatom oxidálódik (2. ábra). A Spd és a Spm oxidációjának során, a reakció eredményeképpen H₂O₂, 1,3-diaminopropán (DAP) és 4-aminobutanol (a Spd lebontása során), illetve N-(3-aminopropil)-4-aminobutanol (a Spm lebontása során) keletkezik (Cona és mtsai., 2006; Moschou és mtsai., 2012; Šebela és mtsai., 2001). A keletkezett DAP mérését használják fel a PAO aktivitás meghatározásához (Tavladoraki és mtsai., 2006). A 4-aminobutanol spontán módon tovább alakulhat Δ¹-pirrolinná, ezen keresztül pedig gamma aminovajsav (GABA) képződhet, ami szukcináttá alakulva belép a Krebs-ciklusba (Chen és mtsai., 2019). A GABA mindemellett részt vehet a ROF termelődés, valamint stressz akklimatizációs folyamatok szabályozásában is (Ansari és mtsai., 2021; Mahadi Hasan és mtsai., 2021) (1. ábra).

A TC útvonal legjobban és legrégebben jellemzett enzime a kukoricában található ZmPAO1 (Binda és mtsai., 1999; Federico és mtsai., 1990). Hasonló aktivitású enzim található rizsben (OsPAO2, OsPAO6 és OsPAO7) (Liu és mtsai., 2014; Ono és mtsai., 2012), árpában HvPAO1 és HvPAO2 (Cervelli és mtsai., 2004), narancsban CsPAO4 (Wang és Liu, 2016) és feltételezhetően dohányban is (NtPAO1) (Yoda és mtsai., 2006).

A BC útvonal enzime a PA-ok visszaalakítását végzik. Ennek során a Spd és Spm N5 pozíciójú nitrogénjének külső oldalán történik oxidáció. Spm-ből Spd, 3-aminopropanol és H₂O₂, míg a Spd-ből Put, H₂O₂ és 3-aminopropanol keletkezik (Tavladoraki és mtsai., 2016). Arabidopsisban és paradicsomban csak ilyen típusú enzim található (Fincato és mtsai., 2011; Hao és mtsai., 2018). A poliaminokat visszaalakító PAO-ok és a poliamin szintézis enzime a együtt egy úgynevezett poliamin kört alkotnak (Pál és mtsai., 2015). Mind a TC, mind pedig a BC útvonal hozzájárul a poliaminok homeosztázisának szigorú szabályozásához, és mindkét útvonalon keletkezik hidrogén-peroxid is (Benkő és mtsai., 2022). Ez alól kivételt képezhet az AtPAO5, mely enzimről kutatások alapján inkább azt feltételezik, hogy a T-Spm homeosztázis szabályozásán keresztül fejti ki hatását a növények életfolyamataiban (Alabdallah és mtsai., 2017; Kaszler és mtsai., 2023, 2021; Kim és mtsai., 2014). Az AtPAO5 nem az oxigént használja elektron donornak, ezért inkább dehidrogenáz aktivitás köthető az enzimhez, így a működése nem jár H₂O₂ képződéssel (Ahou és mtsai., 2014).



3. ábra A PAO kládok fehérje szerkezete. Az ismert *Zea mays* (ZMPAO) és a *Mus musculus* (MMPAO) PAO-ok alapján a növényi I-V kládról molekuláris modellezéssel készített fehérje szerkezetek. Skála: %-ban kifejezett hasonlóságot jelent (Bordenave és mtsai., 2019).

4.4.3. A poliamin-oxidázok sejten belüli elhelyezkedése (lokalizációja), szubsztrát specifitása és szabályozása

A növényi PAO-ok eltérő szubsztrát specifitással rendelkeznek. Arabidopsisban az AtPAO1 a Spm és a T-Spm, az AtPAO3 a Spd, az AtPAO2 és az AtPAO4 a Spd és a Spm (Fincato és mtsai., 2011; Moschou és mtsai., 2008; Tavladoraki és mtsai., 2006), az AtPAO5 pedig a T-Spm visszaalakítását katalizálja (Kim és mtsai., 2014).

A PAO gének szövet, szerv, - és sejtspecifikus mintázatot mutatnak, mely fajoként eltérhet. Arabidopsisban az *AtPAO1* a virágban, azon belül is a porzóban és portokban, valamint a gyökérben, a tranzíciós zónában fejeződik ki. Az *AtPAO2*, az *AtPAO3* és az *AtPAO5* szintén leginkább a virágban expresszál, de az *AtPAO2* a virág mellett a hajtás és gyökér merisztémában, az *AtPAO5* pedig a szárban is kifejeződik. Ezzel szemben az *AtPAO4* a virágban kevésbé, inkább az idősebb levelekben expresszál (Fincato és mtsai., 2012; Takahashi és mtsai., 2010). A lúdfüvel ellentétben narancsban valamennyi PAO (*CsPAO1-6*) leginkább a

gyökérben fejeződik ki (Wang és Liu, 2015). A különböző PAO-ok szerv,-és szövetspecifikus eloszlását, annak más fajokhoz viszonyított különbségeit az említett növényeken túl gyapotban (Cheng és mtsai., 2017), lenben (Eom és mtsai., 2018), paradicsomban (Hao és mtsai., 2018) és uborkában (Wu és mtsai., 2022) is leírták.

Sejten belüli lokalizáció tekintetében az Arabidopsis AtPAO1 és AtPAO5 a citoplazmában, míg az AtPAO2, az AtPAO3 és az AtPAO4 a peroxiszómában található (Fincato és mtsai., 2011). Más növényeknél, pl kukoricában (Federico és mtsai., 1990) és rizsben (Liu és mtsai., 2014) az apoplastikus térben is találhatóak PAO-ok, árpában pedig TC reakciót katalizáló vakuoláris elhelyezkedésű PAO-ok (HvPAO1 és HvPAO2) is működnek (Cervelli és mtsai., 2004).

A lokalizáció funkcionális kapcsolatban állhat a katalizált reakció típusával is. Általánosságban megfigyelhető, hogy míg a terminális katabolizmus a sejten kívüli apoplastikus térben, addig a poliaminok visszaalakítása a peroxiszómában, illetve a citoplazmában játszódik le (Liu és mtsai., 2014; Wang és mtsai., 2019). Ezen túlmenően, a lokalizáció függvényében a PAO-ok különböző folyamatokat befolyásolhatnak a növényekben. A peroxiszómában található PAO-ok pl. hatással lehetnek a nitrogén monoxid (NO) és ROF metabolizmusra (Corpas és Barroso, 2018), míg az apoplastikus térben levők részt vehetnek a ROF termeléshez kötött hiperszenzitiv reakciók szabályozásában (Moschou és mtsai., 2008b).

A PAO gének indukálhatóak különböző stresszorok, illetve hormonok által (Yariuchi és mtsai., 2021). Ezeknek a folyamatoknak a részletes transzkripcionális szabályozásáról azonban viszonylag keveset tudunk. Arabidopsisban ismert az *AtPAO2* poszt-transzkripcionális szabályozása (Guerrero-González és mtsai., 2014). Mindemellett promóter analízissel igazolták, hogy számos stressz faktor és hormon hatással van az *AtPAO3* kifejeződésére (Podia és mtsai., 2023). Kukoricában, az auxin hormon hatás egyik közvetítője a ZmARF30 transzkripció faktor, mely a *ZmPAO1* promóteréhez képes kötődni (Liu és mtsai., 2022)

A PAO enzim aktivitása poliamin analóg molekulákkal gátolható, ilyenek az MDL-72,527 (Binda és mtsai., 1999), az 1,8-diaminooktán, az 1,12-diaminododekán, az N-prenylagmatin (G3), és a guazatin (Guaz), melyek irreverzibilisen gátolják a PAO aktivitását (Cona és mtsai., 2004).

4.5. A poliamin-oxidázok szerepe a reaktív oxigén formák (H₂O₂) képzésén keresztül a növények fejlődési, - és stresszválaszaiban

4.5.1. A poliamin-oxidázok kapcsolata a fejlődési folyamatokkal

A PAO általi H₂O₂ produkció fontos szerepet tölt be a sejtfal és szállító szöveti elemek differenciációjában. A *Zea mays* *ZmPAOI* gén túltermeltetése korai xilém-elem differenciációt indított el és befolyásolta a gyökér fejlődését transzgenikus dohány növényekben. Azonban a *ZmPAOI* túltermeltetése megemelkedett H₂O₂ szinttel járt együtt, ami megnövelte a programozott sejthalált elindító sejtek arányát is (Tisi és mtsai., 2011). Az AtPAO5 szintén szerepet játszik a xilém elemek differenciációjában Arabidopsisban, de azt nem a ROF hanem a T-Spm szintjének szabályozásán keresztül teszi (Ahou és mtsai., 2014; Alabdallah és mtsai., 2017). Az AtPAO5 feltételezhetően indirekt módon a T-Spm homeosztázis szabályozásán keresztül az auxin/citokinin szintekre hatva vesz részt folyamat szabályozásában (Alabdallah és mtsai., 2017).

Számos bizonyíték van arra vonatkozóan, hogy a PA-ok lebontásából származó H₂O₂ hozzájárul a sejtfal poliszacharidok keresztkötéséhez a sejtfal érése során (Cona és mtsai., 2006; Tisi és mtsai., 2011). A ZmPAO által termelt H₂O₂ a sebzés utáni sejtfal regenerálódásban (Tisi és mtsai., 2008), míg a rizs OsPAO7 általi ROF a portok sejtfalának lignin szintézisében játszik szerepet (Liu és mtsai., 2014).

A PAO a pollencső poláris növekedésének szabályozásában is részt vesz. Külsőleg alkalmazott PA kezelés képes a pollentömlő ROF szintjét módosítani és ezáltal befolyásolni annak növekedését (Benkő és mtsai., 2020). Az AtPAO3 génben mutáns növények pollen tömlői degenerált növekedést mutatnak (Wu és mtsai., 2010). A Spd képes a Ca²⁺ csatornákat aktiválni. A Ca²⁺ csatorna aktiválása, valamint a csúcsi ROF felhalmozódás pedig elengedhetetlen a pollen tömlő növekedéséhez (Scholz és mtsai., 2020). A Spd kezelés hatása nem érvényesül az Arabidopsis *pao3* mutánsban, feltehetően azért, mert a Spd PAO3 általi lebontásából származó ROF szükséges a pollencső megfelelő növekedéséhez (Wu és mtsai., 2010).

A PA és lebontásuk szerepet játszik stressz adaptáció során is a Ca²⁺ és K⁺ áramlás indukciójában (Pottosin és mtsai., 2012), ami szintén alátámasztja a PA-PAO-ROF-Ca²⁺ jelátviteli kapcsolat fontosságát az egyes folyamatokban.

4.5.2. A poliamin-oxidázok szerepe az öregedés (szeneszcencia) és a programozott sejthalál során

A PAO általi ROF produkció szerepét a levelek öregedése során több tanulmányban is leírták. Árpában a PAO aktivitás gátlása késelteti a szeneszcenciát. A PAO gátlásának eredményeképpen csökken a H₂O₂ szint és emelkedik a Spd koncentrációja (Sobieszczyk-Nowicka és mtsai., 2016). Ehhez hasonlóan, Arabidopsis *pao4* mutánsok is késeltetett szeneszcenciát és csökkent H₂O₂ tartalmat mutattak (Sequera-Mutiozabal és mtsai., 2016).

A szeneszcenciához hasonló folyamat zajlik le a gyümölcs érése során is, melyben szintén részt vesz a PAO. Az éréshez az azt elősegítő hidrogén-peroxid termeléssel járul hozzá (Agudelo-Romero és mtsai., 2013; Tavladoraki és mtsai., 2016; Wang és mtsai., 2021).

A PAO általi H₂O₂ szerepet játszik a programozott sejthalál kiváltásában is a fejlődési folyamatok, mint pl. a xilém differenciáció során (Tisi és mtsai., 2011). A fejlődési folyamatok mellett, a PAO általi ROF szerepét biotikus (Yoda és mtsai., 2006, 2003) és abiotikus stressz során is kimutatták a programozott sejthalál kialakításában (Gémes és mtsai., 2016; Moschou és mtsai., 2008a). A *ZmPAOI*-et túltermelő transzgénikus dohány növények magasabb H₂O₂ szinttel rendelkeznek, mely fiziológiás körülmények között nem, de stresszhatásra hozzájárul a programozott sejthalál beindításához (Gémes és mtsai., 2016; Moschou és mtsai., 2008a).

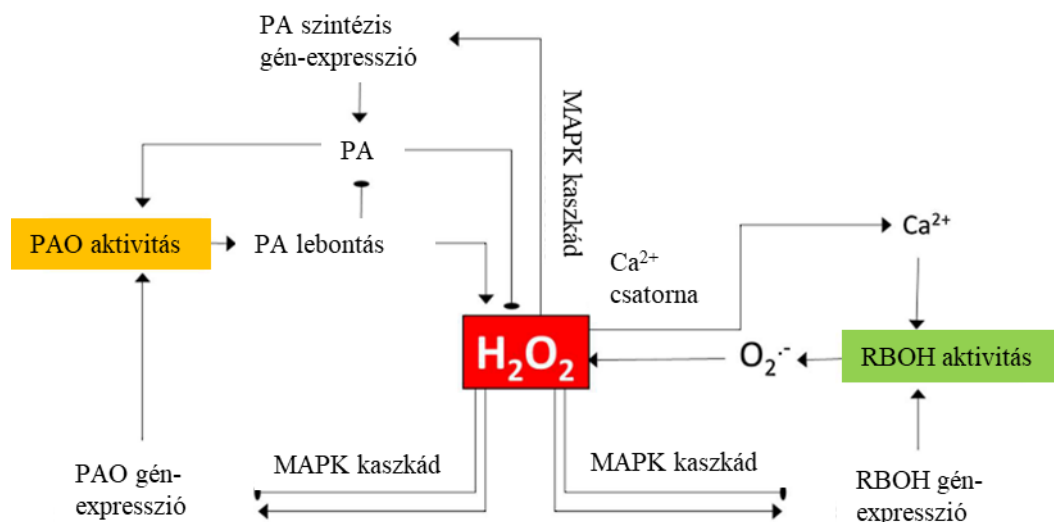
4.5.3. A poliamin-oxidázok szerepe az abiotikus stresszválaszokban

A PAO általi ROF produkció hatása a különböző stresszfolyamatokban koncentrációfüggő. A keletkező ROF alacsony koncentrációban különböző jelátviteli utakon keresztül képes aktiválni azokat az antioxidáns mechanizmusokat, amelyek segítik a stresszel szembeni védekezést, a sikeres akklimatizáció létrejöttét. Magas koncentrációban azonban a ROF felhalmozódása oxidatív stresszt, végső soron sejthalált és a növényi egyed pusztulását eredményezi (Wang és mtsai., 2019; Yu és mtsai., 2019). A PAO hatását már számos abiotikus stresszválaszban tanulmányozták. Szárazságstressz során kimutatták a PAO függő H₂O₂ termelés fontosságát az ABS indukált gázcsere nyílások (sztóma) zárodásában (Desikan és mtsai., 2006; Konstantinos és mtsai., 2010). Sóstressz alatt narancsban (*Citrus sinensis*) a CsPAO4 izoenzim játszik szerepet az oxidatív stresszt kiváltó H₂O₂ produkcióban. Hasonló szerepük van a PAO-eknek magas szelén vagy alumínium koncentráció okozta stressz alatt is (Wang és Liu, 2016; Wang és mtsai., 2019; Yu és mtsai., 2018). Transzgénikus dohány

növényekben, ahol a PAO működése alulszabályozott (AS-ZmPAO) csökkent a hőstressz általi H_2O_2 produkció, aminek eredményeképpen ezek a növények emelkedett termotoleranciát mutattak (Mellidou és mtsai., 2017). Arabidopsisban a PAO5 és a PAO1 játszik szerepet a sótolerancia kialakításában. Arabidopsis *pao5* mutáns sótoleráns fenotípust mutat, igaz nem a ROF szintekben bekövetkezett változás, hanem a megváltozott T-Spm szint következtében (Zarza és mtsai., 2017). Érdekes módon Arabidopsis *pao1pao5* dupla mutáns növény, melyben a citoplazmatikus PAO teljesen hiányzik, szintén sótoleráns. Ezekben a dupla mutáns növényekben sókezelés hatására kisebb mértékű hidrogén-peroxid szint emelkedés figyelhető meg a vad típusú növényhez képest (Sagor és mtsai., 2016). Peroxiszómális PAO-t nem tartalmazó Arabidopsis mutánst nem sikerült létrehozni, aminek az az oka, hogy a peroxiszómális PAO-ok teljes hiánya feltehetően letális. Ugyanakkor a *pao2pao4* dupla mutáns a *pao1pao5* dupla mutánssal szemben sóérzékeny (Sagor és mtsai., 2016). Ezek a megfigyelések rávilágítanak arra, hogy a különböző PAO-ok aktivitástól, illetve lokalizációtól és lebontási reakció mellékterméktől függően különböző módon vesznek részt az egyes abiotikus stresszfolyamatok szabályozásában.

4.6. A poliamin oxidáz és NADPH oxidáz kapcsolata a növények fejlődési, - és stresszválaszaiban

A PA-ok PAO-ok általi lebontásából, valamint az RBOH működéséből származó ROF, gyakran egyidőben, vagy késleltetve, de ugyanazokat a folyamatokat befolyásolja. Ezért a ROF homeosztázis szabályozásán keresztül akár funkcionális kapcsolat is feltételezhető a két enzim között (Benkő és mtsai., 2022). Jelenlegi ismereteink szerint a PAO és NADPH oxidáz aktivitás hipotetikus kapcsolatát a 4. ábra foglalja össze.



4. ábra PAO és NADPH oxidázt összekötő lehetséges jel-átviteli útvonalak. Mindkét enzim működése H₂O₂ képződéssel jár. A H₂O₂ képes MAPK kináz kaszkádot elindítani, ami génexpressziós változásokhoz vezethet. A változás egyaránt lehet pozitív vagy negatív. A H₂O₂ szintén képes aktiválni azokat a géneket, melyek a poliamin bioszintézisben vesznek részt. A poliamin képes antioxidánsként kioltani a ROF molekulákat, de szubsztrátként szolgál a poliamin oxidázoknak is és lebontásuk során H₂O₂ képződik. A H₂O₂ szintén képes Ca²⁺ csatornák szabályzására is. A Ca²⁺ pedig az RBOH aktivitását befolyásolja. A két enzim kölcsönhatása lehet közvetett és közvetlen (például más ROF kioltó mechanizmusok is összeköthetik a két enzimet). PAO: poliamin oxidáz, RBOH: NADPH oxidáz, PA: poliamin MAPK: mitogén aktivált protein kináz (Benkő és mtsai., 2022)

4.6.1. A PAO működése során képződő H₂O₂ hatása a NADPH oxidáz aktivitásra

Számos tanulmány támasztja alá, hogy a PA-ok PAO általi lebontásából származó H₂O₂ befolyásolja az RBOH enzimek aktivitását. Andronis és mtsai. (2014) kimutatták, hogy *Arabidopsis pao3* mutáns növényekben megemelkedett a NADPH oxidáz aktivitása, ami többlet szuperoxid gyökanyon termeléshez vezetett, de a H₂O₂ szint a várakozásokkal ellentétben nem változott, feltehetően azért, mert a NADPH oxidáz aktiválta a mitokondriális alternatív oxidázokat. Az *AtPAO3* túltermelése pedig szintén szuperoxid többletet eredményezett, de ebben az esetben, a szuperoxid gyökanyon egyensúlyban, H₂O₂ is keletkezett. Mindebből arra következtettek, hogy a szuperoxid gyökanyon és a hidrogén-peroxid aránya befolyásolja a mitokondriális respirációs láncot, az *AtPAO3* pedig szabályozhatja ezt az egyensúlyt a NADPH oxidáz aktivitásának befolyásolásán keresztül (Andronis és mtsai., 2014).

Pseudomonas syringae bakteriális fertőzés hatására szintén megfigyelték az RBOH PAO-okkal való kölcsönhatását. *Arabidopsis*-ban a fertőzés az *AtPAO1* és *AtPAO2* génexpressziójának emelkedését okozta. A PAO bakteriális fertőzés elleni védekezésben betöltött szerepét mutatja az is, hogy az *Arabidopsis* dupla mutáns *pao1-1pao2-1* érzékenyebb lett a

fertőzésre. A mutánsban nem csak a H_2O_2 , hanem az $O_2^{\cdot-}$ szint is megemelkedett, ami többek között az RBOH enzimek fokozott aktivitásával is összefüggésbe hozható. *pao1-1pao2-1* dupla mutánsban csökkent az *AtRBOHD* és *AtRBOHF* relatív expressziója. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a Spm oxidációja a peroxisómális PAO-ok által negatívan szabályozza az RBOH aktivitását, de a pontos molekuláris mechanizmus még nem ismert (Jasso-Robles és mtsai., 2020).

4.6.2. A NADPH oxidáz ROF-on keresztül befolyásolja a PAO aktivitását

Sóstressz alatt dohányban a NADPH oxidáz általi ROF fokozza az NtPAO1 aktivitását. Mindemellett, az apoplastikus PAO aktivitása pozitívan befolyásolja a NADPH oxidáz transzkripcióját és aktivitását. A PAO és a NADPH oxidáz együtt egy ROF termelő pozitív visszacsatolási kört alkotnak a folyamatban (Gémes és mtsai., 2016). A programozott sejthalál kialakítása során, a NADPH oxidáz által generált ROF egy kaszkád reakciót indít, ami szükséges a későbbi PAO általi H_2O_2 termelő fázis bekapcsolásához (Yoda és mtsai., 2006). Ezzel ellentétben, szárazságstressz alatt, a NADPH oxidáz aktivitásának eredményeképpen keletkező ROF gátolja a PAO aktivitását (Demiralay és mtsai., 2022).

4.6.3. A poliamin metabolizmus kapcsolata a NADPH oxidáz enzimekkel

A LUPA (Longer uncommon polyamines) molekulák képesek aktiválni a PAO-t és indukálni az RBOH géneket (Sagor és mtsai., 2013). Dohány protoplaszt sejtekben a sejt kultúrához adott poliamin csökkentette a NADPH oxidáz generálta szuperoxid gyökanyon képződést (Papadakis és Roubelakis-Angelakis, 2005). A poliaminok RBOH-ra kifejtett szabályozó hatását vizsgálták sóstressz alatt SAMDC túltermelő dohány növényekben és azt tapasztalták, hogy a magasabb PA szint csökkent *NtRBOHD* és *NtRBOHF* gén-kifejeződéssel járt együtt. Mindebből arra a következtetésre jutottak, hogy a poliaminok képesek sóstressz alatt a NADPH oxidáz általi ROF termelést befolyásolni (Seo és mtsai., 2019). A PA-ok NADPH oxidáz gátló hatását lótuszban és uborkában is leírták (Shen és mtsai., 2000; Cuevas és mtsai., 2004). Uborkában a Spd kezelés hatására csökkent a NADPH oxidáz aktivitása, a kisebb mértékű szuperoxid gyökanyon termelés következtében pedig elkerülhető volt a ROF felhalmozódása fagystressz alatt (Shen és mtsai., 2000). A PA-ok fokozhatják is a NADPH oxidáz aktivitását (Xu és mtsai., 2021). Barackban, külső PA kezelés hatására megemelkedett

az RBOH aktivitása és génexpressziója, ami csökkentette a patogének okozta károsodás mértékét (Li és mtsai., 2019).

Ugyanakkor, a NADPH oxidáz gátlása difenilén jodóniummal (DPI) csökkentette, míg külső hidrogén-peroxid kezelés növelte a poliaminok szintézisét az ADC és AIH aktivitásának befolyásolásán keresztül szárazság stressz alatt (Demiralay és mtsai., 2022). Mindemellett, a DAO és PAO gén-expressziója is magasabb volt DPI kezelés hatására és alacsonyabb hidrogén peroxid kezelésre, ami arra utal hogy az RBOH általi ROF hozzájárul a poliamin bioszintézis és lebontás szabályozásához is (Demiralay és mtsai., 2022).

4.6.4. A PAO és a NADPH oxidáz együttműködése a növények fejlődési válaszaiban

A PAO és RBOH közötti kapcsolat jól szemléltethető a zárósejtek működésének szabályozása során. A zárósejtek csukódását számos stressz faktor és hormon befolyásolja. A H₂O₂ aktiválja a Ca²⁺ ioncsatornákat, aminek eredményeképpen megemelkedik a citoszólikus Ca²⁺ koncentráció, jelátviteli utak aktiválódnak és a zárósejtek becsukódnak (Pel és mtsai., 2000). A H₂O₂ pedig megemelheti a O₂⁻ -produkción az RBOH aktivitásának befolyásolása által. Kukorica levélben, az ABS indukált sztómazáródás során a NADPH oxidázok, a peroxidázok és a PAO együtt járul hozzá a ROF termeléshez, de a H₂O₂ termelésben az RBOH-k szerepe a legjelentősebb (Zhu és mtsai., 2006).

Arabidopsisban a külső PA kezelés hatására megemelkedett ROF szintén befolyásolja a zárósejtek működését, feltételezhetően a PAO révén. A PAO és NADPH oxidáz együttes szerepét erősíti az a tény is, hogy a PA indukált sztómazáródás csak mindkét enzim gátlásával valósulhatott meg (Agurla és mtsai., 2018). Az etilén indukált sztómazáródás során az Arabidopsis RBOHF enzim a legjelentősebb eleme a ROF termelésnek (Desikan és mtsai., 2006). Az etilén a PAO-ok működésének szabályozásán keresztül is hathat a sztómazáródásra. Az epidermisz nyúzatokon végzett kísérletek során a PAO enzim gátlása megakadályozta az etilén indukált sztómazáródást (Hou és mtsai., 2013). Ennek háttérében az állhat, hogy az etilén szabályozhatja az *AtPAO2* és *AtPAO4* gének kifejeződését. Ha ezeket a géneket túltermeltették, fokozódott az etilén érzékenység a sztómazáródás során (Hou és mtsai., 2013). Összességében bár a sztómazáródás során a NADPH oxidáz a fő ROF termelő enzim, a PAO ROF-on keresztüli szabályozása is feltételezhető a folyamatban.

4.6.5. A PAO-NADPH oxidáz kölcsönhatása a stressz akklimatizációs folyamatokban

A PAO és a NADPH oxidáz kölcsönhathat egymással a növények stresszválaszaiban is. A két enzim együttműködését a sikeres alkalmazkodás létrejöttében leírták sóstressz és alumínium stressz alatt is (Gémes és mtsai., 2016; Yu és mtsai., 2018).

Hasonló eset figyelhető meg a növények steril nevelése során tapasztalható ún. hiperhidricitás során. A jelenséget mutató növények sárga színűek, üvegszerűek és *in vitro* nehezebben szaporíthatók. Hiperhidricitás során oxidatív stressz alakulhat ki, melyben az RBOH szerepe jelentősebb, de kisebb mértékben a PAO is hozzájárul a ROF keletkezéséhez (Tian és mtsai., 2017).

Az RBOH fontos szerepet játszik a sebzésre és jázmonsav kezelésre adott növényi válaszokban is (Liu és mtsai., 2008; Marino és mtsai., 2012; Sagi és mtsai., 2004). A NADPH oxidáz gátlása azonban csökkentheti a metil-jázmonát által indukált ROF termelést (Hung és Kao, 2007; Liu és mtsai., 2005; Orozco-Cárdenas és mtsai., 2001). Azokban a növényekben, melyekben gátolt a NADPH oxidáz enzim, vagy mutáció van az *AtRBOHD*, vagy az *AtRBOHF* génben, jázmonsav kezelés hatására kisebb mértékű a H₂O₂ felhalmozódása (Maruta és mtsai., 2011). Ezzel ellentétben, kukoricában a metil jázmonát általi ROF képződésben nem az RBOH, hanem a PAO játszik kiemelkedő szerepet sebzés alatt (Tisi és mtsai., 2008).

4.6.6. A PAO-NADPH oxidáz enzimek együttműködése más jelátviteli útvonalakkal

A melatonin a növényekben is fontos szereppel bíró multifunkcionális jelátviteli molekula (Back, 2021). Paradicsom oldalgyökér növekedése során a melatonin párhuzamosan szabályozza a *SIPA01* és az *SIRBOH3* gének működését (Chen és mtsai., 2019).

Kriptogén által kiváltott patogén válasz során megfigyelték, hogy a fertőzés korai stádiumában a ROF forrása a NADPH oxidáz, ami egy MAPK kináz kaszkádot is elindít, mely a későbbi ROF termeléshez szükséges és melynek során már a PAO a fő ROF termelő enzim (Yoda és mtsai., 2006).

5. A dohány és lúdfű, mint modellnövények

A közönséges dohány (*Nicotiana tabacum*) kétszikű növény a Solanales rend, Solanaceae családjába tartozik. Fontos ipari növény, kozmetikai-szerek, gyógyszerek és dohány termékek alapanyaga (Zou és mtsai., 2021). A világon kb 4,2 millió hektáron termelnek dohányt (wikipédia). Széles körű felhasználását alátámasztja, hogy több ezer bejegyzett termesztett variánsa létezik (<https://www.genesys-pgr.org/>). Könnyen transzformálható, *in vitro* sejtkulturában jól fenntartható és jól regenerálható (Ganapathi és mtsai., 2004). Mindemellett rokonságot mutat számos fontos élelmiszer növényünkkel (paradicsom, paprika burgonya) (Sierra és mtsai., 2014). Mindezek végett, laboratóriumi körülmények között kiválóan használható modell növényként. A közönséges dohány 2 faj hibridizációjaként keletkezett kb. 200.000 évvel ezelőtt. Ősei a *Nicotiana sylvestris* ($2n=24$,) és *Nicotiana tomentosiformis* ($2n=24$,). A Dohány allotetraploid ($2n=4x=48$), genom mérete 4,5 gigabázispár, mely rengeteg ismétlődést tartalmaz (Edwards és mtsai., 2017).

A teljes genom szekvencia több dohány változat esetén is elérhető, a Solgenomics szabadon hozzáférhető adatbázisában (<https://solgenomics.net/>) *N. tabacum* TN90. *tabacum* BX és *N. tabacum* K326).

A közönséges lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) a Brassicales rend Brassicaceae családjába tartozó kétszikű növény. Egyéves növény, 20–25 cm magasra nő. Rövid élet ciklusú, hosszú nappalos, növény. A lúdfű a molekuláris növénybiológiai kutatások egyik legismertebb és leginkább használt modellnövénye, hiszen 2000-ben elsőként ennek a növénynek szekvenálták meg sikeresen a teljes genetikai állományát. Mára már a hagyományos ökotípus vonalak mellett, mint a Columbia (Col) és a Landsberg erecta (Ler) vonalak, számos egyszeres és többszörös mutáns vonal hozzáférhető kutatási célból (Koornneef és Meinke, 2010; Meinke és mtsai., 2012).

