

**A poliamin metabolizmus szerepe az oldalgökér primordiumok
citokinin-indukált hajtásmerisztémává történő átalakulásában
Arabidopsis thaliana növényben**

Doktori (Ph.D.) értekezés

Jillingné Kaszler Nikolett

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

2024

TARTALOM

1. BEVEZETŐ	6
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
2.1 Organogenezis	7
2.1.1 A hajtás <i>de novo</i> organogenezise	8
2.2 A poliaminok	13
2.2.1 A poliaminok általános jellemzői és szerepük a növényekben.....	13
2.2.2. A poliaminok metabolizmusa a növényekben	14
2.2.3 A poliaminok metabolizmusának szerepe a növényi regenerációs folyamatokban.	22
2.2.4 A poliaminok és a növényi hormonok kölcsönhatása.....	23
2.3 Nitrogén-monoxid	27
2.3.1 A nitrogén-monoxid metabolizmusa.....	28
2.3.2 A NO szerepe a fejlődési és regenerációs folyamatokban.....	30
3. CÉLKITŰZÉSEK	33
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	34
4.1 A kísérleti növény bemutatása, <i>in vitro</i> szövettenyészet	34
4.1.1 A kísérleti növény és növényi vonalak	34
4.1.2. A növények előkészítése, nevelése, az <i>in vitro</i> gyökér alapú regenerációs rendszer bemutatása.....	34
4.2 Külső kezelések és mintavétel.....	35
4.3 A kísérleti rendszer bemutatása	36
4.4 Molekuláris biológiai módszerek	37
4.4.1 RNS izolálás.....	37
4.4.2 cDNS szintézis	37
4.4.3 Valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-qPCR).....	37
4.5 Sztereomikroszkóppal végzett vizsgálatok.....	40
4.6 Reaktív oxigén formák és a nitrogén-monoxid detektálása és mennyiségi meghatározása fluoreszcens mikroszkóppal	40
4.6.1 A reaktív oxigén formák <i>in situ</i> detektálása.....	40
4.6.2 A nitrogén-monoxid kimutatása.....	41
4.6.3 Fluoreszcens mikroszkópia	41
4.7 A szabad poliaminok mennyiségének meghatározása HPLC-vel	42
4.7.1 A minták előkészítése	42
4.7.2 A poliamin koncentráció meghatározása	42

4.8 Statisztikai analízis	42
5. EREDMÉNYEK	43
5.1 A poliaminok hatása az oldalgökér primordiumok hajtásmerisztémává történő átalakulására	43
5.1.1 A PA metabolizmus gének expressziójának változása az OGYP- HM átalakulás során.....	44
5.2 Az <i>AtPAO5</i> túltermeltetésének hatása az OGYP-HM átalakulásra.....	46
5.2.1 Az <i>AtPAO5</i> -túltermelő vonal regenerációs hatékonyságának vizsgálata	46
5.2.2 Az endogén poliamin szintek változása a 35S:: <i>PAO5</i> vonalban	48
5.2.3 A <i>PAO5</i> túltermeltetésének hatása a ROF homeosztázisra	49
5.3 Az <i>AtPAO2</i> túltermeltetésének hatása az OGYP-HM konverzióra.....	49
5.4 Az <i>AtPAO5</i> funkcióvesztés hatása az OGYP-HM konverzióra	50
5.4 A <i>PAO5</i> szerepe a citokinin érzékenység szabályozásában	53
5.5 Az NO hatása az <i>AtPAO5</i> függő OGYP-HM konverzió hatékonyságára	58
6. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE	62
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	67
IDÉZETT KÖZLEMÉNYEK	68
ÖSSZEFOGLALÁS.....	90
SUMMARY	91
FÜGGELÉK.....	92
F.1 A pixel intenzitás mérés módja	92
F.2 Az <i>AtPAO5</i> kifejeződése 35S:: <i>PAO5</i> , és az <i>AtPAO2</i> kifejeződése a 35S:: <i>PAO2</i> vonalban.....	93
F.3 A 35S:: <i>PAO5</i> vonal regenerációs hatékonysága.....	94
F.4 A poliaminok lebontásában szerepet játszó enzimek főbb tulajdonságai	95

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2iP: 6-(γ,γ -Dimethylallylamino)purine; N6-(2- izopentenil)adenin
3-AP: 3-aminopropanal
A-ARR: A-típusú válaszregulátor, type-a Arabidopsis response regulator
ABCB4: ATP-binding cassette B4
ACC: 1-aminociklopropán-1-karbonsav
ACL5: acaulis 5
ACO: ACC oxidáz
ACS: ACC szintáz
ADC: arginin-dekarboxiláz
AGI: Arabidopsis genom kezdeményezés, Arabidopsis genome initiative
AGM: agmatin
AIH: agmatin-iminohidroláz
ARF: auxin válasz faktor, auxin response factor
ARGAH: argináz /arginin amidohidroláz
At: közönséges lúdfű, *Arabidopsis thaliana*
B-ARR: B típusú válaszregulátor, type-B Arabidopsis response regulator
BC: visszaalakítás, back-conversion
BUD2: bushy and dwarf 2
Cad: kadaverin
CDC: citrullin-dekarboxiláz
CIM: kalluszindukciós táptalaj, callus-inducing medium
CK: citokinin
CKX: citokinin oxidáz
CLV3: clavata 3
Col-0: Columbia-0 (ökotípus)
CRF8: cytokinin response factor 8
CuAO: réztartalmú amin-oxidáz, copper-containing amine oxidase
CUC: cup-shaped cotyledon
DAF-FM DA: 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorfluoreszcein diacetát
DAF-FM: 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorfluoreszcein
DAF-FMT: triazolofluoreszcein
DAP: 1,3-diaminopropán
dcSAM: dekarboxilált S-adenozil-metionin
DNSO: de novo hajtás organogenezis, de novo shoot organogenesis
E2Fa: E2 promotor binding factor a
ER: endoplazmatikus retikulum
ESR: enhancer of shoot regeneration
F: Forward
FAD: flavin- adenin-dinukleotid
GAPC-2: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase c-2
Gh: *Gossypium hirsutum*
GLB: hemoglobin

GSH: redukált glutation
GSNO: S-nitrozoglutation
GSNOR: S-nitrozoglutation-reduktáz
GSSG: oxidált glutation
H₂O₂: hidrogén-peroxid
HM: hajtásmerisztéma
IAMT1: indol-3-acetic acid carboxymethyltransferase 1
IES: indol-3-ecetsav
LBD/ASL: lateral organ boundaries domain/asymmetric leaves2-like
mRNS: hírvivő RNS
NATA1: N-acetyltransferase activity 1
NCPAH: N-karbamoil-putreszcín-amidohidroláz
NES: naftilecetsav
NH₃: ammónia
NIA1, 2: nitrate reductase 1, 2
NLP1: nitrilase-like protein 1
NLP1: N-karbamoilputreszcín-amidohidroláz
NO: nitrogén-monoxid
NOS: nitrogén-monoxid-szintáz
NR: nitrát reduktáz
N-Spd: norspermidin
NTC: non template control
ODC: ornitín-dekarboxiláz
OGYP: oldalgököér primordium
PA: poliamin
PAO: poliamin-oxidáz
PIN: pin-formed
PLT: plethora
PP2A3: protein phosphatase 2A subunit A3
Put: putreszcín
QC: nyugvó centrum, quiescent center
R: reverse
ROF: reaktív oxigén forma
RT-qPCR: valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
SAM: hajtás apikális merisztéma, shoot apical meristem
SAM: S-adenozil-metionin
SAMDC: S-adenozil-metionin-dekarboxiláz
SAMS/MAT: S-adenozilmetionin-szintáz / metionin-adenoziltranszferáz
SAUR: Small auxin-up RNA
SCR: scarecrow
SHR: short root
SIM: hajtásindukciós táptalaj, shoot-inducing medium
Spd: spermidin

SPDS: spermidin-szintáz

Spm: spermin

SPMS: spermin-szintáz

STM: shoot meristemless

TC: terminális katabolizmus, terminal catabolism

T-Spm: termospermin

TSPMS: termospermin-szintáz

UBQ1: ubiquitin 1

uORF: upstream elhelyezkedő nyitott leolvasási keret, upstream open reading frame

WOX: wuschel-related homeobox

WUS: wuschel

YUC: yucca

1. BEVEZETŐ

A mezőgazdaság számára nagy jelentőséggel bírnak azok a módszerek, amelyek a növények vegetatív szaporításán alapulnak. Ezek egyike az indukált organogenezis, ami teljes szervrendszerek *de novo* regenerációját jelenti testi sejtekből. Számos regenerációs rendszer létezik, mellyel *de novo* hajtásmerisztéma (HM) képzésén keresztül lehet növényi egyed létrehozni. Az *in vitro* regeneráció sikere több tényezőtől is függ, mint például a megfelelő genotípus, az explantum, a megfelelő környezeti feltételek és optimális hormonkombináció. A legtöbb regenerációs rendszerben két lépésben, indirekt úton, kalluszátmeneten keresztül váltják ki a HM megjelenését, azonban ez akár közvetlenül is megvalósítható. Ebben az esetben az oldalgökér primordiumoknak azt a képességét használják ki, hogy megfelelő citokinin koncentráció alkalmazása mellett sejtjei képesek a sejtorsváltásra és HM létrehozására. Ugyanis a *de novo* hajtásregeneráció egyik fő szabályozója, az auxin mellett, a citokinin, így annak endogén szintje, valamint megfelelő érzékelése és jelátvittele kiemelt fontosságú a folyamat szempontjából. A citokinin jelátvitel szabályozásában fontos szerepet játszanak a hisztidin kináz receptorok, valamint az A- és B-típusú citokinin válaszregulátorok, melyek közül előbbiek a citokinin jelátvitel negatív, míg utóbbiak annak pozitív szabályozói.

A poliaminokról kimutatták, hogy bizonyos fejlődési folyamatok során kölcsönhatásba lépnek az auxinnal és a citokininrel. Mind szintézisük mind lebontásuk döntő szerepet játszik a növények növekedésében és fejlődésében. A hajtásregeneráció során a citokininválaszokat a poliaminok mellett számos egyéb útvonal is befolyásolhatja, mint például a hemoglobinok expressziója vagy a nitrogén-monoxid (NO) szint. A hemoglobinok befolyásolhatják az indirekt hajtásmerisztémák kialakulását a citokinin észlelésben és jelátvitelben szereplő gének és ezáltal a citokinin érzékenység befolyásolásán keresztül.

Mivel a hemoglobinok képesek a NO megkötésére, a NO is közvetítheti a citokinin jelátvitelre gyakorolt hatásukat. Ugyanakkor a citokinin válaszok kialakításában a NO-nak is lehet szerepe. Ismert, hogy a NO termelését elősegíthetik a poliaminok (PA-k), továbbá bioszintézisük prekursora, az L-arginin is NO-forrásként szolgálhat. Valamint a NO képződését összefüggésbe hozták a PA katabolizmussal is.

Számos kísérleti adat utal arra, hogy a PA-k, a hemoglobinok és a NO befolyásolhatják egymás hatását a citokinin függő válaszok során. Munkám során ennek a lehetőségét vizsgáltam meg egy erősen citokininfüggő folyamatot, az oldalgökér primordiumok hajtásmerisztémává történő közvetlen átalakulása során lúdfű növényekben.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az előlények az életciklusuk során folyamatosan ki vannak téve fizikai sérüléseknek, így az őket ért károsodás csökkentése érdekében képessé váltak arra, hogy új szövetet vagy szerveket hozzanak létre. Ez a regeneráció, amely konzervált válaszfolyamatnak tekinthető. A regenerációra való képesség a növények életében, helyhez kötött életmódjuk miatt, sokkal nagyobb jelentőséggel bír, mint az állatokban (Birnbaum és Sánchez Alvarado, 2008). A növények figyelemre méltó fejlődési plaszticitással rendelkeznek, hiányzó szövetek vagy szervek pótlásán túl egyedülálló módon, a sérült szervből akár egy teljesen új egyed létrehozására is képesek (Pulianmackal és mtsai., 2014). Ezek alapján a magasabb rendű növényeknél, megkülönböztetjük a szöveti regenerációt, ami sérült szövet pótlását, a *de novo* organogenezist, ami egy teljes szerv létrehozását jelenti és a szomatikus embriogenezist, mely folyamat során egy vagy több testi sejt embrióvá fejlődik, majd létrehoz egy új növényegyet (Xu és Huang, 2014; Fehér és mtsai., 2016; Fehér, 2019).

