

Doktori (Ph.D) értekezés tézisei

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

**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

## **Bevezetés**

A poliaminok (PA) minden élőlényben megtalálhatóak, szerepük esszenciális. Minden növényi szervben és sejtalkotóban előforduló, kis molekula tömegű, kationos természetű molekulák. Kémia tulajdonságaik miatt képesek negatívan töltött molekulákhoz, úgymint lipidekhez, DNS-hez, vagy egyes fehérjékhez kötődni és ezáltal azokat szabályozni. A PA homeosztázis fenntartása kulcsfontosságú a növények normális növekedéshez és fejlődéséhez, mind fiziológias körülmények között, mind stressz alatt. A PA szint szabályozás megvalósulhat a PA-ok bioszintézise, lebontása, szállítása, illetve a PAk megkötése által. A poliamin oxidázok (PAO), flavin adenin dinukleotid függő enzimek, a poliaminok lebontását végzik. Ez történhet a poliaminok terminális lebontása, vagy a poliaminok visszaalakítása által. Mindkét folyamat során hidrogén peroxid ( $H_2O_2$ ) keletkezik, ami befolyásolhatja a növények fejlődési és stressz adaptációs folyamatait. A  $H_2O_2$  nagy koncentrációban oxidatív stresszt okozva programozott sejthalált válthat ki, míg kis 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 haszon- és gyógynövényekben, mint kukoricában, rizsben, paprikában, narancsban, kamillában és a molekuláris modell növényben, a lúdfüben is. Dohányban az egyes PAO izoenzimeket kódoló géneket, azok szöveti/szervi lokalizációját és funkcióit azonban még nem azonosították és jellemezték. Munkám során ezért egyfelől célom volt a PAO gének azonosítása, osztályozása, szekvenenciaanalízise, másfelől pedig funkcionális vizsgálatuk, de nemcsak fiziológias körülmények között, hanem különböző abiotikus stresszhatásokra, hormonkezelésekre, valamint egyes fejlődési állapotokban is.

A reaktív oxigénformák (ROF) képződésében a plazmamembrán lokalizált NADPH oxidáz enzim is fontos szerepet játszik. Tehát a PAO és a NADPH oxidáz a ROF termelésén keresztül ugyanazokban a folyamatokban vehet részt a növények életműködése során. A két enzim egymásra is hatással lehet a növények fejlődési és stresszválaszaiban.

A sejtfa nélküli növényi sejtek, a protoplasztok kiváló modellrendszerként működnek a különböző jelátviteli, illetve anyagcsere folyamatok, valamint hormonális kölcsönhatások tanulmányozására. Mindemellett az *in vitro* növényregenerálás alapjául is szolgálnak, így biotechnológiai szempontból is jelentősek. A protoplasztok előállítása során ROF keletkezik, a NADPH oxidáz és a PAO enzimek működése által. A keletkező ROF pedig befolyásolhatja a protoplasztok életképességét, és regenerációs képességüket is.

## Célkitűzések

Munkám során céлом 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:

- I. A dohányban található PAO gének azonosítása, szekvencia analízise és filogenetikai kapcsolatainak felderítése más fajok, nevezetesen lúdfű, paradicsom, rizs és kukorica PAO génjeivel.
- II. A dohányban található PAO gének szervspecifikus kifejeződésének vizsgálata.
- III. Különböző abiotikus stressz és hormonkezelések hatásának vizsgálata a dohányban található PAO gének kifejeződési mintázatára.
- IV. Dohány PAO gének szerepének vizsgálata protoplaszt kultúrák létrehozása és fenntartása során.
- V. A NADPH oxidáz, azon belül is az RBOHD vizsgálata a ROF keletkezésében dohány protoplasztok izolálása és fenntartása során.
- VI. A PAO és NADPH oxidáz kölcsönhatásának vizsgálata dohány növényekben, a protoplasztok izolálása és fenntartása során. A két enzim általi ROF felszabadulás hatásának vizsgálata a protoplasztok életképességére.
- VII. A PAO és NADPH oxidáz együttműködésének vizsgálata Arabidopsisban. A *PAO5*, az *RBOHD* és *RBOHF* kölcsönhatásának tanulmányozása az oldalgökérprimordiumok hajtásmerisztémává történő átalakulásában.