6. Protoplasztok, mint modellrendszer

Az állati és növényi sejt között az egyik legjelentősebb eltérés a sejtfal megléte. A növényi sejtfal a plazma-membránt burkoló külső védelmi réteg, mely strukturális támaszt ad a sejtnek, és meghatározhatja annak alakját. Az elsődleges sejtfal felépítése 1-4 β D-glükóz polimer váz, melyhez hemicellulóz (egyéb cukrokból úgymint glükóz, xilóz, galaktóz, fruktóz és mannóz monomerekből felépülő poliszacharidok) kapcsolódhat. A galakturonsavat

tartalmazó pektin szintén része az elsődleges sejtfallaknak. Mindemelett, számos strukturális fehérje is részét képezi (Cosgrove, 2005; Wolf, 2022). Cocking dolgozta ki 1960-ban az első enzimátikus úton történő növényi protoplaszt izolálási módszert (Cocking, 1960). A növényi protoplasztok létrehozása jellemzően a sejtfallak enzimek általi elemésztésével történik. Általában levél és gyökér szöveteket, valamint kallusz, vagy sejt kultúrákat alkalmaznak erre a célra. Az izoláláshoz leggyakrabban használt enzimek a celluláz és a macerozim (Fowke és mtsai., 1983; Pasternak és mtsai., 2021; Sangra és mtsai., 2019; Takebe és mtsai., 1968; Yoo és mtsai., 2007). A Celluláz Onozuka R-10, például egy a *Trichoderma viride*-ből izolált több funkciós enzim. Celluláz aktivitása révén az 1,4- β -D-glükózidos kötéseket képes hidrolizálni, az α -amiláz aktivitása az 1,4- α -D-glükózidos kötések megbontásáért felel, míg a pektináz aktivitás az α -1,4 kötéssel egymáshoz kapcsolódó, D-galakturonsav monomerek kötéseit bontja fel. A hemicellulóz aktivitás, mint pl.: xilanáz a xilán cukrokat bontja ki a sejtfallakból. A macerozim pedig erősebb hemicellulóz és pektináz aktivitással rendelkezik, ezért általában kombináltan használják őket (Beldman és mtsai., 1985; Takebe és mtsai., 1968). Fontos megemlíteni, hogy az izoláláshoz használt módszer és a kiindulási növényi anyaga hatással van a protoplaszt mennyiségére és minőségére. A sejtszám, az életképesség, a sejtosztódás, illetve a regenerációs képesség a szöveti eredettől, az életkortól, a fajtól és az ökitípustól is függ (Fehér és mtsai., 2003; Masani és mtsai., 2013; Papadakis és Roubelakis-Angelakis, 1999; Reed és Bargmann, 2021). A létrehozott protoplasztok mennyiségét és életképességét szintén befolyásolja az enzimátikus emésztés folyamata. Megfelelő ozmotikus környezet, emésztő enzim koncentráció, valamint tápanyagok és hormonok jelenléte szükséges. Ezeket a faktorokat gyakran fajoként és a kísérleti cél szerint is optimalizálni kell (Cocking, 1960; Jeong és mtsai., 2021; Reed és Bargmann, 2021; Ruesink, 1978; Uchimiya és Murashige, 1974). *Nicotiana* sp. növény esetén például az izolált protoplasztok életképességének optimuma 1% celluláz, 0,2-0,4% macerozim, 0,4-0,6 M mannitol, vagy szacharóz alkalmazásával érhető el (Nagy és Maliga, 1976; Takebe és mtsai., 1968; Uchimiya és Murashige, 1974; Yamada és mtsai., 1972). A protoplasztok fenntartásához és osztódásuk biztosításához szintén megfelelő ozmotikus közeg, tápanyagok valamint hormon utánpótlás szükséges. A protoplaszt sejt kultúrák hormonként auxint és citokinint, energia forrásként pedig leggyakrabban glükózt/szacharózt tartalmaznak (Caboche, 1980; Jeong és mtsai., 2021; Pasternak és mtsai., 2000; Yau és mtsai., 2011). A sejt kultúrák fenntartása általában steril körülmények között történik, de ez nem feltétlen szükséges (Yoo és mtsai., 2007).

A kutatások során rendszerint mezofillum eredetű protoplasztokat használnak, ezek a sejtek nagyobbak mint a gyökér, vagy hipokotil eredetű protoplasztok és különböznek abban

is, hogy nagy mennyiségben tartalmaznak klorofillt plasztisztaikban (Xu és mtsai., 2021). A protoplasztok funkcionális vizsgálatát számos technika teszi lehetővé. Fluoreszcens próbákkal lehetőség van a sejtfalképződés, az életképesség, a Ca^{2+} , illetve a ROF szintek változásainak nyomon követésére. Mindemellett, az egyedülálló sejtek alkalmasak lehetnek különböző ioncsatorna áramok vizsgálatára, valamint funkcionális, genomikai és proteomikai analízisekre is (Gilliard és mtsai., 2021). A protoplasztokból transzformánsok is létrehozhatóak genetikai módosítások végrehajtása által. A makromolekulák sejtbe juttatására kidolgozott módszerek között szerepel például az RNS vagy DNS protoplasztba juttatása PEG-kálcium vagy elektroporáció által indukált transzformációval (Yoo és mtsai., 2007). Mindemellett Cas9 és gRNS kapcsolódásából létrehozható ribonukleoprotein komplexek is bejuttathatók a protoplaszt sejtekbe a membránon keresztül (Yue és mtsai., 2021). A protoplaszt sejtek vagy azok transzformánsai felhasználhatóak jelátviteli folyamatok, valamint membrántranszport folyamatok vizsgálatára is (Hamilton és mtsai., 2000; Moran és mtsai., 1984; Schroeder és mtsai., 1984).

A protoplasztok biotechnológiai jelentőséggel is bírnak, hiszen különleges regenerációs képességekkel rendelkeznek. Az izolált protoplaszt totipotens, így megfelelő körülmények között képes regenerálni sejtfalát, majd akár az egész növényt is (Chupeau és mtsai., 2013). Azonban akadnak olyan fajok, amelyek nem képesek erre, ilyenek egyes gabonafélék (Papadakis és Roubelakis-Angelakis, 2002). A regenerációt számos transzkripciós faktor és stressz válasz gén befolyásolja. A folyamat során különböző, a kromatin szerkezetet befolyásoló gén aktiválódik és epigenetikai változások is lezajlanak (Chupeau és mtsai., 2013; Reed és Bargmann, 2021; Xu és mtsai., 2021).

Összegezve, bár a protoplasztok számos *in vitro* vizsgálatra adnak lehetőséget és a növényregenerálás alapjául is szolgálhatnak, előállításuk és fenntartásuk speciális körülményeket igényel. Mindemellett, az izolálás folyamata oxidatív stresszt okoz, melynek mértéke hatással lehet a kultúra fenntartására (Gilliard és mtsai., 2021).

6.1. A ROF és a poliaminok szerepe a protoplaszt tenyészetekben.

A protoplaszt izolálást követően ún. oxidatív robbanás történik, melyben a NADPH oxidáz aktívan részt vesz (Pasternak és mtsai., 2005; Tewari és mtsai., 2012). Dohány protoplasztok regenerációs képessége összefüggésben áll a sejtek antioxidáns kapacitásával (Papadakis és mtsai., 2001). A NADPH oxidáz működése során keletkezett ROF okozhat programozott

sejthalált (Tewari és mtsai., 2012), de a sejtek osztódásának indukálásával elindíthatja a regenerációs folyamatokat is (Pasternak és mtsai., 2005, 2007).

A poliaminok képesek befolyásolni a protoplasztok ROF szintjét. Vadkáposzta (*Brassica oleracea*) növényben a Put és Spd kezelés csökkentette az oxidatív stressz mértékét és így elősegítette a sejtosztódást és a regenerálódást (Kielkowska és Adamus, 2021). A Put NADPH oxidáz gátlásán keresztüli oxidatív stresszt mérséklő hatását dohányban is leírták (Papadakis és Roubelakis-Angelakis, 2005). Ezzel ellentétben cukorrépában a Spm bizonyult hatékonynak, bár ennél a növénynél a protoplasztok izolálása és fenntartása során a NADPH oxidáz szerepe nem ismert (Majewska-Sawka és mtsai., 1997). Bab protoplasztban a Put és Spd szint sejtosztódás előtti megemelkedését írták le, míg az izolálás után, osztódás helyett korai szenescenciát mutató zab protoplasztokban csökkent ugyanezeknek a poliaminoknak a szintje. A PA-ok jelentőségét ezekben a folyamatokban alátámasztja, hogy a bioszintézisük gátlása negatívan befolyásolja a protoplasztok osztódási képességét (Sawhney és mtsai., 1985). Ugyanakkor a külső PA kezelés többnyire segíti az osztódási folyamatokat (Papadakis és Roubelakis-Angelakis, 2005; Kielkowska és Adamus, 2021). Bár a poliaminok hatása ezekben a folyamatokban közvetett, kapcsolatba hozható a ROF semlegesítésével. Ezért érdekes lehet lebontásuk tanulmányozása is, hiszen ott ROF képződik. A PAO aktivitásának növekedését már kimutatták Arabidopsis (Fincato és mtsai., 2011), árpa (Cervelli és mtsai., 2001), zab (Kaur-Sawhney és mtsai., 1981), dohány és szőlő (Papadakis és Roubelakis-Angelakis, 2005) protoplaszt kultúrákban izoláláskor, vagy a kultúra fenntartása során. Azonban szerepük, esetleges kölcsönhatásaik pl. a NADPH oxidáz enzimmel a folyamat során még nem tisztázott.

7. Célkitűzések

Munkám során célom volt felderíteni a molekuláris modellként is használt, de gazdaságilag is jelentős dohány növény (*Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin 38) poliamin oxidáz izoenzimeket kódoló géneket, és funkcionálisan jellemezni őket.

Ennek során a következő célokat tűztem ki:

- A dohányban található PAO gének azonosítása, szekvenenciaanalízise és filogenetikai kapcsolatainak felderítése más fajok, nevezetesen lúdfű, paradicsom, rizs és kukorica PAO génekkel
- A dohányban található PAO gének szervspecifikus kifejeződésének vizsgálata
- Különböző abiotikus stressz és hormonkezelések hatásának vizsgálata a dohányban található PAO gének kifejeződési mintázatára
- Dohány PAO gének szerepének vizsgálata protoplaszt kultúrák létrehozása és fenntartása során
- A NADPH oxidáz, azon belül is az RBOHD vizsgálata a ROF keletkezésében dohány protoplasztok izolálása és fenntartása során.
- A PAO és NADPH oxidáz kölcsönhatásának vizsgálata dohányban, a levél protoplasztok izolálása és fenntartása során. A két enzim általi ROF felszabadulás hatásának vizsgálata a protoplasztok életképességére.
- A PAO és NADPH oxidáz együttműködésének vizsgálata Arabidopsisban. A *PAO5*, az *RBOHD* és *RBOHF* kölcsönhatásának tanulmányozása az oldalgyökérprimordiumok hajtásmerisztémává történő átalakulása során.

8. Anyagok és módszerek

8.1. Növénynevelési paraméterek

Kísérleteinkhez *Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin 38 vad típusú, valamint *AS-NtRBOHD* transzgenikus (Ji és Park, 2011). illetve *Arabiopsis thaliana Columbia-0 (Col-0)* ökotípusú, vad típusú és Col-0 háttérű *pao2-2*, *pao3*, *pao4*, *pao5-2*, *rbohd* és *rboh* mutáns növényeket használtunk. Az Arabidopsis mutáns vonalakat a NASC magközpontból (<https://arabidopsis.info/BasicForm>) szereztünk be (*rbohd* (SALK_120299C); *rboh* (SALK_034674C) *pao2-2* (SALK_046281C); *pao3* (SALK_121288C); *pao4* (SALK_133599C); *pao5-2* (SALK_053110C)). Csíráztatás előtt a magokat mindkét faj esetében sterilizáltuk. Ehhez először 70% etil-alkoholban 1 percig, majd 4%-os domestosban (nátrium-hipoklorit) 10 percig áztattuk, majd 5 alkalommal steril vízzel mostuk a magokat. A szilárd steril táptalajra való helyezés előtt a sterilizált magokat 24 órán át 4°C-on tartottuk. A csíráztatáshoz használt táptalaj összetevői: 1/2 MS+ Gambourg B5 vitaminok (Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, The Netherlands,) 1% szacharóz (Molar Chemicals Hungary) 0,6% plant agar (Duchefa Biochemie). A táptalaj pH-ja 5,7-5,8 volt, melynek beállítása 1M KOH segítségével valósult meg. A csíráztatás növénynevelő kamrákban (Fitoclima S 600 PLH, Aralab, Portugal) történt, melynek paraméterei a következők voltak: 22°C, 50% relatív páratartalom. A kísérleti elrendezéstől függően a fényperiódus 16 vagy 8 óra fény szakasz és ennek megfelelően 8 vagy 16 óra sötét szakasz volt. A PAO gének szervspecifikus kifejeződésének vizsgálatához a dohány növényeket nem steril táptalajon, hanem talajkultúrában, cserepekben neveltük, üvegházi körülmények között (ld. később).

8.1.1. Dohány növények kezelése, mintavétel

8.1.1.1. Abiotikus stressz kezelések:

A sóstressz laboratóriumi modellezéséhez, a 16/8 fény perióduson, steril körülmények között nevelt, 2 hetes dohány növényeket kezeltük a táptalajhoz adott 150 mM NaCl (Molar chemicals) alkalmazásával, 6 napon keresztül. A sókoncentrációt Moschou és munkatársai dohánnyal végzett kísérletei alapján választottuk (Moschou és mtsi., 2008b). A hőmérsékleti stressz vizsgálatához 2 hetes növényeket használtunk. A magas hőmérsékleti stressz kiváltása 42°C -on, fényen történt, 5 órán keresztül. Az alacsony hőmérsékleti stressz kiváltásához 8/16

órák fény és sötét perióduson (rövid nappal) nevelt növényeket használtunk, a hideg kezelést pedig a sötét periódus alatt végeztük el, 4°C.-on. A sebzési választ 4 hetes dohány növény fiatal levelein vizsgáltuk, a sebzést követő harmadik órában (Moschou és mtsi., 2008d). Az egyes stressz kezeléseket után mintát vettünk mind a kontroll, mind pedig a kezelt növények leveléből. A mintákat felhasználásukig -80°C-on tároltuk.

8.1.1.2. In vitro hormon és H₂O₂ kezeléseket:

Ezekhez a kezeléseket steril üvegben (ld.: protoplaszt növénynevelés), rövid nappalon (8/16 órák fény/sötét periódus) nevelt négyhetes dohány növények fiatal leveleit használtuk. A különböző hormon és hidrogén-peroxid törzsoldatokat 50 mM foszfát pufferben (pH 6,5) hígítottuk a megfelelő koncentrációra. 9 cm-es üveg Petri csészékben 3 órák keresztül kezeltük a leveleket ugyanazon a fényen, amelyen nőttek. A 3 órák inkubációt rövid 5 perces vákuum kezelés előzte meg. A kezelés során alkalmazott koncentrációk a következők voltak: 5 mM H₂O₂ (AnalaR, NORMAPUR) (Demiralay és mtsi., 2022; Hafez és mtsi., 2012); 10 µM indole-3-ecetsav (IES) (Duchefa Biochemie); 100 µM abszcizinsav (ABS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, United States); 10 µM kinetin (Sigma-Aldrich) 10 µM; gibberellinsav: (GA₃) (Sigma-Aldrich). A hormon kezeléseket az alkalmazott koncentrációkat és idő intervallumokat korábbi Arabidopsis-on és dohányon végzett kísérletek alapján választottuk meg: IES és kinetin (Yariuchi és mtsi., 2021) ABS (Jiu és mtsi., 2016) GA₃ (Zhou és mtsi., 2014). A kezeléseket után a leveleket folyékony N₂ segítségével lefagyasztottuk és felhasználásukig a mintákat -80°C-on tároltuk.

8.1.1.3. Mintavétel a PAO gének szerv specifikus kifejeződésének vizsgálatához

Ehhez az üvegházban 23°C-os standard hőmérsékleten, hosszú nappalon (16/8 órák fény/sötét periódus) cserepekben, talajkultúrában nevelt, rendszeresen öntözött 14 hetes virágzó növényeket használtunk. A vizsgálatokhoz mintát gyűjtöttünk a növények felső fiatal leveléből, szárából, gyökeréből és virágából és folyékony N₂ segítségével lefagyasztottuk őket, majd felhasználásukig -80°C-on tároltuk.

8.1.2. Lúdfű növények kezelése, mintavétel

8.1.2.1. Génexpressziós vizsgálatok csíranövényekből

Ehhez steril táptalajon, növénynevelő kamrában hosszú nappalos körülmények között nevelt 7 napos csíranövényeket használtunk, melyeket a mintavétel után folyékony N₂ segítségével lefagyasztottunk, majd felhasználásukig -80°C-on tároltuk.

8.1.2.2. In vitro regenerációs rendszerek létrehozása, mintavétel

A direkt organogenezis vizsgálatához Kaszler és munkatársai (2021) által kidolgozott rendszert használtuk. A sterilizált magokat négyzet alakú Petri-csészéken csíráztattuk, steril táptalajon, melynek összetétele a következő volt: 1% D(+)-szacharóz (Molar Chemicals KFT, Halásztelek, Magyarország), 0,6 % agaróz (Electran, DNA pure grade for electrophoresis; VWR International LLC, Radnor, Pennsylvania, Egyesült Államok), 1,25 µM 2,3,5-trijód-benzoésav (TIBA) (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Svájc) és 0,5 g/l 2-(N-Morpholino)-etánszulfonsav (MES) monohidrát (Duchefa Biochemie B. V., Harleem, Hollandia), Gamborg B5 vitaminokkal kiegészített MS (Murashige & Skoog Medium including B5 vitamins, Duchefa Biochemie) (pH=5,8). A csíranövényeket 8/16 óra fényt/sötét periódus mellett 21 °C hőmérsékletű növénynevelő kamrában neveltük 6 napig. A fényintenzitás 50 µmol m⁻² s⁻¹ volt, melyet Sylvania Luxline Plus (Felio Sylvania Europe Limited, London, Egyesült Királyság) fénycsövek biztosítottak. Ezután annak érdekében, hogy az oldalgöyökér primordiumok megjelenjenek a csíranövényeket naftilecetsavval (NES; 3,3 µM) (Duchefa Biochemie) kezeltük 43 órán keresztül. Ezt követően annak érdekében, hogy a kompetens oldalgöyökér primordiumokból hajtásmerisztéma alakuljon ki, citokinin tartalmú táptalajra (MS Medium B5 vitaminok, 0,5 g/l MES monohidrát, 2% D (+)-glükóz (Molar Chemicals), 0,6% agaróz, izopentenil adenin (IP) 8,16 µM (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Egyesült Államok) (pH=5,8)) helyeztük a csíranövényeket. A T-Spm kezelést 100 µM koncentrációban a táptalajhoz adva végeztük. Mintát négy időpontban vettünk: 24 óra (mitotikus osztódási szünet), 48 óra (szervkezdemények megjelenése), 72 óra (korai promerisztéma kialakulása) és 96 óra (késői promerisztéma kialakulása). A mintákat -80 °C-on tároltuk a génexpressziós vizsgálatok elvégzéséig.

8.2. Protoplasztok izolálása, fenntartása és kezelése dohány növények leveléből

A protoplasztok izolálása Yau és munkatársai által kidolgozott módszer segítségével történt, steril körülmények között. 4 hetes, üvegben, steril 1/2MS táptalajon nevelt vad típusú (*Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin 38) (Yau és mtsai., 2011) és mutáns (AS-NtRbohD) növények leveleit használtuk fel protoplaszt izolálásra.

Első lépésben a korábban leírt módon sterilizett magokat steril szűrővel ellátott 10 cm átmérőjű 15 cm magas üvegekbe tettük. A táptalaj összetevői: 1/2 MS+ Gamborg B5 vitaminok (Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, The Netherlands,) 1% szacharóz (Molar chemicals Hungary) 0,6% plant agar (Duchefa Biochemie). 4 hetes növényeket használtunk, melyek egészséges szép leveleit apróra vágtuk és emésztő oldatba helyeztük 1 éjszakára (16 óra) sötétbe, 22 °C-os hőmérsékleten. Az emésztő oldat összetétele: 1% celluláz - Onozuka RS; 0,3% Macerozim R-10; K3A . A K3A oldat összetétele: 1/2× MS+ Gamborg B5 (Duchefa Biochemie), 3,13 mM CaCl₂·2H₂O (Duchefa Biochemie), 1,67 mM xilóz (Duchefa Biochemie), 300 mM szacharóz (Molar chemicals), 400 mM D-mannitol. Emésztés után a protoplasztokat és törmelékét tartalmazó oldatot steril fém szűrőn (100µm) átszűrtük és óvatosan új csövekbe pipettáztuk. Centrifugálással az élő protoplasztokat elválasztottuk (Eppendorf 5810 R) szobahőmérsékleten (150 g és 15 perc). Az úszó protoplaszt gyűrűt egy új csőben W5 oldatban (154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂·2H₂O, 5 mM KCl, 5 mM glükóz) felvettük és újra centrifugáltuk (150g 10 perc). Ezután a mosó lépést ismételtük, majd a leült protoplasztokat óvatosan K3AS hormont tartalmazó oldatba vettük fel, úgy, hogy a sejtek száma kb 1x10⁶ legyen milliliterként (ehhez Bürker kamrás sejtszám becslést alkalmaztunk). A K3AS oldat összetétele: 1/2× MS+ Gamborg B5 (Duchefa Biochemie), 3,13 mM CaCl₂·2H₂O (Duchefa Biochemie), 1,67 mM xilóz (Duchefa Biochemie), 400 mM szacharóz (Molar chemicals), 5,38 mM naftilecetsav (NES) (Sigma-Aldrich), 888 nM benziladenin (BA)(Duchefa Biochemie), és 452 nM 2,4-diklórfenoxiecetsav(2,4-D) (Sigma-Aldrich). Az izolált protoplasztokat 8 óra megvilágítás mellett, 22°C -os hőmérsékleten tároltuk.

Az alkalmazott kezelések kivitelezéséhez a dohány protoplasztokat 24x 2ml térfogatú műanyag steril lemezen tartottuk, 23 °C -on, 8 óra megvilágítás mellett. A NADPH oxidáz gátlására 2µM difenilén-jodóniumot (DPI) (Sigma-Aldrich), míg a PAO enzim gátlására 10µM Guazatint (Guaz) (Sigma-Aldrich) adtunk a protoplasztokhoz. Mintavételhez W5 oldatban

leüleptítettük a sejteket és cseppfolyós nitrogénben fagyasztottuk őket. A mintákat felhasználásukig -80 °C-on tároltuk.

8.3. ROF és életképesség meghatározása fluoreszcens mikroszkóp segítségével

A protoplasztok életképességének, valamint a ROF szintek változásának vizsgálatához arra alkalmas fluoreszcens festékeket használtunk. Az életképesség meghatározása 10 μ M fluoreszcein-diacetáttal FDA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) míg a ROF szintek detektálása 10 μ M 2,7-diklorofluoreszcein-diacetáttal (H2DC-FDA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) valósult meg. Korábban kimutatták, hogy ezek a festékek alkalmasak paradicsom protoplasztok esetén a ROF és életképesség detektálására (Horváth, 2009). A festékeket 5 mM törzsoldatból hígítottuk W5 (összetétel ld. protoplaszt izolálás) mosó oldatban 10 μ M végkoncentrációra. A protoplasztokat 15 percen keresztül festettük 25 °C-on. Ezután a W5 oldatban leülepedett protoplasztokról kétszer cseréltük a mosó oldatot. Majd mikroszkópos vizsgálatainkhoz tárgylemezre helyeztük őket. Az így előkészített mintákat Zeiss Axiovert 200M típusú fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltuk. A felvételek készítésénél húszszoros objektívet alkalmaztunk. A minták gerjesztése 450-490 nm-en, az emisszió pedig 515-565 nm-nél történt. Az expozíciós idő mindig azonos volt, 103 ms. A mintákról fotót készítettünk a mikroszkópra szerelt nagy felbontású digitális kamera segítségével (AxioCam HR, HQ CCD kamera, 1300x1030 dpi, Carl Zeiss, Jéna, Németország). Axiovision Rel. 4.8 szoftver használatával, a protoplasztok pixel-intenzitását határoztunk meg.

8.4. Sztereó mikroszkópos vizsgálatok

Arabidopsis növények esetén, a direkt hajtásmerisztéma kialakulás hatékonyságának vizsgálatához sztereó mikroszkópot használtunk (Olympus SZX12 sztereó mikroszkóp) (Olympus Corporation, Sindzsuku, Tokió, Japán), fehér LED fényforrással (Photonic Optics, Bécs, Ausztria). Vizsgálatainkhoz tízszeres nagyítást alkalmaztunk, a mintákról pedig Cannon 200D digitális kamera segítségével készítettünk fotókat (EOS Utility 3 software).

8.5. Szekvencia in silico elemzések és primer tervezés

Molekuláris vizsgálatainkhoz az irodalom alapján dohány növényben stabilnak tekinthető referencia géneket választottunk és teszteltünk. Ezek a következők voltak: *Nicotiana tabacum* 97-like (*NtActin-97-like*; LOC107804820) (Manara és mtsai 2020), valamint *Nicotiana tabacum* 60S riboszomális protein (L25A) kódoló gén (L18908) (Baek és mtsai 2017). A Dohány PAO gének keresését az Arabidopsis PAO szekvenciái alapján végeztük el, mely utóbbiak az Arabidopsis Information Resource (TAIR) (<http://www.arabidopsis.org/>) adatbázisban található meg (4. függelék). Az Arabidopsis szekvenciák mintájára a dohány genomban végzett BLAST analízis (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) eredményeként kapott feltételezett PAO szekvenciákkal dolgoztunk tovább. A megfelelő, génenként egyedi primer /indítószekvencia pár tervezéshez az NCBI primer design toolt használtuk (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Ye és mtsai., 2012). A tervezést a PRJNA319578 dohány szekvenálás alapján felalított adatbázisban hajtottuk végre (Sierro és mtsai., 2014). Mindemellett, NT90 Edwards újabb, de más ökotípusban végzett szekvenálási adatbázisban is megkerestük a megfelelő dohány PAO géneket, melyeket a 8. függelék foglal össze. A dohány és Arabidopsis kísérletekhez használt primerek szekvenciái a 9-10. függelék-ben találhatóak. Az aminosav és nukleinsav szekvenciák illesztése és filogenetikai modellezése a MEGA11 szoftver (<https://www.megasoftware.net/>) segítségével történt. A ClustalW illesztő algoritmus alapján illesztett a PAO fehérje szekvenciákból a Neighbor-Joining filogenetikai rekonstrukcióhoz a JTT matrix-alapú modellt alkalmaztuk. A kládok támogatottságát nem paraméteres bootstrap módszerrel becsültük meg, 1000 ismétlést végezve (Tamura és mtsai., 2021).

PAO kromoszóma lokalizáció meghatározása és gén szerkezet vizsgálatához a Solgenomics adatbázisából letöltött (https://solgenomics.net/ftp/genomes/Nicotiana_tabacum/edwards_et_al_2017/assembly/) dohány genom szekvencia formátumból a TBtools segítségével készítettünk kromoszóma térképet, valamint intron-exon felosztásos gén szerkezeti ábrát (<https://github.com/CJ-Chen/TBtools>) (Chen és mtsai., 2020).

Promóter analízishez a PAO gén start kodon előtti 1800 bázispárt vizsgáltuk, stressz kapcsolt vagy hormon jelátvitelhez köthető DNS kötő motívumok után kutatva. A szekvenciákat a PlantCare adatbázis segítségével vizsgáltuk át (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>), majd az eredmények vizuális megjelenítéséhez a TBtools eszközt használtuk (<https://github.com/CJ-Chen/TBtools>) (Chen és mtsai., 2020).

A dohány és Arabidopsis PAO fehérjék konzervált motívumainak összehasonlítását a MEME_motif based sequence analysis tool segítségével végeztük el (http://meme.sdsc.edu/meme4_6_1/cgi-bin/meme.cgi)(Bailey és mtsai., 2015). Az így kapott eredményeket szintén a TBtools segítségével ábrázoltuk (Chen és mtsai., 2020).

Az NtPAO-k sejten belüli esetleges lokalizációját a fehérje szekvencia alapján a WoLF PSORT (Horton és mtsai., 2007) (<https://wolfsort.hgc.jp/>) online elérhető kereső adatbázisának segítségével vizsgáltuk (5.függelék).

Az illesztések ábrázolását és jelölését a Genedoc (version 2.7) program felhasználásával végeztük el (6-7.függelék).

A specificitást determináló helyek (SDP: specificity-determining site) elemzése a JDet Software-rel (Muth és mtsai. 2012) készült, amely az alábbi helyről tölthető le: <http://csbg.cnb.csic.es/JDet/>

8.6. RNS izolálás és valós idejű kvantitatív PCR (Génkifejeződés vizsgálata)

Az RNS kivonáshoz előzetesen lefagyasztott mintáinkat első lépésben eldörzsöltük folyékony nitrogénben. Az RNS kivonás Quick-RNA Miniprep Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) segítségével valósult meg, folyamata a gyártó szerint javasolt lépéseket követte. A kivonás után a mennyiségi RNS meghatározás fotométerrel történt (NanoDrop™2000/2000c) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Ezt követően a cDNS szintéziséhez 600ng RNS-t használtunk templátként. A cDNS könyvtár előállítását a RevertAidFirst Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével, a gyártó által javasolt protokoll szerint történt. Valamennyi minta cDNS-ét a (qRT)-PCR reakció előtt tízszeresére hígítottuk. A valós idejű kvantitatív PCR reakciók CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) készülék segítségével valósultak meg. A RT-qPCR reakciókat 384-férőhelyes lemezen mértük össze Hard-Shell®384-well plates (thin-wall, skirted, white; Bio-Rad, Cat. no: HSP3805). A reakció komponensek 1 mintára vonatkozóan a következők voltak: 1 µL cDNS, 0,21 µL forward és reverse primer 3,5 µL Maxima SYBR Green/ROX qPCR MasterMix (Thermo Fisher Scientific), a végtérfogat 7 µL volt. Reakció első lépése 15 perces aktiválás 95°C-on, amit a PCR ciklus követ, melynek paraméterei: 10mp 95°C és 1 perc 60°C 40 cikluson

keresztül. Templátonként és primerenként három technikai ismétlést alkalmaztunk, ami mellett az úgynevezett „non template control”-t (NTC) is használtuk negatív kontrollként.

Az adatok kiértékelése a Bio-Rad CFX Maestro (Bio-Rad) software és Microsoft Excel 2016 programok segítségével történtek. A relatív mRNS szinteket a $(2)^{-\Delta\Delta Ct}$ módszerrel állapítottuk meg. A primerek szekvenciáit a 9-10. függelék tartalmazza.

8.7. Statisztika és ábrakészítéshez felhasznált szoftverek.

Az adatok tárolását és rendezését MS excel 2016 program segítségével hajtottuk végre. A statisztikai kiértékelést SigmaPlot v.12.0 szoftver segítségével végeztük. A varianciaanalízis elvégzése utána a kontrolltól való szignifikáns eltérést Duncan-féle teszttel állapítottuk meg. Az azonos betűvel nem jelölt átlagok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0.05$ szinten. Más esetekben a szignifikáns különbség megállapítására Student-féle t-tesztet használtunk, $P \leq 0.05$ (*), 0.01 (**), vagy 0.001 (***) valószínűségi szinteken. A feltüntetett adatok három független biológiai ismétlés átlag - és szórásértékeit tartalmazzák.

9. Eredmények

9.1. Dohány PAO gének azonosítása és szekvencia analízise

Tizennégy PAO génszekvenciát azonosítottunk a dohány genomában. Az Interproscan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>) és az NCBI Search for Conserved Domains (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) adatbázisban való domén kereséssel erősítettük meg a kiválasztott PAO szekvenciákat. A keresés során a kiválasztott fehérje szekvenciákon az amin oxidázok FAD kötő és az amin oxidáz domén jelenlétét ellenőriztük, melyek a PAO-okra jellemző konzervált szerkezeti elemek (Šebela és mtsai., 2001; Tavladoraki és mtsai., 1998). A szekvencia alapján azonosított dohány PAO géneket az Arabidopsis PAO-kal mutatott szekvencia hasonlóság alapján (2. függelék) neveztük el: *NtPAO1(A-B)*, *NtPAO2(A-C)*, *NtPAO4(A-D)* és *NtPAO5(A-E)*. A kiválasztott PAO-t kódoló nukleinsavról mRNS szekvenciákra tervezett primerekkel később RT-qPCR analíziseket végeztünk. A dohány PAO gének RNS és fehérjék adatait a 8. függelék táblázata foglalja össze.