2.1 Organogenezis

A *de novo* organogenezis egy olyan regeneratív folyamat, amely során pluripotens sejtekből egy merisztematikus központ alakul ki, amely azután képes létrehozni az új szervet (Xu és Huang, 2014; Lardon és Geelen, 2020). Természetes (*in planta*) körülmények között elsősorban a sebzés váltja ki, de a sejtfal eltávolítása vagy bioszintézisének hibája (Avivi és mtsai., 2004; Krupková és Schmölling, 2009), biotikus és abiotikus stresszorok (Tu és mtsai., 2021; Tran és mtsai., 2023) is előidézhetik a folyamatot. Organogenezis azonban nemcsak természetes körülmények között valósulhat meg, hanem mesterségesen (*in vitro*) is kiváltható. *In vitro* rendszerekben a növényi regeneráció hatását számos tényező befolyásolja, úgymint a választott explantum, a környezeti tényezők, a külsőleg alkalmazott hormonok, valamint a szövetkultúra azokra adott válaszai (Bernula és mtsai., 2020). A folyamat történhet közvetlenül, kallusz átmenet nélkül (direkt organogenezis) vagy közvetve, kallusz képződéssel (indirekt organogenezis). A kallusz egy átmeneti szövet, a sejt és szöveti identitásukat veszített, osztódó sejtek heterogén halmaza, melynek bizonyos sejtjei pluripotensek. A hormonok közül kiemelkedő jelentőségű az auxin és a citokininek szerepe, de számos más hormon is szerepet játszik a folyamat szabályozásában (Su és Zhang, 2014). Az auxin-citokinin arány képes befolyásolni a regenerációs folyamatokat. Magas auxin és alacsony citokinin (CK) arány mellett gyökérfejlődés, míg magas CK, alacsony auxin arány mellett hajtásregeneráció figyelhető meg. A két hormon kiegyenlített hatása pedig kallusz képződést eredményez. Ez a

felfedezés elősegítette az *in vitro* organogenezis rendszerek létrehozását több száz növényfajban, köztük *Arabidopsis thaliana* (közönséges lúdfű, *At*) növényekben is (Ikeuchi és mtsai., 2016; Bernula és mtsai., 2020). Az *in vitro* organogenezis egy többlépcsős folyamat, amely az alapító sejtek specifikációjából, a kallusz/primordium kialakulásából, az organogén kompetencia megszerzéséből, a fejlődő primordiumok szervazonosságának rögzítéséből és a szerv kifejlődéséből áll (Motte és mtsai., 2014).

2.1.1 A hajtás *de novo* organogenezise

A legtöbb rendszerben hajtás *in vitro* organogenezise indirekt módon, két egymást követő inkubációs lépéssel valósul meg: az explantum auxinban gazdag kalluszindukációs táptalajon (callus-inducing medium, CIM), majd citokininben gazdag hajtásindukációs táptalajon (shoot-inducing medium, SIM) történő inkubációjával (Che és mtsai., 2007). Ezzel szemben direkt rendszerekben a citokininnel történő kezelés, akár auxin kezelés nélkül is, eredményezhet hajtás kialakulást (Atta és mtsai., 2009; Radhakrishnan és mtsai., 2018). A *de novo* hajtás organogenezisben (de novo shoot organogenesis, DNSO) mind a CK, mind pedig az auxin jelátvitel központi szerepet játszik. Az alapító sejtek specifikációját, a pluripotens primordiumok kialakulását és az organogén kompetencia megszerzését az auxin, míg a fejlődő primordiumok hajtásidentitásának kialakulását a CK szabályozza (Motte és mtsai., 2014).

A közvetlen és az indirekt hajtás organogenezis a megfelelő morfogenetikus szakaszokhoz kapcsolódó sejszintű és genetikai események hasonló sorozatán keresztül zajlik, függetlenül a látható kalluszsövet jelenlététől vagy hiányától (Raspor és mtsai., 2021). Korábban úgy gondolták, hogy a DNSO során a folyamatban részt vevő sejtek dedifferenciálódás révén válnak pluripotenssé. Számos bizonyíték utal azonban arra, hogy a DNSO-ban egy, a normál növekedés során a szövetek differenciálódása után is megmaradó, őssejt populáció vesz részt (Muñoz és mtsai., 2017). *Arabidopsis* gyökér- és hipokotil explantumok esetén kimutatták, hogy a kallusz-indukáló médiumon kialakuló primordiumok a xilém pólusokkal szomszédos periciklus sejtek osztódásával jönnek létre. Ezek nem valódi kallusz szövetet hoznak létre, hanem rendezett struktúrával bírnak, ami az oldalgökér merisztémára hasonlít és gyökér merisztéma-specifikus géneket expresszálnak. Mindemellett megfigyelték, hogy kallusz-indukáló médium helyett, csak auxint tartalmazó táptalajon az explantumok valódi oldalgökér kezdeményekké fejlődnek, azaz fejlődésük a gyökér kialakulás genetikai programját követi (Benková és mtsai., 2003; Atta és mtsai., 2009; Ikeuchi és mtsai., 2016). A föld feletti szervek, például a sziklevelel vagy a szíromlevelel esetén az

explantumokból származó kalluszból a hajtás regenerációja szintén oldalgökér primordium (OGYP)-szerű struktúrákból valósul meg. Az oldalgökerek képzésére képtelen mutánsok nem képesek kalluszokat képezni a CIM-en, ami megerősíti, hogy a kalluszokban lévő organogén primordiumok szerkezeti és funkcionális homológiát mutatnak az OGYP-vel (Sugimoto és mtsai., 2010). Ugyanezek az OGYP-szerű primordiumok alakulnak ki a közvetlen hajtás organogenezis során, kallusz szövet proliferációja nélkül (Kareem és mtsai., 2016). Ezek a primordiumok, amelyek a gyökérfejlődés során oldalgökereket alakítanak ki, egy bizonyos fejlődési ablakon belül indukálhatók, hogy transzdifferenciációval hajtás primordiumokat alakítsanak ki (Rosspopoff és mtsai., 2017).

A legkorábbi morfogenetikai esemény, amely a DNSO szempontjából releváns és amely az explantum CIM-en történő inkubálásakor következik be, az a periciklus xilémpólusában lévő alapító sejtek specifikációja, amelyekből később pluripotens primordiumok keletkeznek (Motte és mtsai., 2014). Az OGYP-hez való hasonlósága arra utal, hogy a specifikációt CIM-ben lévő auxin, az oldalgökér alapító sejtek specifikációjához hasonló módon váltja ki. A periciklus sejtek elköteleződése alapító sejté, így az OGYP kialakítása a gyökércsúcsához közel, a bazális merisztémában kialakuló auxin maximum, valamint az általa kiváltott válaszok révén történik (De Smet és mtsai., 2007). Természetes körülmények között csak kis számú alapító sejt alakul ki, azonban megnövekedett auxin szint hatására bármelyik xilémpólus periciklus sejt képes osztódni (Boerjan és mtsai., 1995; Dubrovsky és mtsai., 2008). A lokális auxin maximum kialakításában auxin efflux és influx karrierek vesznek részt. A folyamatban az *AUXIN-RESISTANT1* auxin influx karrier emelkedett, míg a *PIN-FORMED (PIN)* gének csökkent kifejeződése figyelhető meg (Pernisová és mtsai., 2009). Az alapító sejtek specifikációja auxin-indukált folyamat (De Rybel és mtsai., 2010) azonban a CK is fontos szerepet játszik az *in planta* OGYP kialakulás során és a DNSO-ban is (Laplaze és mtsai., 2008; Pernisová és mtsai., 2009). Az auxin-indukált organogenezis során Pernisová és munkatársai (2009) a CK bioszintézist indukcióját, valamint CK szignalizáció szövetspecifikus aktivációját figyelték meg. A CK pedig befolyásolta az auxin eloszlást a *PIN* gének expressziójának szabályozása révén (Pernisová és mtsai., 2009).

A DNSO során a CIM-en történő kalluszképződés az OGYP kialakulásának molekuláris útját követi. Az oldalgökér fejlődés során fontos szerepe van az auxin válasz faktorok (auxin response factor, ARF) közül az ARF7-nek és ARF19-nek, melyek elindítják az OGYP kialakulást a lateral organ boundaries domain/asymmetric leaves 2-like (LBD/ASL) transzkripciós faktor család bizonyos tagjai, többek közt az *LBD16*, *LBD17*, *LBD18*, *LBD29* és

LBD33, kifejeződésének direkt aktivációja révén (Okushima és mtsai., 2007; Lee és mtsai., 2009; Fan és mtsai., 2012). Az LBD transzkripciós faktorok változatos funkciókat látnak el. Például az *LBD18* és az *LBD33* heterodimert alkotva aktiválja a sejtciklus-kapcsolt *E2 PROMOTER BINDING FACTORa (E2Fa)* kifejeződését, mely az OGYP iniciációjának sebességmeghatározó lépése (Berckmans és mtsai., 2011). Az auxin-indukált kalluszképződés során felülszabályozódik az *LBD16*, *LBD17*, *LBD18* és *LBD29* és az *E2Fa* is kifejeződik LBD-függő módon. Az LBD-k számos kalluszképződésben is részt vevő reaktív oxigén forma (ROF) anyagcseréjét, lipidanyagcserét, sejtfa hidrolízist és metilációt szabályozó gének kifejeződését indukálják. Az *LBD16* kifejeződését az auxin-indukált WUSCHEL-related homeobox 11 (*WOX11*) és *WOX12* is pozitívan szabályozza. A CIM-en a magas auxin szint aktiválja a *WOX11 / 12* expressziót, az pedig az *LBD16*-ot. Az *LBD16* elsősorban az újonnan képződött kalluszban fejeződik ki, részt vesz a pluripotencia megszerzésében és a sejtosztódás elősegítése révén az OGYP-szerű struktúrák sejtazonosságának kialakításában (Liu és mtsai., 2018b). Az oldalgyökér fejlődése során a gyökér merisztéma kialakulásakor az *LBD16*, valamint a *WOX11/12* kifejeződése csökken és a *WOX11/12* aktiválja a *WOX5* és a *WOX7* kifejeződését. A *WOX5* felelős az őssejtek pluripotenciájának fenntartásáért és osztódásuk szabályozásáért (Lee és mtsai., 2009). Ezt a szerepét a hajtásregeneráció során is bizonyították (Kim és mtsai., 2018). A *WOX5* mellett számos gyökérmerisztéma kialakításában is részt vevő gén, többek közt a *SCARECROW (SCR)*, a *SHORT ROOT (SHR)* és a *PLETHORA (PLT)* transzkripciós család számos tagjának kifejeződése is fokozódik az auxin-indukált kallusz kialakulása során (Atta és mtsai., 2009). Feltételezhető, hogy a *SCR* és a *SHR* a poszt-embriális fejlődésben betöltött szerepük mellett a nyugvó centrum (quiescent center; QC) fenntartásában is részt vesz a CK/auxin egyensúly szabályozása révén (Salvi és mtsai., 2018). Míg a *PLT1*-nek és *PLT2*-nek a gyökér merisztémában az őssejt niche fentartásában van szerepe (Du és Scheres, 2017), addig a *PLT3*, *PLT5* és *PLT7* az OGYP és a pluripotens primordium megfelelő sejtosztódási mintázatának kialakulásáért felel (Kareem és mtsai., 2015).