## Anyagok és módszerek

### **Növénynevelési paraméterek**

Kísérleteinkhez *Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin 38 vad típusú, valamint *AS-NtRBOHD* transzgenikus. illetve *Arabidopsis thaliana* Columbia-0 (Col-0) vad típusú, és Col-0 háttérű *pao2-2*, *pao3*, *pao4*, *pao5-2*, *rbohhd* és *rbohfh* mutáns növényeket használtunk.

A csíráztatás steril körülmények között szilárd 1/2 MS táptalajon, növénynevelő kamrákban (Fitoclima S 600 PLH, Aralab, Portugal) történt, 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 talajkultúrában, cserepekben neveltük, üvegházi körülmények között. Az üvegházban folyamatos 23°C-os hőmérsékleten, 16/8 fény/sötét perióduson nevelt és rendszeresen öntözött 14 hetes virágzó növények levelét, szárát, gyökerét és virágát használtuk fel.

## **Dohány növények kezelése**

### **Abiotikus stressz kezelések:**

A sóstressz laboratóriumi modellezéséhez, a hosszú nappalon (16/8 óra fény/sötét perióduson), steril körülmények között nevelt 2 hetes dohány növényeket kezeltük a táptalajhoz adott 150 mM NaCl alkalmazásával, 6 napon keresztül. A magas hőmérsékleti stressz kiváltása 42°C -on, fényen történt, 5 órán keresztül. Az alacsony hőmérsékleti stressz kiváltásához rövid nappalon (8/16 órás fény-sötét perióduson) nevelt növényeket használtunk, a hideg kezelést pedig a sötét periódus alatt végeztük el, 4°C- on.

### ***In vitro* hormon és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelések:**

Ezekhez a kezelésekhöz steril üvegben 1/2 MS szilárd táptalajon, rövid nappalon (8/16 óra fény/sötét periódus) nevelt négyhetes dohány növények fiatal leveleit használtuk. Petri csészékben a leveleket 3 órán keresztül kezeltük ugyanazon a fényen, amelyen nőttek. A kezelés során alkalmazott koncentrációk a következők voltak: 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 10 µM indole-3-ecetsav (IES); 100 µM abszcizinsav (ABS); 10 µM kinetin; 10 µM gibberelinsav: (GA<sub>3</sub>) .

### **Protoplasztok izolálása, fenntartása és kezelése dohány növények leveléből**

A protoplasztok izolálásához 4 hetes steril üvegben 1/2 MS szilárd táptalajon és rövid nappalon (8/16 óra fény/sötét periódus mellett) nevelt növényeket használtunk. Az egészséges ép leveleket apróra vágtuk és sejtfal-emésztő oldatba helyeztük (1%celluláz - Onozuka RS; 0,3% Macerozim) 1 éjszakára (16 óra) sötétben, 22 C°-os hőmérsékleten. Emésztés után centrifugálással az élő protoplasztokat elválasztottuk (Eppendorf 5810 R). Az izolált protoplasztokat 1x10<sup>6</sup> sejt/milliliter koncentrációra hígítottuk K3AS oldatban (1/2× MS+ Gamborg B5, 3,13 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1,67 mM xilóz, 400 mM szacharóz, 5,38 mM naftilecetsav, 888 nM benziladenin, és 452 nM 2,4-diklórfenoxiecetsav. Az izolált protoplasztokat 8 óra megvilágítás mellett, 22C°-os hőmérsékleten tároltuk.

A NADPH oxidáz gátlására 2µM difenilén-jodóniumot (DPI), míg a PAO enzim gátlására 10µM guazatint (Guaz) adtunk a protoplasztokhoz. Mintavételhez leüleptítettük a sejteket és cseppfolyós nitrogénben fagyasztottuk őket.