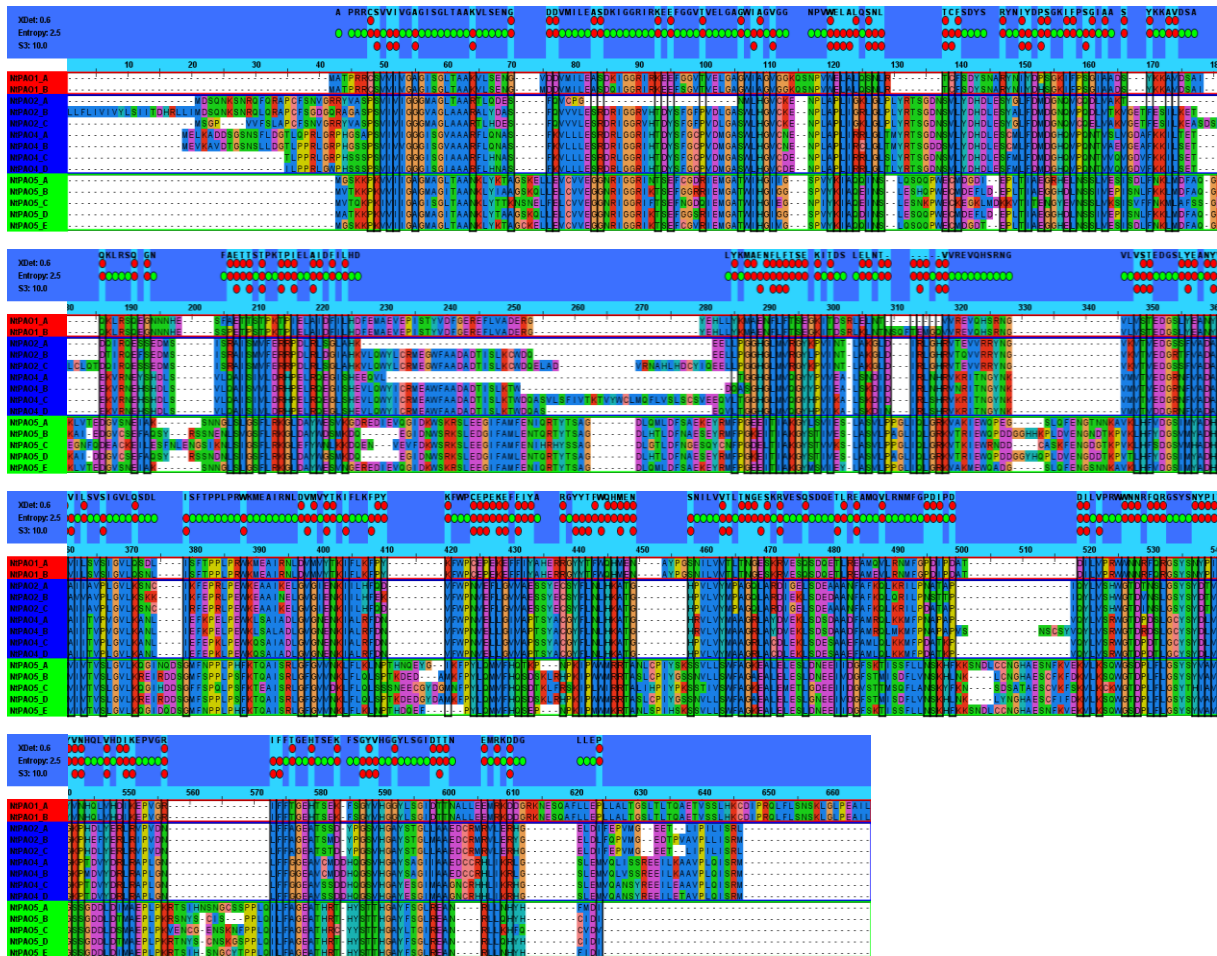
9.1.1. Dohány NtPAO gének szerkezete és filogenetikai kapcsolata

A 14 dohány PAO gén kromoszóma térképezése nem teljes, mert az elérhető genom szekvencia összerendezése még csupán 64%-os (Edwards és mtsai., 2017). Hat NtPAO kromoszóma lokalizációját tudtuk megvizsgálni (3. függelék). Az *NtPAO2B* a 2. az *NtPAO4C* a 3. az *NtPAO5E* a 13. az *NtPAO4A* a 14. az *NtPAO4D* a 17., az *NtPAO1A* pedig a 19. kromoszómán helyezkedik el (3. függelék). A PAO gének szerkezetét, osztályozását és funkcionális vizsgálatát már számos növényfajban elvégezték. Lúdfüben 5 (*AtPAO1-5*), narancsban 6 (*CsPAO1-6*) paradicsomban, rizsben és kamillában 7 (*SIPAO1-7*; *OsPAO1-7*; *CsPAO1-7*), kukoricában pedig 9 (*ZmPAO1-9*) PAO izoenzim kódoló gént azonosítottak (Hao és mtsi., 2018; Li és mtsi., 2020; Sagor és mtsi., 2021; Takahashi és mtsi., 2010; Wang és Liu, 2015; Xi és mtsi., 2022). Filogenetikai analízis szerint növényekben 5 PAO klád különíthető el: I, II, III, IV és V (Bordenave és mtsai., 2019). A dohány PAO gének evolúciós kapcsolatának vizsgálatához és kládokba sorolásához filogenetikai fát készítettünk ismert PAO szekvenciák alapján néhány fontos fajból. A rokonsági fa elkészítéséhez Neighbor-Joining filogenetikai rekonstrukciós modellt alkalmaztunk Arabidopsis, dohány, rizs, kukorica és paradicsom fajokon (1. függelék). Az összehasonlítást elkészítettük csak az Arabidopsis és a

dohány növények között is, mely esetben MEME web szerver segítségével konzervált motívum analízist is végeztünk (5. ábra). Kilenc olyan motívum található, melyek eltérően vannak jelen az egyes NtPAO-k fehérje szekvenciáiban. Az 1,2,3,6,8-as motívum minden NtPAO-ban megtalálható, a 9-es csak a *NtPAO5B*-ből hiányzik, ugyanakkor a 4,5,7-es számú motívum az *NtPAO1A*, *NtPAO1B*, *NtPAO2A*, *NtPAO2C*, *NtPAO4D*, *NtPAO5C* és *NtPAO5B*-ből hiányzik. Mindezek alapján az NtPAO géneket 3 kládba soroltuk be. Az I.- es kládba két dohány PAO (*NtPAO1 A-B*), egy Arabidopsis PAO (*AtPAO1*) és egy paradicsom PAO (*SIPAO1*) tartozik. A paradicsomhoz és a rizshez hasonlóan egyetlen dohány NtPAO sem található a II-es és az V-ös kládban (5. ábra; 1. függelék). A III-as kládba 5 dohány PAO (*NtPAO5A*, *NtPAO5B*, *NtPAO5C*, *NtPAO5D*, *NtPAO5E*) egy arabidopsis PAO (*AtPAO5*) és két paradicsom PAO (*SIPAO6-7*) (5. ábra; 1. függelék), a IV-es kládba pedig 7 dohány PAO (*NtPAO2A*, *NtPAO2B*, *NtPAO2C*, *NtPAO4A*, *NtPAO4B*, *NtPAO4C*, *NtPAO4D*), három Arabidopsis PAO (*AtPAO2-4*), három paradicsom PAO (*SIPAO2-5*) három rizs PAO (*OsPAO3-5*) és hat kukorica PAO (*ZmPAO3-4*, *ZmPAO 6-9*) (5. ábra; 1. függelék) tartozik. Az egyes dohány PAO-ok adott kládba való tartozását JDet szoftver (Muth és mtsai., 2012) segítségével is megerősítettük (6. ábra). A specificitás meghatározó pozíciókban (specificity-determining positions, SPD) olyan aminosavak találhatóak, melyek fontos szerepet játszanak a fehérje funkciójában és evolúciósan konzerválódtak (Chakraborty és Chakrabarti, 2013).

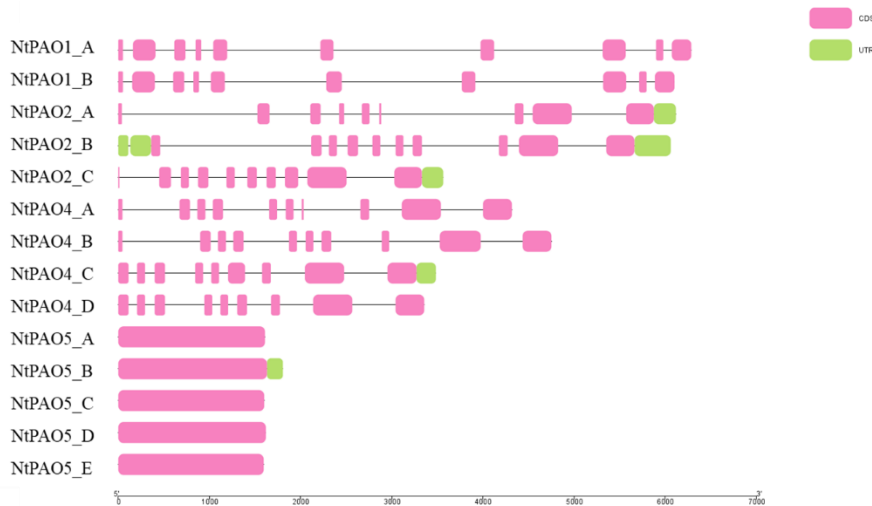


5. ábra Dohány és Arabidopsis PAO filogenetikai kapcsolata fehérje szekvencia alapján. (Felhasznált szekvenciák azonosítói NtPAO 8. függelék; AtPAO 4. függelék). A filogenetikai modellezés MEGA11 szoftverrel készült. A PAO fehérje ClustalW illesztése után a Neighbor-Joining filogenetikai rekonstrukció a JTT mátrix-alapú modellel készült. (Tamura és mtsai., 2021.) Az elágazásoknál feltüntetett számok bootstrap értékeket jelölik. Konzervált PAO motívumok azonosítása MEME online adatbázisból történt. Arabidopsis és dohány PAO fehérjéken (balra) az eltérő színek eltérő konzerválódott motívumokat jelentenek.



6. ábra Az *NtPAO*-ok képviselői három különböző osztályt alkotnak, amelyeket egymástól különböző színekkel elválasztva jelöltem. Piros: I. klád; Kék IV klád; Zöld III klád. Dohány PAO fehérje kódoló szekvencia illesztése ClustalW algoritmus alapján MEGA11 szoftverrel. Az összehasonlítás és az SDP meghatározása a Jdet szoftver (Muth és mtsai., 2012) segítségével készült. A Jdet programcsomag három különböző megközelítést alkalmaz (XDet, Entrópia-alapú és 3Det) az SDP-k és az alcsaládok meghatározására. A zöld pontok az SDP-eket jelölik, míg a piros pontok jelzik a három különböző módszer által egybehangzóan azonosított SDP-k pozícióját.

A PAO gének közötti filogenetikai kapcsolatok vizsgálata során további információt ad az egyes gének szerkezetének, intron-exon szerveződésének vizsgálata (7. ábra). A legszembetűnőbb az *NtPAO5* család hasonlósága az *Arabidopsis AtPAO5*-el, ugyanis az *AtPAO5* és az azzal homológ PAO gének nem tartalmaznak intront, azaz mRNS érés során kivágódó szakaszt (Fincato és mtsai., 2011). A génszerkezet alapján a családokon belül is megfigyelhetők különbségek és hasonlóságok. Az *NtPAO4C* az *NtPAO4D*-vel mutat közös intron szerkezetet az *NtPAO4A* az *NtPAO4B*-vel, de a két pár egymástól már különbözik. Az *NtPAO1A* és *B* szinte teljesen megegyezik. Míg az *NtPAO2* esetén az *NtPAO2C* különbözik az *NtPAO2A* és *NtPAO2B*-től (7. ábra).

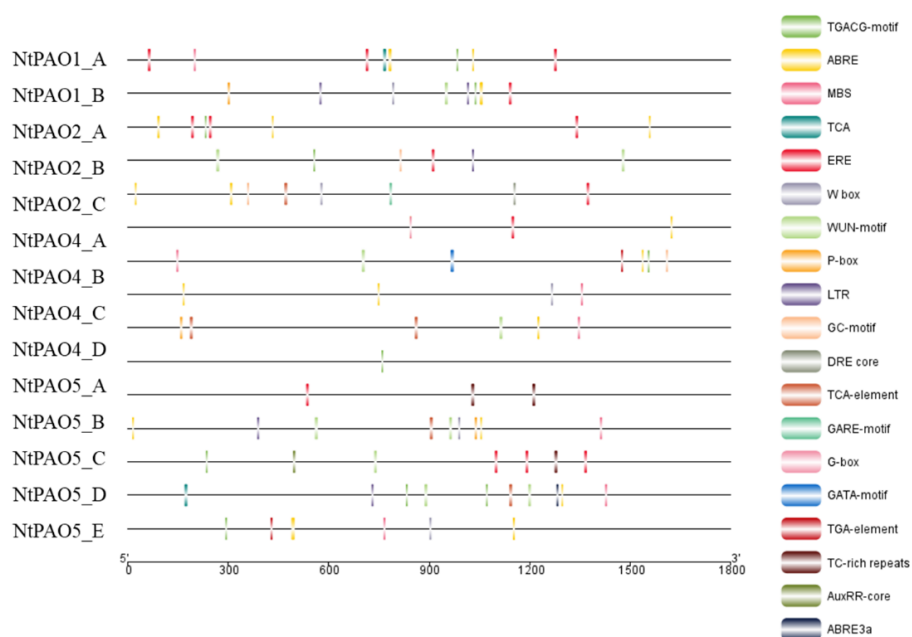


7. ábra Dohány PAO gének szerkezete 5'-3' irányban. Az egyes *NtPAO* gének és azok nukleinsav hossza bázispárban kifejezve. Ábramagyarázat: lila doboz: intron; vonal: exon zöld: nem transzlálódó régió. A gének elérhetősége a 8. függelékben található. A gén szekvenciák a *Nicotiana tabacum* TN90, genom szekvenálás projektből PRJNA319578 (Sierra és mtsai 2014) lettek kiválasztva és a TBtools segítségével ábrázolva.

A Cisz-ható szabályozó elemek azonosítása a PAO gének promóter (szabályozó) régiójában a Plant Care adatbázis segítségével történt. A vizsgálat a promóter régióban számos, főleg stressz válaszhoz kapcsolható kötőhelyet derített fel. Ezek között volt hidegstressz (pl.: LTR) az *NtPAO5D* gén promóter régiójában, szárazságstressz (pl. DRE) sebzés (pl. WUN motívum), valamint egyéb nem csak a stresszhez köthető elem, úgymint fény válasz (pl. G box), valamint hormonok (IES, ABS, GA3), és MYB transzkripció faktor kötő helyek is. IES szabályzó régió található a *NtPAO2B* és *C*, *NtPAO4B* és *NtPAO5C* gének promóterében. ABS szabályzó régió valamennyi *NtPAO* promóterében megfigyelhető, kivéve *NtPAO2B* *NtPAO5A* és *C*. GA3 szabályzó régió pedig az *NtPAO2C*, *NtPAO4D*, *NtPAO5B* és *D* gének promóterében található (8. ábra, 11. függelék).

A *NtPAO*-k sejten belüli elhelyezkedését előre jelezhetjük a szekvencia motívumok alapján. Az online elérhető WoLF PSORT (Horton és mtsai., 2007) a már ismert lokalizációjú proteinekből álló adatbázist veti össze az általunk vizsgálni kívánttal. A teljes prediktált eredményt a 5. függelék tartalmazza. A vizsgálat alapján az *NtPAO4* és *NtPAO2* család valószínűleg peroxiszómális elhelyezkedésű, amit megerősít a szekvencia C terminális részén található (S/A/C) (K/R/H)(L/M) aminosav hármas megléte is (6.függelék). Ez a C terminális utolsó három aminosava jellegzetes peroxiszómális target (cél) szekvenciaként ismert

(Reumann, 2004). Ugyanakkor az NtPAO1 és NtPAO5 -ről nem állapítható meg ilyen valószínűséggel, hogy a citoplazmában lokalizált-e.



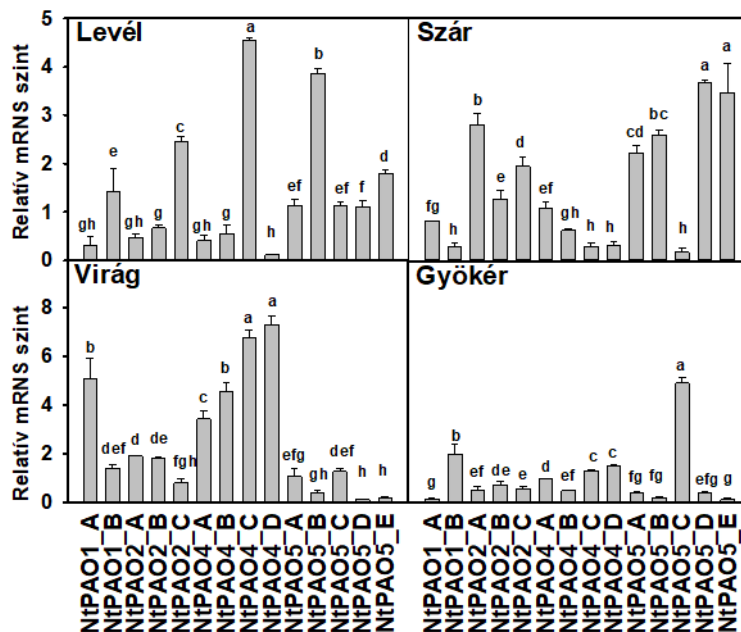
8. ábra NtPAO gének promóter régióinak az analízise. A PAO gént kódoló régió előtti 1800bp- szakaszon a Plant Care adatbázis alapján azonosított szabályzó elemek kötő helyei a TBtools által ábrázolva. Rövidítések: TGACG-motívum -Jázmonsav válasz elem kötő helye. Az ABRE; ABRE3 (abscisic acid response element3), -abszizinsav válasz regulátor. A DRE (drought-responsive element) és MBS -szárazság stresszhez kapcsolt elem. A TCA motívum -szalicilsav válasz. Az ERE (Ethylene-responsive element) -etilén válasz elem. A W-box és WUN motívum -sebzés válasz. A P-box (GA responsive element) és a GARE: -gibberelin sav válasz regulátor. A LTR (low-temperature responsiveness) -hideg stressz válasz. A GATA-motívum és G-box -fény szabályzott elemek. A GC-motívum; TGA, és AuxRR (auxin-responsive region):-auxin szabályzott válasz elem; Tc-rich: -védelem és stressz válaszhoz köthető motívum.

9.2. Dohány PAO gének kifejeződési mintázata fiziológiai körülmények között, valamint különböző stressz és hormonkezelések hatására

9.2.1. A dohány NtPAO gének szervspecifikus kifejeződése

A PAO gének kifejeződése és szervi lokalizációja növényfajonként eltérő lehet (Takahashi és mtsai., 2010; Wang és mtsai, 2015; Hao és mtsai, 2018; Sagor és mtsai., 2021; Xi és mtsai., 2022), ezért a következőkben megnéztük, hogy a tizennégy NtPAO gén hogyan fejeződik ki dohány növények egyes szerveiben, így a gyökérben, szárban, fiatal levélben és a kifejlett virágban. A kísérletekhez már kifejlett és virágzó dohány növényeket használtunk fel melyeket 14 hetes korukig, üvegházban neveltünk (cserépből, rendszeres öntözés és hosszú nappalos megvilágítás mellett). Az eredményeket a 9. ábra foglalja össze. Az *NtPAO1A* mRNS szintje alig volt kimutatható a levélben és a gyökérben és alacsony szinten fejeződött ki a szárban is, viszont a virágban jelentős, mintegy ötszörös expressziót mutatott a kontrollhoz (kontroll: génenként az összes szövet átlaga) képest (9. ábra). A *NtPAO1B* relatív transzkript szintje pedig leginkább a levélben és a gyökérben emelkedett meg. Az *NtPAO4* gének mindegyike legerősebben a virágban, míg az *NtPAO2C* és az *NtPAO5B* a levélben fejeződött ki (9. ábra). Az *NtPAO2A* és *NtPAO2B* gének relatív expressziója leginkább a szárban és a virágban, míg az *NtPAO2C* relatív transzkript szintje főleg a levélben emelkedett meg. Gyökérben az *NtPAO1B* mellett az *NtPAO5C* gén fejeződött ki. Az *NtPAO5C* génnel ellentétben, az *NtPAO5A*, *D* és *E* relatív transzkript szintje szárban, míg az *NtPAO5B* expressziója levélben volt a legmagasabb a többi szervhez képest (9. ábra).

Összefoglalásképpen tehát elmondható, hogy a dohány PAO gének szervspecifikusan fejeződnek ki, azonban az egyes családokon belül a gének kifejeződésében megfigyelhetőek különbségek.



9. ábra Virágzó, 14 hetes dohány növények, NtPAO gének szervspecifikus expressziós vizsgálata. A relatív mRNS szintet levélben, szárban, virágban és gyökérben a dohány PAO génekre specifikus primerekkel határoztuk meg valós idejű kvantitatív PCR segítségével. Két referencia gén átlagát használva normalizáltuk az eredményeket. Génenként az összes szövet átlagához viszonyítottunk. Az ábra 3 biológiai ismétlés átlagát és szórását tartalmazza. A Duncan féle rang teszt statisztikai szignifikáns eltéréseit eltérő betűk jelzik szignifikancia szint $p < 0,05$.

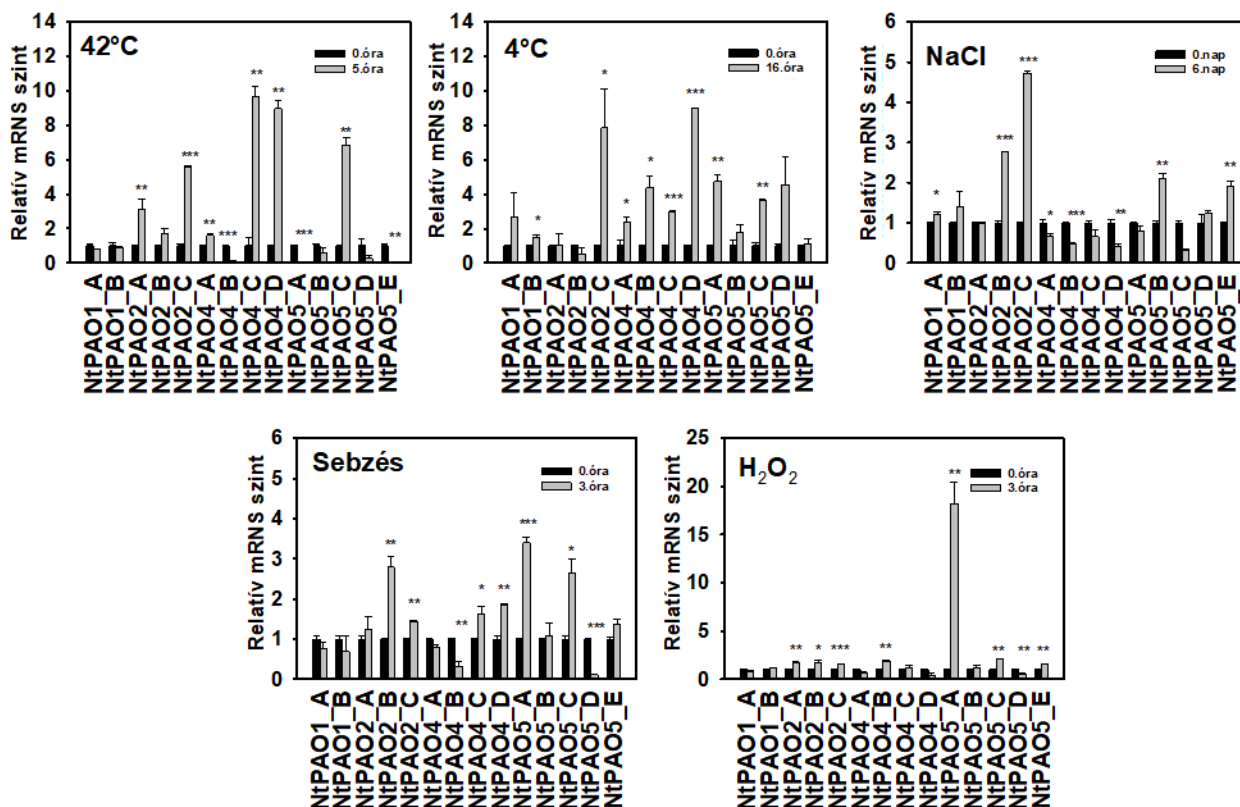
9.2.2. PAO gének expressziós változása abiotikus és oxidatív stressz hatására

A PAO gének különböző stresszválaszokban játszott szerepét számos növényfaj esetében már igazolták (Gémes és mtsai., 2017, 2016; Hao és mtsai., 2018; Liu és mtsai., 2015; Sagor és mtsai., 2021, 2016; Samanta és mtsai., 2023; Toumi és mtsai., 2019; Zhang és mtsai., 2022). Miután a promóter analízis eredményei alapján feltételezhető volt a dohány NtPAO gének stressz általi indukálhatósága is (8. ábra), megvizsgáltuk, hogyan változik a 14 NtPAO gén relatív expressziós szintje extrém hőmérsékletváltozásra (hideg és hő stressz), sóstresszre, valamint sebzés hatására. Mivel a PAO gének működése során, a poliaminok lebontásakor reaktív oxigén forma, H_2O_2 keletkezik, kíváncsiak voltunk arra is, hogy a kívülről hozzáadott H_2O_2 miként hat az egyes PAO gének kifejeződésére.

A hőmérsékleti stresszek hatásának tanulmányozásához, két hetes *in vitro* 23 °C-on és rövid nappalon nevelt dohány növényeket használtunk. Ezeket a növényeket hidegkezelés

céljából 4°C-ra helyeztük át, 16 órán keresztül, míg a hőstressz vizsgálatához 42°C-ra, 5 órán át. Ez a rövid hősok már képes beindítani a dohány válaszreakcióit, valamint a PAO gének expresszióját (Hao és mtsi., 2018; Min Park és Bong Hong, 2002). Hideg kezelés hatására, a kezeletlen kontrollhoz képest nőtt az *NtPAO1A*, *NtPAO2C* az összes *NtPAO4(A-D)*, az *NtPAO5A*, *NtPAO5C*, valamint *NtPAO5D* relatív transzkript szintje (10. ábra). A hidegstresszhez hasonlóan, hőstressz alatt is nőtt az *NtPAO2C*, *NtPAO4A*, *NtPAO4C*, *NtPAO4D*, valamint *NtPAO5C* relatív mRNS szintje, azonban a hideg kezeléssel ellentétben csökkent az *NtPAO5A* relatív expressziója (10. ábra). Ugyanakkor, az *NtPAO4B* expressziója csak hidegkezelés hatására emelkedett, a hőstressz csökkentette azt (10. ábra).

A sóstressz kiváltásához 2 hetes dohánynövényeket 150 mM NaCl-ot tartalmazó tápoldatra helyeztünk és ilyen körülmények között neveltük őket további 6 napig. Sókezelés hatására az *NtPAO2B*, *NtPAO2C*, *NtPAO5B* és az *NtPAO5E* relatív mRNS szintje emelkedett meg a kezeletlen kontrollhoz képest. Az *NtPAO1B*, *NtPAO2A*, *NtPAO5A* és *NtPAO5D* relatív expressziójára a sóstressz nem volt hatással, míg az *NtPAO4* gének és az *NtPAO5C* expressziója csökkent sókezelés hatására (10. ábra). A sóstresszhez hasonlóan, az *NtPAO2B* és *C* relatív expressziója sebzés során is megemelkedett, míg az *NtPAO4B* és *NtPAO5D* gének sebzés alatt alul szabályozódnak. A sóstressztől eltérően azonban sebzés hatására, mintegy 2-4-szeres mértékben emelkedett az *NtPAO4C*, *NtPAO4D*, *NtPAO5A* és *NtPAO5C* gének relatív transzkript szintje. Miután a H₂O₂ a PAO általi poliamin lebontás egyik lehetséges terméke, megnéztük, miként változik külső H₂O₂ kezelés hatására az egyes dohány NtPAO gének kifejeződése. A külső H₂O₂ kezelés jelentősen, mintegy húszszorosára növelte az *NtPAO5A* relatív expresszióját, ami mellett bár kisebb mértékben, de emelte az *NtPAO5C* és *NtPAO5E* valamint az összes *NtPAO2* gén relatív transzkript szintjét (10. ábra). Az *NtPAO5A* H₂O₂-ra adott erős válasza alapján feltételezhető, hogy ez a gén a többi NtPAO génhez képest érzékenyebb a H₂O₂-re. Összeségében megállapítható, hogy az NtPAO gének abiotikus stresszhatásra indukálódnak és stresszspecifikus mintázatot mutatnak dohányban.

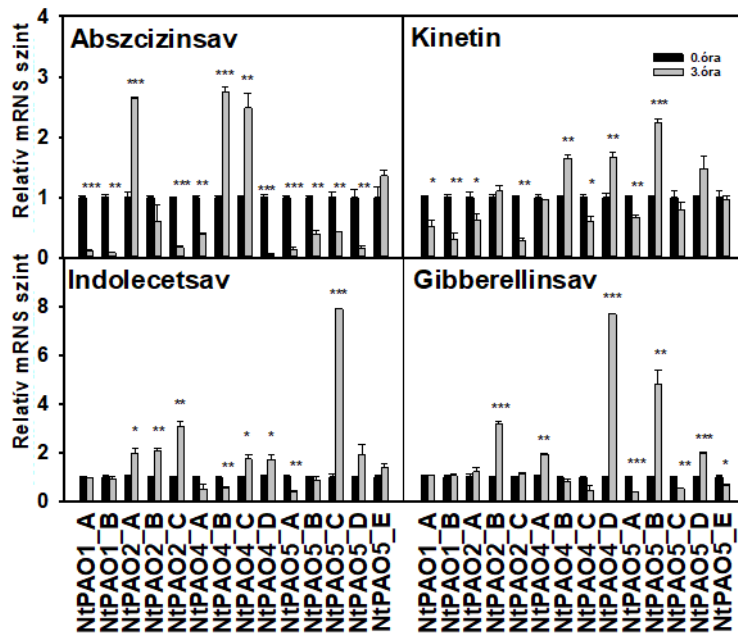


10. ábra Dohány növények stressz kezelése, és *NtPAO* gének expressziós mintázata hajtásban. 5 óra 42°C; 16 óra 4°C; 150 mM só; sebzés; 3óra 5 mM H₂O₂; kezelés hatására bekövetkező relatív mRNS szint változás. Két referencia gén átlagát használva normalizáltuk az eredményeket. Génenként a kezeltlen kontroll mintát tekintettük 1-nek. Az ábra 3 biológiai ismétlés átlagát és szórását tartalmazza. A szignifikancia meghatározása student féle *t* teszt *p* értéke alapján * *p* < 0.05; ** *p* < 0.01 *** *p* < 0.001.

9.2.3. A növényi hormonok hatása a PAO gének kifejeződési mintázatára dohányban

A *NtPAO* gének promóter analízise során számos hormon válaszban résztvevő szabályozó elemet (ABRE; ERE; TGACG; TGA; GARE; TCA) is kimutattunk (8. ábra), ami arra enged következtetni, hogy a PAO géneket a különböző növényi hormonok is képesek befolyásolni. Éppen ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy különböző hormonkezelések, milyen expressziós változásokat indukálnak a dohány *NtPAO* génekben. Kísérleteinkhez 4 hetes dohány növények leveleit használtuk, a hormonhatás vizsgálatához pedig a következő hormonokat alkalmaztuk: 10 µM indol-ecetsav (IES), 10 µM kinetin, 100 µM abszcizinsav (ABS), illetve 10 µM gibberelinsav (GA₃). Azt tapasztaltuk, hogy az ABS kezelés jelentősen, mintegy háromszorosára növelte az *NtPAO2A*, *NtPAO4B* és *NtPAO4C* gének relatív

expresszióját, nem volt hatással az *NtPAO5E* relatív transzkript szintjére, a többi gént pedig alulszabályozta (11. ábra). A külső auxin (indol ecetsav; IES) kezelés jelentős mértékben, mintegy nyolcszorosára növelte az *NtPAO5C*, kismértékben az *NtPAO2* (*NtPAO2A-C*), az *NtPAO4C* és az *NtPAO4D* gének relatív mRNS szintjét, azonban alulszabályozta az *NtPAO4B* és *NtPAO5A* gének expresszióját. Az *NtPAO1A*, az *NtPAO1B* és az *NtPAO5B* gének nem voltak érzékenyek a külső IES kezelésre (11. ábra). Kinetinnel a citokinin választ modelleztük. A kinetin nem befolyásolta az *NtPAO2B*, *NtPAO4A*, *NtPAO5C* és *NtPAO5E* gének kifejeződését, növelte három *NtPAO* gén (*NtPAO4B*, *NtPAO4D* és *NtPAO5B*) relatív expresszióját. A többi *NtPAO* gén működését a külső citokinin kezelés alulszabályozta (11. ábra). A GA₃ kezelés jelentős mértékben, mintegy 2-8-szorosan növelte az *NtPAO2B*, *NtPAO4A*, *NtPAO4D*, *NtPAO5B* és *NtPAO5D* relatív transzkript szintjét a nem kezelt kontrollhoz képest. Az *NtPAO1A*, *NtPAO1B*, *NtPAO2A*, *NtPAO2C*, *NtPAO4B* és *NtPAO4C* gének relatív mRNS szintjére a GA₃ kezelés nem volt hatással, ugyanakkor az *NtPAO5A*, *NtPAO5C* és *NtPAO5E* géneket alulszabályozta (11. ábra). Összefoglalásképpen megállapíthatjuk, hogy a PAO gének hormonspecifikusan aktiválódnak. Különösen érdekesnek találtuk, hogy a stresszhormon ABS a PAO gének többségét gátolta (9 gén mutatott csökkent kifejeződést), és csak három PAO gén működése aktiválódott ABS kezelés hatására (*NtPAO2A*, *NtPAO4B* és *NtPAO4C*). Eredményeink megerősítik azt a feltételezésünket, hogy a PAO gének komplex hormonális szabályozás alatt állnak, és specifikus szerepet játszhatnak mind a növény fejlődésében, mind pedig a stresszválaszokban.