Rosspopoff és munkatársai (2017) az organogén kompetencia megszerzésének vizsgálatát egy közvetlen regenerációs rendszerben végezték el, ahol a megfelelő hormonkezeléssel sikerült a fejlődő primordiumok szervi identitásának transzdifferentiálódását előidézni, és egy szűk fejlődési ablakon belül azt oda-vissza is lehetett fordítani. Col-0 ökotípusú *Arabidopsis* gyökérexplantumokon N6-(2-izopentenil)adenin alkalmazásával hatékonyan lehetett a VI. és VII. fejlődési stádiumban lévő OGYP-k transzdifferentiálódását indukálni funkcionális hajtásprimordiumokká. A génexpressziós elemzés feltárta, hogy a

gyökérprimordium expressziós profilja átmenetileg a hajtás apikális merisztémára (shoot apical meristem, SAM) jellemzővé vált. A *PLT1* és a *SHR* kifejeződése gyorsan lecsökkent és a fejlődő hajtás SAM-ra jellemző *SHOOTMERISTEMLESS (STM)*, *WUSCHEL (WUS)* és *CLAVATA3 (CLV3)* kifejeződési mintázat alakult ki. A hajtásprimordiumok egy rövid fejlődési ablakon belül naftilecetsavval történő kezeléssel visszaállíthatók voltak a gyökérprimordium identitására. Ezeket a változásokat a gyökérprimordiumra jellemző génexpressziós mintázat helyreállása kísérte. Kimutatták, hogy a gyors identitásváltás a fejlődési program egyenértékű elemei közötti egyszerű váltásokon keresztül valósul meg, például a *WOX5* expressziója a gyökér őssejt niche-ben gyorsan lecserélődik a *WUS* egyenértékű expressziós mintázatára, hogy az expressziós doménhez hajtásidentitást rendeljen (Rosspopoff és mtsai., 2017).

A pluripotens primordiumok kialakulása után további fejlődésük a hajtások kialakításához az organogenezishez való kompetenciájuktól függ. Ennek kulcsfontosságú szabályozó génjei a *PLT*, az *ENHANCER OF SHOOT REGENERATION (ESR)* és a *CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC)* géncsaládokba tartoznak. A *PLT3*, *PLT5* és *PLT7* nemcsak a primordium kialakulásában, hanem a DNSO későbbi szakaszaiban is részt vesznek. (Kareem és mtsai., 2015). Ennek a három génnek az indukciója aktiválja *CUC2*-t, valamint a *PLT1*-et és a *PLT2*-t, melyek kifejeződése lehetővé teszi a hajtás progenitorok kialakulását a sejtek pluripotenciájának biztosítása révén. Továbbá szerepük van a *CLV3 - WUS* megfelelő kifejeződési mintázatának szabályozásában (Kareem és mtsai., 2015). A *CUC* gének már sokkal a hajtás elköteleződése előtt felülszabályozódnak, és már a CIM táptalajon is kifejeződnek. A *CUC1* a SAM kialakulásában játszik szerepet. Kifejeződését az *ESR1* és *ESR2* pozitívan befolyásolja. Az *ESR1* továbbá a *WUS*, a *CLV3* és a *STM* kifejeződését is befolyásolja a SAM kialakulás során (Kirch és mtsai., 2003). A *CUC2* CIM táptalajon a kallusz szövetben kiterjedt régiókban fejeződik ki, azonban CK indukció hatására, SIM táptalajon, ez a PIN1-függő lokális auxin maximummal egybeeső doménekre korlátozódik. A CK továbbá indukálja a *WUS* kifejeződését, a *CUC2*-vel nem átfedő régiókban. A *CUC2* és *WUS* eltérő régiókban való kifejeződésének eredményeképpen a kalluszon belül kijelölődnek a progenitor és nem progenitor sejtek (Gordon és mtsai., 2007).

A progenitor sejtek kialakulása után, azaz miután hajtás organogenezisre kompetenssé vált, a primordium a további fejlődése során, a hajtás identitás megszerzésével kialakítja a hajtás promerisztémát. Bár az ontogenetikus hajtásfejlődés és a DNSO során a SAM kialakulása között vannak különbségek, ezek a folyamatok genetikai szinten nagyrészt hasonlóak. A SAM kialakulásának folyamatában központi szerepet játszik két homeodomain transzkripciós faktor,

az STM és a WUS, melyek aktivitása, valamint szabályozása szorosan összefügg a CK jelátvitellel. Mindkét gén expressziója CK indukció hatására fokozódik. (Raspor és mtsai., 2021). Az STM kiterjedt expressziót mutat a SAM-ban. A CK bioszintézis fokozásán keresztül gátolja a sejtdifferenciációt, továbbá CK-független módon a merisztéma szerveződését szabályozza, valamint a WUS kifejeződését, ami által pedig az organizáló centrum és az összejt identitás fenntartásában is szerepet játszik (Scofield és mtsai., 2014). Az auxin gátolja az STM expresszióját, lehetővé téve a SAM perifériás zónájában az oldalszervek kialakulásához szükséges sejtek differenciálódását (Chang és mtsai., 2020). A WUS irányítja a hajtásmerisztéma kialakulásának folyamatát, gátolja a sejtosztódást és a sejt megnyúlást, hogy fenntartsa a sejtek összejt állapotát (Negin és mtsai., 2017). A WUS-t a SIM-ben jelen lévő CK felülszabályozza azokban a sejtekben, amelyekben az *ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 4*, auxin kezelés révén, az organogén kompetencia megszerzése során kifejeződött (Gordon és mtsai., 2009). A CK jelátvitelben fontos szerepet játszó B- típusú válaszregulátorok (type-B Arabidopsis response regulators, B-ARR-ek), többek közt a ARR1, ARR2, ARR10, és ARR12, aktiválják a WUS expressziót (Liu és mtsai., 2018a) és erősítik azt a YUCCA-mediált auxin felhalmozódás gátlása révén (Meng és mtsai., 2017). Ezek aktivitását a HD-ZIP III transzkripciós faktorok korlátozzák a kompetens merisztéma sejtjeire (Zhang és mtsai., 2017a). Bár a B-ARR-ek direkt módon aktiválják a citokinin jelátvitel negatív szabályozói, az A-típusú válaszregulátorok (type-a Arabidopsis response regulators, A-ARR-ek) kifejeződését (Mason és mtsai., 2005), a WUS ezek transzkripcióját gátolja. Így a WUS negatívan szabályozza az ARR5-öt, az ARR6-ot, az ARR7-et és ARR15-öt, ezáltal a merisztéma CK iránti érzékenységét is növeli (Leibfried és mtsai., 2005). Kimutatták, továbbá, hogy az ARR7 a WUS negatív szabályozója, valamint, hogy az ARR7 és az ARR15 túltermeltetése Arabidopsis növényekben csökkenti a hajtás regeneráció hatékonyságát (Leibfried és mtsai., 2005; Buechel és mtsai., 2010). Arabidopsis embrionális fejlődése során a WUS helyett a *WOX2* felelős a hajtás progenitorok létrehozásáért, valamint ezek pluripotenciájának fenntartásáért az auxin és a CK jelátvitel közötti egyensúly finomhangolásával (Zhang és mtsai., 2017b).

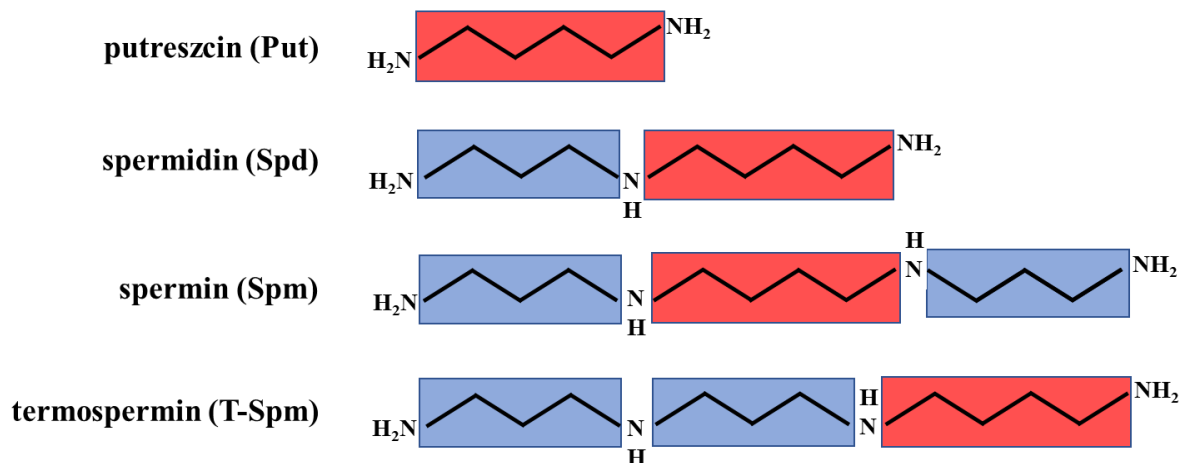
A hajtás identitás megszerzése és a SAM kialakulása, amelyet mind auxin-, mind CK-függő gének szabályoznak, a DNSO utolsó lépésének tekinthető. Bár az ötödik fázist, azaz a hajtás kiemelkedését általában a DNSO részeként írják le, a folyamat spontán módon megy végbe még akkor is, ha az explantumok növekedésszabályozó-mentes táptalajba kerülnek és a csíranövények a hajtás fejlődési programját követik (Shin és mtsai., 2020; Raspor és mtsai., 2021).

2.2 A poliaminok

2.2.1 A poliaminok általános jellemzői és szerepük a növényekben

A poliaminok minden élő organizmusban jelen lévő nitrogén tartalmú egy vagy több amino csoportot tartalmazó, egyenes vagy elágazó láncú alifás, alacsony molekula tömegű, vízdékony molekulák (Kusano és mtsai., 2008; Chen és mtsai., 2019; Hasanuzzaman és mtsai., 2019). Élő szervezetekben előfordulhatnak szabad, kovalensen konjugált, vagy nem kovalensen konjugált formában. Utóbbit további két csoportra oszthatjuk, a perklórsav által oldható és nem oldható PA-okra (Chen és mtsai., 2019). A különböző fajokban megtalálható PA-ok eloszlása és koncentrációja nagyon eltérő. A sejtekben szintjük dinamikusan változik, bioszintézis, interkonverzió, konjugáció, kémiai módosulások, transzport és lebontás révén (Wang és mtsai., 2019; Pál és mtsai., 2021).

Magasabb rendű növényekben főként szabad formában vannak jelen, legnagyobb mennyiségben a putreszcin (Put), spermidin (Spd) és a spermin (Spm) fordul elő (**1. ábra**), azonban termospermin (T-Spm), kadaverin (Cad), norspermidin (N-Spd) valamint egyes növényfajoknál további, úgy nevezett „nem szokványos” PA-ok, például homokaldopentamin, homokaldohexamin is megtalálható (Chen és mtsai., 2019; Kuehn és mtsai., 1990; Kuznetsov és mtsai., 2006).



1. ábra A növényekben leggyakrabban megtalálható poliaminok felépítése

Kakehi és mtsai., 2010 alapján, módosítva. A piros keret a putreszcint jelöli, a kék keret a poliaminok bioszintézise során hozzá kapcsolódó aminopropil csoportokat.

A szabad PA-ok a fiziológias pH tartományban teljesen protonáltak és pozitív töltéssel rendelkeznek, így elektrosztatikus kölcsönhatásba léphetnek negatív töltésű

biomakromolekulákkal (fehérjékkel, foszfolipidekkel, aminosavakkal). Az így kialakuló nem kovalensen kötött PA-ok részt vesznek a DNS replikáció, a transzkripció, a sejtosztódás, a membrán stabilitás, valamint különböző enzimek aktivitásának szabályozásában, ezáltal pedig a növényi növekedés és fejlődés szinte minden folyamatában, valamint a stresszre adott válaszreakciókban (Miller-Fleming és mtsai., 2015; Chen és mtsai., 2019; Wang és mtsai., 2019).