## **Arabidopsis *in vitro* regenerációs rendszerek létrehozása**

A direkt organogenezis vizsgálatához Kaszler és munkatársai (2021) által kidolgozott rendszert használtuk. A sterilizált magokat négyzet alakú petri-csészékben csíráztattuk, steril táptalajon. A csíranövényeket rövid nappalon (8/16 óra fény/sötét periódus mellett) 21 °C hőmérsékletű növénynevelő kamrában neveltük, 6 napig. A fényintenzitás  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  volt. Ezután annak érdekében, hogy az oldalgökér primordiumok megjelenjenek a csíranövényeket naftilecetsavval (NES;  $3,3 \mu\text{M}$ ) kezeltük 43 órán keresztül. Ezt követően citokinin (izopentenil adenin  $8,16 \mu\text{M}$ ) tartalmú táptalajra helyeztük a csíranövényeket, hogy a kompetens oldalgökér primordiumokból hajtásmerisztéma alakuljon ki. Ezt követően négy időpontban vettünk mintákat: 24 óra (mitotikus osztódási szünet), 48 óra (szervkezdemények megjelenése), 72 óra (korai promerisztéma kialakulása) és 96 óra (késői promerisztéma kialakulása).

## **Szekvencia *in silico* elemzések**

Nukleotid szekvencia analízis segítségével meghatároztuk a dohány PAO-gének kromoszóma lokalizációját, génszerkezetét, a promóter DNS kötő motívumait, illetve a dohány PAO fehérje szekvenciák alapján azok feltételezett lokalizációját, konzervált motívumait, valamint filogenetikai kapcsolatát más fajokkal úgy, mint lúdfüvel, rizzsel, kukoricával és paradicsommal.

A munka során az alábbi szoftvereket és web szervereket használtuk:

Az NtPAO gén lokalizáció és szerkezet meghatározása TBtools segítségével történt. Az NtPAO gének promóter analízise a PAO gének start kodon előtti 1800 bázispárnyi szakaszának vizsgálatával a PlantCare adatbázis segítségével történt. Az NtPAO-k sejten belüli lokalizációt a fehérje szekvenciát felhasználva, WoLF PSORT webes keresővel határoztuk meg. Az NtPAO aminosav szekvencia konzervált motívumok keresése a MEME web keresővel történt. Az NtPAO filogenetikai kapcsolatai és kládokba sorolása a MEGA11 szoftver segítségével valósult meg. A ClustalW illesztő algoritmust, Neighbor-Joining filogenetikai rekonstrukcióhoz a JTT matrix-alapú modellt alkalmaztuk. A specificitást determináló helyek (SDP: specificity-determining site) elemzése a JDet Software-rel készültek.

## **Primer tervezés RNS izolálás és Valós idejű kvantitatív PCR (Génkifejeződés vizsgálata)**

A Dohány PAO gének keresését az Arabidopsis PAO szekvenciái alapján végeztük el, mely utóbbiak az Arabidopsis Information Resource (TAIR) (<http://www.arabidopsis.org/>) adatbázisban találhatóak meg. Az Arabidopsis szekvenciák mintájára a dohány genomon végzett BLAST analízis (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) eredményeként kapott feltételezett

PAO szekvenciákkal dolgoztunk tovább. A megfelelő, génenként egyedi primer párok tervezéséhez az NCBI primer design toolt használtuk (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A tervezést a PRJNA319578 dohány genom projektből felállított adatbázis segítségével hajtottuk végre. Mindemellett vizsgálatainkhoz a szakirodalom alapján megbízható dohány és Arabidopsis referencia géneket választottunk és vizsgáltunk. Az RNS kivonás a Quick-RNA Miniprep Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) segítségével valósult meg, folyamata a gyártó szerint javasolt lépéseket követte. A cDNS könyvtár előállítását a RevertAidFirst Strand cDNA Synthesis Kit-tel történt (Thermo Fisher Scientific). A valós idejű kvantitatív PCR reakciók, a CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) készülék segítségével valósultak meg. Az adatok kiértékelése a Bio-Rad CFX Maestro (Bio-Rad) szoftver és Microsoft Excel 2016 programok segítségével történtek. A relatív mRNS szinteket a  $(2)^{-\Delta\Delta C_t}$  módszerrel állapítottuk meg.