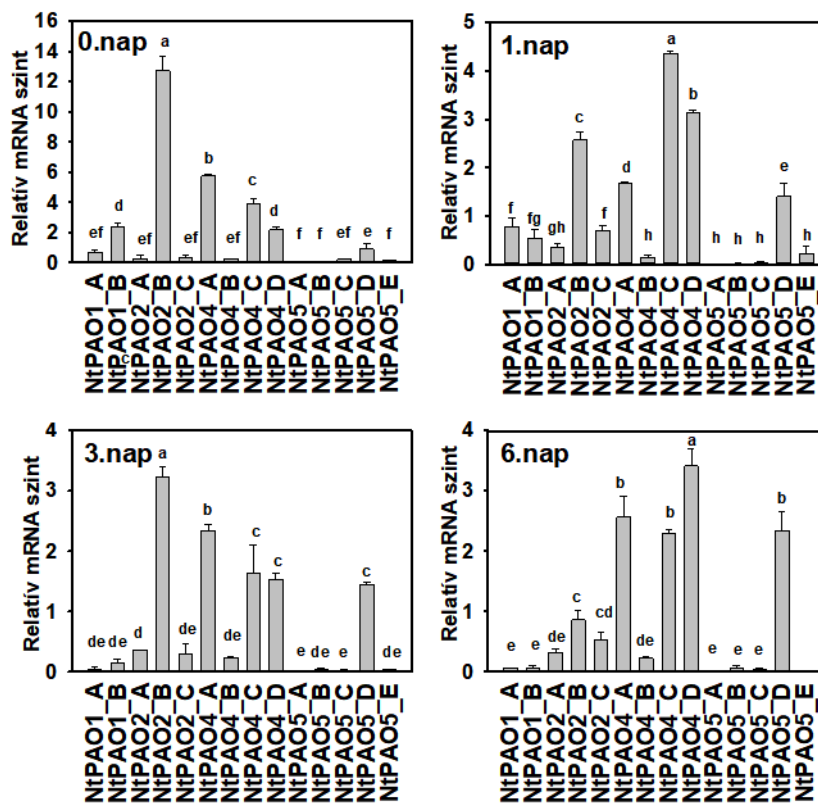


11. ábra Dohány növények hormon kezelése (100 μ M ABS, 10 μ M IES/ Kinetin/GA3) és annak hatása az NtPAO gének kifejeződésére dohány 4 hetes növény levélben. A relatív mRNS szintet a dohány PAO génekre specifikus primerekkel határoztuk meg valós idejű kvantitatív PCR segítségével. Két referencia gén átlagát használva normalizáltuk az eredményeket. Génenként a kezelést nem kapott (kontroll) mintát tekintettük 1-nek. Az ábra 3 biológiai ismétlés átlagát és szórását tartalmazza. A szignifikancia meghatározása Student félé t teszt p értéke alapján történt, ahol a * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

9.2.4. A PAO gének kifejeződése protoplasztok izolálása és fenntartása során

Korábban számos tanulmányban kimutatták, hogy a protoplasztok izolálása és fenntartása során ROF keletkezik. Az izolálás során, a sejtfal eltávolításakor oxidatív stressz éri a sejtet, viszont ezt követően a kultúra fenntartása során a keletkező ROF mennyisége csökkenhet azáltal, hogy aktiválódnak a különböző antioxidáns védőmechanizmusok. A protoplasztok jól használhatóak az *in vitro* növényregenerálás során, de ha a sejtfal emésztésekor keletkező ROF koncentrációja túl magas lesz, akkor az gátolhatja a regenerációt számos növényben. A ROF kis mennyiségben azonban szükséges a későbbi sejtfalképződéshez és így módon a regenerációs folyamatok elősegítéséhez is (Gémes és mtsai., 2011; Papadakis és mtsai., 1999; Papadakis és Roubelakis-Angelakis, 2005; Siminis és mtsai., 1994). A ROF hatása tehát, mint minden más folyamatban, itt is koncentrációfüggő. Mindezek miatt arra voltunk kíváncsiak, miként változik az egyes NtPAO gének relatív expressziója a protoplasztok izolálása és fenntartása során. Ennek érdekében 4 hetes dohány növények leveléből

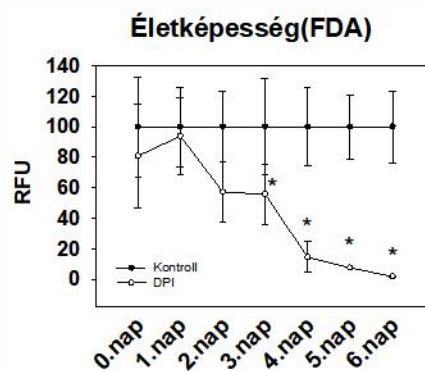
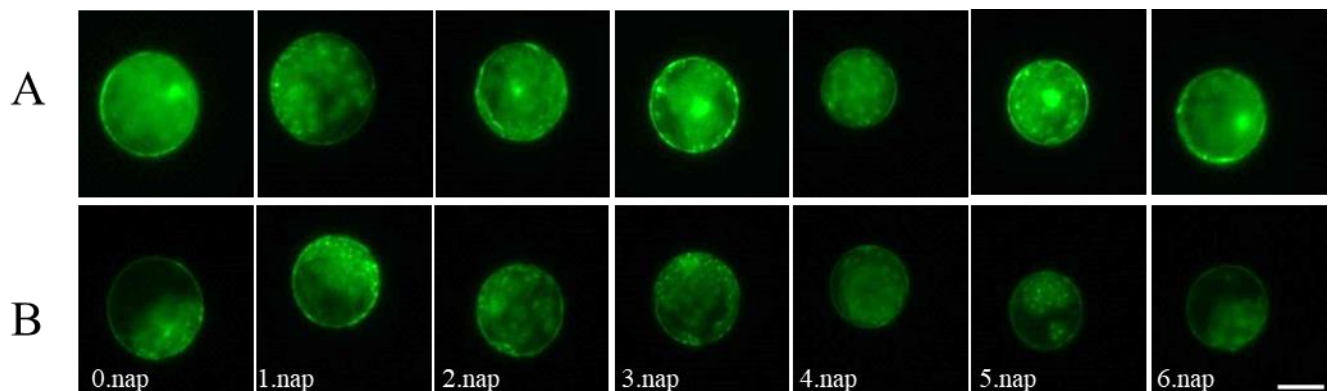
protoplasztokat izoláltunk (0. nap), majd 1, 3 és 6 nappal később, a protoplasztok fenntartása során is mintákat vettünk. Izolálás után közvetlenül, a tenyésztés 0. napján főleg a peroxiszómális lokalizáltságú *NtPAO* gének (*NtPAO2B*, *NtPAO4A*, *NtPAO4C* és *NtPAO4D*) expressziója emelkedett meg és végig, a protoplaszt kultúra fenntartása során is magas maradt, bár alacsonyabb szinten (12. ábra). Érdekes módon, izolálás után közvetlenül nem változott, ugyanakkor a kultúra fenntartása (1-6 nap) során fokozatosan nőtt az *NtPAO5D* relatív expressziója (12. ábra). Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a peroxiszómális PAOk oxidatív stresszre aktiválódnak és a redox egyensúly szabályozásán keresztül fejtik ki hatásukat a protoplasztok izolálása és fenntartása során, míg az *NtPAO5D* később, nem oxidatív stresszhatásra aktiválódik, ami által szerepe eltérhet a peroxiszómális PAOk-tól a folyamatban. Ezek bizonyítása azonban további vizsgálatokat igényel.



12. ábra Protoplaszt izolálás dohány növény leveléből (0.nap) és protoplaszt sejt-kultúra fenntartása (1-6.nap), és ezek hatása az *NtPAO* gének relatív expressziójára. A relatív mRNS szintet a dohány PAO génekre specifikus primerekkel határoztuk meg valós idejű kvantitatív PCR segítségével. Két referencia gén átlagát használva normalizáltuk az eredményeket. Génenként a levél (kontroll=1) mintához viszonyítottunk. Az ábra 3 biológiai ismétlés átlagát és szórását tartalmazza. A Duncan-féle statisztikai szignifikáns eltéréseit eltérő betűk jelzik szignifikancia szint $p < 0,05$.

9.3. A NADPH oxidáz szerepe a ROF keletkezésében dohány protoplasztok izolálása és fenntartása során

Miután a protoplasztok izolálása során keletkező ROF forrása a NADPH oxidáz is lehet (Papadakis és Roubelakis, 2005), megnéztük miként befolyásolja a protoplasztok életképességét, ha gátoljuk a NADPH oxidázt. A teljes enzim gátlására difenilén jodóniumot (DPI) használtunk (Sagi és Fluhr, 2001). Azt tapasztaltuk, hogy a DPI a protoplasztok izolálása után közvetlenül (0. nap) még nem, de később, a sejtkultúra fenntartása során, különösen a 3. naptól jelentősen csökkentette a protoplasztok életképességét (13. ábra).



13. ábra Dohány levélből izolált protoplasztok életképesség meghatározása FDA fluoreszcens festéssel. Kontroll körülmények (A), és $2\mu\text{M}$ difenilén jodónium (DPI) kezelésre (B), mérce= $25\mu\text{m}$. A grafikon a biológiai ismétlések átlagait és szórását mutatja. RFU: relatív fluoreszcencia értéket jelent, ahol a kontroll 100-as értéknek felel meg. Statisztikailag szignifikáns különbséget a kontrollhoz képest a Student féle kétmintás t próba p érték alapján határoztuk meg $*=p<0,05$.

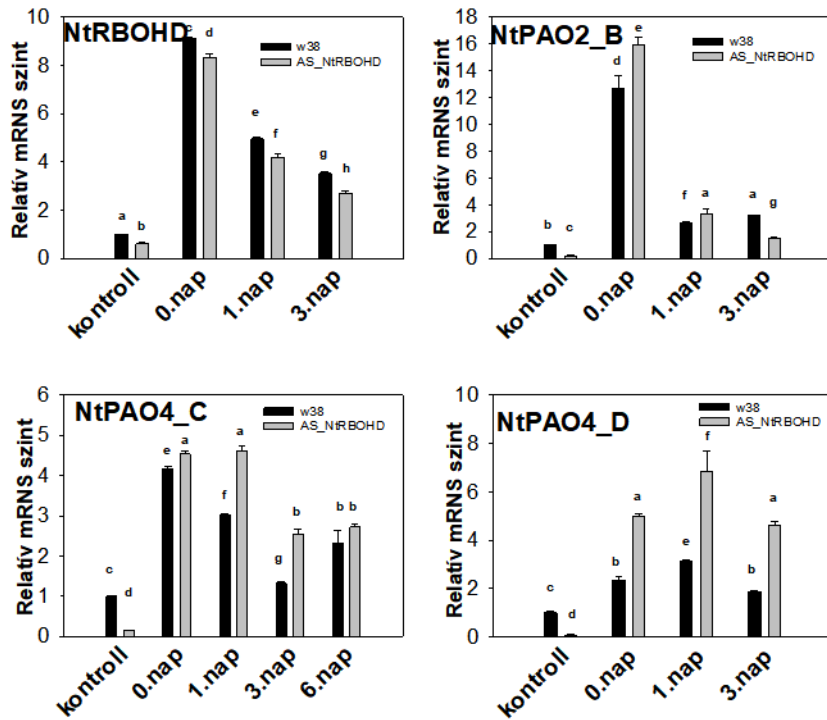
Miután a DPI az összes NADPH oxidáz enzimet gátolja, mindemellett az *NtRBOHD* expressziója jelentősen, mintegy nyolcszorosára emelkedett a protoplasztok izolálása után (14. ábra), a következőkben megnéztük, mi történik, ha csak az *NtRBOHD* izoenzimet kódoló gén

működését gátoljuk. Ehhez *AS-NtRBOHD* antiszensz csendesített transzgenikus dohány növények leveleit használtuk fel protoplaszt izolálásra.

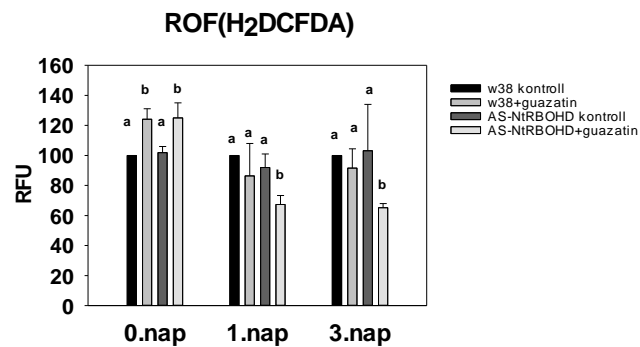
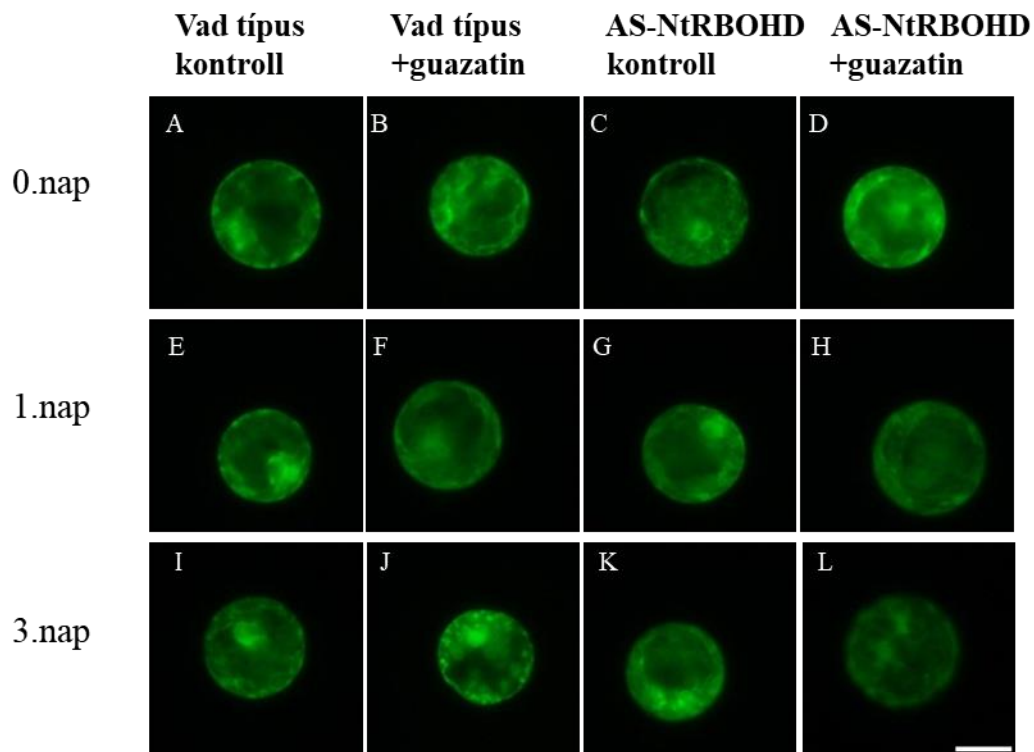
Meglepő módon a ROF szintekben az *AS-NtRBOHD* és a vad típusú növények protoplasztjai sem a protoplasztok közvetlen izolálása (0. nap), sem pedig azok fenntartása során (1-3 nap) nem mutattak különbséget (15. ábra). Az *AS-NtRBOHD* mutáns protoplasztok életképessége az izolálást követő első napon kismértékben ugyan csökkent, de a 3. napon a mutáns és vad típusú protoplasztok életképessége már nem különbözött egymástól (16. ábra). Mindezek alapján megállapítható, hogy az *NtRBOHD* önmagában nem befolyásolja jelentősen a protoplasztok ROF szintjét és életképességét.

9.4. A PAO és a NADPH oxidáz szerepe a ROF keletkezésében a protoplasztok izolálása és fenntartása során

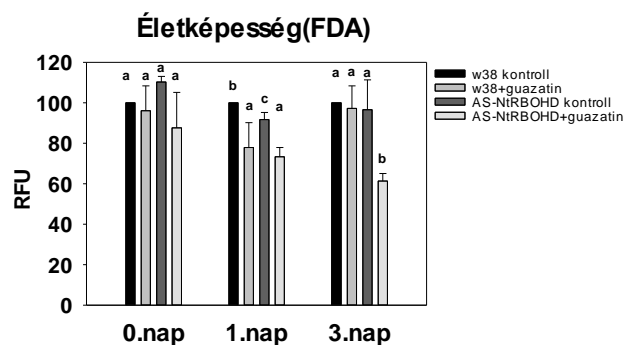
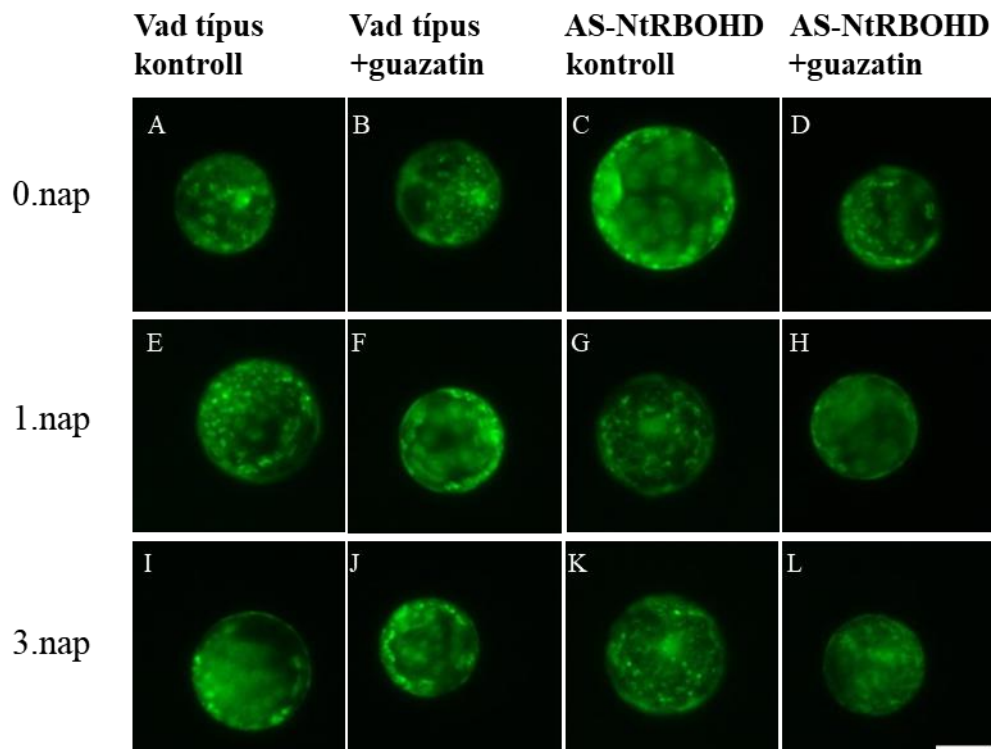
A PAO és a NADPH oxidáz kölcsönhatását dohány növényben a protoplasztok izolálása után közvetlenül (0. nap) és későbbi fenntartásuk (1-3 nap) során vizsgáltuk. Első lépésben megnéztük, miként változik az RBOH gének közül az *NtRBOHD* expressziója vad típusú és *AS-NtRBOHD* protoplasztokban, illetve az *NtPAO* gének közül azoknak a géneknek a kifejeződése *AS-NtRBOHD* protoplasztokban, amelyek a vad típus esetén magas expressziót mutattak (*NtPAO2B*, *NtPAO4C*, *NtPAO4D*). Az izolálás után közvetlenül (0. nap) az *NtRBOHD* relatív mRNS szintje, jelentős mértékben, mintegy 8-szorosára nőtt vad típusú protoplasztokban a levélben detektálhoz képest. *AS-NtRBOHD* protoplasztokban a vad típushoz képest némileg kisebb *NtRBOHD* transzkript szinteket mértünk (14. ábra). Érdekes módon, a protoplasztok tenyésztése során (1-3 nap) valamennyi *NtPAO* gén relatív transzkript szintje magasabb volt a mutáns protoplasztokban, mint a vad típusúakban (14. ábra). A PAO gátlása guazatinnal (Guaz) csak a 0. napon befolyásolta a ROF szintet a vad típusú protoplasztokban (15. ábra). Az életképességet a DPI-vel való gátláshoz hasonlóan, a Guaz kezelés csak kismértékben és átmentileg csökkentette a tenyésztés első napján, azonban ezt követően a kezeletlen kontrollhoz hasonló életképességet eredményezett (16. ábra). Ettől eltérően, *AS-NtRBOHD* protoplasztokban a Guaz kezelés mind a kezeletlen mutáns, mind a vad típusú protoplasztokhoz képest csökkentette a ROF szintet és érdekes módon a protoplasztok életképességét is (15-16. ábra). Ez alapján megállapíthatjuk, hogy az *NtRBOHD* csökkent expressziója önmagában nem, de a PAO guazatinnal való gátlásával együtt csökkent ROF szintet és csökkent életképességet eredményez.



14. ábra Az *NtRBOHD*, valamint *NtPAO* gének kifejeződése vad típusú és *AS-NtRBOHD* mutáns dohány növények leveléből izolált protoplasztokban, a protoplasztok izolálása (0.nap) majd a kultúra fenntartása (1-3.nap) során. A relatív mRNS szintet a dohány PAO génekre specifikus primerekkel határoztuk meg valós idejű kvantitatív PCR segítségével. Két referencia gén átlagát használva normalizáltuk az eredményeket. Génenként a vad típusú levélhez (kontroll=1) viszonyítottunk. Az ábra három ismétlés átlagát és szórását mutatja. Szignifikáns eltérést a különböző kisbetűk jelentik, Duncan-féle rang teszt alapján, szignifikancia szint $p < 0,05$.



15. ábra ROF szint meghatározása H₂DCFDA festéssel, vad típusú és AS-NtrBOHD mutáns protoplasztokban kontroll (A, E, I; C, G, K) körülmények között és guazatin kezelés (B, F, J és D, H, L) hatására. 0.nap (A-D) 1.nap (E-H) és 3 nap (I-L), mérce=25 μ m. Az ábra az ismétlések átlagát és szórását mutatja n=90 elemszámmal. RFU: relatív fluoreszcencia értéket jelent, ahol a kontroll 100-as értéknek felel meg. Statisztikai összehasonlítás naponként, Duncan-féle teszt alapján történt és a szignifikáns eltéréseket eltérő betűk jelzik, szignifikancia szint $p < 0,05$.



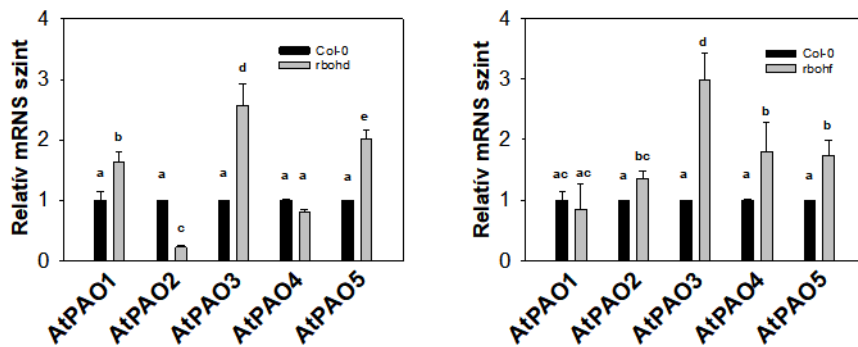
16. ábra Életképesség meghatározása FDA festéssel vad típusú és AS-NtRBOHD mutáns protoplastokban kontroll (A, E, I; C, G, K) körülmények között és guazatin kezelés (B,F,J és D, H, L) hatására. 0.nap (A-D) 1.nap (E-H) és 3 nap (I-L), mérce=25 μ m. Az ábra az ismétlések átlagát és szórását mutatja n=90 elemszámmal. RFU: relatív fluoreszcencia értéket jelent, ahol a kontroll 100-as értéknek felel meg. Statisztikai összehasonlítás naponként a Duncan-féle teszt alapján történt és a szignifikáns eltéréseket eltérő betűk jelzik, szignifikancia szint $p < 0,05$.

9.5. A PAO és NADPH oxidáz kölcsönhatásának tanulmányozása

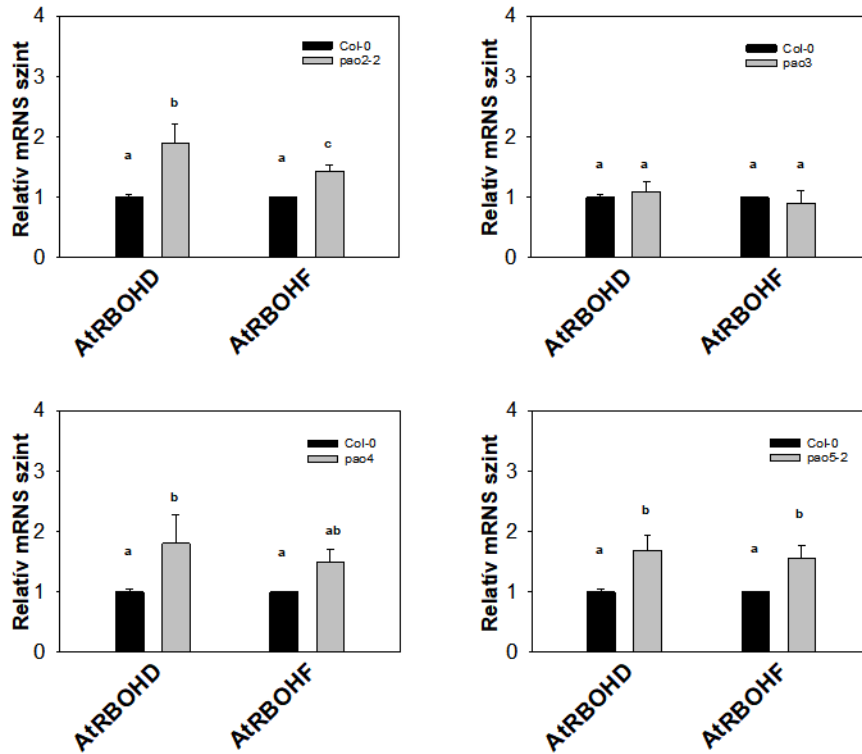
Arabidopsis növényben

Dohányban nem állnak rendelkezésre azok a mutáns vonalak, amelyek lehetővé tennék a PAO-NADPH oxidáz egymással való kölcsönhatásának mélyebb tanulmányozását, ezért a következő kísérleteinkhez Arabidopsis vad típusú kontroll, és T-DNS inszerciós *rboh* és *pao* mutáns

növényeket használtunk. Első lépésben megnéztük, van-e különbség *rboh*d, *rboh*f és vad típusú csíranövények között a különböző PAO gének, illetve a *pao2-2*, *pao3*, *pao4*, *pao5* mutáns és vad típusú növények között az *AtRBOHD* és *AtRBOHF* gének kifejeződési mintázatában kontroll körülmények között. Azt tapasztaltuk, hogy egy hetes *rboh*d mutánsban megnőtt az *AtPAO1*, az *AtPAO3* és az *AtPAO5*, míg *rboh*f mutánsban az *AtPAO1* kivételével valamennyi *AtPAO* gén relatív transzkript szintje a vad típushoz (Col) képest (17. ábra). Ezzel szemben a *pao3* mutánsban nem változott, viszont *pao2-2*, *pao4* és *pao5* mutánsban nőtt mind az *AtRBOHD*, mind pedig az *AtRBOHF* relatív expressziója a vad típushoz képest (18. ábra). Eredményeink megerősítik, hogy a PAO és a NADPH oxidáz egymással kölcsönhathat Arabidopsis növényben.



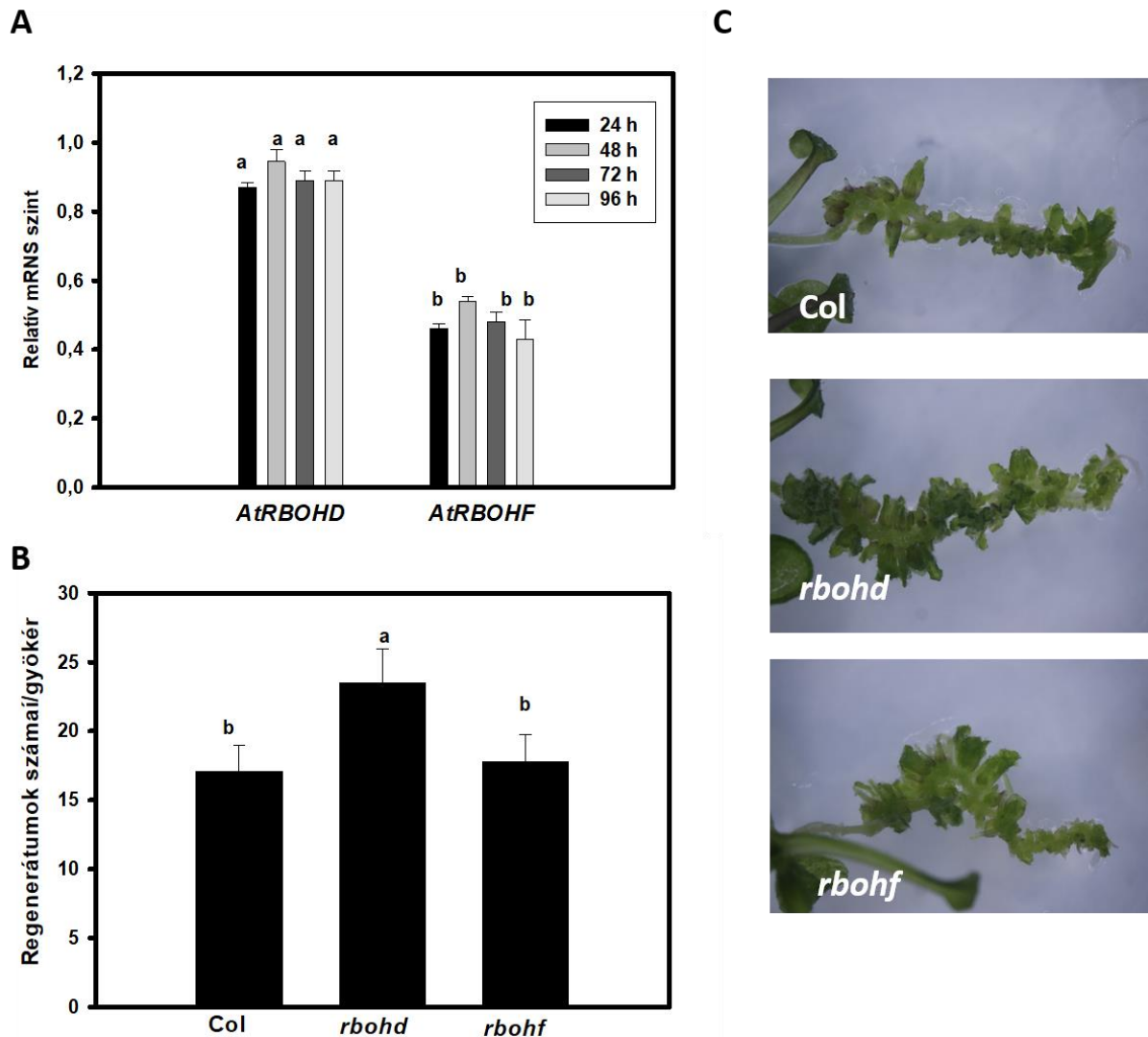
17. ábra Az *rboh*d és *rboh*f mutáns Arabidopsis csíranövény-hajtás, PAO gének expressziós analízise. A relatív mRNA szintet az Arabidopsis PAO (1-5), génekre specifikus primerekkel határoztuk meg valós idejű kvantitatív PCR segítségével. Két referencia gén átlagát használva normalizáltuk az eredményeket. Génenként a vad típust, *col-0* (kontroll) mintát tekintettük 1-nek. Az ábra három biológiai ismétlés átlagát és szórását tartalmazza. A Duncan-féle statisztika szignifikáns eltéréseit eltérő betűk jelzik, szignifikancia szint $p < 0,05$.