2.2.2. A poliaminok metabolizmusa a növényekben

2.2.2.1 A poliaminok bioszintézise

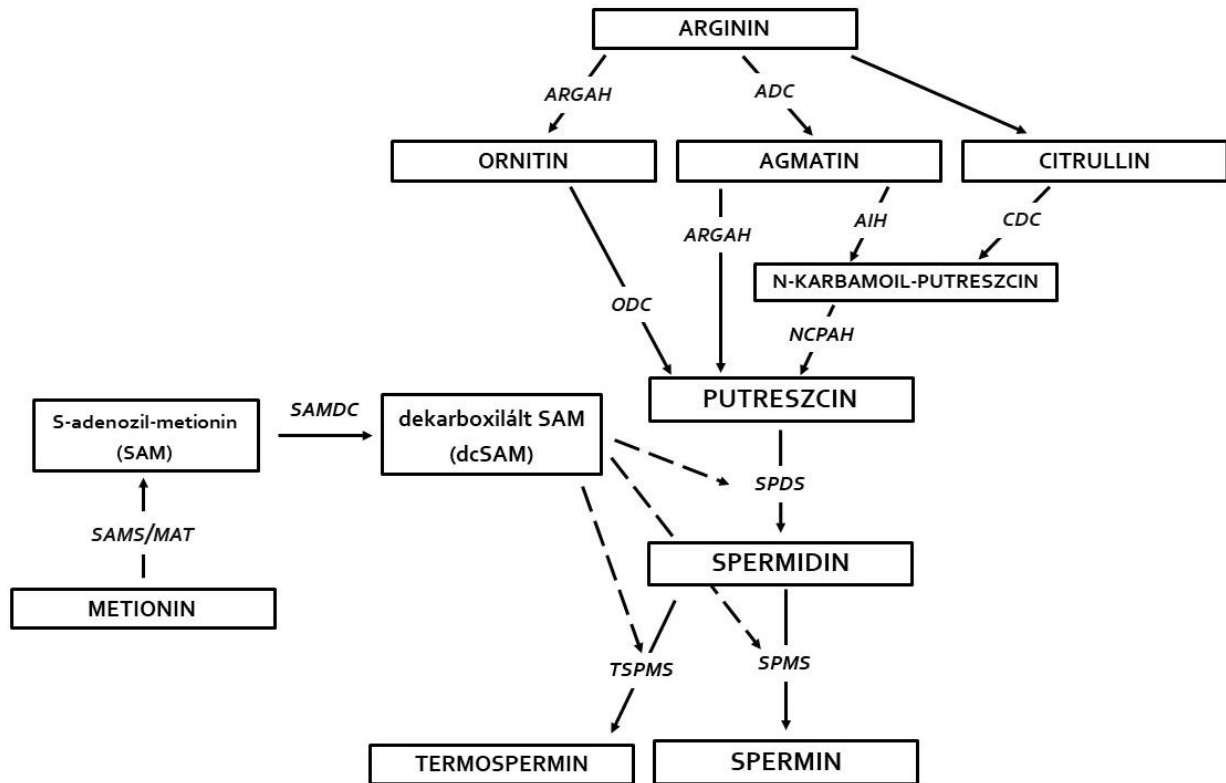
A putreszcín bioszintézise

A putreszcín bioszintézise jelen ismereteink szerint több útvonalon keresztül is megvalósulhat (**2. ábra**). Az „arginin” útvonalon, az argininből az arginin-dekarboxiláz enzim (ADC, EC 4.1.1.19) agmatint (AGM) szintetizál. A keletkezett AGM-t az agmatin-iminohidroláz enzim (AIH, EC 3.5.3.12) N-karbamoil-putreszcinné, majd azt az N-karbamoil-putreszcín-amidohidroláz enzim (NCPAH, EC 3.5.1.53) Put-né alakítja. Az „ornitin útvonalon” argininből az argináz (ARGAH, EC 3.5.3.1) enzim működése révén ornitin, majd abból az ornitin-dekarboxiláz (ODC, EC 4.1.1.17) enzim által Put keletkezik (Chen és mtsai., 2019). Lúdfüben és szójában kimutatták, hogy az argináz, vagy más néven arginin amidohidroláz nemcsak argináz, hanem agmatináz aktivitással is rendelkezik. Mivel ezek az enzimek erősen konzerváltak, feltételezhető, hogy minden növényi argináz enzim rendelkezik mindkét aktivitással. Argináz aktivitásuk révén képesek az arginint ornitinné és ureává alakítani, míg agmatináz aktivitásuk az arginin Put-né történő átalakítását katalizálja (Patel és mtsai., 2017; Pál és mtsai., 2021). A Put bioszintézis egy alternatív útvonala a citrullin útvonal. Ennek során az arginin citrullinná konvertálódik, majd a citrullin-dekarboxiláz (CDC) segítségével a citrullinból N-karbamoil-putreszcín majd Put keletkezik. A citrullin útvonalat csak szezámiban mutatták ki, így döntő fontosságúnak a növényekben az arginin és az ornitin útvonal tekinthető (Crocomo és mtsai., 1970; Samanta és mtsai., 2023).

A magasabb-rendű poliaminok bioszintézise

A diamin Put-hez egy aminopropil csoport kapcsolásával alakul ki a triamin Spd. A reakciót a spermidin-szintáz enzim (SPDS, EC 2.5.1.16) katalizálja. A triamin Spd-ből a spermin-szintáz enzim (SPMS, EC 2.5.1.22) alakítja ki a tetraamin Spm-t vagy a termospermin-szintáz (TSPMS; EC 2.5.1.79) a termospermint, egy újabb aminopropil csoportot kapcsolva a Spd N⁸- (aminobutil) és az N¹- (aminopropil) végre (**1. ábra**). A szükséges aminopropil csoportokat a

dekarboxilált S-adenozil-metionin (dcSAM) biztosítja, mely a SAM-dekarboxiláz enzim (SAMDC, EC 4.1.1.50) működése révén jön létre (Salvi és Tavloraki, 2020; Pál és mtsai., 2021) (2. ábra).



2. ábra: A poliaminok bioszintézisének sematikus ábrázolása

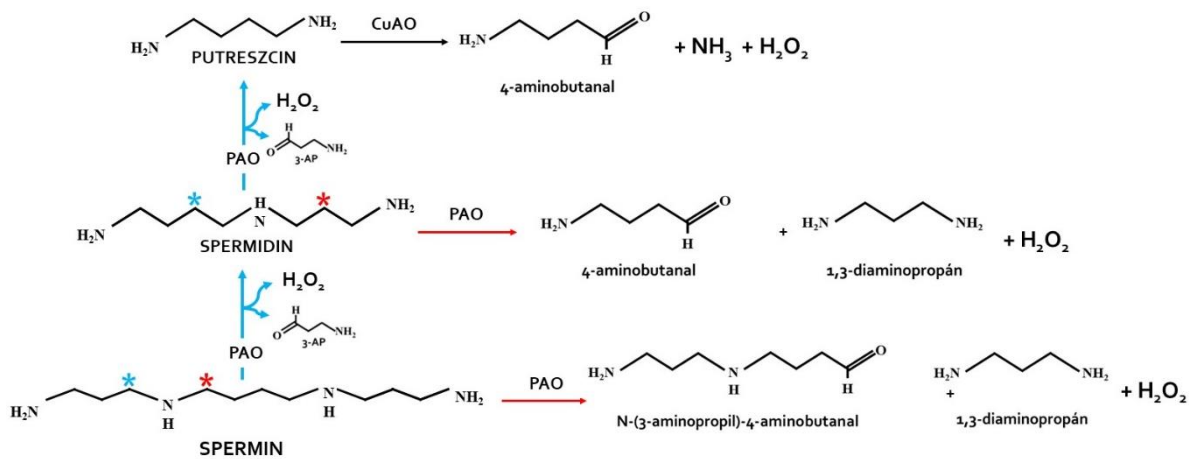
Használt rövidítések: ADC: arginin-dekarboxiláz; AIH: agmatin-iminohidroláz; ARGAH: argináz/ arginin amidohidroláz; CDC: citrullin-dekarboxiláz; SAM: S-adenozil-metionin, NCPAH: N-karbamoilputreszcin-amidohidroláz; ODC: ornitin-dekarboxiláz; SPDS: spermidin-szintáz; SPMS: spermin-szintáz, TSPMS: termospermin-szintáz; SAMDC: S-adenozil-metionin-dekarboxiláz; SAMS/MAT: S-adenozil-metionin-szintáz / metionin-adenoziltranszferáz

2.2.2.2 A poliaminok lebontása

A PA-ok lebontását amin-oxidázok végzik. Ezeknek az enzimeknek két csoportja különböztethető meg, a réztartalmú amin-oxidázok (copper-containing amine oxidases, CuAO-ok; EC 1.4.3.6) valamint a flavin- adenin-dinukleotidot (FAD) tartalmazó poliamin-oxidázok (PAO-ok; EC 1.5.3.11).

A CuAO-k főként a diaminok (Put, Cad) lebontásában vesznek részt. A legtöbb eddig jellemzett CuAO számára a Put a legjobb szubsztrát, azonban a Spd-t és Spm-t is képesek oxidálni (Moschou és mtsai., 2012; Planas-Portell és mtsai., 2013). Az enzim a Put-t a primer aminocsoportjánál oxidálja. A reakció termékeként 4-aminobutanal, valamint ammónia (NH_3) és hidrogén-peroxid (H_2O_2) keletkezik (Wang és mtsai., 2019) (**3. ábra**). A 4-aminobutanal spontán módon tovább alakulhat Δ^1 -pirrolinná, ami γ -amino-vajsavvá majd szukcináttá alakulva a Krebs-ciklusba léphet be (Chen és mtsai., 2019). A CuAO-k homodimerként működnek, az enzim kettő 70-90 kDA-os alegységből áll, mindkettő tartalmaz egy réz ionot és egy topakinon (2,4,5-trihidroxi fenilalanin kinon) kofaktort. Szubcelluláris lokalizációjukat tekintve két csoportra oszthatók. Lehetnek extracelluláris fehérjék, melyek egy N-terminális szignál peptidet, vagy peroxiszomális fehérjék, melyek C-terminális szignál peptidet hordoznak (Planas-Portell és mtsai., 2013).

Szubsztrát specifikitásukat tekintve a PAO-k erős affinitást mutatnak a Spd és Spm, valamint azok származékai iránt, a Put-t viszont nem bontják (Alcázar és mtsai., 2010). Funkcionálisan a PAO-k két csoportra oszthatók. Az első csoportba tartozók a PA-ok terminális katabolizmusát (terminal catabolism, TC) végzik. A reakció során oxidálják a Spd és a Spm N^4 pozíciójú nitrogénjének *endo* oldalán található szénatomját, melyhez elektron donorként molekuláris oxigént használnak. A reakció termékeként H_2O_2 , 1,3-diaminopropán (DAP) és Spd szubsztát esetén 4-aminobutanal, míg Spm esetén N-(3-aminopropil)-4-aminobutanal keletkezik (Moschou és mtsai., 2012; Liu és mtsai., 2014). A másik csoportba tartozó PAO-k, a PA-ok visszaalakítását (back-conversion, BC) végző enzimek. A Spd és Spm és vagy acetilált származékai N^4 pozíciójú nitrogénjének *exo* oldalán található szénatomot oxidálják és termékként a Spd-ből Put; Spm-ből Spd, továbbá 3-aminopropanal (3-AP) és H_2O_2 keletkezik (Moschou és mtsai., 2012) (**3. ábra**).



3. ábra: A putreszcín, spermidin, spermin lebontásának sematikus ábrázolása

Kusano és mtsai. (2015) alapján, módosítva; kék vonallal jelölt a BC (visszaalakítás) útvonala; piros vonallal jelölt a TC (végoxidáció, terminális katabolizmus) útvonala; piros és kék csillag a TC, valamint a BC reakció során oxidálódó szénatomot jelöl; Használt rövidítések: CuAO: réztartalmú amin-oxidáz; PAO: poliamin-oxidáz; H₂O₂: hidrogén peroxid; NH₃: ammónia; 3-AP: 3-aminopropanal

2.2.2.3.A poliaminok metabolizmusa *Arabidopsis thaliana*-ban és a résztvevő enzimek jellemzése

A putreszcín bioszintézise *Arabidopsis*ban

Az ODC-t kódoló gén hiányzik a *Brassicaceae* család számos tagjából, így *Arabidopsis thaliana*-ból is (Hanfrey és mtsai., 2001). Bár feltételezhető olyan gének jelenléte melyek az ODC génekkel kismértékű homológiát mutatnak (Tassoni és mtsai., 2003; Hao, 2005) és az ornitin nem enzimátikus dekarboxilációját is megfigyelték már *Arabidopsis*ban (Hanfrey és mtsai., 2001), a poliamin bioszintézis fő útvonalának lúdfüben az ADC útvonal tekinthető. A szintézis sebesség-meghatározó lépése az ADC által katalizált agmatin kialakulása (Urano és mtsai., 2005).