### **Fluoreszcens mikroszkópia**

A protoplasztok életképességének, valamint a ROF szintek változásának vizsgálatához arra alkalmas fluoreszcens festékeket használtunk. Az életképesség meghatározása 10  $\mu\text{M}$  fluoreszcein-diacetáttal (FDA), míg a ROF szintek detektálása 10  $\mu\text{M}$  2,7-diklorofluoreszcein-diacetáttal (H<sub>2</sub>DC-FDA) valósult meg.

A fluoreszcencia detektálásához Zeiss Axiovert 200M típusú fluoreszcens mikroszkópot használtunk. A fluoreszcensen jelölt protoplasztok pixel-intenzitását Axiovision Rel. 4.8 szoftver használatával, mértük meg.

### **Sztereó mikroszkópia**

Arabidopsis növények esetén, a direkt organogenezis hatékonyságának vizsgálatához sztereó mikroszkópot használtunk (Olympus SZX12 sztereó mikroszkóp), fehér LED fényforrással. Vizsgálatainkhoz tízszeres nagyítást alkalmaztunk, a mintákról pedig Cannon 200D digitális kamera segítségével készítettünk fotókat (EOS Utility 3 software).

### **Statisztika**

A statisztikai kiértékelést SigmaPlot v.12.0 szoftver segítségével végeztük. A varianciaanalízis elvégzése után a kontrolltól való szignifikáns eltérést Duncan-féle teszttel állapítottuk meg  $P \leq 0.05$  szinten. Más esetekben a szignifikáns különbség megállapítására Student-féle t-tesztet használtunk,  $P \leq 0.05$  (\*),  $0.01$  (\*\*), vagy  $0.001$  (\*\*\*) valószínűségi szinteken.

## Eredmények

**Munkánk során az alábbi főbb következtetéseket állapítottuk meg:**

**1. Tizennégy PAO génszekvenciát azonosítottunk a dohány genomában, melyeket az Arabidopsis PAOk-kal való szekvencia homológia alapján neveztünk el: *NtPAO1(A-B)*, *NtPAO2(A-C)*, *NtPAO4(A-D)* és *NtPAO5(A-E)*.**

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 családban található PAOk eltérő funkciót vehetnek fel, ami által több szervben kifejeződve több feladatot is elláthatnak.

**2. Filogenetikai analízis alapján a dohány NtPAOk 3 kládba sorolhatóak (I,III,IV).**

A II-es kládba nem tartozik egy NtPAO sem, amire magyarázat lehet egy duplikációs és egy kihalási esemény az evolúció során, ami eltüntette a *ZmPAO1* típust néhány kétszikűből, de meghagyta az *AtPAO1* típust.

Korábbi irodalmakkal ellentétben, szekvencia illesztés segítségével igazoltuk, hogy a *ZmPAO1* apoplasztikus szekvencia egy része hiányzik a dohány *NtPAO1*-ről, így az analízis alapján az *NtPAO1* nem apoplasztikus és nem terminális típusú (TC) reakciót katalizál, hanem inkább az Arabidopsis *AtPAO1* génnel mutat nagyobb szekvencia hasonlóságot, feltehetően citoplazmatikus és BC reakciót katalizál.

Az III-as kládba tartozó PAOk génszerkezetükben és eredetükben is eltérnek a többi növényi PAO-tól. Az Arabidopsis *AtPAO5* és feltehetően az azzal homológiát mutató PAO gének esetében jellemző a citoplazmatikus lokalizáció, a BC reakció, az intron nélküli génszerkezet, valamint a T-Spm oxidáció. Génszerkezeti vizsgálattal igazoltuk, hogy a dohány *NtPAO5*-k sem rendelkeznek intronnal. Annak bizonyítása azonban, hogy az ide tartozó NtPAOk szubsztrátspecifitása és az általuk katalizált reakció is hasonló az *AtPAO5*-höz további vizsgálatokat igényel.