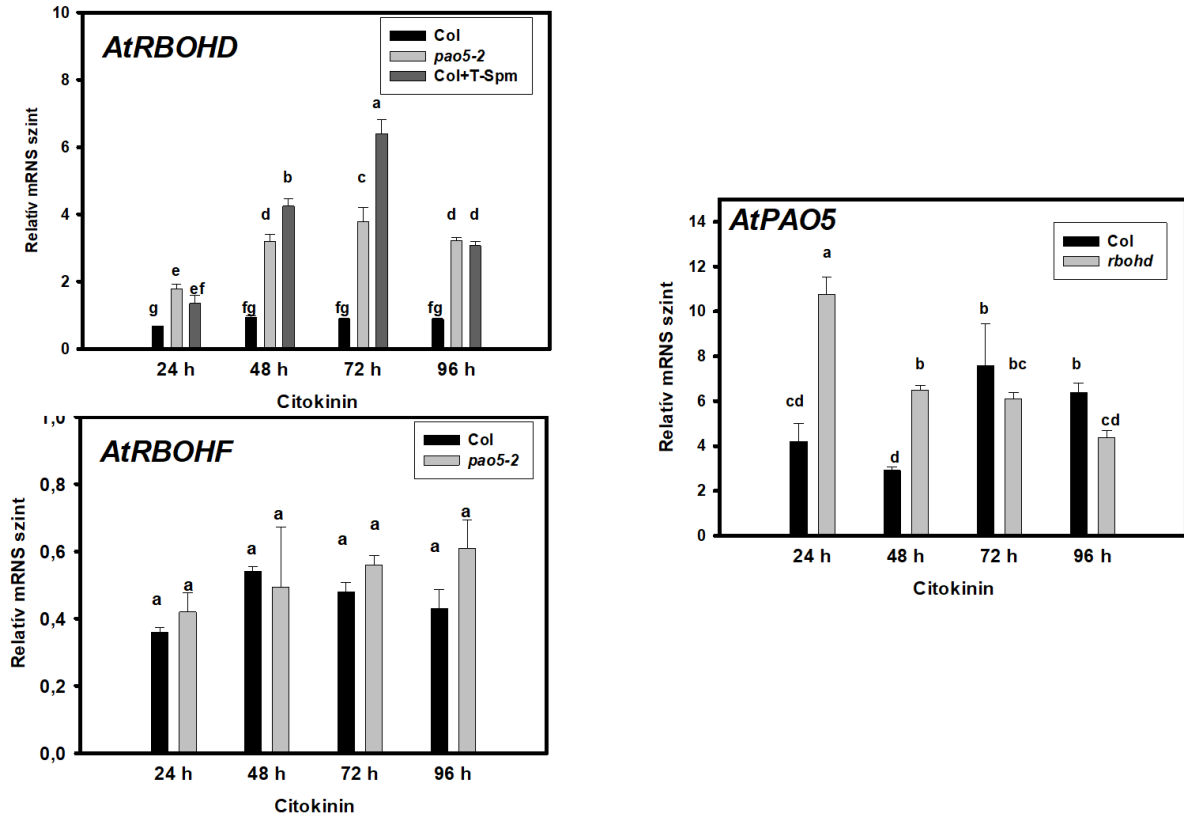
18. ábra *pao2-2*, *pao3*, *pao4* és *pao5-2* mutáns *Arabidopsis* csíranövények hajtás génexpressziós analízise. A relatív mRNS szintet az *arabidopsis* *RBOHD* és *RBOHF*, génekre specifikus primerekkel határoztuk meg valós idejű kvantitatív PCR segítségével. Két referencia gén átlagát használva normalizáltuk az eredményeket. Génenként a vad típust *col-0* (kontroll) mintát tekintettük 1-nek. Az ábra három biológiai ismétlés átlagát és szórását tartalmazza. A Duncan-féle statisztikai szignifikáns eltéréseit eltérő betűk jelzik, szignifikancia szint $p < 0,05$.

Ezután megnéztük, hogy ez a kölcsönhatás megfigyelhető-e bizonyos fejlődési folyamatokban. Erre a célra egy szervfejlődési folyamatot választottunk, nevezetesen az oldalgyökér primordiumok citokinin által indukált direkt hajtásmerisztémává történő átalakulását, melyről korábban leírták, hogy a PAO5 fontos szerepet játszik a szabályozásában (Kaszler és mtsai., 2021, 2023). Miután az RBOH szerepét ebben a folyamatban még egyáltalán nem vizsgálták, először megnéztük, hogy miként változik az *AtRBOHD* és az *AtRBOHF* relatív expressziója a direkt hajtásmerisztéma kialakulásának 4 időpontjában: a citokinin indukciót követő 24 (mitotikus osztódási szünet), 48 (szervkezdemények megjelenése), 72 (korai promerisztémák kialakulása) és 96 (késői promerisztémák megjelenése) órával. Azt tapasztaltuk, hogy a kontrollhoz képest nem emelkedett meg sem az *AtRBOHD*, sem pedig az *AtRBOHF* relatív expressziója (19. ábra A). Az *rboh*d mutánsban ugyanakkor szignifikánsan megnőtt, míg az

*rboh*f mutánsban nem változott a hajtás regenerátumok száma a vad típushoz képest (19. ábra B-C).



19. ábra. Az *AtRBOHD* és az *AtRBOHF* hatása az oldalgökeér primordiumok direkt hajtásmerisztémává történő átalakulása során *Arabidopsis*ban. Az *AtRBOHD* és *AtRBOHF* relatív transzkript szintjének változása a citokinin indukciót követő 24-96 órával 6 napos kezeletlen csíranövény gyökeréhez viszonyítva (kontroll=1). B-C: Az *RBOHD* és *F* hiányának hatása a direkt regeneráció hatékonyságára. A vizsgálathoz T-DNS inszerciós *rbohD* és *rbohF* mutáns vonalakat használtunk, kontrol vad típus *Arabidopsis* (*Col*) növényekhez hasonlítottuk őket. Az adatsorok statisztika összehasonlításához Duncan féle tesztet használtunk, a szignifikáns eltérést betűk jelzik $P \leq 0,05$ -szinten.



20. ábra. *RBOHD* és *RBOHD F* valamint *PAO5* gének expressziós változásainak vad típusú növényekben T-Spm kezelés hatására, illetve *pao5-2* mutáns növényekben, valamint az *AtPAO5* expressziójának változása *rbohD* mutáns növényekben a kezeletlen vad típusú növényekhez viszonyítva a citokinin indukciót követő 24, 48, 72 és 96 órában. A 6 napos kezeletlen csíranövény gyökeréhez viszonyítva (kontroll=1). Az adatsorok statisztika összehasonlításához Duncan féle tesztet használtunk, a szignifikáns eltérést betűk jelzik $P \leq 0,05$ -szinten.

pao5-2 mutánsban a vad típushoz képest kétszeres a T-Spm szintje, a többi poliamin szintjében azonban nincs különbség a mutáns és a vad típusú növények között (Kim és mtsai., 2014). Mindemellert a PAO5 a T-Spm homeosztázis szabályozásán keresztül szabályozza az oldalgökér primordiumok citokinin indukált hajtásmerisztémává történő átalakulását (Kaszler és mtsai., 2023). Így a PAO5 hatásának megerősítésére vad típusú növények esetében T-Spm kezelést is alkalmaztunk. Azt tapasztaltuk, hogy az oldalgökér primordiumok hajtásmerisztémává történő átalakulása során az *AtRBOHF* relatív mRNS szintjében a vad típusú és a *pao5-2* mutáns növények nem különböztek egymástól (20. ábra).

Ezzel szemben *pao5-2* mutáns növényekben a vad típusú T-Spm kezelt növényekhez hasonlóan, már a mitotikus osztódási szünettől (citokinin indukció után 24 óra) nőtt az *AtRBOHD* relatív transzkript szintje és magas maradt egészen a késői promerisztémák kialakulásáig (citokinin indukció után 96 óra) a kezeletlen vad típusú növényekhez képest.

Érdekes módon *rboh*d mutánsban is nőtt az *AtPAO5* relatív expressziója a citokinin indukciót követő 24 órától és magas maradt a szervezdemények megjelenéséig a vad típushoz képest (20. ábra). Eredményeink alapján elmondható, hogy az *AtPAO5* és az *AtRBOHD* kölcsönhathat egymással az oldalgyökérprimordiumok hajtásmerisztémává történő átalakulásának folyamatában. Ennek során a T-Spm az *AtRBOHD* pozitív szabályozója, ugyanakkor az *AtRBOHD* negatív szabályozója lehet az *AtPAO5*-nek.

10. Eredmények értékelése

10.1. A dohány PAO 1, 2, 4 és 5 gének a kétszikű PAO génekhez hasonlóan három kládba csoportosíthatóak

Szekvencia analízis alapján 14 dohány PAO génszekvenciát azonosítottam, melyeket a lúdfűvel való szekvencia hasonlóság alapján neveztem el: *NtPAO1* (A-B), *NtPAO2* (A-C), *NtPAO4* (A-D) és *NtPAO5* (A-E) (8. függelék). Az egyes családokon belüli több PAO oka lehet az, hogy a dohány allotetraploid faj, ami által, egyes gének nagyobb kópiaszámban lehetnek jelen a genomban. Ez nagyfokú genetikai diverzitásra ad lehetőséget. Az egy családba található PAOk eltérő funkciót vehetnek fel, ami által több szervben kifejeződve több feladatot is elláthatnak. Filogenetikai analízis alapján a növényi PAO-ok öt kládba csoportosíthatók, I, II, III, IV és V (Bordenave és mtsai., 2019). A dohány PAO-ok három kládba sorolhatóak be (5. ábra; 1. függelék). A II-es kládba nem tartozik egyetlen dohány NtPAO gén sem, a lúdfű és paradicsom PAO génekhez hasonlóan (Takahashi és mtsai., 2010; Fincato és mtsai., 2012; Hao és mtsai., 2018) (5. ábra, 1. függelék). A II-es kládba három rizs PAO (*OsPAO2*, *OsPAO6* és *OsPAO7*) és egy kukorica PAO (*ZmPAO1*) gén sorolható, amit a kukorica után *ZmPAO1* típusú kládnak neveznek (Ono és mtsai., 2012; Sagor és mtsai., 2021; Bordenave és mtsai., 2019; Xi és mtsai., 2022). Arra, hogy miért nem tartozik egyetlen dohány NtPAO sem ebbe a kládba, magyarázat lehet egy duplikációs és egy kihalási esemény az evolúció során, ami eltüntette a *ZmPAO1* típust néhány kétszikűből, de meghagyta az *AtPAO1* típust (Bordenave és mtsai., 2019). A I-es, a III-as és az V-os kládba tartozó PAO-ok a PA-ok visszaalakítását (BC útvonal) végzik és a citoplazmában lokalizáltak (Ahou és mtsai., 2014; Bordenave és mtsai., 2019; Kim és mtsai., 2014; Liu és mtsai., 2014; Yu és mtsai., 2019). Az *NtPAO1*-re korábban azt gondolták, hogy apoplasztikus és terminális típusú (TC) reakciót katalizál (Gémes és mtsai., 2016; Moschou és mtsai., 2008b). Ezzel szemben mi azt találtuk, hogy mindkét *NtPAO1* (*NtPAO1A* és B) az I-es kládba tartozik, akárcsak az *Arabidopsis AtPAO1* és a paradicsom *SlPAO1*-t, amelyek a citoplazmában lokalizáltak és BC típusú reakciót katalizálnak (5. ábra, 1. függelék). Ennek az ellentmondásnak az oka a következő lehet. A PAO által katalizált reakció típusa (BC vagy TC) az enzim működése során termelődő DAP-tól függ. Az *NtPAO1* esetén apoplasztikus lokalizációt írtak le, amikor fluoreszcensen jelölt *NtPAO1*-et fejeztettek ki hagyma epidermisz sejtekben, izolált extracelluláris sejt maradványokban pedig TC enzimaktivitását találtak (Moschou és mtsai., 2008b; Yoda és mtsai., 2006). A szekvencia illesztés során azonban mi azt találtuk, hogy a *ZmPAO1* apoplasztikus szekvencia (Tavladoraki és mtsai., 2006) egy része

hiányzik a dohány NtPAO1-ből, és az analízis alapján inkább az Arabidopsis *AtPAO1* génnel mutat közelebbi szekvencia rokonságot (2., 7. függelék). Habár a ZmPAO1 apoplasztikus szekvencia nélkül is megtalálható lehet az apoplasztban, ilyen például a narancs CsPAO4 (Wang és Liu, 2016). Érdekes módon a citoplazmatikus lokalizációjú Arabidopsis *AtPAO1* baktérium sejtekbe juttatva mutat TC típusú aktivitást is (Tavladoraki és mtsai., 2006), aminek feltehetően az lehet az oka, hogy azok a növények, melyek nem rendelkeznek apoplasztikus TC típusú PAO-val, ezt a feladatot más enzimmel együtt, például a DAO, vagy egy citoplazmatikus PAO segítségével látják el (Bordenave és mtsai., 2019; Planas-Portell és mtsai., 2013). A ZmPAO1-től való szekvencia különbség (csak 40% a hasonlóság), a prediktált lokalizáció és az irodalmi adatok alapján nem zárható ki egy TC típusú, de nem extracelluláris dohány PAO megléte is, azonban ez kísérletesen még nem bizonyított. Az III-as kládba tartozó PAO-ok génszerkezetben és eredetben is eltérnek a többi növényi PAO-tól. Az Arabidopsis *AtPAO5* és feltehetően az azzal homológiát mutató más PAO génekre is jellemző az intron nélküli génszerkezet, valamint a T-Spm oxidáció (Fincato és mtsai., 2012; Kim és mtsai., 2014; Alabdallah és mtsai., 2017). Az Arabidopsis *AtPAO5* inkább dehidrogenáz, mint oxidáz aktivitással rendelkezik, így feltételezhető, hogy a különböző fejlődési és stresszfolyamatok szabályozására nem a H₂O₂ keletkezésén, hanem a T-Spm homeosztázis szabályozásán keresztül fejt ki hatását (Wang és mtsai., 2012; Kim és mtsai., 2014; Alabdallah és mtsai., 2017; Zarza és mtsai., 2017; Kaszler és mtsai., 2021, 2023). Ebbe a kládba tartozik az összes dohány *NtPAO5* gén (*NtPAO5A-E*) is, de a kládra jellemző génszerkezeti sajátosság figyelhető meg két paradicsom PAO (*SIPAO6-7*) esetében is (Hao és mtsai., 2018). Az ide tartozó dohány NtPAO5-ök tehát feltehetően a T-Spm-t részesítik előnyben szubsztrátként és a T-Spm Spd-né történő visszaalakítását katalizálják, de ennek kísérleti igazolása még nem történt meg. A PSORT report szubcelluláris lokalizációs eredményei alapján az *NtPAO2(A-C)* és *NtPAO4(A-D)* gének által kódolt PAO-ok az Arabidopsis *AtPAO2-4* génekhez hasonlóan, peroxiszómálisak lehetnek (Fincato és mtsai., 2011; Moschou és mtsai., 2008c; Samanta és mtsai., 2023) és a IV-es kládba tartoznak. A peroxiszómális lokalizációt megerősíti a C terminálisú peroxiszómális target szekvencia jelenléte, ami minden IV-es kládba tartozó PAO esetében megfigyelhető (Arabidopsis *AtPAO2-4*; paradicsom *SIPAO2-5*; rizs *OsPAO3-5*; kukorica *ZmPAO3-4*, *ZmPAO6-9*)(Hao és mtsi., 2018; Sagor és mtsi., 2021; Takahashi és mtsi., 2010; Xi és mtsi., 2022). Ez alapján feltételezhető, hogy az *NtPAO2(A-C)* és *NtPAO4(A-D)* a többi növényfaj IV-es kládba tartozó PAO-ival hasonló funkciót lát el a növények különböző életfolyamataiban. Mindemellett, a promóter analízis során a dohány NtPAO génben megfigyelt stressz, hormon és fény szabályozott elemek jelenléte alapján feltételezhető, hogy a

dohány PAO-ok a többi növényfajban található PAO-ok-hoz hasonlóan (Gholizadeh és Mirzaghaderi, 2020; Hao és mtsai., 2018; Sagor és mtsai., 2021, 2012; Yu és mtsai., 2022) komplex szabályozás alatt állnak és fontos szerepet játszanak mind a fejlődési, mind pedig a stresszválaszokban.

10.2. A dohány PAO-ok szervspecifikusan fejeződnek ki

A PAO-ok szervi/szöveti mintázata növényfajonként eltérő (Takahashi és mtsai., 2010; Hao és mtsai., 2018; Sagor és mtsai., 2021; Li és mtsai., 2020), ami megerősíti azt az elképzelést, hogy az egyes PAO-ok szervi/szöveti lokalizációjuktól függően, specifikus feladattal bírnak a növények fejlődési és stresszfolyamatainak során. Dohányban néhány PAO szervi kifejeződésében hasonlóságot mutat más fajokkal, ami funkcióbeli hasonlóságra utalhat. A dohány *NtPAO1* például, az Arabidopsis *AtPAO1*-hez hasonlóan leginkább a virágban fejeződik ki (Takahashi és mtsai., 2010; 9. ábra). Az *NtPAO2* gének szervi lokalizációja szintén hasonlóságot mutatott az Arabidopsis *AtPAO2* kifejeződésével, ami a szárban jelentős (Takahashi és mtsai., 2010; 9. ábra). Az *NtPAO* gének közül az *NtPAO5C* csak gyökérben fejeződött ki, ami alapján feltételezhető ennek a PAO-nak a gyökérspecifikus funkciója. A többi *NtPAO5* gén elsősorban a szárban expresszál, a virágban azonban az Arabidopsis *AtPAO5*-tel ellentétben nem fejeződik ki (9. ábra). Az *NtPAO4* gének expressziója a virágban volt a legmagasabb, ami azonban ellentétes az Arabidopsis *AtPAO4* génnel, ami inkább a levélben fejeződött ki. Mindez alapján az *NtPAO4* és *AtPAO4* gének között feltételezhető funkcionális különbség (Takahashi és mtsai., 2010; 9. ábra). Eredményeink alapján megállapítható, hogy a dohány PAO-ok szekvencia hasonlósága az Arabidopsis PAO-kal valószínűleg funkcionálisan is megnyilvánulhat. Mindemellett, miután bizonyos *NtPAO* gének általánosabban, több szervben is kifejeződnek, esetükben feltételezhető, hogy szervspecifikusan eltérő funkciót látnak el. Az *NtPAO4C* is ilyen, ami a virágban és a levélben is expresszál, vagy az *NtPAO5B* és *NtPAO5E*, melyek szárban és levélben is kifejeződnek.

10.3. A dohány PAO-ok különböző abiotikus stressz kezelésekre aktiválódnak

A PAO-ok szerepét az abiotikus stresszválaszokban már számos növényfajban leírták (Desikan és mtsai., 2006; Moschou és mtsai., 2008a; Konstantinos és mtsai., 2010; Gémes és mtsai., 2016; Wang és Liu, 2016; Zarza és mtsai., 2017; Wang és mtsai., 2019; Yu és mtsai., 2018). Promóter analízis alapján feltételezhető volt, hogy a különböző abiotikus stresszhatások differenciális válaszokat eredményeznek az NtPAO gének között dohányban. Eredményeink alapján izoenzim specifikus expressziós mintázat figyelhető meg, azaz a különböző stresszhatásokra eltérően reagáltak az egyes *NtPAO* gének (10.ábra). A szélsőségesen magas vagy alacsony hőmérséklet károsíthatja a növényeket és csökkentheti a termést, ami komoly problémát okozhat a mezőgazdaságban (Devireddy és mtsai., 2021). Hőstressz alatt a PAO-k részt vesznek a H_2O_2 termelésben, illetve ezen keresztül egyéb kulcs fontosságú molekulák szabályzásában is. Arabidopsisban az *AtPAO3* hatással van a hősokk fehérjék közül a hsp90 mennyiségére (Toumi és mtsai., 2019), míg dohányban az *NtPAO1* a redox válasz szabályzásában vesz részt hőstressz alatt (Mellidou és mtsai., 2017). Az általunk létrehozott kísérleti rendszerben, a IV-es kládba tartozó Arabidopsis *AtPAO3*-hoz és a paradicsom *SIPAO3-5*-höz hasonlóan az *NtPAO2A*, *NtPAO2C*, *NtPAO4A*, *NtPAO4C*, *NtPAO4D* gének hőre, míg az *NtPAO2C* és valamennyi *NtPAO4(A-D)* gén hidegre volt érzékeny (Hao és mtsai., 2018; Toumi és mtsai., 2019; 10. ábra). Mindezek alapján feltételezhető a IV-es kládba tartozó peroxiszómális dohány NtPAO-ok termoregulációban betöltött szerepe. A PAO-ok szerepét sóstressz alatt Arabidopsisban, narancsban, paradicsomban és dohányban is igazolták (Gémes és mtsai., 2016; Wang és Liu, 2016; Zarza és mtsai., 2017; Hao és mtsai., 2018). Dohányban sóstressznek kitett növényekben az *NtPAO1* a ROF termelésért a NADPH oxidázzal együttműködve felelős (Gémes és mtsai., 2016). Narancsban a *CsPAO4* játszik szerepet az oxidatív stressz kiváltó H_2O_2 produkcióban (Wang és Liu, 2016). Arabidopsisban pedig a citoplazmikus lokalizációt mutató PAO-ok (*AtPAO1* és *AtPAO5*) játszanak szerepet a sótolerancia kialakításában. Ezek közül az *AtPAO5* a sótolerancia kialakításában nem a ROF szintekben bekövetkezett változáson, hanem a T-Spm homeosztázisának szabályozásán keresztül vesz részt (Zarza és mtsai., 2017). Arabidopsis III-as klád *AtPAO5*-höz hasonlóan dohányban az *NtPAO5B* és *NtPAO5E* gének mutattak sóérzékenységet (10. ábra). Annak bizonyítására azonban, hogy az *NtPAO5* dohányban is a T-Spm szintek szabályozásán keresztül vesz részt a sóstressz válaszban, további vizsgálatok szükségesek. Az I-es kládba

tartozó Arabidopsis *AtPAO1*-hez és paradicsom *SIPAO1*-hez hasonlóan a sóstressz, bár kismértékben, de fokozta az *NtPAO1* gének kifejeződését (10. ábra). A IV-es kládba tartozó peroxisómális paradicsom *SIPAO4*-hez hasonlóan (Hao és mtsai., 2018) a sóstressz felülszabályozta az *NtPAO2B* és *C* gének működését, ugyanakkor az *NtPAO4* gének kifejeződése csökkent sóstressz alatt (10. ábra). A sóstresszhez hasonlóan a sebzés is felülszabályozta az *NtPAO2B* és *C*, valamint *NtPAO4C* és *D* gének működését (10. ábra). A peroxisómális PAO gének expressziójának növekedése sebzés hatására ezzel egyetértésben megfigyelhető Arabidopsisban és paradicsomban is (Moschou és mtsai., 2008c; Hao és mtsai., 2018). A PAO által katalizált reakciók egyik mellékterméke a hidrogén-peroxid, ami szintén képes a PAO aktivitását indukálni (Yoda és mtsai., 2006). A külső H₂O₂ kezelés rizsben csak a II-es kládba tartozó terminális reakciót katalizáló *OsPAO6* expresszióját fokozta és nem volt hatással egyik BC reakciót katalizáló PAO kifejeződésére sem (Sagor és mtsai., 2021). Ezzel ellentétben dohányban felülszabályozta a BC reakciót katalizáló *NtPAO2A-C*, illetve az *NtPAO5* gének, különösen az *NtPAO5A* gén működését (10. ábra). Összeségében megállapítható, hogy dohányban az *NtPAO* gének különböző abiotikus stresszhatásokra stressz specifikus expressziós mintázatot adnak. Az *NtPAO5* géncsaládon belül egyes gének a sóstresszre, míg mások a hőmérséklet változására válaszoltak, mely utóbbi szabályozásában feltehetően a IV-es kládba tartozó peroxisómális dohány *NtPAO*k is rész vesznek. Mindemellett, az *NtPAO5* és *NtPAO2* géncsaládokon belül a funkciók megoszlása figyelhető meg az egyes *PAO*k esetében az abiotikus stresszre adott válaszban. Az *NtPAO5B* és *NtPAO5E* sóstressz hatására expresszált, de a termoregulációban nem vett részt, ezzel szemben az *NtPAO5C* és *NtPAO5D* hőmérsékleti stresszre fejeződött ki, de sóstresszre nem volt érzékeny. Hasonló szubfunkcionalizáció figyelhető meg az *NtPAO2* géncsaládon belül, ahol az *NtPAO2A* hőstresszre, míg az *NtPAO2B* sóstresszre és sebzésre volt érzékeny.

10.4. Az NtPAO gének hormonális szabályozás alatt állnak

A növényi hormonok, mint szabályozó molekulák, a növények számos jelátviteli, -és stresszfolyamatában vesznek részt. A stresszhormonnak is hívott abszcizinsav (ABS) képes a H₂O₂ termelés indukcióján keresztül számos életfolyamatot befolyásolni, mint például a sztómazáródást (Hou és mtsai., 2013), vagy a gyökér növekedését (Wimalasekera és mtsai., 2015.). Az ABS által indukált sztómazáródásban a PAO általi H₂O₂ jelentőségét szölőben írták le (Konstantinos és mtsai., 2010). Bár a promóter analízis során több ABS válasz elemet is

találtunk (ABRE, ABRE3; 8. ábra), a 14 NtPAO gén közül a kívülről hozzáadott ABS kezelés hatására csak 3 gén (*NtPAO2A*, *NtPAO4B* és *NtPAO4C*) működése aktiválódott, a többi PAO gén pedig gátlódott (11. ábra). Az említett 3 gén különböző abiotikus stresszkezelésekre is indukálódott (10. ábra). Miután az abiotikus stresszválaszokban az ABS fontos jelátviteli közvetítő (Alcazar és mtsai., 2006; Yamaguchi-Shinozaki és Shinozaki, 1994), feltételezzük, hogy az ABS részt vesz ezeknek a PAO géneknek a stressz általi szabályozásában. Az auxin és a citokinin számos fejlődési folyamatban aktívan közreműködik. Az auxin és a citokinin PAO expressziót befolyásoló hatását többek között paradicsomban és rizsben is leírták (Hao és mtsai., 2018; Sagor és mtsai., 2021). Ugyanakkor meg kell említeni, hogy a PAO maga is hatással lehet az auxin és citokinin szintekre. Arabidopsis AtPAO5 a T-Spm homeosztázis szabályozásán keresztül befolyásolja az auxin és citokinin szinteket és ezen keresztül a növények növekedési és fejlődési folyamatokat (Wang és mtsai., 2012; Kim és mtsai., 2014; Alabdallah és mtsai., 2017; Kaszler és mtsai.; 2021,2023). Mindemellett, dohány PAO gének promóter analízise során számos auxin válaszelemet találtunk (pl. TGA és AuxRR; 8. ábra), melyek jelenléte alapján feltételezhető, hogy az auxin részt vesz ezeknek a géneknek a szabályozásában. A III-as kládban található paradicsom *SIPAO7*-hez hasonlóan, az auxin jelentős mértékben növelte az ugyanebbe a kládba tartozó dohány *NtPAO5C* relatív transzkript szintjét (Hao és mtsai., 2018; 11. ábra). Rizsben az auxin egyedül a IV-es kládba tartozó *OsPAO5* működését szabályozta felül (Sagor és mtsai., 2021). Ehhez hasonlóan, dohányban is indukálta a külső auxin kezelés a IV-es kládba tartozó gének közül az *NtPAO2* (*NtPAO2A-C*), az *NtPAO4C* és az *NtPAO4D* expresszióját (11. ábra). Ezzel szemben a citokinin nem befolyásolta az *NtPAO2B*, *NtPAO4A*, *NtPAO5C* gének kifejeződését, viszont növelte három *NtPAO* gén (*NtPAO4B* és *D* valamint *NtPAO5B*) relatív expresszióját (11. ábra). A gibberelinsav szükséges a dohány növények virágzásához (Gallego-Giraldo és mtsai., 2007). A dohány NtPAO-ok közül az *NtPAO4D*, mely a legmagasabb expressziót mutatta virágban, adta a legerősebb válaszreakciót gibberelinsav kezelés hatására, ami pedig utalhat arra, hogy az *NtPAO4D* szerepe a virágzásban is fontos lehet (11. ábra).

10.5. Dohányban a IV-es kládba tartozó perxiszómális NtPAO-ok fontos szerepet játszanak a protoplaszt kultúra fennmaradásában

Izolálásuk és fenntartásuk során a protoplasztok számos anyagcsere változáson mennek keresztül. Az izolálás során a sejtfal enzimatisz eltávolítása történik, melynek során ROF

képződik, ami nagy mennyiségben felhalmozódva oxidatív stresszt eredményez a sejten belül (Anastasia K. Papadakis, 1999; Pasternak és mtsai., 2007). Ha azonban az oxidatív stressz csak kismértékű, a keletkező ROF nélkülözhetetlen szerepet játszik a protoplasztok későbbi regenerálásában (Papadakis és Roubelakis-Angelakis, 2005). Az emésztést követően, megfelelő indukciós környezetben ugyanis az egyedülálló protoplaszt sejtek képesek teljes növényre regenerálódni. Ehhez az szükséges, hogy a protoplasztok osztódjanak, ismét sejtfaluk képződjön és differenciálódjanak. A folyamatot számos transzkripciós faktor és stressz válasz gén befolyásolja (Chupeau és mtsai., 2013). Bár a PAO-ok működése szintén szorosan kapcsolódik a növényi stresszválaszokhoz (Wang és mtsai., 2019; Yu és mtsai., 2019) és aktivitásuk változását is leírták már többek között árpa, dohány és szőlő protoplasztokban (Cervelli és mtsai., 2004; Papadakis és Roubelakis-Angelakis, 2005), részletes adatok a PAO gének szerepéről dohány protoplasztok izolálása és fenntartása során mindez ideáig nem álltak rendelkezésre. Az általunk vizsgált protoplaszt kultúrában főleg a peroxiszómális lokalizáltságú *NtPAO* gének (*NtPAO2B*, *NtPAO4A*, *NtPAO4C* és *NtPAO4D*) expressziója emelkedett meg az izolálás után közvetlenül és magas maradt később, a protoplaszt kultúra fenntartása során is (12. ábra). Ez alapján feltételezhető, hogy dohányban a peroxiszómális *NtPAO*-ok fontos szerepet játszanak a protoplaszt kultúra fennmaradásában. Feltételezhető, hogy ezek a PAO-ok a ROF szintek befolyásolásán keresztül, a redox rendszer szabályozásán át fejtik ki hatásukat ebben a folyamatban. Ennek bizonyítása azonban további vizsgálatokat igényel.