*Arabidopsis*ban az ADC enzimet két gén kódolja, az *AtADC1* és az *AtADC2*. A gének által kódolt fehérje szekvenciák aminosav szinten 80%-os homológiát mutatnak, azonban génexpressziós mintázatuk eltér (Alcázar és mtsai., 2005). Az *AtADC1* és *AtADC2* egymástól eltérő szövetspecifitással rendelkezik. Az *AtADC1* minden szövetben kifejeződik és expressziója konstitutív, az *AtADC2* viszont főleg levélben, becőtermésben expresszálódik, mindemellett kifejeződik a merisztémákban, szállító szöveti sejtekben és az oldalgyökér

iniciálisokban. Mindkét gén részt vesz a különféle abiotikus, illetve biotikus stresszre adott válaszfolyamatokban, szerepük átfedő, de nem minden esetben megegyező (Urano és mtsai., 2004; Alcázar és mtsai., 2010; Sánchez-Rangel és mtsai., 2016). Természes körülmények között Arabidopsisban a Put bioszintézis főként az *AtADC2* gén működése révén valósul meg, azonban sem ennek a génnek, sem pedig az *AtADC1* génnek a kiütése nem jár jelentős fenotípusos változással, viszont a magképződést és csírázást befolyásolja. Mindemellett, *AtADC2* hiányában csökken a Put és a Spd szint (Urano és mtsai., 2004, 2005) A két gén együttes csendesítése a fejlődés visszamaradását, kései virágzást, a magszám csökkenését okozza, kiütésük pedig az embrió letalítását eredményezi (Sánchez-Rangel és mtsai., 2016; Urano és mtsai., 2005). Az *AtADC1* és *AtADC2* is hordoz kloroplasztisz szignál peptidet, mindemellett a citoszolban is jelen vannak, ahol képesek *in planta* homo- és heterodimereket képezni. A dimer képzésnek a pontos szerepe nem ismert, feltételezik, hogy a partner enzim domén aktivitásának szabályozásában vehet részt (Maruri-López és Jiménez-Bremont, 2017). Az *AtADC1* dekarboxiláz aktivitása révén nemcsak az agmatin, hanem N-acetilputreszcinn kialakításában is szerepet játszik. Az *AtADC1* és az N-acetyltransferase activity 1 (*AtNATA1*) az endoplazmatikus retikulumban található, ahol a *NATA1* katalizálja, az N-acetilputreszcinn kialakulása mellett, az ornitinből történő N^δ-acetylornitin kialakulását is, amit az *AtADC1* N-acetilputreszcinné alakít (4. ábra). Az N-acetilputreszcinn szerepe pontosan nem ismert, azonban feltételezhetően részt vesz a patogének elleni védekezési reakciókban, prekursorként szolgálhat az N-acetilpermidin és az N-acetilpermin szintéziséhez vagy a PA lebontás egy terméke lehet, így szerepe lehet a poliaminok szintjének szabályozásában (Lou és mtsai., 2020; Pál és mtsai., 2021).

Arabidopsis-ban az *AIH*-t és az *NCPAH*-t 1-1 gén, az *AtAIH* és a *NITRILASE-LIKE PROTEIN 1* (*AtNLP1*) kódolja. Az *AtAIH*-nak 5, *AtNLP1*-nek 3 izoformája létezik. Az *AtNLP1* összes izoformája és négy *AtAIH* izoenzim csak az endoplazmatikus retikulumban (ER) fejeződik ki, egy *AtAIH* izoforma pedig az ER-ben és a kloroplasztiszban lokalizált. Ebből a Joshi és munkatársai (2022) arra következtettek, hogy Arabidopsis esetén a Put bioszintézise mintegy kizáródik a citoplazmából és az ER-ben, a kloroplasztiszban valamint a mitokondriumban valósul meg. Az *AtAIH* gén, az *EMBRYO DEFECTIVE* gének közé tartozik (*EMBRYO DEFECTIVE 1873*), azaz mutációja okozhat embrió fejlődési rendellenességeket (Meinke, 2020), amíg az *AtNLP1* génben homozigóta mutáns növények nem mutatnak fenotípust. Az agmatinból Put-t kialakító *ARGAH*-t kódoló gének, az *AtARGAH1* és *AtARHGAH2*, mutációja esetén a növény életképes, ami azt jelzi, hogy a Put bioszintézise

ezeknek az enzimeknek a hiányában is megvalósulhat és az egyik útvonal hiányát a másik, ha részlegesen is, de képes kompenzálni. Az *AtARGAH* gének expressziója alacsony arginin szintnél megemelkedik és az enzim inkább agmatinázként funkcionál. Az *AtAGAH2* az *AtADC2*-vel azonos kompartmentalizációt mutat és ko-expresszál. *adc* mutánsokkal végzett vizsgálatok alapján az *AtADC2*, *AtARGAH2* útvonal a Put bioszintézis fő útvonalának tekinthető bizonyos stresszválaszok esetén (Patel és mtsai., 2017).

A spermidin, spermin és termospermin bioszintézise Arabidopsisban

A Spm az SPDS, majd ebből Spm vagy T-Spm kialakulás a SPMS, vagy az *ACAULIS 5 (ACL5)* gén által kódolt TSPMS működése révén történik. A reakció a SAMDC által dekarboxilált SAM aminopropil csoportjának átvitelével valósul meg (**4. ábra**).

A magasabb-rendű poliaminok bioszintézisének kulcsenzime a legtöbb zárwatermő esetén multigén család által kódolt SAMDC. Az enzimek a génszekvenciáik alapján a sejtmagban vagy a citoszolban lokalizálódnak (Gonzalez és mtsai., 2021). Arabidopsis genomában öt SAMDC-t kódoló gén (*AtSAMDC1-5*) található. Ezek kódoló szekvenciájukban magas homológiát mutatnak. Mind az öt *AtSAMDC* gén promótere hordoz stressz-és hormonválasz elemeket (Majumdar és mtsai., 2017). Az *AtSAMDC1* és az *AtSAMDC3* a kifejlett növény minden szervében kifejeződik, bár az utóbbi gyengébben expresszálódik és nem található meg a becőben. Az *AtSAMDC2* magas expressziót mutat a gyökérben, a levélben és a virágban. Az *AtSAMDC4/BUSHY AND DWARF 2 (AtSAMDC4/BUD2)* szintén alacsony szinten, de konstitutívan expresszálódik. A promóter aktivitása alapján az *AtSAMDC5* génről képződik mRNS és fehérje, de a termék nem funkcionális (Majumdar és mtsai., 2017). Ismert, hogy az *AtSAMDC1* és *AtSAMDC2* kifejeződése, az 5' nem transzlálódó régióban lévő kettő, upstream elhelyezkedő nyitott leolvasási keret (uORF) által PA-függő módon a transzláció szintjén szigorú szabályozás alatt áll (Hanfrey és mtsai., 2005). Az *AtSAMDC3*, melyben csak egy, és az *AtSAMDC4/BUD2* és *AtSAMDC5*, melyekben nem található uORF, transzlációs szabályozása jelenleg nem ismert (Majumdar és mtsai., 2017; Gonzalez és mtsai., 2021). A SAMDC enzim aktivitása nem mutat korrelációt sem specifikus *AtSAMDC* gén expressziójával, sem pedig a Spd és Spm tartalommal szöveti szinten (Majumdar és mtsai., 2017).

Az Arabidopsis genomában a SPDS-t kettő, míg az SPMS-t (Fuell és mtsai., 2010) és a T-Spm bioszintéziséhez szükséges TSPMS-t egy-egy gén kódolja (Knott és mtsai., 2007; Fuell és mtsai., 2010). Lúdfüben az aminopropil transzferázok kettős, sejtmagi és citoszolikus lokalizációt mutatnak. A *AtSPDS1* és *AtSPDS2* megtalálható ugyan a citoszolban, de leginkább a sejtmagban van jelen. A SPMS lokalizációja az SPDS fehérjék jelenlététől függ. A

sejtmagban ezek dimereket alkotva működnek (Belda-Palazón és mtsai., 2012). Mindkét *SPDS* transzkriptum megtalálható minden növényi szervben. A két gén együttes kiütése embrió korban letális, az egyik *SPDS* elcsendesítése viszont nem jár jelentős fenotípusos változással, így köztük funkcionális redundancia feltételezhető. Azonban válaszuk eltérő külső hormonkezelésekre, például exogén CK kezelésre, mely során az *AtSPDS2* expressziójának szintje megnő, amíg az *AtSPDS1*-é nem változik. Mindez azt jelzi, hogy egyes sejtfolyamatokban vagy eltérő növekedési feltételek mellett egyedi szereppel is bírnak (Hanzawa és mtsai., 2002; Imai és mtsai., 2004a). A *SPMS* gén mutációja és ebből adódóan a Spm hiánya nem letális és fenotípusos változást sem okoz, azaz a Spm nem eszenciális az *Arabidopsis* növények életfolyamataihoz (Imai és mtsai., 2004b).

A termospermin a spermin strukturális izomerje. *Arabidopsis*-ban [a korábban sperminszintázként azonosított (Hanfrey és mtsai., 2005)] *AtACL5* gén által kódolt termosperminszintáz enzim katalizálja a kialakulását Spd-ből. Az *AtACL5* specifikusan a fejlődő xilém sejtekben expresszálódik (Muñiz és mtsai., 2008). A T-Spm-szint szigorú szabályozás alatt áll, mely során a T-Spm negatívan szabályozza az *AtACL5* és az *AtSAMDC4/BUD2* expresszióját (Hanzawa, 2000).

A poliaminok lebontása Arabidopsisban

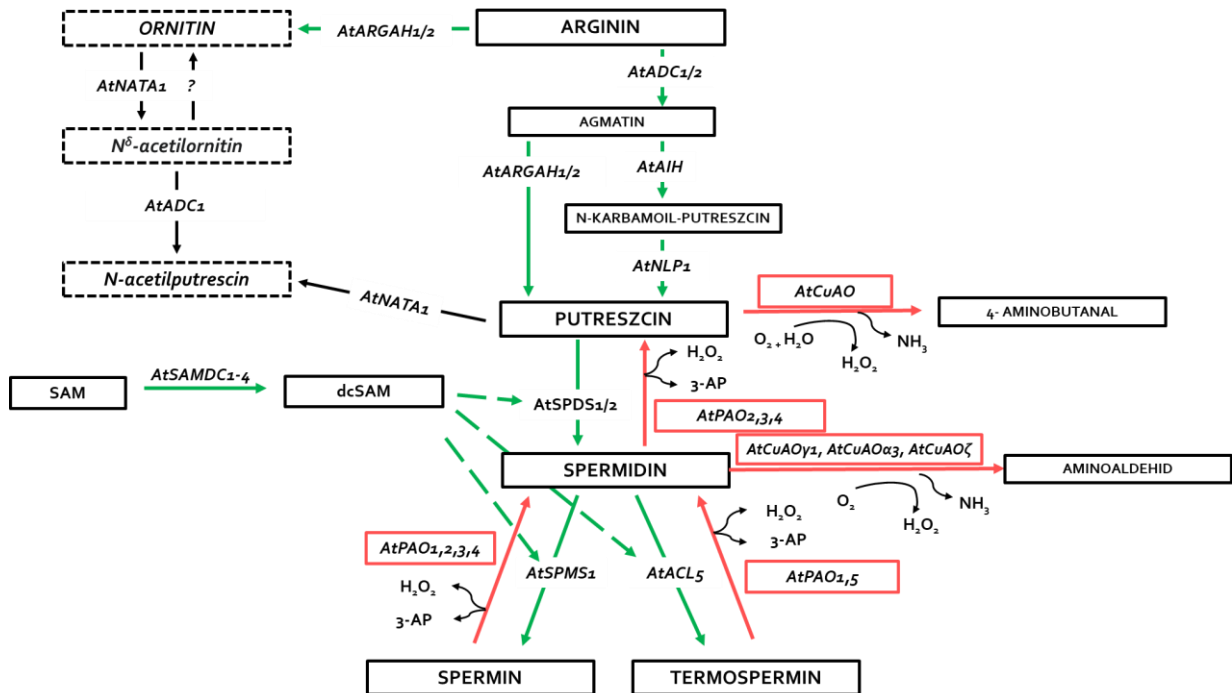
Arabidopsis thaliana genomjában 10 CuAO-t kódoló gént azonosítottak, melyek közül mindössze nyolc kódol funkcionális enzimet (Tavladoraki és mtsai., 2016). Az *AtCuAO β* , *AtCuAO γ 1* és feltételezhetően az *AtCuAO γ 2* az apoplastban, az *AtCuAO α 2*, *AtCuAO α 3* és az *AtCuAO ζ* a peroxiszómában található, az *AtCuAO δ* pedig vakuoláris elhelyezkedésű (Planas-Portell és mtsai., 2013; Alharbi és mtsai., 2020). Az izoenzimok eltérő szubsztrát specifitással és fiziológiai funkcióval rendelkeznek, az őket kódoló gének szöveti kifejeződése, valamint különböző stresszorok, hormonok, illetve PA-ok általi indukálhatóságuk eltérő (**lásd: 1. függelék táblázat: Az Arabidopsis CuAO-k főbb jellemzői**). Bár elsődlegesen a diamin Put és Cad lebontását végzik, *Arabidopsis*-ban három enzim, az *AtCuAO γ 1*, az *AtCuAO α 3* és az *AtCuAO ζ* képes a Spd, de nem a Spm, oxidációjára is (Planas-Portell és mtsai., 2013, Alharbi és mtsai., 2020) (**4. ábra**).