A PSORT report szubcelluláris lokalizációs eredményei alapján az *NtPAO2(A-C)* és *NtPAO4(A-D)* gének az Arabidopsis *AtPAO2-4* génekhez hasonlóan, feltehetően peroxiszómális elhelyezkedésűek és a IV-es kládba tartoznak. A peroxiszómális lokalizációt megerősíti a C terminálison a peroxiszómális target szekvencia jelenléte, ami megfigyelhető valamennyi IV-es kládba tartozó PAO esetén.

**3. A dohány PAOk szekvencia hasonlósága az Arabidopsis PAOk-kal a hasonló szervi lokalizáció alapján funkcionálisan is megnyilvánulhat.** Dohányban a *NtPAO1A* szervi kifejeződése hasonló az Arabidopsis *AtPAO1*-hez, így ezek feltételezhetően funkcionálisan is hasonlóak egymással. Az *NtPAO4* gének szervi kifejeződése azonban eltér az Arabidopsis *AtPAO4* géntől, ami alapján ezek között funkcionális különbség áll fent.

**4. Szervi kifejeződésük alapján a III-as kládba tartozó *NtPAO5* géncsaládnál feltételezhető stressz, és/vagy szervfejlődés specifikus expresszió.** Az *NtPAO5* géncsaládon belül a *NtPAO5C* csak a gyökérben, míg az *NtPAO5B* leginkább a levélben, és az *NtPAO5A* és *D* pedig a szárban fejeződik ki. Mindemellett, bizonyos *NtPAO* gének általánosabban, több szervben is kifejeződnek, így 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.

**5. Promóter analízissel azonosítottunk számos abiotikus stresszválaszhoz kapcsolható, valamint különböző hormonszabályozási kötőhelyeket a PAO gének promóter régióiban.** A *NtPAO* géneket különböző abiotikus stresszhatások alatt tesztelve megállapítottuk, hogy többnyire stressz specifikus expressziós mintázatot mutatnak. 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 *NtPAO*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 funkció megoszlás figyelhető meg az *NtPAO2* géncsaládon belül, ahol az *NtPAO2A* hőstresszre, míg az *NtPAO2B* sóstresszre és sebzésre volt érzékeny.

**6. Az ABS válaszelemek jelenléte alapján a promóter régióban 3 peroxisómális *NtPAO* gén (*NtPAO2A*, *NtPAO4B* és *NtPAO4C*) abiotikus stresszhatásra és ABS-re való indukálhatósága alapján feltételezhető, hogy ezeknek a PAO géneknek az abiotikus stressz általi indukciója az ABS hatásával magyarázható.**



7. A dohány *NtPAOk* közül az *NtPAO4D*, mely a legmagasabb expressziót a virágban mutatta, gibberelinsav kezelésre is erősen fejeződött ki, ami utalhat a *NtPAO4D* szerepére a virágzásban.

8. Dohányban a IV-es kládba tartozó peroxiszómális *NtPAOk* (*NtPAO2B*, *NtPAO4A*, *NtPAO4C* és *NtPAO4D*) fontos szerepet játszanak a protoplaszt kultúra fennmaradásában. Feltételezhető, hogy ezek a PAOk a ROF szintek befolyásolásán keresztül, a redox rendszer szabályozásán át fejtik ki hatásukat ebben a folyamatban. Ennek bizonyítása azonban további vizsgálatokat igényel.

9. Az *NtRBOHD* negatív szabályozója a peroxiszómális *NtPAO* (*NtPAO2B*, *NtPAO4C* és *NtPAO4D*) géneknek a protoplasztok fenntartása során. Az *NtRBOHD* és a peroxiszómális *NtPAOk* egy pozitív visszacsatolási kör részét képezhetik, ami biztosítja a ROF optimális szintjét a protoplasztok 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 PAOk Guaz-zal történő gátlására.