10.6. A PAO-ok és a NADPH oxidáz kölcsönhat egymással

Dohányban a protoplasztok osztódása és így a regenerálhatósága is függ az antioxidáns kapacitástól és a ROF szintjétől. Azok a dohány protoplasztok, melyek kisebb antioxidáns kapacitással rendelkeznek, több ROF-t tartalmaznak és totipotenciájuk is alacsonyabb (Papadakis és mtsai., 2001). Ugyanakkor a ROF kismértékű emelkedése elősegíti a sejtek osztódását (Pasternak és mtsai., 2005). A ROF termeléséhez a PAO mellett hozzájárulhat a NADPH oxidáz enzim is. *Brassica napus* levél protoplasztokban a NADPH oxidáz működése által keletkezett nagy mennyiségű ROF nem az osztódási folyamatokat segítette, hanem programozott sejthalálhoz vezetett (Tewari és mtsai., 2012). Ugyanakkor a ROF szintjének túlzott mértékű csökkentése ROF kioltó DMTU, vagy NADPH oxidáz gátló DPI alkalmazásával, csökkentheti a sejtek osztódási rátáját (Pasternak és mtsai., 2007). A poliaminok és NADPH oxidáz enzim kölcsönhatásának vizsgálatokor dohány protoplaszt

kultúrában azt tapasztalták, hogy a külső poliamin kezelés, különösen a Spd és a Spm, csökkentette a szöveti izolálás során a NADPH oxidáz aktivitása által keletkezett szuperoxid gyökönion mennyiségét (Papadakis és Roubelakis, 2005). Ugyanakkor, a Spd és a Spm indukálta a PAO enzimet, ami által oly mértékben emelkedett meg a H₂O₂ szintje, hogy az oxidatív stresszt és a protoplasztok pusztulását eredményezte (Papadakis és Roubelakis, 2005). Azt, hogy a PAO és a NADPH oxidáz kölcsönhathat-e a folyamatban ez ideáig még nem vizsgálták. Ahogy azt az előző fejezetben is említettem, az *NtPAO* gének közül a peroxiszómális lokalizációjú *NtPAO2* és *NtPAO4* gének szerepe feltételezhető dohány protoplasztok izolálása és fenntartása során a ROF szintek és ezáltal a redox egyensúly szabályozásában. *NtRBOH* gének közül az *NtPAO* génekkel párhuzamosan, már az izolálás után közvetlenül nőtt az *NtRBOHD* gén relatív transzkript szintje és magas maradt a kultúra fenntartása során is (14. ábra). Az RBOH enzim teljes gátlása DPI-vel, a protoplasztok izolálása után közvetlenül nem, de a kultúra fenntartása során jelentős mértékben csökkentette az életképességet (13. ábra). Ezzel szemben a PAO aktivitás gátlása Guaz-zal csak átmenetileg és kismértékben csökkentette a protoplasztok életképességét a kultúra fenntartása kezdetén, később azonban már a kezeletlen kontrollal megegyező életképességet eredményezett (16. ábra). Az *AS-NtRBOHD* mutánsban nem csökkent le a ROF szintje és az életképesség sem változott szignifikáns mértékben a vad típushoz képest (15-16. ábra). Guaz kezelés hatására azonban csökkent a ROF szintje és a protoplasztok életképessége mind a Guaz-zal kezelt vad típusú, mind pedig a nem kezelt *AS-NtRBOHD* mutáns protoplasztokhoz képest a kultúra fenntartása során (15-16. ábra). Mindemellett, *AS-NtRBOHD* mutáns protoplasztokban az izolálás után közvetlenül csökkent, viszont a kultúra fenntartása során nőtt valamennyi vizsgált peroxiszómális *NtPAO* gén relatív expressziója (14. ábra). Ezek alapján feltételezhető, hogy az *NtRBOHD* negatív szabályozója a peroxiszómális *NtPAO* (*NtPAO2B*, *NtPAO4C* és *NtPAO4D*) géneknek a protoplasztok fenntartása során. Mind az *NtRBOHD*, mind pedig az említett peroxiszómális *NtPAO*-ok egy pozitív visszacsatolási kör részét képezhetik, ami biztosítja a ROF optimális szintjét a protoplasztok izolálása és fenntartása során. Ezt a feltételezésünket alátámasztja, hogy bár az *AS-NtRBOHD* mutáns protoplasztokban megemelkedik az *NtPAO2* és *NtPAO4* gének relatív expressziója, a protoplasztok életképessége és ROF szintje a vad típushoz képest nem változik, ugyanakkor a mutáns érzékenyebb a PAO-ok Guaz-zal történő gátlására (14-16. ábra).

10.7. AtPAO5 és az AtRBOHD együttműködik az oldalgökerprimordiumok hajtásmerisztémává történő átalakításában

A PAO és NADPH oxidáz közötti kölcsönhatást a növények stressz válaszaiban már számos tanulmányban igazolták (Andronis és mtsai., 2014; Gémes és mtsai., 2016; Toumi és mtsai., 2019; Demiralay és mtsai., 2022). A növények fejlődési válaszaiban azonban a két enzim közötti kapcsolatot még nem vizsgálták. Annak érdekében, hogy fiziológiai állapotok mellett is információt kapjunk arról, hogy hatással van-e egyes *RBOH* gének hiánya a *PAO*-ok, illetve egyes *PAO*-ok hiánya az *RBOHD* és *RBOHF* kifejeződésére, *Arabidopsis* csíranövényeket használtunk. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy az *AtRBOHD* negatív szabályozója az *AtPAO1*, az *AtPAO5* és különösen a peroxiszómális *AtPAO3* génnek. Az *AtRBOHF* ehhez hasonlóan szintén leginkább az *AtPAO3* gén működését szabályozza alul (17. ábra). Az *AtPAO3* ugyanakkor nem befolyásolja sem az *AtRBOHD*, sem pedig az *AtRBOHF* gének kifejeződését (18. ábra). Az *AtPAO2*, az *AtPAO4* és az *AtPAO5* pedig feltehetően alulszabályozza az *AtRBOHD* és *F* géneket (18. ábra). Korábban kimutatták, hogy az *AtPAO5* fontos szerepet játszik az oldalgökerprimordiumok citokinin indukált direkt hajtásmerisztémává történő átalakulásában *Arabidopsis* növényben (Kaszler és mtsai., 2021; 2023). Az *RBOH* szerepét a folyamatban azonban nem vizsgálták. Érdekes módon, bár az *AtRBOHD* kifejeződése nem változott, az *AtRBOHF* pedig alulszabályozott volt a direkt hajtásmerisztémák kialakulása során, *rbohd* mutánsban szignifikánsan nőtt a képződött regenerátumok száma (19. ábra). *pao5-2* mutáns növények kisebb regenerációs hatékonyságot mutatnak az oldalgökerprimordiumok hajtásmerisztémává történő átalakulása során (Kaszler és mtsai., 2023). Ezekben a mutánsokban eredményeink alapján az *AtRBOHD* gén felülszabályozódik a direkt hajtásmerisztémák kialakulása során. Miután az *AtPAO5* az oldalgökerprimordiumok hajtásmerisztémává történő direkt átalakításában nem a ROF szintek befolyásolásán, hanem a T-Spm homeosztázis szabályozásán keresztül vesz részt (Kaszler és mtsai., 2021; 2023), feltételezhető, hogy a T-Spm az *AtRBOHD* pozitív szabályozója a folyamatban. Ezt alátámasztják külső T-Spm kezeléssel végzett kísérleti eredményeink, mely során az *AtRBOHD* kifejeződését illetően, a *pao5-2* mutáns növényekkel megegyező eredményt kaptunk (20. ábra). Mindemellett az *AtRBOHD* negatív szabályozója lehet az *AtPAO5*-nek (20. ábra). Mivel a ROF szintek az oldalgökerprimordiumok hajtásmerisztémává történő átalakulása során a *pao5-2* mutánsban a vad típuséhoz képest nem különböztek (Kaszler és mtsai., 2023),

mindemellett mind a NADPH oxidáz, mind pedig a PA/PAO hatását szabályozhatja a Ca^{2+} (Wu és mtsai., 2010; Kadota és mtsai., 2015; Scholz és mtsai., 2020), feltételezhető egy RBOHD-PAO5-T-Spm- Ca^{2+} jelátviteli kapcsolat a folyamat során. Ennek alátámasztása azonban további vizsgálatokat igényel.

11. Összefoglalás

A poliamin oxidázok fontos szerepet töltenek be a poliaminok homeosztázisának és a reaktív oxigénformák szintjének szabályozásában. A PAO géneket és azok funkcióit már számos fajban azonosították, dohányban azonban mindez ideáig átfogó, az összes PAO génre kiterjedő vizsgálat nem történt. Munkám során ezt a hiányt igyekeztem pótolni. Szekvencia analízis segítségével tizennégy PAO gént azonosítottam, melyeket filogenetikai analízis alapján 5 kládba soroltam. Az I-es kládba az *NtPAO1(A-B)*, a III-as kládba az *NtPAO5(A-E)*, míg a IV-es kládba a peroxiszómális lokalizációjú *NtPAO2(A-C)* és *NtPAO4(A-D)* dohány PAO gének tartoznak, míg a II-es és az V-ös kládba egyetlen dohány NtPAO gén sem tartozik. Az egyes dohány NtPAO-ok gének szerepének tisztázásához, megvizsgáltam azok szervspecifikus kifejeződését, valamint különböző abiotikus stresszválaszokban és fejlődési válaszokban való részvételét. Az *NtPAO1* és *NtPAO4* leginkább a virágban, az *NtPAO2* és *NtPAO5* gének pedig leginkább a szárban fejeződnek ki. A termoreguláció szabályozásában leginkább a IV-es kládba tartozó peroxiszómális PAO-ok (*NtPAO2A*, *NtPAO2C*, *NtPAO4A-D*) vesznek részt. A sóstressz elsősorban az *NtPAO2B-C*, illetve az *NtPAO5(E és B)*, míg a sebzés az *NtPAO2B-C*, az *NtPAO4C-D*, illetve az *NtPAO5A* és *NtPAO5C* gének működését szabályozza felül. A promóter analízis, valamint az abiotikus stresszben való részvétel alapján feltételeztük az egyes NtPAO gének hormonális befolyásolhatóságát. Az abiotikus stresszválaszokban indukálódó *NtPAO2A*, *NtPAO4B* és *NtPAO4C* expresszióját az ABS is felülszabályozta, ami által feltételezhető az ABS hatása ezeknek a géneknek a stressz alatti indukciójában. A többi növekedésszabályozó hormonra adott válasz alapján feltételezhető, hogy az NtPAO-ok fontos szerepet játszanak a növények növekedésének és fejlődésének szabályozásában is, mint pl. az *NtPAO4D* a virágzásban. Az NtPAO-ok szerepét a protoplasztok izolálása és fenntartása során is igazoltuk, melyben a peroxiszómális NtPAO-ok feltehetően a redox egyensúly szabályozásával vesznek részt. A protoplasztok fenntartása során a peroxiszómális *NtPAO* gének (*NtPAO2B*, *NtPAO4C* és *NtPAO4D*) működését az *NtRBOHD* alulszabályozza. Mind az *NtRBOHD*, mind pedig a peroxiszómális NtPAO-ok egy pozitív visszacsatolási kör részét képezhetik, ami hozzájárul a

redox egyensúly fenntartásához a protoplasztok izolálása és fenntartása során. Az AtPAO5 együttműködését az AtRBOHD-vel Arabidopsis direkt organogenezise során is megfigyeltük. A T-Spm az NtRBOHD felülszabályozásával gátolta az oldalgyökérprimordiumok direkt hajtásmerisztémává történő átalakulását. A direkt hajtásmerisztémák kialakulása során eredményeink alapján feltételezhető egy RBOHD-PAO5-T-Spm-Ca²⁺ jelátviteli kapcsolat, ennek bizonyítása azonban további kísérleteket igényel.

12. Summary

Polyamine oxidases play important role in the regulation of polyamine homeostasis and the level of reactive oxygen species. Even though PAO gene families and their function have been demonstrated in several species, little is known about PAOs in tobacco. In this study, based on sequence analysis, fourteen PAO genes were unravelled in tobacco genom. Based on phylogenetic analysis, plant PAOs could be categorized into five clades, of which *NtPAO1*s (A-B) belong to clade I, *NtPAO5*s (A-E) to clade III, the residual seven with peroxisomal localization (*NtPAO2*s and *NtPAO4*s) to clade IV and none of the NtPAOs to clade II and clade V. To understand the roles of fourteen tobacco NtPAOs, organ specific expression and their expression profiles under different abiotic stress and developmental processes was characterized. Transcript level of *NtPAO1* and *NtPAO4* genes were abundant in flowers, while mRNA level of *NtPAO2* and *NtPAO5* genes were higher in stems. Possible involvement of clade IV member *NtPAOs* (*NtPAO2A*, *NtPAO2C*, *NtPAO4A-D*) in thermoregulation was also shown. Transcript level of *NtPAO2B-C* and *NtPAO5(E,B)* was upregulated by salt stress, while wounding induced the expression of *NtPAO2B-C*, *NtPAO4C-D*, *NtPAO5A* and *NtPAO5C* genes. Based on the results of in silico analysis of tobacco PAOs promoter, influence of different plant growth regulators on expression of NtPAOs was also suggested. In responses to abiotic stresses, a possible common signal mediator is ABA. Thus, *NtPAO2A*, *NtPAO4B* and *NtPAO4C* induction by abiotic stresses may be explained by ABA involvement. Based on the response of NtPAO genes for other plant growth regulators, it can be hypothesized that NtPAOs play important role in the regulation of plant growth and development, for instance *NtPAO4* in flowering. Based on our results, during the isolation and maintenance of tobacco protoplast, regulatory role of peroxisomal NtPAOs in redox balance was also suggested. Furthermore, supposedly peroxisomal NtPAOs (*NtPAO2B*, *NtPAO4C* és *NtPAO4D*) were downregulated by NtRBOHD in this process. Presumably, they form a positive feed back loop, which contributes

to the maintenance of redox balance. Moreover, cross talk between AtPAO5 and AtRBOHD during the direct conversion of lateral root primordia to shoot meristem in Arabidopsis was also suggested in this study. Supposedly, in this process, upregulation of NtRBOHD by T-Spm inhibited the formation of direct shoot meristem. Based on our results we hypothesized an RBOHD-PAO5-T-Spm-Ca²⁺ signalling network during the conversion of lateral root primordia to shoot meristem, however it needs to be proved.

13. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönettel és hálával tartozom témavezetőimnek, **Prof. Dr. Fehér Attilának** és **Pichererné Dr. Gémes Katalinnak**, akik kitartó és inspiráló munkájukkal BSc-s hallgató korom óta mindig támogatták és irányították szakmai fejlődésem, és akik tanácsai javaslatai nélkül a PhD disszertációm és a közös publikációink nem jöhettek volna létre.

Külön köszönettel tartozok Dr. Bernula Dóra, Kaszler Nikolett munkatársaknak „lab-tesóknak” a közös manuális és elméleti munkákért, a tapasztalatokért, a jó hangulatért és hogy bármikor számíthattam rájuk szakmai és személyes vonatkozásban.

Az SZTE Növénybiológia tanszéknek, vezetőjének Prof. Dr. Fehér Attilának és a tanszék valamennyi munkatársának tartozom köszönettel, hogy doktori fokozat megszerzéséhez vezető utat az SZTE-n kezdhettem el, és ehhez minden segítséget megadtak. Külön kiemelve szeretném megköszöni Dr. Mainé Dr. Csiszár Jolán támogatását. A PhD kezdetén szakmai és technikai támogatásért, valamint a későbbi közös munka során szerzett tapasztalatokért tartozom köszönettel Ördögné Dr. Kolbert Zsuzsannának és Dr. Molnár Árpádnak.

A Szegedi Biológiai Központ Növényi Morfogenezis Szabályozása Csoport vezetőjének Dr. Magyar Zoltánnak szeretném megköszönni hogy biztosították munkámhoz a feltételeket. Köszönet illeti, a csoport minden munkatársát, hogy a precíz folyamatos munka mellett bármikor bármilyen kérdéssel fordulhattam hozzájuk, továbbá, hogy mindig vidáman teltek a munkanapok. A labor működéséhez elengedhetetlen volt, asszisztensünk Nagy Róza munkája, amiért leírhatatlan nagy hálával tartozunk neki.

A hazai és nemzetközi konferenciákon való részvétel lehetőségért az ott szerzett ismeretekért tartozom köszönettel témavezetőimnek. Örökké tartó hála illeti meg Pichererné Dr. Gémes Katalint, Dr. Bernula Dórát, Kaszler Nikolettet a tudományos kongresszusokon szerzett tapasztalatok megvitatása, és azok lehető legjobb felhasználásához nyújtott segítségük, és optimista hozzáállásukért, valamint a felejthetetlen élményekért.

Nagyon köszönöm opponenseimnek lelkiismeretes és precíz bírálati munkájukat, észrevételeiket, javaslataikat.

Családomnak, barátoknak, türelemért megértésért vagyok hálás. Páromnak pedig azért, mert mindig mellettem állt a munka során, türelmével, idejeével és finom főztjével támogatott.

A dolgozat elkészüléséhez szükséges támogatást az NKFIH FK 128997 pályázat biztosította.

14. Irodalomjegyzék:

- Agudelo-Romero, P., Bortolloti, C., Pais, M.S., Tiburcio, A.F., Fortes, A.M., 2013. Study of polyamines during grape ripening indicate an important role of polyamine catabolism. *Plant Physiol. Biochem.* 67, 105–119. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.02.024>
- Agurla, S., Gayatri, G., Raghavendra, A.S., 2018. Polyamines increase nitric oxide and reactive oxygen species in guard cells of *Arabidopsis thaliana* during stomatal closure. *Protoplasma* 255, 153–162. <https://doi.org/10.1007/s00709-017-1139-3>
- Ahou, A., Martignago, D., Alabdallah, O., Tavazza, R., Stano, P., Macone, A., Pivato, M., Masi, A., Rambla, J.L., Vera-Sirera, F., Angelini, R., Federico, R., Tavladoraki, P., 2014. A plant spermine oxidase/dehydrogenase regulated by the proteasome and polyamines. *J. Exp. Bot.* 65, 1585–1603. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru016>
- Alabdallah, O., Ahou, A., Mancuso, N., Pompili, V., Macone, A., Pashkoulov, D., Stano, P., Cona, A., Angelini, R., Tavladoraki, P., 2017. The *Arabidopsis* polyamine oxidase/dehydrogenase 5 interferes with cytokinin and auxin signaling pathways to control xylem differentiation. *J. Exp. Bot.* 68, 997–1012. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw510>
- Alcázar, R., Bueno, M., Tiburcio, A.F., 2020. Polyamines: Small Amines with Large Effects on Plant Abiotic Stress Tolerance. *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells9112373>
- Amicucci, E., Gaschler, K., Ward, J.M., 1999. NADPH Oxidase Genes from Tomato (*Lycopersicon esculentum*) and Curly-Leaf Pondweed (*Potamogeton crispus*). *Plant Biol.* 1, 524–528. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1999.tb00778.x>
- Andrés Juan, C., Manuel Pérez de la Lastra, J., Plou, F.J., Pérez-Lebeña, E., Reinbothe, S., Juan, C.A., Pérez de la Lastra, J.M., Plou, F.J., Pérez-Lebeña, E., 2021. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 4642. <https://doi.org/10.3390/ijms22094642>
- Andronis, E.A., Moschou, P.N., Toumi, I., Roubelakis-Angelakis, K.A., 2014. Peroxisomal polyamine oxidase and NADPH-oxidase cross-talk for ROS homeostasis which affects respiration rate in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00132>
- Angelini, R., Cona, A., Federico, R., Fincato, P., Tavladoraki, P., Tisi, A., 2010. Plant amine oxidases “on the move”: An update. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 560–564.

<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.02.001>

- Ansari, M.I., Jalil, S.U., Ansari, S.A., Hasanuzzaman, M., 2021. GABA shunt: a key-player in mitigation of ROS during stress. *Plant Growth Regul.* <https://doi.org/10.1007/s10725-021-00710-y>
- Back, K., 2021. Melatonin metabolism, signaling and possible roles in plants. *Plant J.* 105, 376–391. <https://doi.org/10.1111/tpj.14915>
- Bailey, T.L., Johnson, J., Grant, C.E., Noble, W.S., 2015. The MEME Suite. *Nucleic Acids Res* 43, 39–49. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv416>
- Beldman, G., SEARLE-VAN LEEUWEN, M.F., ROMBOUITS, F.M., VORAGEN, F.G.J., 1985. The cellulase of *Trichoderma viride* Purification, characterization and comparison of all detectable endoglucanases, exoglucanases and β -glucosidases. *Eur. J. Biochem.* 146, 301–308. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb08653.x>
- Benkő, P., Gémes, K., Fehér, A., 2022. Polyamine Oxidase-Generated Reactive Oxygen Species in Plant Development and Adaptation: The Polyamine Oxidase—NADPH Oxidase Nexus. *Antioxidants* 11. <https://doi.org/10.3390/antiox11122488>
- Benkő, P., Jee, S., Kaszler, N., Fehér, A., Gémes, K., 2020. Polyamines treatment during pollen germination and pollen tube elongation in tobacco modulate reactive oxygen species and nitric oxide homeostasis. *J. Plant Physiol.* 244, 153085. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.153085>
- Bienert, G.P., Schjoerring, J.K., Jahn, T.P., 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.015>
- Binda, C., Coda, A., Angelini, R., Federico, R., Ascenzi, P., Mattevi, A., 1999. A 30 Å long U-shaped catalytic tunnel in the crystal structure of polyamine oxidase. *Structure* 7, 265–276. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80037-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80037-9)
- Bordenave, C.D., Granados Mendoza, C., Jiménez Bremont, J.F., Gárriz, A., Rodríguez, A.A., 2019. Defining novel plant polyamine oxidase subfamilies through molecular modeling and sequence analysis. *BMC Evol. Biol.* 19, 28. <https://doi.org/10.1186/s12862-019-1361-z>
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., Martin-Tanguy, J., 1999. Polyamines and environmental challenges: recent development A. *Plant Sci.* [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00218-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00218-0)
- Caboche, M., 1980. Nutritional requirements of protoplast-derived, haploid tobacco cells grown at low cell densities in liquid medium. *Planta* 149, 7–18. <https://doi.org/10.1007/BF00386221>

- Cai, G., Sobieszczuk-Nowicka, E., Aloisi, I., Fattorini, L., Serafini-Fracassini, D., Del Duca, S., 2015. Polyamines are common players in different facets of plant programmed cell death. *Amino Acids* 47, 27–44. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1865-1>
- Cervelli, M., Di Caro, O., Di Penta, A., Angelini, R., Federico, R., Vitale, A., Mariottini, P., 2004. A novel C-terminal sequence from barley polyamine oxidase is a vacuolar sorting signal. *Plant J.* 40, 410–418. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02221.X>
- Chakraborty, A., Chakrabarti, S., 2013. A survey on prediction of specificity-determining sites in proteins. *Brief. Bioinform.* 16, 71–88. <https://doi.org/10.1093/bib/bbt092>
- Chapman, J.M., Muhlemann, J.K., Gayomba, S.R., Muday, G.K., 2019. RBOH-Dependent ROS Synthesis and ROS Scavenging by Plant Specialized Metabolites to Modulate Plant Development and Stress Responses, *Chemical Research in Toxicology*. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00028>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01945>
- Chen, J., Li, H., Yang, K., Wang, Y., Yang, L., Hu, L., Liu, R., Shi, Z., 2019. Melatonin facilitates lateral root development by coordinating PAO-derived hydrogen peroxide and Rboh-derived superoxide radical. *Free Radic. Biol. Med.* 143, 534–544. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.09.011>
- Cheng, X.Q., Zhu, X.F., Tian, W.G., Cheng, W.H., Hakim, Sun, J., Jin, S.X., Zhu, H.G., 2017. Genome-wide identification and expression analysis of polyamine oxidase genes in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 129, 237–249. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1172-0>
- Chupeau, M.-C., Granier, F., Pichon, O., Renou, J.-P., Gaudin, V., Chupeau, Y., 2013. Characterization of the Early Events Leading to Totipotency in an Arabidopsis Protoplast Liquid Culture by Temporal Transcript Profiling. *Plant Cell* 25, 2444–2463. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.109538>
- Cocking, E.C., 1960. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature* 187, 962–963. <https://doi.org/10.1038/187962a0>
- Cona, A., Manetti, F., Leone, R., Corelli, F., Tavladoraki, P., Polticelli, F., Botta, M., 2004. Molecular Basis for the Binding of Competitive Inhibitors of Maize Polyamine Oxidase. *Biochemistry* 43, 3426–3435. <https://doi.org/10.1021/bi036152z>
- 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>
- Corpas, F.J., Barroso, J.B., 2017. Peroxisomal plant metabolism – an update on nitric oxide, Ca²⁺ and the NADPH recycling network. *J. Cell Sci.* 131.
<https://doi.org/10.1242/jcs.202978>
- Cosgrove, D.J., 2005. Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
<https://doi.org/10.1038/nrm1746>
- Cuevas, J.C., Sánchez, D.H., Marina, M., Ruiz, O.A., 2004. Do polyamines modulate the *Lotus glaber* NADPH oxidation activity induced by the herbicide methyl viologen? *Funct. Plant Biol.* 31, 921–928. <https://doi.org/10.1071/FP04007>
- Cvikrová, M., Gemperlová, L., Martincová, O., Vanková, R., 2013. Effect of drought and combined drought and heat stress on polyamine metabolism in proline-over-producing tobacco plants. *Plant Physiol. Biochem.* 73, 7–15.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.08.005>
- Czarnocka, W., Karpiński, S., 2018. Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. *Free Radic. Biol. Med.* <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.011>
- Demiralay, M., Sağlam, A., Yetişsin, F., Kadioğlu, A., 2022. Investigation of The Roles of Hydrogen Peroxide and NADPH Oxidase in The Regulation of Polyamine Metabolism in Maize Plants under Drought Stress Conditions. *Tarim Bilim. Derg.* 28, 613–625.
<https://doi.org/10.15832/ankutbd.861008>
- Desikan, R., Last, K., Harrett-Williams, R., Tagliavia, C., Harter, K., Hooley, R., Hancock, J.T., Neill, S.J., 2006. Ethylene-induced stomatal closure in *Arabidopsis* occurs via AtrbohF-mediated hydrogen peroxide synthesis. *Plant J.* 47, 907–916.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02842.x>
- Devireddy, A.R., Tschaplinski, T.J., Tuskan, G.A., Muchero, W., Chen, J.-G., 2021. Role of Reactive Oxygen Species and Hormones in Plant Responses to Temperature Changes. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 8843. <https://doi.org/10.3390/ijms22168843>
- Edit Horváth, 2009. Protoplast isolation from *Solanum lycopersicum* L. leaf tissues and. *Acta Biol. Szeged.* 53, 83–86.
- Edwards, K.D., Fernandez-Pozo, N., Drake-Stowe, K., Humphry, M., Evans, A.D., Bombarely, A., Allen, F., Hurst, R., White, B., Kernodle, S.P., Bromley, J.R., Sanchez-Tamburrino, J.P., Lewis, R.S., Mueller, L.A., 2017. A reference genome for *Nicotiana tabacum* enables map-based cloning of homeologous loci implicated in nitrogen utilization efficiency. *BMC Genomics* 18. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3791-6>

- Eom, S.H., Lee, J.K., Kim, D.H., Kim, H., Jang, K. Il, Ryu, H., Hyun, T.K., 2018. Identification and expression profiling of flax (*Linum usitatissimum* L.) polyamine oxidase genes in response to stimuli. *Acta Bot. Croat.* 77, 97–101. <https://doi.org/10.1515/botcro-2017-0022>
- Federico, R., Cona, A., Angelini, R., Schininà, M.E., Giartosio, A., 1990. Characterization of maize polyamine oxidase. *Phytochemistry* 29, 2411–2414. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)85157-B](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)85157-B)
- Fehér, A., Pasternak, T.P., Dudits, D., 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* <https://doi.org/10.1023/A:1024033216561>
- Fincato, P., Moschou, P.N., Ahou, A., Angelini, R., Roubelakis-Angelakis, K.A., Federico, R., Tavladoraki, P., 2012. The members of *Arabidopsis thaliana* PAO gene family exhibit distinct tissue- and organ-specific expression pattern during seedling growth and flower development. *Amino Acids* 42, 831–841. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0999-7>
- Fincato, P., Moschou, P.N., Spedaletti, V., Tavazza, R., Angelini, R., Federico, R., Roubelakis-Angelakis, K.A., Tavladoraki, P., 2011. Functional diversity inside the *Arabidopsis* polyamine oxidase gene family. *J. Exp. Bot.* 62, 1155–1168. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq341>
- Fowke, L.C., Rennie, P.J., Constabel, F., 1983. Organelles associated with the plasma membrane of tobacco leaf protoplasts. *Plant Cell Rep.* 2, 292–295. <https://doi.org/10.1007/BF00270184>
- Fraudentali, I., Rodrigues-Pousada, R.A., Angelini, R., Ghuge, S.A., Cona, A., 2021. Plant copper amine oxidases: Key players in hormone signaling leading to stress-induced phenotypic plasticity. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms22105136>
- Gallego-Giraldo, L., García-Martínez, J.L., Moritz, T., López-Díaz, I., 2007. Flowering in tobacco needs gibberellins but is not promoted by the levels of active GA1 and GA4 in the apical shoot. *Plant Cell Physiol* 48, 615–625. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm034>
- Ganapathi, T.R., Suprasanna, P., Rao, P.S., Bapat, V.A., 2004. Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) - A model system for tissue culture interventions and genetic engineering. *Indian J. Biotechnol.* <https://doi.org/Corpus ID: 6959227>
- Gémes, K., Kim, Y.J., Park, K.Y., Moschou, P.N., Andronis, E., Valassaki, C., Roussis, A., Roubelakis-Angelakis, K.A., 2016. An NADPH-oxidase/polyamine oxidase feedback loop controls oxidative burst under salinity. *Plant Physiol.* 172, 1418–1431.