Arabidopsis-ban öt PAO izoenzimet kódoló gén (*AtPAO1-AtPAO5*) található. Az *AtPAO* géncsalád tagjai közül az *AtPAO1* és *AtPAO5* a citoplazmában, amíg az *AtPAO2*, *AtPAO3* és *AtPAO4* a peroxiszómában lokalizálódik (Takahashi és mtsai., 2010).

A lúdfű PAO-k szerv és szövetspecifikus kifejeződése eltérő (lásd: **2. függelék táblázat**: Az Arabidopsis PAO-k főbb jellemzői). Az *AtPAO1* erős expressziót mutat a gyökér tranzíciós zónájában és a portokban, így szerepet játszhat a gyökérfejlődésben és fertilitásban. A fejlődési folyamatokon túl, szerepe a különböző abiotikus és biotikus stresszválaszokban is jelentős (Fincato és mtsai., 2011). Az *AtPAO2* a hajtás és gyökér merisztematikus régiójában, a levélereken és a portokban fejeződik ki, ezáltal szerepet játszik a hajtás, a gyökér, a levél és a virág fejlődésben, utóbbin belül a pollencső növekedésében (Fincato és mtsai., 2011; Yu és mtsai., 2019), továbbá a csírázás és a csíranövény fejlődés korai szakaszának szabályozásában (Takahashi és mtsai., 2019). Az *AtPAO2*-höz hasonlóan az *AtPAO3* leginkább a virágban expresszálódik (Takahashi és mtsai., 2010). Az *AtPAO2*-től eltérően azonban az *AtPAO3* nem a késői, hanem inkább a korai fejlődési stádiumokban fejeződik ki (Takahashi és mtsai., 2010). Mindemellett az *AtPAO3* fontos szerepet játszik a különböző abiotikus stresszorokkal, úm. sóstresszel és hőstresszel szembeni védekezési válaszokban a ROF homeosztázis szabályozásán keresztül (Moschou és mtsai., 2008; Andronis és mtsai., 2014; Toumi és mtsai., 2019). Az *AtPAO4* főként a fiatal csíranövényben és az idősebb levelekben fejeződik ki, a szárban és a virágban kevésbé expresszálódik (Takahashi és mtsai., 2010). Az *AtPAO4* mutációja késlelteti a sötét-indukálta szenescenciát (Sequera-Mutiozabal és mtsai., 2016), továbbá hiányában szárazságstressz kapcsolt gének, valamint lignin és flavonoid bioszintézis gének expressziója fokozódik (Kamada-Nobusada és mtsai., 2008). Az *AtPAO5* kifejeződése időben és térben is szabályozott. Leginkább a hajtás és gyökér szállítószöveiben, valamint a virágban fejeződik ki (Takahashi és mtsai., 2010; Yu és mtsai., 2019). Fontos szerepet játszik a különböző stresszválaszokban, úm. a sótolerancia kialakításában (Zarza és mtsai., 2017), de leginkább a növények növekedésének és fejlődésének szabályozásában vesz részt, úm. a xilém differenciáció, illetve az indirekt hajtásmerisztéma képződése (Lim és mtsai., 2006; Alabdallah és mtsai., 2017).

A PAO-k nemcsak a poliaminok lebontását, hanem azok visszaalakítását is katalizálják (**4. ábra**), az egyes PAO-k szubsztrát specifikusa azonban eltérő. A legtöbb PAO több szubsztrátot is képes felismerni (lásd: **2. függelék táblázat**: Az Arabidopsis PAO-k főbb jellemzői), azonban azokat eltérő hatékonysággal tudják oxidálni. Az *AtPAO2* és *AtPAO3* a Spm Put-né történő visszaalakítását végzi Spd-en keresztül, azaz a Spd és a Spm is szubsztrátja, míg az *AtPAO4* a Spm-t részesíti előnyben. Az *AtPAO1* és az *AtPAO5* képes oxidálni a Spm-t, a Nor-Spm-t és a T-Spm-t is és mindkettőnek az utóbbi felé nagyobb a katalitikus aktivitása (Takahashi és mtsai., 2010). Az *AtPAO1* enzimmel szemben az *AtPAO5*-nek azonban oxidáz

helyett, inkább dehidrogenáz aktivitása van, így ez az enzim elsősorban nem a H₂O₂ produkción, hanem inkább a PA (T-Spm-Spd) szint szabályozásán keresztül fejt ki a hatását a növények növekedési és fejlődési folyamataiban (Sequera-Mutiozabal és mtsai., 2016; Alabdallah és mtsai., 2017; Benkő és mtsai., 2022).



4. ábra: A poliaminok metabolizmusa Arabidopsisban

A zöld nyilak a bioszintézis, míg a piros nyilak a lebontás, valamint a visszaalakítás útvonalaait jelölik, piros keretben az ezekben részt vevő enzimeket kódoló gének nevei. Használt rövidítések: At: Arabidopsis thaliana, AtNATA1: N-acetyltransferase activity 1; AtADC: arginin-dekarboxiláz; AtAIH: agmatin-iminohidroláz; AtNLP1: N-karbamoilputreszcín-amidohidroláz; AtARGAH: arginin-amidohidroláz; SAM: S-adenozil-metionin; AtSAMDC: SAM-dekarboxiláz; dcSAM: dekarboxilált SAM; AtSPDS: spermidin-szintáz; AtSPMS: spermin-szintáz; AtACL5: acaulis 5 (termospermin-szintáz); AtPAO: poliamin-oxidáz; AtCuAO: réztartalmú amin-oxidáz

2.2.3 A poliaminok metabolizmusának szerepe a növényi regenerációs folyamatokban

Bár a poliaminok szabályozó szerepét közvetett organogenezis során már sok tanulmányban vizsgálták, a hajtásmerisztémák közvetlen kialakulásának folyamatában még kevésbé tanulmányozták. Direkt organogenezis során az ADC és SAMDC gének kismértékű expresszió fokozódását írták le lúdfüben (Rosspopoff és mtsai., 2017). Indirekt organogenezis

során már nagyobb irodalom áll rendelkezésünkre. A poliaminok részvételét az indirekt organogenezis során a hajtás-, illetve a gyökérbésképződésben leírták már többek között kurkumában, csuporkában, cédrusban, tormában és lúdfűben is (Curtis és mtsai., 2004; Hu és mtsai., 2006; Baron és Stasolla, 2008; Viu és mtsai., 2009; Park és mtsai., 2012; Aragão és mtsai., 2016;). Lúdfűben az *AtADC* mutációja gyökérbésképződési rendellenességet és kisebb mértékű virágzást eredményezett (Baron és Stasolla, 2008). Ugyanakkor *SAMDC* túltermelő növényekben fokozott, amíg alultermelő növényekben csökkent hajtásmerisztéma képződés volt megfigyelhető (Hu és mtsai., 2006). A poliaminok lebontása, illetve az azt katalizáló enzimek szintén hatással lehetnek a kallusz, a gyökér, illetve a hajtás kialakulására indirekt organogenezis alatt. Gyapotban (*Gossypium hirsutum*, Gh) a *GhPAO1* és *GhPAO4* gének transzkript szintjének emelkedése fokozott H₂O₂ produkcióval járt az embriogén kallusz képződése során (Cheng és mtsai., 2015). Ugyanakkor lúdfűben indirekt organogenezis alatt a *PAO5* túltermelő növényekben csökkent a Spd szintje és a regeneráció hatékonysága (Lim és mtsai., 2006).

2.2.4 A poliaminok és a növényi hormonok kölcsönhatása

A PA-k szinergista és antagonisták módon is kölcsönhatnak a növényi hormonokkal, ezáltal befolyásolva a növények növekedési és fejlődési válaszait, valamint a különböző stresszválaszokat (Asija és mtsai., 2022; Tyagi és mtsai., 2022; Napieraj és mtsai., 2023).

Bár a poliaminok kölcsönhatását egyéb hormonokkal már számos folyamatban leírták, molekuláris szinten ezeket a kölcsönhatásokat ezideáig még nem tanulmányozták (Tyagi és mtsai., 2022).

A PA-k egyéb hormonokkal való interakcióit leginkább poliamin metabolizmusban módosított transzgenikus növények [35S::*AtSPMS-9*, 35S::*AtADC2*, 35S::*AtSAMDC1*, és *spms-2*, (*bushy and dwarf 2*) *bud2/samdc4*] segítségével, azok transzkriptomikai elemzéseivel vizsgálták. A 35S::*AtSPMS-9*, valamint a 35S::*AtSAMDC1* növényekben a Spm szint nő, amíg az *spms-2*, T-DNS inszerciós mutánsban csökken a vad típushoz képest, azonban a Put és Spd szint változatlan marad. Az *ADC2* túltermelő növényekben (35S::*AtADC2*) a Put szint emelkedése figyelhető meg, a Spd és Spm szint jelentős változása nélkül. A *SAMDC* nélkülözhetetlen a növények fejlődéséhez és morfogeneziséhez. *samdc1 bud2/samdc4* dupla mutáns esetében az embrió életképtelen, míg a *bud2/samdc4* szimpla mutáns bokros törpe fenotípust ad. A *bud2/samdc4* mutánsban a Put szint növekedése mellett a Spd és Spm szint

csökken. (Alcázar és mtsai., 2005; Ge és mtsai., 2006; Gonzalez és mtsai., 2011; Marco és mtsai., 2011; Anwar és mtsai., 2015). Mindemellett a *samdc4/bud2* mutáns hiposzenzitív auxinra és hiperszenzitív citokininre, ami alapján arra lehet következtetni, hogy a poliaminok hatással lehetnek az auxin és citokinin szintekre is (Cui és mtsai., 2010).

2.2.4.1 A poliaminok és az auxin kölcsönhatása

Az auxinok fontos szerepet játszanak a növények növekedési és fejlődési folyamataiban. Koncentrációjuk és eloszlásuk a szövetekben több szinten szabályozott, ezek a bioszintézis, a konjugáció, a módosítás, a transzport és a lebontás.