10. Az *AtPAO5* és az *AtRBOHD* együttműködik az oldalgökerprimordiumok direkt hajtásmerisztémává történő átalakításában *Arabidopsis* növényben. A T-Spm az *AtRBOHD* pozitív szabályozója, ugyanakkor az *AtRBOHD* negatív szabályozója lehet az *AtPAO5*-nek. Eredményeink alapján feltételezhető egy RBOHD-PAO5-T-Spm-Ca<sup>2+</sup> jelátviteli kapcsolat a direkt hajtásmerisztémák kialakulása során. Ennek alátámasztása azonban további vizsgálatokat igényel.

## **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 *NtPAO1s* (A-

B) belong to clade I, *NtPAO5s* (A-E) to clade III, the residual seven with peroxisomal localization (*NtPAO2s* and *NtPAO4s*) 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-Ca<sup>2+</sup> signalling network during the conversion of lateral root primordia to shoot meristem, however it needs to be proved.

## **Folyóirat cikkek, könyvfejezetek:**

**MTMT azonosító: 10078295**

\***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>

IF.:7.07

**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>

IF.:3.48

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>

IF.: 2.71

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>

IF.: 4.658

Kaszler, N., **Benkő, P.**, Molnár, Á., Zámboi, 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>

IF.: 4.5(2022)

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>

IF.: 5.7

**Összesített IF.: 28.118**

\*a dolgozat alapjául szolgáló közlemény

#### **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>

**Konferencia kiadványok, poszterek:**

**Benkő, P.**, Bernula, D., Domonkos, I., Fehér, A., Gémes, K. (2018). Inhibitory effect of auxin on plant regeneration from cytokinin-induced Arabidopsis roots. STRAUB-DAYS, 10-11 May, 2018, Szeged, Biological Research Centre.

**Benkő, P.**, Bernula, D., Domonkos, I., Fehér, A., Gémes, K. (2018). In vitro somatic embryogenesis on Arabidopsis root explants. I. The role of hormones. 3rd National Conference of Young Biotechnologists, 28-29 March, 2018, Budapest, Eötvös Loránd University, Faculty of Science. Book of Abstracts, pp: 111.

**Benkő P.**, Fehér A., Gémes K. (2020) Polyamines regulatory effects during tobacco pollen germination and pollen tube elongation In: Tünde, Pusztahelyi; Levente, Czeglédi; Éva, Domokos-Szabolcsy; Tamás, Emri (szerk.) 4th National Conference of Young Biotechnologists "FIBOK 2020" online conference : abstract book Debrecen, Magyarország : Debreceni Egyetem (2020) 113 p. pp. 37.

**Benkő, P.**, Fehér, A., Gémes, K., Bernula, D. (2019). Somatic embryogenesis: inhibitory effect of shoot derived auxin on cytokinin-induced Arabidopsis roots. VISCEA International Conference – „Plant Cells & Tissues in Vitro”, 1-2 July, 2019, Vienna. Programme and Abstracts, pp: 27

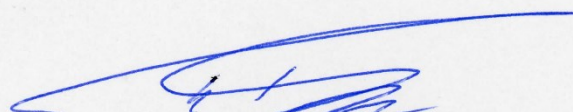
**Benkő, P.**, Kaszler N., Fehér, A., Gémes, K., (2022) The possible role of tobacco PAO during protoplast isolation and maintenance. VISCEA International Conference – „Plant Cells & Tissue culture in Vitro”, 4-5 July, 2022, Vienna. Abstractsbook , pp: 25.

## Nyilatkozat

Mint az alábbi közlemény felelős szerzője igazolom, hogy Benkő Péter Ph.D. jelölt jelentős mértékben hozzájárult az alábbi tudományos publikáció létrehozásához és tézisében közölt eredményeit más Ph. D. értekezésben nem használjuk fel:

**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>

Szeged, 2023.07.28. ....



Prof. Dr. Fehér Attila

tanszékvezető egyetemi tanár

SZTE Növénybiológiai Tanszék