<https://doi.org/10.1104/pp.16.01118>

- Gémes, K., Mellidou, I., Karamanoli, K., Beris, D., Park, K.Y., Matsi, T., Haralampidis, K., Constantinidou, H.I., Roubelakis-Angelakis, K.A., 2017. Deregulation of apoplastic polyamine oxidase affects development and salt response of tobacco plants. *J. Plant Physiol.* <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.12.012>
- Gémes, K., Poór, P., Horváth, E., Kolbert, Z., Szopkó, D., Szepesi, Á., Tari, I., 2011. Cross-talk between salicylic acid and NaCl-generated reactive oxygen species and nitric oxide in tomato during acclimation to high salinity. *Physiol. Plant.* 142, 179–192. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01461.x>
- Gholizadeh, F., Mirzaghaderi, G., 2020. Genome-wide analysis of the polyamine oxidase gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.) reveals involvement in temperature stress response. *PLoS One* 15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236226>
- Gilliard, G., Huby, E., Cordelier, S., Ongena, M., Dhondt-Cordelier, S., Deleu, M., 2021. Protoplast: A Valuable Toolbox to Investigate Plant Stress Perception and Response. *Front. Plant Sci.* <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.749581>
- Groom, Q.J., Torres, M.A., Fordham-Skelton, A.P., Hammond-Kosack, K.E., Robinson, N.J., Jones, J.D.G., 1996. rbohA, a rice homologue of the mammalian gp91phox respiratory burst oxidase gene. *Plant J.* 10, 515–522. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.10030515.x>
- Groppa, M.D., Benavides, M.P., 2008. Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* 34, 35–45. <https://doi.org/10.1007/s00726-007-0501-8>
- Guerrero-González, M.L., Rodríguez-Kessler, M., Jiménez-Bremont, J.F., 2014. UORF, a regulatory mechanism of the *Arabidopsis* polyamine oxidase 2. *Mol. Biol. Rep.* 41, 2427–2443. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3098-5>
- Hafez, Y.M., Bacsó, R., Király, Z., Künstler, A., Király, L., 2012. Up-regulation of antioxidants in tobacco by low concentrations of H₂O₂ suppresses necrotic disease symptoms. *Phytopathology* 102, 848–856. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-12-0012-R>
- Hamilton, D.W.A., Hills, A., Köhler, B., Blatt, M.R., 2000. Ca²⁺ channels at the plasma membrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarization and abscisic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 4967–4972. <https://doi.org/10.1073/pnas.080068897>
- 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

- Hao, Y., Huang, B., Jia, D., Mann, T., Jiang, X., Qiu, Y., Niitsu, M., Berberich, T., Kusano, T., Liu, T., 2018. Identification of seven polyamine oxidase genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and their expression profiles under physiological and various stress conditions. *J. Plant Physiol.* 228, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.05.004>
- Hasan, M.M., Alabdallah, N.M., Alharbi, B.M., Waseem, M., Yao, G., Liu, X.-D., Abd El-Gawad, H.G., El-Yazied, A.A., Ibrahim, M.F.M., Jahan, M.S., Fang, X.-W., 2021. GABA: A Key Player in Drought Stress Resistance in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 10136. <https://doi.org/10.3390/ijms221810136>
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.H.M.B., Parvin, K., Bhuiyan, T.F., Anee, T.I., Nahar, K., Hossen, M.S., Zulfiqar, F., Alam, M.M., Fujita, M., 2020. Regulation of ROS metabolism in plants under environmental stress: A review of recent experimental evidence. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms21228695>
- Heimer, Y.M., Mizrahi, Y., 1982. Characterization of ornithine decarboxylase of tobacco cells and tomato ovaries. *Biochem. J.* 201, 373–376. <https://doi.org/10.1042/bj2010373>
- Horton, P., Park, K.J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C.J., Nakai, K., 2007. WoLF PSORT: Protein localization predictor. *Nucleic Acids Res.* 35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm259>
- Hou, Z. hui Z. hu., Liu, G. hu. G. hua, Hou, L. xia L. xi., Wang, L. xiang L. xian., Liu, X., 2013. Regulatory Function of Polyamine Oxidase-Generated Hydrogen Peroxide in Ethylene-Induced Stomatal Closure in *Arabidopsis thaliana*. *J. Integr. Agric.* 12, 251–262. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60224-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60224-5)
- Hu, C.-H.H., Wang, P.-Q.Q., Zhang, P.-P.P., Nie, X.-M.M., Li, B.-B. Bin, Tai, L., Liu, W.-T.T., Li, W.-Q.Q., Chen, K.-M.M., 2020. NADPH Oxidases: The Vital Performers and Center Hubs during Plant Growth and Signaling. *Cells* 9, 437. <https://doi.org/10.3390/cells9020437>
- Huang, H., Ullah, F., Zhou, D.X., Yi, M., Zhao, Y., 2019. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Front. Plant Sci.* <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00800>
- Hung, K.T., Kao, C.H., 2007. The participation of hydrogen peroxide in methyl jasmonate-induced NH₄⁺ accumulation in rice leaves. *J. Plant Physiol.* 164, 1469–1479. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.10.005>
- Hussain, S.S., Ali, M., Ahmad, M., Siddique, K.H.M., 2011. Polyamines: Natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnol. Adv.*

- <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.003>
- Jancewicz, A.L., Gibbs, N.M., Masson, P.H., 2016. Cadaverine's Functional Role in Plant Development and Environmental Response. *Front. Plant Sci.* 7.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00870>
- Jasso-Robles, F.I., Gonzalez, M.E., Pieckenstain, F.L., Ramírez-García, J.M., Guerrero-González, M. de la L., Jiménez-Bremont, J.F., Rodríguez-Kessler, M., 2020. Decrease of Arabidopsis PAO activity entails increased RBOH activity, ROS content and altered responses to *Pseudomonas*. *Plant Sci.* 292, 110372.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110372>
- Jeong, Y.Y., Lee, H.Y., Kim, S.W., Noh, Y.S., Seo, P.J., 2021. Optimization of protoplast regeneration in the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Plant Methods* 17.
<https://doi.org/10.1186/s13007-021-00720-x>
- Ji, N.-R., Park, K.-Y.Y., 2011. Stress-induced biphasic ethylene and ROS biosynthesis are synergistically interacted in cell damage. *J. Plant Biotechnol.* 38, 22–29.
<https://doi.org/10.5010/jpb.2011.38.1.022>
- Jiu, S.T., Wang, C., Zheng, T., Liu, Z., Leng, X.P., Pervaiz, T., Lotfi, A., Fang, J.G., Wang, X.M., 2016. Characterization of VvPAL-like promoter from grapevine using transgenic tobacco plants. *Funct. Integr. Genomics* 16, 595–617. <https://doi.org/10.1007/s10142-016-0516-x>
- Kaszler, N., Benkő, P., Bernula, D., Szepesi, Á., Fehér, A., Gémes, K., Benk, P., Bernula, D., Szepesi, Á., Fehér, A., Gémes, K., Benkő, P., Bernula, D., Szepesi, Á., Fehér, A., Gémes, K., 2021. Polyamine metabolism is involved in the direct regeneration of shoots from arabidopsis lateral root primordia. *Plants* 10, 1–15.
<https://doi.org/10.3390/plants10020305>
- Kaszler, N., Benkő, P., Molnár, Á., Zámbari, A., Fehér, A., Gémes, K., 2023. Absence of Arabidopsis Polyamine Oxidase 5 Influences the Cytokinin-Induced Shoot Meristem Formation from Lateral Root Primordia. *Plants* 12.
<https://doi.org/10.3390/plants12030454>
- Kaur, G., Guruprasad, K., Temple, B.R.S., Shirvanyants, D.G., Dokholyan, N. V., Pati, P.K., 2018. Structural complexity and functional diversity of plant NADPH oxidases. *Amino Acids* 50, 79–94. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2491-5>
- Kaya, H., Takeda, S., Kobayashi, M.J., Kimura, S., Iizuka, A., Imai, A., Hishinuma, H., Kawarazaki, T., Mori, K., Yamamoto, Y., Murakami, Y., Nakauchi, A., Abe, M., Kuchitsu, K., 2019. Comparative analysis of the reactive oxygen species-producing

- enzymatic activity of Arabidopsis NADPH oxidases. *Plant J.*
<https://doi.org/10.1111/tpj.14212>
- Kiełkowska, A., Adamus, A., 2021. Exogenously applied polyamines reduce reactive oxygen species, enhancing cell division and the shoot regeneration from brassica oleracea l. Var. capitata protoplasts. *Agronomy* 11. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040735>
- Kim, D.W., Watanabe, K., Murayama, C., Izawa, S., Niitsu, M., Michael, A.J., Berberich, T., Kusano, T., 2014. Polyamine oxidase5 regulates arabidopsis growth through thermospermine oxidase activity. *Plant Physiol.* 165, 1575–1590.
<https://doi.org/10.1104/pp.114.242610>
- Konstantinos, P.A., Imene, T., Panagiotis, M.N., Roubelakis-Angelakis, K.A., 2010. ABA-dependent amine oxidases-derived H₂O₂ affects stomata conductance. *Plant Signal. Behav.* 5, 1153–1156. <https://doi.org/10.4161/psb.5.9.12679>
- Koornneef, M., Meinke, D., 2010. The development of Arabidopsis as a model plant. *Plant J.* 61, 909–921. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04086.x>
- Kwak, J.M., 2003. NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis. *EMBO J.* 22, 2623–2633.
<https://doi.org/10.1093/emboj/cdg277>
- Li, Mengshuang, Lu, J., Tao, M., Li, Mengru, Yang, H., Xia, E., Chen, Q., Wan, X., 2020. Genome-Wide Identification of Seven Polyamine Oxidase Genes in *Camellia sinensis* (L.) and Their Expression Patterns Under Various Abiotic Stresses. *Front. Plant Sci.* 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.544933>
- Li, Y., Ma, Y., Zhang, T., Bi, Y., Wang, Y., Prusky, D., 2019. Exogenous polyamines enhance resistance to *Alternaria alternata* by modulating redox homeostasis in apricot fruit. *Food Chem.* 301. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125303>
- Lin, J., Wang, Y., Wang, G., 2006. Salt stress-induced programmed cell death in tobacco protoplasts is mediated by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status. *J. Plant Physiol.* <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.06.016>
- Liu, J.-H.H., Wang, W., Wu, H., Gong, X., Moriguchi, T., 2015. Polyamines function in stress tolerance: from synthesis to regulation. *Front. Plant Sci.* 6.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00827>
- Liu, T., Kim, D.W., Niitsu, M., Maeda, S., Watanabe, M., Kamio, Y., Berberich, T., Kusano, T., 2014. Polyamine oxidase 7 is a terminal catabolism-type enzyme in *oryza sativa* and is specifically expressed in anthers. *Plant Cell Physiol* 55, 1110–1122.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcu047>

- Liu, X., Liu, S., Chen, X., Prasanna, B.M., Ni, Z., Li, X., He, Y., Fan, Z., Zhou, T., 2022. Maize miR167-ARF3/30-polyamine oxidase 1 module-regulated H₂O₂ production confers resistance to maize chlorotic mottle virus. *Plant Physiol.* 189, 1065–1082. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac099>
- Liu, Y., Huang, W., Zhan, J., Pan, Q., 2005. Systemic induction of H₂O₂ in pea seedlings pretreated by wounding and exogenous jasmonic acid. *Sci. China, Ser. C Life Sci.* 48, 202–212. <https://doi.org/10.1360/04yc0088>
- Liu, Y.Y., Pan, Q.H., Yang, H.R., Liu, Y.Y., Huang, W.D., 2008. Relationship between H₂O₂ and jasmonic acid in pea leaf wounding response. *Russ. J. Plant Physiol.* 55, 765–775. <https://doi.org/10.1134/S1021443708060058>
- Majewska-Sawka, A., Niklas, A., Jażdżewska, E., 1997. The effect of polyamines on the development of sugar beet protoplasts. *Biol. Plant.* 39, 561–567. <https://doi.org/10.1023/A:1000926714622>
- Marino, D., Dunand, C., Puppo, A., Pauly, N., 2012. A burst of plant NADPH oxidases. *Trends Plant Sci.* 17, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.10.001>
- Maruta, T., Inoue, T., Tamoi, M., Yabuta, Y., Yoshimura, K., Ishikawa, T., Shigeoka, S., 2011. Arabidopsis NADPH oxidases, AtrbohD and AtrbohF, are essential for jasmonic acid-induced expression of genes regulated by MYC2 transcription factor. *Plant Sci.* 180, 655–660. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.01.014>
- Masani, M.Y.A., Noll, G., Parveez, G.K.A., Sambanthamurthi, R., Prüfer, D., 2013. Regeneration of viable oil palm plants from protoplasts by optimizing media components, growth regulators and cultivation procedures. *Plant Sci.* 210, 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.05.021>
- Mattoo, A.K., Sobieszczuk-Nowicka, E., 2018. Polyamine as signaling molecules and leaf senescence, in: *Senescence Signalling and Control in Plants*. Elsevier, pp. 125–138. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813187-9.00008-1>
- Meinke, D.W., Cherry, J.M., Dean, C., Rounsley, S.D., Koornneef, M., 1998. Arabidopsis thaliana : A Model Plant for Genome Analysis. *Science (80-.)*. 282, 662–682. <https://doi.org/10.1126/science.282.5389.662>
- Mellidou, I., Karamanoli, K., Beris, D., Haralampidis, K., Constantinidou, H.-I.I.A., Roubelakis-Angelakis, K.A., 2017. Underexpression of apoplastic polyamine oxidase improves thermotolerance in *Nicotiana tabacum*. *J. Plant Physiol.* 218, 171–174. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.08.006>
- Min Park, S., Bong Hong, C., 2002. Class I small heat-shock protein gives thermotolerance in

- tobacco, *J. Plant Physiol.*
- Minocha, R., Majumdar, R., Minocha, S.C., 2014. Polyamines and abiotic stress in plants: A complex relationship. *Front. Plant Sci.* <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00175>
- Mittler, R., 2017. ROS Are Good. *Trends Plant Sci.*
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>
- Mittler, R., Zandalinas, S.I., Fichman, Y., Van Breusegem, F., 2022. Reactive oxygen species signalling in plant stress responses. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
<https://doi.org/10.1038/s41580-022-00499-2>
- Moran, N., Ehrenstein, G., Iwasa, K., Bare, C., Mischke, C., 1984. Ion Channels in Plasmalemma of Wheat Protoplasts. *Science (80-.)*. 226, 835–838.
<https://doi.org/10.1126/science.6093255>
- Moschou, P.N., Delis, I.D., Paschalidis, K.A., Roubelakis-Angelakis, K.A., 2008a. Transgenic tobacco plants overexpressing polyamine oxidase are not able to cope with oxidative burst generated by abiotic factors. *Physiol. Plant.* 133, 140–156.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01049.x>
- Moschou, P.N., Paschalidis, K.A., Delis, I.D., Andriopoulou, A.H., Lagiotis, G.D., Yakoumakis, D.I., Roubelakis-Angelakis, K.A., 2008b. Spermidine exodus and oxidation in the apoplast induced by abiotic stress is responsible for H₂O₂ signatures that direct tolerance responses in tobacco. *Plant Cell* 20, 1708–1724.
<https://doi.org/10.1105/tpc.108.059733>
- Moschou, P.N., Paschalidis, K.A., Roubelakis-Angelakis, K.A., 2008c. Plant polyamine catabolism. *Plant Signal. Behav.* 3, 1061–1066. <https://doi.org/10.4161/psb.3.12.7172>
- Moschou, P.N., Sanmartin, M., Andriopoulou, A.H., Rojo, E., Sanchez-Serrano, J.J., Roubelakis-Angelakis, K.A., 2008d. Bridging the Gap between Plant and Mammalian Polyamine Catabolism: A Novel Peroxisomal Polyamine Oxidase Responsible for a Full Back-Conversion Pathway in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 147, 1845–1857.
<https://doi.org/10.1104/pp.108.123802>
- 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, 695–709.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ers202>
- Muth, T., García-martín, J.A., Rausell, A., Juan, D., Valencia, A., Pazos, F., 2012. JDet: Interactive calculation and visualization of function-related conservation patterns in multiple sequence alignments and structures. *Bioinformatics* 28, 584–586.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr688>

- Nagy, J.I., Maliga, P., 1976. Callus Induction and Plant Regeneration from Mesophyll Protoplasts of *Nicotiana sylvestris*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 78, 453–455. [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(76\)80093-1](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(76)80093-1)
- Niu, L., Liao, W., 2016. Hydrogen peroxide signaling in plant development and abiotic responses: Crosstalk with nitric oxide and calcium. *Front. Plant Sci.* <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00230>
- Ono, Y., Kim, D.W., Watanabe, K., Sasaki, A., Niitsu, M., Berberich, T., Kusano, T., Takahashi, Y., 2012. Constitutively and highly expressed *Oryza sativa* polyamine oxidases localize in peroxisomes and catalyze polyamine back conversion. *Amino Acids* 42, 867–876. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1002-3>
- Orozco-Cárdenas, M.L., Narváez-Vásquez, J., Ryan, C.A., 2001. Hydrogen Peroxide Acts as a Second Messenger for the Induction of Defense Genes in Tomato Plants in Response to Wounding, Systemin, and Methyl Jasmonate. *Plant Cell* 13, 179–191. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.1.179>
- Pál, M., Szalai, G., Gondor, O.K., Janda, T., 2021. Unfinished story of polyamines: Role of conjugation, transport and light-related regulation in the polyamine metabolism in plants. *Plant Sci.* 308, 110923. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.110923>
- Pál, M., Szalai, G., Janda, T., 2015. Speculation: Polyamines are important in abiotic stress signaling. *Plant Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.05.003>
- Papadakis, A.K., Roubelakis-Angelakis, K.A., 2005. Polyamines inhibit NADPH oxidase-mediated superoxide generation and putrescine prevents programmed cell death induced by polyamine oxidase-generated hydrogen peroxide. *Planta* 220, 826–837. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1400-9>
- Papadakis, A.K., Roubelakis-Angelakis, K.A., 2002. Oxidative stress could be responsible for the recalcitrance of plant protoplasts, in: *Plant Physiology and Biochemistry*. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01423-7](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01423-7)
- Papadakis, A.K., Roubelakis-Angelakis, K.A., Author, P., Papadakis, A.K., Roubelakis-Angelakis, K.A., 1999. The Generation of Active Oxygen Species Differs in Tobacco and Grapevine Mesophyll Protoplasts. *Plant Physiol.* 121, 197–206. <https://doi.org/10.1104/pp.121.1.197>
- Papadakis, A.K., Siminis, C.I., Roubelakis-Angelakis, K.A., 2001. Reduced Activity of Antioxidant Machinery Is Correlated with Suppression of Totipotency in Plant Protoplasts. *Plant Physiol.* 126, 434–444. <https://doi.org/10.1104/pp.126.1.434>

- Paschalidis, K.A., Roubelakis-Angelakis, K.A., 2005. Spatial and temporal distribution of polyamine levels and polyamine anabolism in different organs/tissues of the tobacco plant. Correlations with age, cell division/expansion, and differentiation. *Plant Physiol.* 138, 142–152. <https://doi.org/10.1104/pp.104.055483>
- Pasternak, T., Miskolczi, P., Ayaydin, F., Mészáros, T., Dudits, D., Fehér, A., 2000. Exogenous auxin and cytokinin dependent activation of CDKs and cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Growth Regul.* 32, 129–141. <https://doi.org/10.1023/A:1010793226030>
- Pasternak, T., Paponov, I.A., Kondratenko, S., 2021. Optimizing protocols for arabidopsis shoot and root protoplast cultivation. *Plants* 10, 1–17. <https://doi.org/10.3390/plants10020375>
- Pasternak, T., Potters, G., Caubergs, R., Jansen, M.A.K., 2005. Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level. *J. Exp. Bot.* 56, 1991–2001. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri196>
- Pasternak, T.P., Ötvös, K., Domoki, M., Fehér, A., 2007. Linked activation of cell division and oxidative stress defense in alfalfa leaf protoplast-derived cells is dependent on exogenous auxin. *Plant Growth Regul.* 51, 109–117. <https://doi.org/10.1007/s10725-006-9152-0>
- Pel, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klüsener, B., Allen, G.J., Grill, E., Schroeder, J.I., 2000. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406, 731–734. <https://doi.org/10.1038/35021067>
- Planas-Portell, J., Gallart, M., Tiburcio, A.F., Altabella, T., 2013. Copper-containing amine oxidases contribute to terminal polyamine oxidation in peroxisomes and apoplast of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* 13, 109. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-109>
- Podia, V., Chatzopoulos, D., Milioni, D., Stravopodis, D.J., Dervisi, I., Roussis, A., Roubelakis-Angelakis, K.A., Haralampidis, K., 2023. GUS Reporter-Aided Promoter Deletion Analysis of *A. thaliana* POLYAMINE OXIDASE 3. *Int. J. Mol. Sci.* 24. <https://doi.org/10.3390/ijms24032317>
- Pottosin, I., Velarde-Buendía, A.M., Zepeda-Jazo, I., Dobrovinskaya, O., Shabala, S., 2012. Synergism between polyamines and ROS in the induction of Ca²⁺ and K⁺ fluxes in roots. *Plant Signal. Behav.* 7, 1084–1087. <https://doi.org/10.4161/psb.21185>
- Qu, Y., Yan, M., Zhang, Q., 2017. Functional regulation of plant NADPH oxidase and its role in signaling. *Plant Signal. Behav.* 12. <https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1356970>

- Reed, K.M., Bargmann, B.O.R.R., 2021. Protoplast Regeneration and Its Use in New Plant Breeding Technologies. *Front. Genome Ed.* 3.
<https://doi.org/10.3389/fgeed.2021.734951>
- Reumann, S., 2004. Specification of the peroxisome targeting signals type 1 and type 2 of plant peroxisomes by bioinformatics analyses. *Plant Physiol* 135, 783–800.
<https://doi.org/10.1104/pp.103.035584>
- Romero, F.M., Maiale, S.J., Rossi, F.R., Marina, M., Ruíz, O.A., Gárriz, A., 2018. Polyamine Metabolism Responses to Biotic and Abiotic Stress, in: Alcázar, R., Tiburcio, A.F. (Eds.), . New York, NY, pp. 37–49. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7398-9_3
- Rosenheim, O., 1924. The Isolation of Spermine Phosphate from Semen and Testis. *Biochem. J.* 18, 1253-1262.1. <https://doi.org/10.1042/bj0181253>
- Ruesink, A.W., 1978. Leucine Uptake and Incorporation by *Convolvulus* Tissue Culture Cells and Protoplasts under Severe Osmotic Stress. *Physiol. Plant.* 44, 48–56.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1978.tb01612.x>
- Sagi, M., Davydov, O., Orazova, S., Yesbergenova, Z., Ophir, R., Stratmann, J.W., Fluhr, R., 2004. Plant respiratory burst oxidase homologs impinge on wound responsiveness and development in *Lycopersicon esculentum*. *Plant Cell* 16, 616–628.
<https://doi.org/10.1105/tpc.019398>
- Sagi, M., Fluhr, R., 2006. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiol.* <https://doi.org/10.1104/pp.106.078089>
- Sagi, M., Fluhr, R., 2001. Superoxide Production by Plant Homologues of the gp91phox NADPH Oxidase. Modulation of Activity by Calcium and by Tobacco Mosaic Virus Infection. *Plant Physiol.* 126, 1281–1290. <https://doi.org/10.1104/pp.126.3.1281>
- Sagor, G.H.M., Inoue, M., Kusano, T., Berberich, T., 2021. Expression profile of seven polyamine oxidase genes in rice (*Oryza sativa*) in response to abiotic stresses, phytohormones and polyamines. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 27, 1353–1359.
<https://doi.org/10.1007/s12298-021-01006-1>
- Sagor, G.H.M., Liu, T., Takahashi, H., Niitsu, M., Berberich, T., Kusano, T., 2013. Longer uncommon polyamines have a stronger defense gene-induction activity and a higher suppressing activity of Cucumber mosaic virus multiplication compared to that of spermine in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* 32, 1477–1488.
<https://doi.org/10.1007/s00299-013-1459-5>
- Sagor, G.H.M., Takahashi, H., Niitsu, M., Takahashi, Y., Berberich, T., Kusano, T., 2012. Exogenous thermospermine has an activity to induce a subset of the defense genes and

- restrict cucumber mosaic virus multiplication in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* 31, 1227–1232. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1243-y>
- Sagor, G.H.M., Zhang, S., Kojima, S., Simm, S., Berberich, T., Kusano, T., 2016. Reducing Cytoplasmic Polyamine Oxidase Activity in *Arabidopsis* Increases Salt and Drought Tolerance by Reducing Reactive Oxygen Species Production and Increasing Defense Gene Expression. *Front. Plant Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00214>
- Salvi, D., Tavladoraki, P., 2020. The tree of life of polyamine oxidases. *Sci. Rep.* 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74708-3>
- Samanta, I., Roy, P.C., Das, E., Mishra, S., Chowdhary, G., 2023. Plant Peroxisomal Polyamine Oxidase: A Ubiquitous Enzyme Involved in Abiotic Stress Tolerance. *Plants.* <https://doi.org/10.3390/plants12030652>
- Sangra, A., Shahin, L., Dhir, S.K., 2019. Optimization of Isolation and Culture of Protoplasts in Alfalfa (&i>Medicago sativa&i>) Cultivar Regen-SY. *Am. J. Plant Sci.* 10, 1206–1219. <https://doi.org/10.4236/ajps.2019.107086>
- 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>
- Schieber, M., Chandel, N.S., 2014. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr. Biol.* 24, R453–R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Scholz, P., Anstatt, J., Krawczyk, H.E., Ischebeck, T., 2020. Signalling pinpointed to the tip: The complex regulatory network that allows pollen tube growth. *Plants.* <https://doi.org/10.3390/plants9091098>
- Schroeder, J.I., Hedrich, R., Fernandez, J.M., 1984. Potassium-selective single channels in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* 312, 361–362. <https://doi.org/10.1038/312361a0>
- Šebela, M., Radová, A., Angelini, R., Tavladoraki, P., Frébort, I., Peč, P., Sebel, M., Radová, A., Angelini, R., Tavladoraki, P., Frébort, I., Peč, P., 2001. FAD-containing polyamine oxidases: a timely challenge for researchers in biochemistry and physiology of plants, *Plant Science.* [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00380-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00380-0)
- Seo, S.Y., Kim, Y.J., Park, K.Y., 2019. Increasing Polyamine Contents Enhances the Stress Tolerance via Reinforcement of Antioxidative Properties. *Front. Plant Sci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01331>
- Sequera-Mutiozabal, M.I., Erban, A., Kopka, J., Atanasov, K.E., Bastida, J., Fotopoulos, V., Alcázar, R., Tiburcio, A.F., 2016. Global Metabolic Profiling of *Arabidopsis* Polyamine

- Oxidase 4 (AtPAO4) Loss-of-Function Mutants Exhibiting Delayed Dark-Induced Senescence. *Front. Plant Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00173>
- Shen, W., Nada, K., Tachibana, S., 2000. Involvement of Polyamines in the Chilling Tolerance of Cucumber Cultivars. *Plant Physiol.* Vol. 124, 431–439. <https://doi.org/10.1104/pp.124.1.431>
- Shi, H., Chan, Z., 2014. Improvement of plant abiotic stress tolerance through modulation of the polyamine pathway. *J. Integr. Plant Biol.* 56, 114–121. <https://doi.org/10.1111/jipb.12128>
- Shoeb, F., Yadav, J.S., Bajaj, S., Rajam, M. V., 2001. Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of indica rice, *Plant Science*. [https://doi.org/10.1016/s0168-9452\(01\)00375-2](https://doi.org/10.1016/s0168-9452(01)00375-2)
- Sierro, N., Battey, J.N.D., Ouadi, S., Bakaher, N., Bovet, L., Willig, A., Goepfert, S., Peitsch, M.C., Ivanov, N. V., 2014. The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. *Nat. Commun.* 5, 3833. <https://doi.org/10.1038/ncomms4833>
- Siminis, C.I., Kanellis, A.K., Roubelakis-Angelakis, K.A., 1994. Catalase Is Differentially Expressed in Dividing and Nondividing Protoplasts. *Plant Physiol.* 105, 1375–1383. <https://doi.org/10.1104/pp.105.4.1375>
- Simon-Plas, F., Elmayan, T., Blein, J.P., 2002. The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J.* 31, 137–147. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01342.x>
- Singh, R., Singh, S., Parihar, P., Mishra, R.K., Tripathi, D.K., Singh, V.P., Chauhan, D.K., Prasad, S.M., 2016. Reactive Oxygen Species (ROS): Beneficial Companions of Plants' Developmental Processes. *Front. Plant Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01299>
- Sobieszczuk-Nowicka, E., Kubala, S., Zmienko, A., Małecka, A., Legocka, J., 2016. From Accumulation to Degradation: Reprogramming Polyamine Metabolism Facilitates Dark-Induced Senescence in Barley Leaf Cells. *Front. Plant Sci.* 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01198>
- 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>
- Szigeti, Z., 2018. Changes in the explanation of plant stress concept. *Bot. Közlemények* 105,

- 165–178. <https://doi.org/10.17716/BotKozlem.2018.105.2.165>
- Takahashi, Y., Cong, R., Sagor, G.H.M.M.H.M.M., Niitsu, M., Berberich, T., Kusano, T., 2010. Characterization of five polyamine oxidase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* 29, 955–965. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0881-1>
- Takahashi, Y., Tahara, M., Yamada, Y., Mitsudomi, Y., Koga, K., 2018. Characterization of the Polyamine Biosynthetic Pathways and Salt Stress Response in *Brachypodium distachyon*. *J. Plant Growth Regul.* 37, 625–634. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9761-z>
- Takano, A., Kakehi, J.-I.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>
- Takebe, I., Otsuki, Y., Aoki, S., 1968. Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state. *Plant Cell Physiol.* 9, 115–124. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a079318>
- Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S., 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* 38, 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tavladoraki, P., Cona, A., Angelini, R., 2016. Copper-containing amine oxidases and FAD-dependent polyamine oxidases are key players in plant tissue differentiation and organ development. *Front. Plant Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00824>
- Tavladoraki, P., Rossi, M.N., Saccuti, G., Perez-Amador, M.A., Polticelli, F., Angelini, R., Federico, R., 2006. Heterologous expression and biochemical characterization of a polyamine oxidase from *Arabidopsis* involved in polyamine back conversion. *Plant Physiol* 141, 1519–1532. <https://doi.org/10.1104/pp.106.080911>
- Tavladoraki, P., Schininà, M.E., Cecconi, F., Di Agostino, S., Manera, F., Rea, G., Mariottini, P., Federico, R., Angelini, R., 1998. Maize polyamine oxidase: primary structure from protein and cDNA sequencing. *FEBS Lett.* 426, 62–66. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00311-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00311-1)
- Tewari, R.K., Watanabe, D., Watanabe, M., 2012. Chloroplastic NADPH oxidase-like activity-mediated perpetual hydrogen peroxide generation in the chloroplast induces apoptotic-like death of *Brassica napus* leaf protoplasts. *Planta* 235, 99–110. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1495-8>
- Tian, J., Cheng, Y., Kong, X., Liu, M., Jiang, F., Wu, Z., 2017. Induction of reactive oxygen species and the potential role of NADPH oxidase in hyperhydricity of garlic plantlets in vitro. *Protoplasma* 254, 379–388. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-0957-z>

- Tiburcio, A.F., Altabella, T., Bitrián, M., Alcázar, R., 2014. The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress. *Planta* 240, 1–18.
<https://doi.org/10.1007/s00425-014-2055-9>
- Tisi, A., Angelini, R., Rea, G., Cona, A., Tisi, A., Rea, G., Chen, M.M., Botta, M., Federico, R., Cona, A., Angelini, R., Rea, G., Cona, A., 2008. Involvement of polyamine oxidase in wound healing. *Plant Physiol.* 146, 162–177. <https://doi.org/10.1104/pp.107.108902>
- Tisi, A., Federico, R., Moreno, S., Lucretti, S., Moschou, P.N., Roubelakis-Angelakis, K.A., Angelini, R., Cona, A., 2011. Perturbation of polyamine catabolism can strongly affect root development and xylem differentiation. *Plant Physiol.* 157, 200–215.
<https://doi.org/10.1104/pp.111.173153>
- Toumi, I., Pagoulatou, M.G., Margaritopoulou, T., Milioni, D., Roubelakis-Angelakis, K.A., 2019. Genetically Modified Heat Shock Protein90s and Polyamine Oxidases in Arabidopsis Reveal Their Interaction under Heat Stress Affecting Polyamine Acetylation, Oxidation and Homeostasis of Reactive Oxygen Species. *Plants* 8, 323.
<https://doi.org/10.3390/plants8090323>
- Turkan, I., 2018. ROS and RNS: Key signalling molecules in plants. *J. Exp. Bot.* 69, 3313–3315. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery198>
- Uchimiya, H., Murashige, T., 1974. Evaluation of Parameters in the Isolation of Viable Protoplasts from Cultured Tobacco Cells. *Plant Physiol.* 54, 936–944.
<https://doi.org/10.1104/pp.54.6.936>
- Verhage, L., 2021. Smelly business – Cadaverine modulates root growth by inhibiting biotin synthesis. *Plant J.* <https://doi.org/10.1111/tpj.15471>
- Wang, W., Liu, J.-H., 2016. CsPAO4 of *Citrus sinensis* functions in polyamine terminal catabolism and inhibits plant growth under salt stress. *Sci. Rep.* 6, 31384.
<https://doi.org/10.1038/srep31384>
- Wang, W., Liu, J.H., 2015. Genome-wide identification and expression analysis of the polyamine oxidase gene family in sweet orange (*Citrus sinensis*). *Gene* 555, 421–429.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.11.042>
- Wang, W., Paschalidis, K., Feng, J.-C.C., Song, J., Liu, J.-H.H., 2019. Polyamine catabolism in plants: A universal process with diverse functions. *Front. Plant Sci.* 10.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00561>
- Wang, W., Zheng, X., Liu, S., Tan, B., Cheng, J., Ye, X., Li, J., Feng, J., 2021. Polyamine oxidase (PAO)-mediated polyamine catabolism plays potential roles in peach (*Prunus persica* L.) fruit development and ripening. *Tree Genet. Genomes* 17, 10.