Az auxin hatással lehet a belső PA szintekre, a *SAMDC*, *PAO* és az *ACL5* gének expressziójának szabályozása révén (Cui és mtsai., 2010), de maguk a poliaminok is kölcsönhatnak az auxinnal (Hausman és mtsai., 1995). A kapcsolatukról rendelkezésre álló információkat az **5. ábra** foglalja össze. Kölcsönhatásuk tisztázásához PA metabolizmusban módosított transzgenikus növényeket használtak. Megfigyelték, hogy az *SPMS* túlműködése az indolpiroszólósavból indol-3-ecetsav (IES) bioszintézisét végző *YUCCA* (*YUC*) gének expressziós mintázatának változását okozta: a *YUC1* és a *YUC10* expresszióját csökkentette, a *YUC5* és a *YUC8* expresszióját viszont növelte (Gonzalez és mtsai., 2011).

A poliaminok feltehetően hatással vannak az auxin transzportjára is, azonban ez még nem bizonyított. *35S::AtSAMDC1* és az *35S::AtSPMS-9* túltermelő növényekben a *P-glycoprotein 10*, a *PIN5* auxin efflux és a *LIKE AUX1 3* auxin influx karrier, míg *spms-2* mutánsokban a Spm szintjének csökkenése következtében a *PIN1*, *PIN7* és *ATP-binding cassette B4 (ABCB4)* efflux karrierek kifejeződése csökkent. Ugyanakkor az *ADC2* túlműködése az *ABCB4* expressziójának növekedését eredményezte. Mindemellett a *SPMS* emelkedett expressziója (*35S::AtSPMPS-9*) miatti Spm szint növekedés az *ACL5* gén expresszióját növelte (Gonzalez és mtsai., 2011; Anwar és mtsai., 2015). A T-Spm gátolja a xilem differenciálódását, ugyanakkor elősegíti a szár megnyúlását (Takehi és mtsai., 2010; Takano és mtsai., 2012; Alabdallah és mtsai., 2017; Miyamoto és mtsai., 2019). Mindemellett, a T-Spm gátolja az auxin szintézisben, transzportban, illetve jelátvitelben szerepet játszó géneknek az expresszióját (Yoshimoto és mtsai., 2016).

A *35S::AtSPMS-9* levelekben megnövekedett Spd szint a korai auxin válasz Small auxin-up RNA (SAUR) géncsalád számos tagjának expresszióját csökkentette (Gonzalez és mtsai., 2011). A Put aminosavakkal való konjugációját a GH3 enzim család tagjai közül GH3.4, GH3.6, GH3.17 míg a Spm aminosavakkal való konjugációját a GH3.3, GH3.5 és az IES metilációját végző *INDOL-3-ACETIC ACID CARBOXYLMETHYLTRANSFERASE 1 (IAMT1)*

9-vonalakban a CK-ek inaktivációját végző *CITOKININ OXIDÁZ 1 (CKX1)* és *CKX6*, míg 35S::AtSAMDC1-vonalakban a *CKX1* kifejeződését emelte meg (Alcázar és mtsai., 2005; Gonzalez és mtsai., 2011) (6. ábra). Az *ADC2* túlműködése a *CKX* transzkripcióra nem volt hatással.

Ez alapján feltételezhető, hogy a poliaminok a CK homeosztázisban, azon belül is leginkább a lebontás szabályozásában játszanak szerepet (Alcázar és mtsai., 2005; Anwar és mtsai., 2015). Ugyanakkor a citokininek növelik az ADC és a PAO aktivitását, ami által pedig növelik a Put és csökkentik a Spd, illetve a Spm akkumulációját. A megnövekedett Put szint feltehetően nem befolyásolja a CK bioszintézist és jelátvitelt. A Spd és a Spm is fokozza a CK-ek lebontását, viszont a Spd gátolja, míg a Spm fokozza a CK jelátvitelben résztvevő gének kifejeződését. (Anwar és mtsai., 2015) (6. ábra).

35S::AtSPMPS-9 Arabidopsis levelekben csökkent a *CYTOKININ RESPONSE FACTOR 8 (CRF8)*, míg nőtt az B-típusú (pozitív) CK válaszregulátorok, *B-ARR1* és az A-típusú (negatív) CK válaszregulátorok, *ARR3*, *ARR5* és *ARR7* expressziója. Külső Spm kezelés szintén növelte az *ARR5* expresszióját (Gonzalez és mtsai., 2011; Anwar és mtsai., 2015). A *bud2/samdc4* mutáns hiperszenzitív CK-re, a megváltozott auxin bioszintézis mellett a mutáció az A-ARR-ek kifejeződését is befolyásolja (*ARR5*, *ARR6* és *ARR15*) (Cui és mtsai., 2010) (6. ábra).

A poliaminok szintézisén túl azok visszaalakítása is hatással lehet a citokinin szintekre, ezáltal befolyásolva a növények növekedési és fejlődési folyamatait. Az AtPAO5 a T-Spm/Spd homeosztázis szabályozásán keresztül befolyásolja az auxin-citokinin jelátvitelt és ezen keresztül szabályozza a xilem differenciációját (Kim és mtsai., 2014; Alabdallah és mtsai., 2017).

szerepét a neurotranszmisszió, a különböző immunológiai és gyulladási folyamatok, valamint a vérnyomás szabályozásában (Bredt és Snyder, 1992; Kolbert és mtsai., 2019). A Science folyóirat a NO-t az év molekulájának nevezte 1992-ben és felfedezéséért, valamint érrendszerben betöltött szerepének tisztázásáért orvosi Nobel díjat adományoztak 1998-ban (Howlett, 1998). Növényekben kezdetben úgy gondolták, hogy a NO, mint külső légszennyező van hatással. Azt, hogy a növények is képesek az előállítására közel 45 évvel ezelőtt Klepper írta le elsőként (Klepper, 1974, 1979), azóta pedig növényekben is megindult a molekula szerepének, szintézisének intenzív tanulmányozása a különböző növekedési, fejlődési és stresszfolyamatok során.

A NO színtelen, gáz halmazállapotú, kétatomos szabadgyök, mely kis koncentrációban fontos szerepet tölt be a jelátviteli folyamatokban, nagy koncentrációban azonban sejtkárosító hatású. Kisméretű, így könnyen átjut a plazmamembránokon. Az átlagos féléletideje rövid, mindössze 2-30 s (Habib és Ali, 2011), viszont kis koncentrációban ez jelentősen megnövekedhet (Stohr, 2002).

A NO növényekben betöltött szerepét, forrásait, funkcióit, molekuláris mechanizmusait, jelátviteli útvonalait és hatásait az elmúlt évtizedekben széles körben tanulmányozták (Delledonne és mtsai., 1998; Wendehenne és mtsai., 2004; Yu és mtsai., 2014; Sanz és mtsai., 2015; Astier és mtsai., 2018; Kolbert és mtsai., 2019).

Kimutatták, hogy fontos szerepet játszik számos fiziológiai folyamatban, hatással van a növények növekedésére és fejlődésére, jelátviteli molekulaként befolyásolja számos hormon, így többek között az auxinok és a citokininek szerepét, fontos szerepet játszik a növényi immunválaszokban, valamint a különböző abiotikus és biotikus stresszválaszokban (Delledonne és mtsai., 1998; Pagnussat és mtsai., 2002; Ötvös és mtsai., 2005; Corpas és mtsai., 2006; Neill és mtsai., 2008; Qiao és Fan, 2008; Liu és mtsai., 2013; Hasanuzzaman és mtsai., 2018).

2.3.1 A nitrogén-monoxid metabolizmusa

Állatokban a nitrogén-monoxid-szintáz (NOS) enzim katalizálja az L-arginin kétlépéses oxidációját L-citrulinná, majd nitrogén oxiddá (Forstermann és Sessa, 2012). Növényekben keletkezése összetettebb folyamat, erre vonatkozóan több útvonalat is leírtak. Növényekben NO keletkezhet redukzív és oxidatív úton. A redukzív útvonalon a NO a nitrítből keletkezik a nitrát redukáz (NR) enzim nitrit aktivitása (Ni-NR aktivitás) által. A NR fő feladata a nitrát átalakítása nitritté, azonban NADH jelenlétében képes a nitritet is átalakítani nitrogén-

monoxiddá. Az össz enzim aktivitásának ez mindössze 1%-a, de indukálható pl. savas pH-n (Meyer és mtsai., 2005; Rockel és mtsai., 2002). Lúdfű genomban 2 NR izoenzimet kódoló gént azonosítottak: a *NITRATE REDUCTASE 1 (AtNIA1)* és a *NITRATE REDUCTASE 2 (AtNIA2)*. Az enzim NO szintézisben betöltött szerepét szimpla *nia1*, *nia2* és *nia1/nia2* dupla mutáns lúdfű növényekkel végzett kísérletekkel igazolták (Desikan és mtsai., 2002).

A nitrit redukálódhat nitrogén-monoxiddá a mitokondriális elektrontranszportlánc közreműködésével is (Gupta és mtsai., 2011a). Ha magas a nitrit koncentráció és alacsony a pH, akkor a redukció megtörténhet nem enzimátikus folyamatok, pl. a karotinoidok közreműködésének az eredményeképpen is (Bethke és mtsai., 2004; Crawford, 2006). A xantin dehidrogenáz szintén redukálhatja a nitritet NO-dá. A folyamat a peroxiszómában történik, NADH vagy xantin jelenlétében, anaerob körülmények mellett (Harrison, 2004). Mindezek mellett a hidroxil-amin, illetve a szalicil-hidroxiámát is lehet kiindulási vegyülete a NO redukzív úton történő keletkezésének (Hasanuzzaman és mtsai., 2018).

A NO oxidatív úton többek között az L-arginin függő útvonalon keletkezhet. Ez az útvonal NADPH-t használ, viszont az enzimet és a mechanizmust, ami ezt az útvonalat szabályozza, még nem sikerült teljes mértékben azonosítani (Hasanuzzaman és mtsai., 2018). A Spd és a Spm növényekben szintén okozhat NO képződést, bár ennek pontos mechanizmusa nem ismert, a hatás gyors megjelenése alapján közvetlen kapcsolat feltételezhető közöttük (Gupta és mtsai., 2011a). Nemcsak a poliaminok, hanem azok lebontása a különböző aminosavak által is hozzájárulhat közvetlenül vagy közvetve a NO keletkezéséhez, de a mechanizmus, ami által ez történik, még szintén nem tisztázott (Tun és mtsai., 2006; Procházková és mtsai., 2014; Wimalasekera és mtsai., 2011; Benkő és mtsai., 2020).

Mint minden jelmolekulánál, így a NO-nál is fontos, hogy szintje szabályozott legyen, azaz, ha magas a koncentrációja, aktiválódjanak azok a folyamatok, amelyek a lebontását lehetővé teszik. Ezek a folyamatok magukba foglalják a NO oxigénnel történő reakcióját, melynek eredményeképpen nitrit és nitrát keletkezik. A reaktív oxigénformák szintén csökkenthetik a NO mennyiségét, ilyen pl. a szuperoxid gyökkanion, melynek NO-dal való reakciója peroxinitritet eredményez (Alamillo és García-Olmedo, 2001).

Ennél jóval szelektívebb enzimátikus szabályozást tesz lehetővé a S-nitrozoglutation-reduktáz (GSNOR) (Malik és mtsai., 2011). A NO és a redukált glutation (GSH) reakciója által S-nitrozoglutation (GSNO) keletkezik, ami a növényi sejtek mobilis NO raktára. A GSNO-t az GSNOR NADPH jelenlétében oxidált glutationná (GSSG) és ammóniává alakítja, ezáltal

csökkentve a GSNO és így a raktározott NO szintjét (Corpas és Barroso, 2013). Az enzimet lúdfűben egy gén, az *AtGSNOR1* kódolja (Xu és mtsai., 2013).