<https://doi.org/10.1007/s11295-021-01495-x>

- Wang, Y., Ye, X., Yang, K., Shi, Z., Wang, N., Yang, L., Chen, J., 2019. Characterization, expression, and functional analysis of polyamine oxidases and their role in selenium-induced hydrogen peroxide production in *Brassica rapa*. *J. Sci. Food Agric.* 99, 4082–4093. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9638>
- Waszczak, C., Carmody, M., Kangasjärvi, J., 2018. Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 69, 209–236. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040322>
- Wimalasekera, R., Schaarschmidt, F., Angelini, R., Cona, A., Tavladoraki, P., Scherer, G.F.E., 2015. POLYAMINE OXIDASE2 of *Arabidopsis* contributes to ABA mediated plant developmental processes. *Plant Physiol. Biochem.* 96, 231–240. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.08.003>
- Wolf, S., 2022. Cell Wall Signaling in Plant Development and Defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* 73, 323–353. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-102820-095312>
- Wu, J., Liu, W., Jahan, M.S., Shu, S., Sun, J., Guo, S., 2022. Characterization of polyamine oxidase genes in cucumber and roles of CsPAO3 in response to salt stress. *Environ. Exp. Bot.* 194, 104696. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104696>
- Wu, J.J., Shang, Z., Wu, J.J., Jiang, X., Moschou, P.N., Sun, W., Roubelakis-Angelakis, K.A., Zhang, S., 2010. Spermidine oxidase-derived H₂O₂ regulates pollen plasma membrane hyperpolarization-activated Ca²⁺-permeable channels and pollen tube growth. *Plant J.* 63, 1042–1053. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04301.x>
- Xi, Y., Hu, W., Zhou, Y., Liu, X., Qian, Y., 2022. Genome-Wide Identification and Functional Analysis of Polyamine Oxidase Genes in Maize Reveal Essential Roles in Abiotic Stress Tolerance. *Front. Plant Sci.* 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.950064>
- Xu, J., Kang, Z., Zhu, K., Zhao, D., Yuan, Y., Yang, S., Zhen, W., Hu, X., 2021. RBOH1-dependent H₂O₂ mediates spermine-induced antioxidant enzyme system to enhance tomato seedling tolerance to salinity–alkalinity stress. *Plant Physiol. Biochem.* 164, 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.04.017>
- Xu, M., Du, Q., Tian, C., Wang, Y., Jiao, Y., 2021. Stochastic gene expression drives mesophyll protoplast regeneration. *Sci. Adv.* 7, 8466–8477. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abg8466>
- Yamada, Y., Kiso, K., Sekiya, J., Yasuda, T., 1972. Examination of the Conditions for Protoplast Isolation from Tobacco Cells Cultured in vitro. *Agric. Biol. Chem.* 36, 1055–1059. <https://doi.org/10.1080/00021369.1972.10860365>

- Yamaguchi, K., Takahashi, Y., Berberich, T., Imai, A., Miyazaki, A., Takahashi, T., Michael, A., Kusano, T., 2006. The polyamine spermine protects against high salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 580, 6783–6788.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.10.078>
- Yariuchi, Y., Okamoto, T., Noutoshi, Y., Takahashi, T., 2021. Responses of Polyamine-Metabolic Genes to Polyamines and Plant Stress Hormones in *Arabidopsis* Seedlings. *Cells* 10, 3283. <https://doi.org/10.3390/cells10123283>
- Yau, Y.-Y., Wang, Y., Thomson, J.G., Ow, D.W., 2011. Method for Bxb1-Mediated Site-Specific Integration In Planta, in: *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). pp. 147–166. https://doi.org/10.1007/978-1-61737-957-4_8
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T.L., 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Yoda, H., Hiroi, Y., Sano, H., 2006. Polyamine oxidase is one of the key elements for oxidative burst to induce programmed cell death in tobacco cultured cells. *Plant Physiol.* 142, 193–206. <https://doi.org/10.1104/pp.106.080515>
- Yoda, H., Yamaguchi, Y., Sano, H., 2003. Induction of hypersensitive cell death by hydrogen peroxide produced through polyamine degradation in tobacco plants. *Plant Physiol.* 132, 1973–1981. <https://doi.org/10.1104/pp.103.024737>
- Yoo, S.-D.D., Cho, Y.-H.H., Sheen, J., 2007. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: A versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat. Protoc.* 2, 1565–1572.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.199>
- Yu, K., Na, C., Zhao, Xunchao, Zhao, K., Zhan, Y., Xia, N., Zhao, Xue, Han, Y., 2022. Genome-wide identification and expression analysis of the polyamine oxidase gene family in soybean. *Can. J. Plant Sci.* 102, 1151–1163. <https://doi.org/10.1139/cjps-2022-0019>
- Yu, S., Kakar, K.U., Yang, Z., Nawaz, Z., Lin, S., Guo, Y., Ren, X. liang, Baloch, A.A., Han, D., 2020. Systematic study of the stress-responsive Rboh gene family in *Nicotiana tabacum*: Genome-wide identification, evolution and role in disease resistance. *Genomics* 112, 1404–1418. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.08.010>
- Yu, Y., Zhou, W., Zhou, K., Liu, W., Liang, X., Chen, Y., Sun, D., Lin, X., 2018. Polyamines modulate aluminum-induced oxidative stress differently by inducing or reducing H₂O₂ production in wheat. *Chemosphere* 212, 645–653.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.133>

- Yu, Z., Jia, D., Liu, T., 2019. Polyamine Oxidases Play Various Roles in Plant Development and Abiotic Stress Tolerance. *Plants* 8, 184. <https://doi.org/10.3390/plants8060184>
- Yue, J.J., Yuan, J.L., Wu, F.H., Yuan, Y.H., Cheng, Q.W., Hsu, C.T., Lin, C.S., 2021. Protoplasts: From Isolation to CRISPR/Cas Genome Editing Application. *Front. Genome Ed.* <https://doi.org/10.3389/fgeed.2021.717017>
- Zarza, X., Atanasov, K.E., Marco, F., Arbona, V., Carrasco, P., Kopka, J., Fotopoulos, V., Munnik, T., Gómez-Cadenas, A., Tiburcio, A.F., Alcázar, R., 2017. Polyamine oxidase 5 loss-of-function mutations in *Arabidopsis thaliana* trigger metabolic and transcriptional reprogramming and promote salt stress tolerance. *Plant Cell Environ.* 40, 527–542. <https://doi.org/10.1111/pce.12714>
- Zhang, J., Liang, L., Xiao, J., Xie, Y., Zhu, L., Xue, X., Xu, L., Zhou, P., Ran, J., Huang, Z., Sun, G., Lai, Y., Sun, B., Tang, Y., Li, H., 2022. Genome-Wide Identification of Polyamine Oxidase (PAO) Family Genes: Roles of CaPAO2 and CaPAO4 in the Cold Tolerance of Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Int. J. Mol. Sci.* 23, 9999. <https://doi.org/10.3390/ijms23179999>
- Zhou, M., Xu, M., Wu, L., Shen, C., Ma, H., Lin, J., 2014. CbCBF from *Capsella bursa-pastoris* enhances cold tolerance and restrains growth in *Nicotiana tabacum* by antagonizing with gibberellin and affecting cell cycle signaling. *Plant Mol. Biol.* 85, 259–275. <https://doi.org/10.1007/s11103-014-0181-1>
- Zhu, D., Jiang, M., Tan, M.-P., 2006. The mechanism of ABA-induced apoplastic H₂O₂ accumulation in maize leaves. *Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao* 32, 519–526.
- Zou, X., BK, A., Abu-Izneid, T., Aziz, A., Devnath, P., Rauf, A., Mitra, S., Emran, T. Bin, Mujawah, A.A.H., Lorenzo, J.M., Mubarak, M.S., Wilairatana, P., Suleria, H.A.R., 2021. Current advances of functional phytochemicals in *Nicotiana* plant and related potential value of tobacco processing waste: A review. *Biomed. Pharmacother.* 143, 112191. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112191>

15. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

MTMT azonosító: 10078295

ORCID azonosító: 0000-0002-1736-6311

15.1. Tudományos folyóiratcikkek

15.1.1. A dolgozat alapjául szolgáló közlemény (külföldi kiadású szakfolyóiratban):

Benkő, P., Gémes, K., & Fehér, A. (2022). Polyamine Oxidase-Generated Reactive Oxygen Species in Plant Development and Adaptation: The Polyamine Oxidase—NADPH Oxidase Nexus. *Antioxidants*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/antiox11122488>

15.1.2. Egyéb közlemények (külföldi kiadású szakfolyóiratban):

Benkő, P., Jee, S., Kaszler, N., Fehér, A., & Gémes, K. (2020). Polyamines treatment during pollen germination and pollen tube elongation in tobacco modulate reactive oxygen species and nitric oxide homeostasis. *Journal of Plant Physiology*, 244, 153085. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.153085>

Bernula, D., **Benkő, P.**, Kaszler, N., Domonkos, I., Valkai, I., Szöllősi, R., Ferenc, G., Ayaydin, F., Fehér, A., & Gémes, K. (2020). Timely removal of exogenous cytokinin and the prevention of auxin transport from the shoot to the root affect the regeneration potential of Arabidopsis roots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 140(2). <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01730-3>

Kaszler, N., **Benkő, P.**, Bernula, D., Szepesi, Á., Fehér, A., Gémes, K., Benk, P., Bernula, D., Szepesi, Á., Fehér, A., Gémes, K., Benkő, P., Bernula, D., Szepesi, Á., Fehér, A., & Gémes, K. (2021). Polyamine metabolism is involved in the direct regeneration of shoots from Arabidopsis lateral root primordia. *Plants*, 10(2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/plants10020305>

Kaszler, N., **Benkő, P.**, Molnár, Á., Zámbari, A., Fehér, A., & Gémes, K. (2023). Absence of Arabidopsis Polyamine Oxidase 5 Influences the Cytokinin-Induced Shoot Meristem Formation from Lateral Root Primordia. *Plants*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/plants12030454>

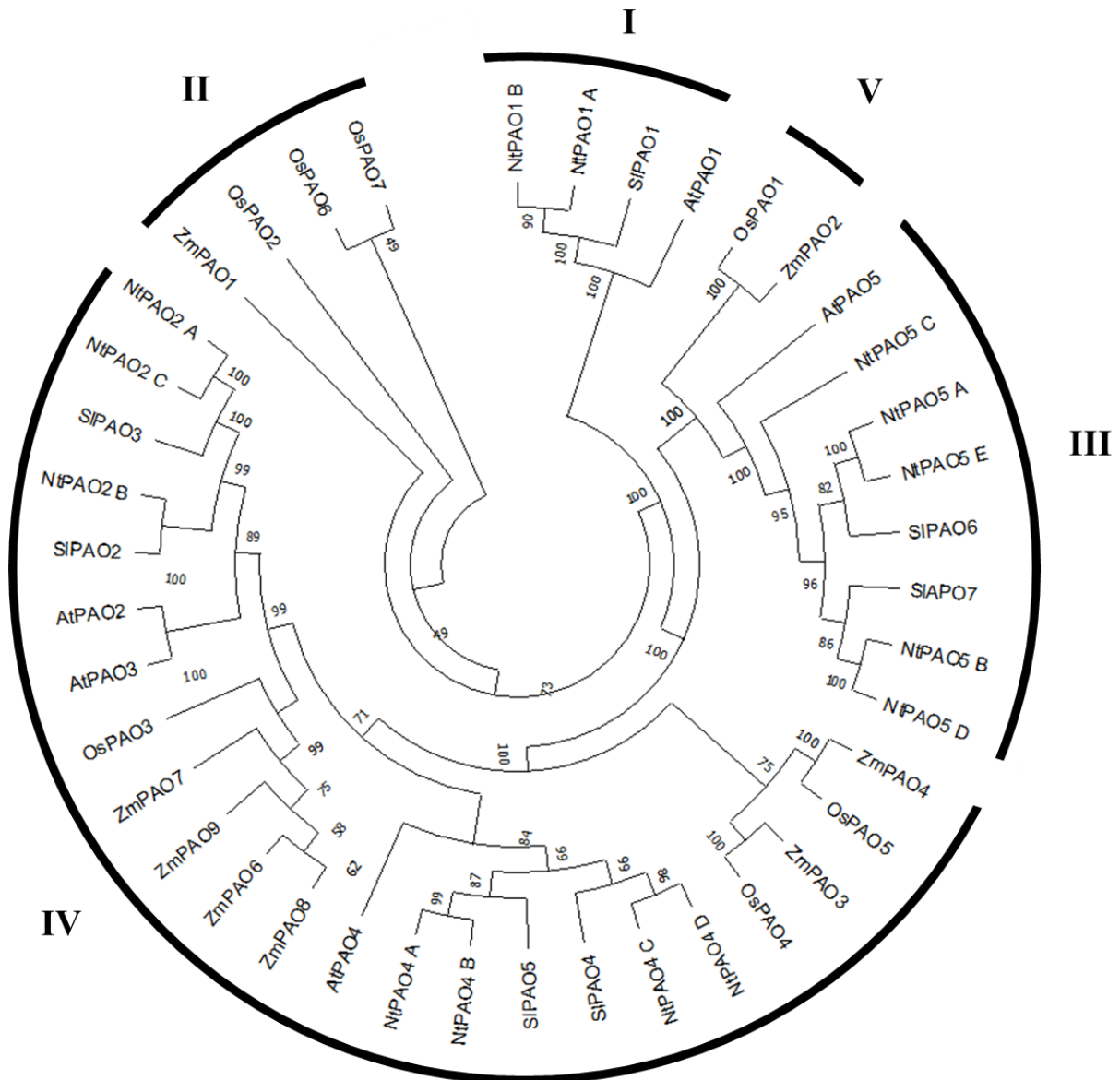
Molnár, A., Kondak, S., **Benkő, P.**, Janovszky, P., Kovács, K., Szöllősi, R., Gondor, O. K., Oláh, D., Gémes, K., Galbács, G., Janda, T., & Kolbert, Z. (2022). Limited Zn supply affects nutrient distribution, carbon metabolism and causes nitro-oxidative stress in sensitive Brassica napus. *Environmental and Experimental Botany*, 202. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.105032>

15.1.3. Könyvfejezet

Benkő, P., Kaszler, N., & Gémes, K. (2022). 9 - NO regulates temperature stress in plants. In V. Pratap Singh, S. Singh, D. K. Tripathi, M. C. Romero-Puertas, & L. M. Sandalio (Eds.), *Nitric Oxide in Plant Biology* (pp. 211–240). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818797-5.00025-X>

Kaszler, N., **Benkő, P.**, & Gémes, K. (2022). Cross-talk of NO and phytohormones in the regulation of plant development. In *Nitric Oxide in Plant Biology* (pp. 539–572). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818797-5.00026-1>

16. Függelék

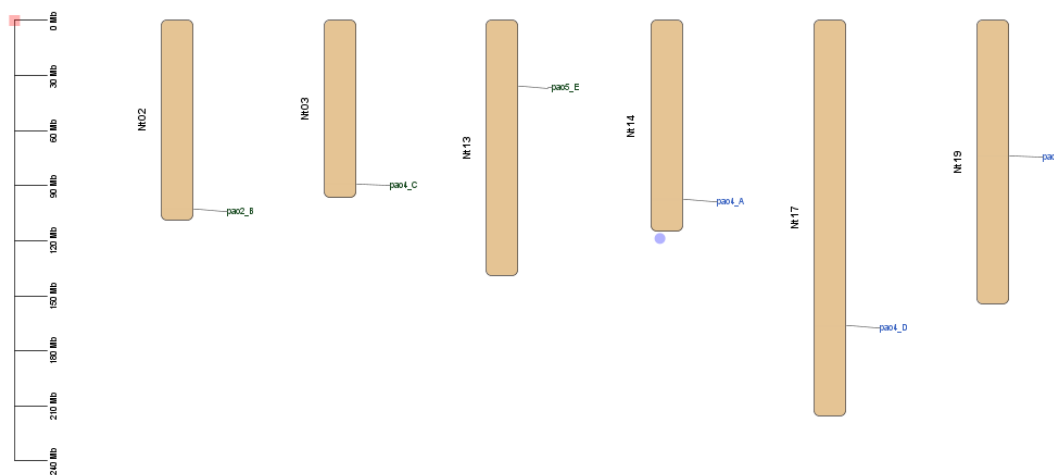


1. **Függelék.** PAO-ok filogenetikai kapcsolata. A fa 43 növényi PAO aminosav szekvencia alapján készült ClustalW illesztő algoritmussal illesztett, Neighbor-Joining filogenetikai rekonstrukcióhoz a JTT mátrix-alapú modellt alkalmaztuk. A kládok támogatottságát nemparaméteres bootstrap módszerrel becsültük meg, 1000 ismétlést végezve.

Az illesztéshez és a filogenetikai fa a MEGA11 szoftverrel készült (Tamura és mtsai., 2021)

	AtPAO1	AtPAO2	AtPAO3	AtPAO4	AtPAO5
NtPAO1_A	70.7%	24.7%	22.5%	24.4%	18.0%
NtPAO1_B	69.2%	24.2%	22.2%	24.0%	17.7%
NtPAO2_A	18.8%	67.6%	64.6%	48.6%	17.1%
NtPAO2_B	21.7%	77.8%	74.8%	57.2%	18.9%
NtPAO2_C	21.6%	74.9%	73.0%	57.4%	19.8%
NtPAO4_A	23.4%	56.4%	56.0%	62.5%	18.4%
NtPAO4_B	23.0%	59.2%	59.2%	65.0%	18.1%
NtPAO4_C	22.8%	62.1%	61.4%	65.2%	19.7%
NtPAO4_D	23.9%	64.9%	64.5%	68.2%	19.4%
NtPAO5_A	18.8%	22.0%	21.2%	21.2%	56.9%
NtPAO5_B	19.4%	21.2%	20.4%	20.1%	57.9%
NtPAO5_C	18.0%	21.3%	20.4%	20.6%	51.6%
NtPAO5_D	18.6%	20.8%	20.0%	20.1%	56.7%
NtPAO5_E	18.9%	22.4%	21.6%	21.8%	56.4%

2. Függelék *Arabidopsis thaliana* és *Nicotiana tabacum* Poliamin oxidáz fehérje szekvenciák hasonlóság mátrixa. Fehérje szekvencia illesztés a ClustalW algoritmus alapján MEGA11 programban.



3. Függelék. Dohány kromoszómákon a genom összerendezés alapján meghatározható NtPAO gének elhelyezkedése A pozíciók meghatározása a *N.tabacum* cv. K326 genom szekvenciájából PRJNA376174(Edwards és mtsai., 2017). A TBtools segítségével.

Gén	Gén azonosító	Fehérje azonosító
AtPAO1	AT5G13700	NP_196874.1
AtPAO2	AT2G43020	NP_181830.1
AtPAO3	AT3G59050	NP_191464.1
AtPAO4	AT1G65840	NP_176759.1
AtPAO5	AT4G29720	NP_194701.1

4. Függelék. *Arabidopsis thaliana* PAO gének és fehérjék azonosítói. TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>).

	Prediktált lokalizáció
NtPAO1_A	vacu: 8, chlo: 2, nucl: 1, plas: 1, extr: 1, golg: 1
NtPAO1_B	vacu: 8, chlo: 2, nucl: 1, plas: 1, extr: 1, golg: 1
NtPAO2_A	pero: 4, chlo: 3, E.R.: 3, plas: 2, cyto: 1, vacu: 1
NtPAO2_B	plas: 5, E.R.: 5, vacu: 2, chlo: 1, pero: 1
NtPAO2_C	plas: 5, E.R.: 5, vacu: 2, chlo: 1, pero: 1
NtPAO4_A	pero: 6, E.R.: 3, plas: 2, chlo: 1, cyto: 1, vacu: 1
NtPAO4_B	pero: 7, E.R.: 3, plas: 2, chlo: 1, vacu: 1
NtPAO4_C	chlo: 4, E.R.: 3, pero: 3, plas: 2, cyto: 1, vacu: 1
NtPAO4_D	pero: 4, chlo: 3, E.R.: 3, plas: 2, cyto: 1, vacu: 1
NtPAO5_A	nucl: 5, cyto: 5, mito: 1, plas: 1, pero: 1, cysk: 1
NtPAO5_B	nucl: 5, cyto: 5, mito: 1, plas: 1, pero: 1, cysk: 1
NtPAO5_C	cyto: 7, nucl: 3, pero: 2, chlo: 1, mito: 1
NtPAO5_D	nucl: 7, cyto: 5, chlo: 1, mito: 1
NtPAO5_E	nucl: 6, cyto: 4, chlo: 1, mito: 1, pero: 1, cysk: 1

5. Függelék. *Nicotiana tabacum* PAO enzimek feltételezett lokalizációja. vac:vakuólum;chlo:kloroplasztisz;nucl:sejtmag;plas:plasztisz;extr:extracelluláris;golg:golgi;pero:peroszizóma;cyto:citoplazma;mito:miokondrium PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>).

```

          *           660           *           680
NtPAO1_A : LLALTGSLTITLQAEVSSLHKCDIPQLFLSNSKLG LPEA : 493
NtPAO1_B : LLALTGSLTITLQAEVSSLHKCDIPQLFLSNSKLG LPEA : 502
AtPAO1   : LLAFTESLTTLTHQKPNNQIYTNVK---FISGTS~ : 472
NtPAO2_A : VLERHGELDIFEPVMGE-----ET--LIPILISRL : 426
NtPAO2_C : VLERHGELDIFEPVMGE-----ET--LIPILISRL : 508
NtPAO2_B : VVERYGELDIFQPVMGE-----DTPVAVPLLI SRM : 510
AtPAO2   : VVERYGELDIFQPVMGE-----EGPASVPLLI SRM : 490
AtPAO3   : VVERYGEL---EHEMEE-----EAPASVPLLI SRM : 488
AtPAO4   : IFERLGAWEKLLVSLMGNSDILETATVPLQISR M : 497
NtPAO4_A : LLKRLGSLQVQLISSR--EEILKAA-VPLQISR M : 468
NtPAO4_B : LLKRLGSLQVQLVSSR--EEILKAA-VPLQISR M : 498
NtPAO4_C : LLKRHGSLQVQANSYR--EEILEAA-VPLQISR M : 507
NtPAO4_D : LLKRHGSLQVQANSYR--EEILETA-VPLQISR M : 481
AtPAO5   : LLKHYKCNF~ : 533
NtPAO5_C : LLKHFQCVDV~ : 543
NtPAO5_E : LLNHYHFIDI~ : 531
NtPAO5_A : LLNHYHFMDI~ : 536
NtPAO5_D : LLQHYHCIDI~ : 539
NtPAO5_B : LLQHYHCIDI~ : 533
6

```

6. Függelék. Dohány és arabidopsis PAO fehérje szekvencia illesztés ClustalW(MEGA11; ábrázolva genedoc2.0). A fehérje szekvenciák C terminális végén található peroxiszómális transzport szignál pirossal bekeretezve.

```

          *           20           *           40           *           60
ZmPAO1   : ~~~~~MSSSPSFGLLALAAVLLALNLAQHGSLEATVGPFRVIVVAGMSGISAARKLSEA : 54
NtPAO1_A : ~~~~~MATPRRCSSVVIVGAGISGLTAAKVLSEN : 28
NtPAO1_B : ~~~~~MATPRRCSSVVIVGAGISGLTAAKVLSEN : 28
AtPAO1   : ~~~~~MST---ASVIIIGAGISGISAARKLVEN : 25

```

7. Függelék. Dohány, arabidopsis és kukorica PAO fehérje szekvencia illesztés ClustalW (MEGA11; ábrázolva genedoc2.0). Pirossal jelölve a kukorica extracelluláris szignál(Tavladoraki és mtsai., 2006) szekvenciája.

Gén neve (a)	Azonosító (a)	Új név	mRNS azonosító (a)	Gén pozíció scaffold(a)	mRNS (bp)	CDS (bp)	Fehérje azonosító (a)	a.s. hossz	azonosító (b)
polyamine oxidase 1	LOC107832568	NtPAO1_A	NM_001326282.2	NW_015864215.1 (20974..27671)	1888	76..1563	NP_001313211.1	495	Nitab4.5_0000707g0200.1
polyamine oxidase 1-like	LOC107788770	NtPAO1_B	XM_016610479.1	NW_015916267.1 (46836..53239)	1801	111..1454	XP_016465965.1	447	Nitab4.5_0008441g0030.1
probable polyamine oxidase 2	LOC107762338	NtPAO2_A	XM_016580681.1	NW_015876609.1 (111786..118428,	2235	490..1956	XP_016436167.1	488	Nitab4.5_0002015g0070.1
probable polyamine oxidase 2	LOC107799822	NtPAO2_B	XM_016622969.1	NW_015931733.1 (28305..34373,	2300	443..1915	XP_016478455.1	490	Nitab4.5_0007665g0030.1
probable polyamine oxidase 2	LOC107775961	NtPAO2_C	XM_016595768.1	NW_015901231.1 (12262..17390)	2295	559..2025	XP_016451254.1	488	Nitab4.5_0004862g0070.1
probable polyamine oxidase 4	LOC107775720	NtPAO4_A	XM_016595473.1	NW_015900952.1 (12745..17683	1492	88..1338	XP_016450959.1	416	Nitab4.5_0000091g0280.1
probable polyamine oxidase 4	LOC107800087	NtPAO4_B	XM_016623232.1	NW_015932137.1 (603..6066,	2199	470..1957	XP_016478718.1	495	Nitab4.5_0001374g0220.1
probable polyamine oxidase 4	LOC107761719	NtPAO4_C	XM_016579980.1	NW_015874368.1 (104479..111727	2802	1085..2572	XP_016435466.1	495	Nitab4.5_0003412g0030.1
probable polyamine oxidase 4	LOC107812697	NtPAO4_D	XM_016637848.1	NW_015954488.1 (6193..10774)	2094	468..1667	XP_016493334.1	399	Nitab4.5_0000483g0140.1
probable polyamine oxidase 5	LOC107813795	NtPAO5_A	XM_016639103.1	NW_015789106.1 (85803..87734)	1932	174..1784	XP_016494589.1	536	Nitab4.5_0004978g0010.1
probable polyamine oxidase 5	LOC107791914	NtPAO5_B	XM_016614062.1	NW_015920426.1 (26034..28297,	2264	403..2004	XP_016469548.1	533	Nitab4.5_0003310g0050.1
probable polyamine oxidase 5	LOC107778196	NtPAO5_C	XM_016598410.1	NW_015903755.1 (63036..64820)	1785	49..1680	XP_016453896.1	543	Nitab4.5_0008523g0010.1
probable polyamine oxidase 5	LOC107767845	NtPAO5_D	XM_016586944.1	NW_015887926.1 (167021..169486	2466	562..2181	XP_016442430.1	539	Nitab4.5_0000095g0080.1
probable polyamine oxidase 5	LOC107765565	NtPAO5_E	XM_016584233.1	NW_015794575.1 (4084..5978,	1895	183..1778	XP_016439719.1	531	Nitab4.5_0016456g0010.1

8. Függelék: *Nicotiana tabacum* PAO gén, mRNS, fehérje azonosító adatai. A felhasznált adatok az NCBI adatbázis (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). alapján. Az elérhető *Nicotiana tabacum* TN90, genom szekvenálás projektből PRJNA319578^a (Sierro és mtsai 2014) és a *Nicotiana tabacum* K326 genom projektből (PRJNA376174)^b (Edwards, K. és mtsai. 2017) származnak.

GÉN	Azonosító	mRNS Azonosító		Primer szekvencia 5'->3'
NtPAO1_A	LOC107832568	XM_016610479.1	forward	CGGCGTATTGGTGTCAACAG
			reverse	TGTGAAGGAAATGAGGTCGCT
NtPAO1_B	LOC107788770	XM_016610479.1	forward	TCCCCTCGGCCTCTTTTATG
			reverse	TATGACGACAGAGCAGCGAC
NtPAO2_A	LOC107762338	XM_016580681.1	forward	CTTCCTAATGCGACTGCTCCA
			reverse	CATGGGGCTTCCCAACTGTA
NtPAO2_B	LOC107799822	XM_016622969.1	forward	CCCAGAGTTCTCTTAATTCCCCT
			reverse	CTCTCTCCGGATCAAACAATGGA
NtPAO2_C	LOC107775961	XM_016595768.1	forward	CACGTCTACGTAGGAAACACCA
			reverse	TTGGGAAGACGAAGGGGAGA
NtPAO4_A	LOC107775720	XM_016595473.1	forward	GTTTCCTAATGCACCTGCCC
			reverse	TCTGTTCCCCAGCGTGATAC
NtPAO4_B	LOC107800087	XM_016623232.1	forward	TCCCCTCCAGATTTCCAGGAT
			reverse	GCACGAGTGCTACAACCTCATT
NtPAO4_C	LOC107761719	XM_016579980.1	forward	CCCCGATGCTACTAAGCCTG
			reverse	CCAATGGTGCTCGAAGCCTA
NtPAO4_D	LOC107812697	XM_016637848.1	forward	TCCACAAGGCAACAGGACAT
			reverse	AAATTAGCATGGGTGCAACACT
NtPAO5_A	LOC107813795	XM_016639103.1	forward	CAATCTCAAGGCTTGGTTTTGGT
			reverse	TGTTCTCCTCATCCACCAAGGA
NtPAO5_B	LOC107791914	XM_016614062.1	forward	TCTGATTGTTGAGGGGGTTGT
			reverse	CACCACTGTTACATACACACACATA
NtPAO5_C	LOC107778196	XM_016598410.1	forward	GGAATTCGCGACGACTTTC
			reverse	TCATCCCCTCATAGCCACATTC
NtPAO5_D	LOC107767845	XM_016586944.1	forward	GTCTGTGATTGTTGAGGGGGT
			reverse	CACACACACATAGCTGTCCCA
NtPAO5_E	LOC107765565	XM_016584233.1	forward	TCTGCCACCTGGTTTGATCC
			reverse	AATGAACCATCAGCCTGCCA
NtRBOHD	EF366670	XM_016650414.1	forward	TGCTGCTGTTCCTTTTGATG
			reverse	CGTGTATTCCAACCCCAAGA
Nt Actin-97-like	LOC107804820	XM_016628756.1	forward	CAGTGTCTGGATTGGAGGTTT
			reverse	ATCTGCTGGAAGGTGCTGAG
NtL25	L18908	XM_016628756.1	forward	CACCCTTGTTCATTGTGG
			reverse	ATGCTTCTTCGTCCCATCA

9. Függelék. Génexpresszós vizsgálatok (RT-qPCR) során használt primer szekvenciák. A dohányban stabilan kifejeződő Actin 97like és L25-öt referenciagénként használtuk.

GÉN	Azonosító	mRNS Azonosító		Primer szekvencia 5'->3'
AtPAO1	AT5G13700	NM_121373.4	forward	CTACCGCCTCCGTCATCATC
			reverse	ACTCTTTACCACCGACACCG
AtPAO2	AT2G43020	NM_129863.3	forward	GGTTTCGGTGGGATTTTCAGC
			reverse	CACTGGAACCCTAAGCCTCT
AtPAO3	AT3G59050	NM_115767.3	forward	AAAGTCAGGGATGAGCAGGA
			reverse	GAAGAGGGACAGAAGCAGGA
AtPAO4	AT1G65840	NM_105256.4	forward	CGCCGCAGTTGGTTACTA
			reverse	GGAGATTTGGAGAGGCACAG
AtPAO5	AT4G29720	NM_119117.2	forward	CTGGTTTGTTCACTGCTCTCA
			reverse	TAGGTCATCCCCGCTTGAT
AtRBOHD	AT5G47910	NM_124165.3	forward	CGGGATAGTCGTCGGTGTGTT
			reverse	AATGCCAGTCCATCCTTCCA
AtRBOHF	AT1G64060	NM_105079.3	forward	TGTTTGTCCAATGTCCTGCG
			reverse	TTTCGTCGGCTCTGAGAAGT
AtPP2A_A3	AT1G13320	NM_101203.5	forward	ATTCCGATAGTCGACCAAGC
AtUBQ1	AT3G52590	NM_115119.4	reverse	AACATCAACATCTGGGTCTTCA
			forward	CGCAAGTGCTATGCTCGTCTT
			reverse	GCCTCAACTGGTTGCTGTGA

10. Függelék. Génexpresszós vizsgálatok (RT-qPCR során használt primer szekvenciák. Az arabidopsisban stabilan kifejeződő UBQ1 és PP2A_A3 gént *referenciagénként* használtuk.

NtPAO2_A	NtPAO2_B	NtPAO2_C	NtPAO4_A	NtPAO4_B	NtPAO4_C	NtPAO4_D	NtPAO5_A	NtPAO5_B	NtPAO5_C	NtPAO5_D	NtPAO5_E
ABRE	ERE	ABRE	ABRE	ABRE	ABRE	ABRE	GATA-motif	ABRE	AuxRR-core	ABRE	ABRE
ARE	GC-motif	DRE core	DRE1	G-box	ABRE3a	G-Box	TCA-element	ABRE3a	DRE1	ABRE3a	G-Box
ERE	LTR	ERE	ERE	GC-motif	ABRE4	MBS	TGACG-motif	ABRE4	ERE	ABRE4	MBS
G-box	MRE	GARE-motif	G-box	MRE	ARE	MRE		DRE core	TC-rich repeats	ARE	TGACG-motif
MYB	MYB	G-box		TCA	GATA-motif	P-box		GATA-motif	TCT-motif	G-box	TGA-element
TGACG-motif	TGACG-motif	GC-motif		TGA-element	G-box	TATA-box		G-box	TGACG-motif	LTR	W box
	TGA-element	MYB		WUN-motif	MBS	TCA-element		LTR	WRE3	MBS	
	WUN-motif	TCA-element			W box	TCT-motif		MBS	WUN-motif	P-box	
		W box				WUN-motif		P-box		TCA	
								TCA-element		TCA-element	
								TCT-motif		W box	
								W box		WUN-motif	
								WUN-motif			

11. Függelék *NtPAO* gének promóter régióinak az analízise. A PAO gént kódoló régió előtti 1800bp- szakaszon a Plant Care adatbázis alapján azonosított szabályzó elemek kötő helyei a TBtools által ábrázolva. Rövidítések: TGACG-motívum -Jázmonsav válasz elem kötő helye. Az ABRE; ABRE3 (abscisic acid response element3), -abszicizinsav válasz regulátor. A DRE (drought-responsive element) és MBS -szárazság stresszhez kapcsolt elem. A TCA motívum -szalicilsav válasz. Az ERE (Ethylene-responsive element) -etilén válasz elem. A W-box és WUN motívum -sebzés válasz. A P-box (GA responsive element) és a GARE: -gibberelin sav válasz regulátor. A LTR (low-temperature responsiveness) -hideg stressz válasz. A GATA-motívum és G-box -fény szabályozott elemek. A GC-motívum; TGA, és AuxRR (auxin-responsive region):-auxin szabályozott válasz elem; Tc-rich: -védelem és stressz válaszhoz köthető motívum.