Mindemellett a NO képes reakcióba lépni a növényekben található nem szimbiotikus hemoglobinokkal is, mely reakció során nitrát keletkezik (Hebelstrup és mtsai., 2013). Az irodalom alapján ez a reakció főleg anoxia és hipoxia során játszik fontos szerepet (Dordas és mtsai., 2003; Hebelstrup és mtsai., 2013). A növényi hemoglobint 20 évvel ezelőtt fedezték fel. Fontos szerepet játszanak az oxigén szállításában és a NO kioltásában. 3 osztályuk különíthető el. Az első és a második osztályba tartozó hemoglobintok struktúrája hasonló az állati mioglobinokhoz, illetve az emberi globinokhoz, amíg a harmadik osztályba tartozó hemoglobintok a prokarióták globinjához mutatnak nagyobb hasonlóságot. Mindemellett az első és második osztályba tartozó hemoglobintok erősen, amíg a harmadik osztályba tartozók gyengén kötik az oxigént (Wang és mtsai., 2011). Számos tanulmány mutatja, hogy az egyes hemoglobintok szintjében bekövetkező változások jelentősen befolyásolják a növények fejlődési és morfogén folyamatait (Kolbert és mtsai., 2019; Mira és mtsai., 2015). Az *Arabidopsis* genom három hemoglobin gént tartalmaz [*HEMOGLOBIN 1 (GLB1)*, *GLB2* és *GLB3*]. Az általuk kódolt fehérjék eltérő osztályokba tartoznak és különböző feladatokkal rendelkeznek (Gupta és mtsai., 2011b). Mind a *GLB1*, mind a *GLB2* képes csökkenteni az endogén NO szintjét, a *GLB1*-nek azonban nagyobb affinitása van NO iránt, ezért erősebb kioltónak számít (Wang és mtsai., 2011).

2.3.2 A NO szerepe a fejlődési és regenerációs folyamatokban

A NO szerepét a növények növekedési és fejlődési folyamataiban már széles körben tanulmányozták. Növekedésre kifejtett hatását elsőként kicsit több mint 30 évvel ezelőtt írták le. Az öregedés során alacsony koncentrációban csökkenti az etilén mennyiségét, ezáltal lassítva a folyamatot (Leshem és Haramaty, 1996). Ennek a megfigyelésnek gazdasági jelentősége is van, hiszen lehetővé teszi a növények betakarítás utáni kezelése által az öregedés késleltetését (Kolbert és mtsai., 2019). A NO növekedésre gyakorolt hatását kimutatták többek között a gyökér megnyúlása, illetve a hipokotil növekedése során is (Gouvêa és mtsai., 1997, Beligni és Lamattina, 2000).

A fejlődési folyamatokon belül szerepet játszik a fotomorfogenezis, a virágképződés, a magnyugalom, a gravitropizmus, illetve a xilém differenciáció szabályozásában is (Lamattina és mtsai., 2003; He és mtsai., 2004; Gabaldón és mtsai., 2005; Hu és mtsai., 2005; Bethke és mtsai., 2006). A regenerációs folyamatokon belül szerepét leírták az embriogenezis és az

indirekt organogenezis szabályozásában is (Pagnussat és mtsai., 2002; Correa-Aragunde és mtsai., 2004; Ötvös és mtsai., 2005). A gyökérfejlődést több ponton is szabályozza, részt vesz az oldalgyökerek, a járulékos gyökerek és a gyökérszőrök kialakulásában is (Del Castello és mtsai., 2019). A gyökérfejlődés, illetve a hajtásregeneráció során az auxin jelátvitelen keresztül befolyásolja a sejtosztódási folyamatokat (Pagnussat és mtsai., 2002; Correa-Aragunde és mtsai., 2004; Shen és mtsai., 2013). Hatása azonban ezekben a folyamatokban is koncentrációfüggő. Auxinnal együtt alkalmazva, megfelelő koncentrációban a NO a sejtosztódások indukálásával pozitív hatással lehet az embriogén sejtek képződésére (Ötvös és mtsai., 2005). Magas koncentrációban azonban a NO csökkenti az auxin transzportot és az auxin választ, amin keresztül negatívan befolyásolja a merisztéma sejtek osztódását és ezáltal a merisztéma méretét és fenntartását (Fernández-Marcos és mtsai., 2011).

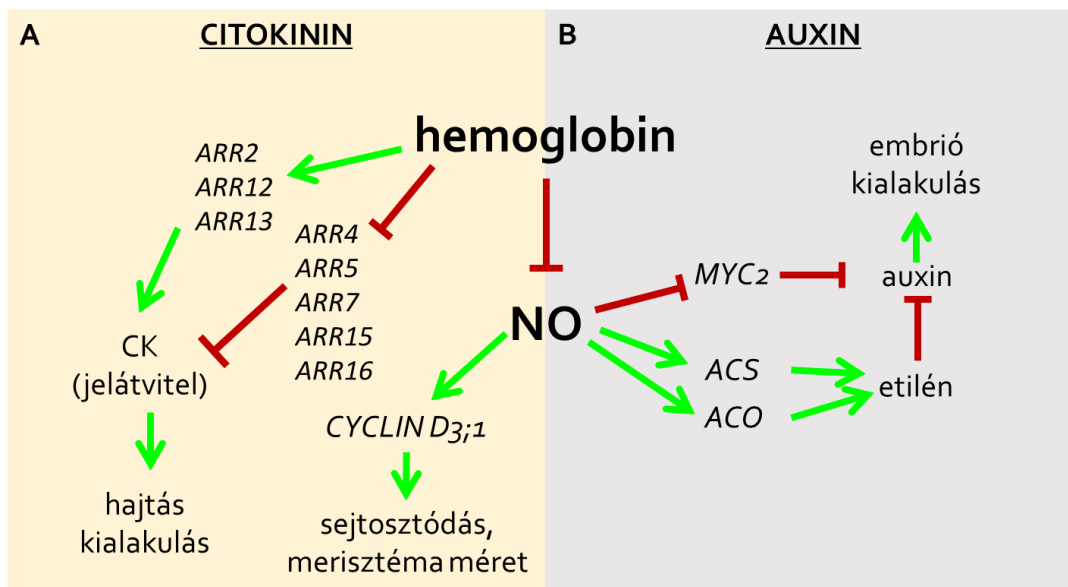
A NO nemcsak az auxin, de a citokinin jelátvitelben is rész vehet. Utánozhatja a citokininnek hatását, ugyanakkor a NO szintézis gátlása gátolhatja a CK hatását (Romanov és mtsai., 2008). Mindemellett a citokininnek is hatással lehetnek a NO keletkezésére. Kimutatták, hogy a NO a kalluszképzésben és a hajtásmerisztéma fenntartásában a CK jelátvitel útvonal részeként az *Arabidopsis CYCLIN D3;1* indukálásán keresztül szabályozza a sejtosztódási folyamatokat (Shen és mtsai., 2013).

Auxin, illetve CK jelátvitelre kifejtett hatását alátámasztja, hogy a külső NO befolyásolhat CK és auxin-függő folyamatokat is. A CK függő hajtásregenerációt befolyásoló hatását leírták már többek között vaníliában (Tan és mtsai., 2013) és taticában (Zafarghandi és Rahmati-Joneidabad, 2020), míg azt, hogy hatással van az auxin-függő gyökérregenerációra, kigyóuborkában és paradicsomban (Pagnussat és mtsai., 2002; Correa-Aragunde és mtsai., 2004).

A hemoglobinok szintén fontos szerepet játszanak a növények növekedési és fejlődési folyamataiban. *In vitro* embriogenezis alatt fontos szerepet játszanak a sejsors meghatározásában. A NO szintek módosításával befolyásolhatják az auxin jelátvitelt és így az embriogenezist (Mira és mtsai., 2015 és referenciák ezen belül). Lúdfüben a *GLB2* elnyomása miatti NO emelkedés serkenti az auxin termelést a *MYC2* transzkripciós faktor, az auxin bioszintézis gátlójának leszabályozása révén. Az auxin szint mellett a *MYC2* számos más növekedésszabályozó, köztük a jázmonsav, a szalicilsav, a gibberellinsav és az abszcizinsav jelátvitelében is részt vesz. Szomatikus embriogenezis alatt a jázmonsav *GLB2/NO* függő módon gátolja a *MYC2*-t, mely auxin felhalmozódáshoz vezet, ami kedvez az embrió képződésnek (Elhiti és mtsai., 2013; Huang és mtsai., 2014; Mira és mtsai., 2016). Lúdfüben

külső NO kezelés hatására vagy *glb1* mutánsban a megnövekedett NO szint fokozza az etilén bioszintézis gének, az *1-AMINOCIKLOPROPÁN-1-KARBONSAV (ACC) SZINTÁZ (ACS)* és *ACC OXIDÁZ (ACO)* expresszióját, a megnövekedett etilén szint pedig gátolja az auxin bioszintézist és ezen keresztül az embrió keletkezést. Ugyanakkor az etilén szintézis gátlása számos auxin bioszintézis gén expresszióját növeli, ami kedvez az auxin felhalmozódásnak az explantum azon oldalán, ahol embriók keletkeznek. Összegezve, *glb1* mutánsban a magas NO szint növeli az etilén szintet, ami gátolja az auxin keletkezését és ily módon az embrió képződést lúdfűben (Mira és mtsai., 2015) (7. ábra).

A hemoglobinok a CK érzékenység befolyásolásával hatással lehetnek az indirekt hajtásregenerációra. Lúdfűben mind az *AtGLB1* (35S::GLB1), mind pedig az *AtGLB2* (35S::GLB2) gén túltermelése növeli a CK érzékenységet a *B-ARR* válaszregulátor gének expressziójának (*ARR2*, *ARR12* és *ARR13*) növelésén és az *A-ARR*-ek (*ARR4*, *ARR5*, *ARR7*, *ARR15* és *ARR16*) kifejeződésének gátlásán keresztül, ami több hajtás kialakulását eredményezi *in vitro* indirekt hajtásképződés során (7. ábra). Érdekes módon a két gén elcsendesítése során csak az *AtGLB2* elcsendesítése csökkenti a kialakult hajtásmerisztémák számát. Az *AtGLB1* elcsendesítése a kontrollhoz hasonló számú hajtás megjelenését eredményezi (Wang és mtsai., 2011).



7. ábra A NO és a hemoglobinok kapcsolata az auxinnal és a citokininnel

Az ábrán a zöld nyilak indukciót/aktivációt, a piros jelek gátlást jelentenek. A) A NO és a hemoglobinok kapcsolata a citokininnel, B) A NO és a hemoglobinok kapcsolata az auxinnal
 Használt rövidítések: ARR: válaszregulátor; CK: citokinin; ACO: ACC oxidáz; ACS: ACC szintáz; Wang és mtsai., 2011; Shen és mtsai., 2013; Elhiti és mtsai., 2013; Huang és mtsai., 2014; Mira és mtsai., 2015; Mira és mtsai., 2016 alapján; Bővebb magyarázat a szövegben.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Miután a poliaminok, a poliamin oxidáz, a nitrogén-monoxid és a hemoglobinok is hatással lehetnek a citokinin érzékenységre, munkám során ezek hatását vizsgáltam egy erősen citokinin-függő folyamat, az oldalgökér primordiumok hajtásmerisztémává történő direkt átalakulása során *Arabidopsis thaliana* növényben.

Kutatásaim során az alábbi kérdésekre kerestem a választ:

- Van-e szerepe a PA-oknak a CK-indukált hajtásmerisztéma kialakulásban?
- Változik-e a PA-k szintézisében és lebontásában szerepet játszó gének expressziója a OGYP-HM konverzió során?
- Amennyiben a PA-k lebontása hatással van a hajtásmerisztémák kialakulására, akkor az miként valósul meg?
- Van-e szerepe a hemoglobinoknak vagy a nitrogén-monoxidnak a CK-indukált hajtásmerisztéma képződés folyamatában? Kapcsolódik-e ez a hatás a poliaminokhoz?

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 A kísérleti növény bemutatása, *in vitro* szövettenyésztés

4.1.1 A kísérleti növény és növényi vonalak

Kísérleteinkhez *Arabidopsis thaliana* (L.) vad típusú (Columbia ökotípus, Col-0), továbbá *AtPAO2* (35S::PAO2) és *AtPAO5* (35S::PAO5) transzgenikus vonalakat és *pao5-2* T-DNS inszerciós mutánst (SALK_053110, Alonso et al., 2003) használtunk (Ahou és mtsai., 2014; Alabdallah és mtsai., 2017; Fincato és mtsai., 2011; Kim és mtsai., 2014).

4.1.2. A növények előkészítése, nevelése, az *in vitro* gyökér alapú regenerációs rendszer bemutatása

Első lépésként a magokat 70%-os etanol és 4%-os nátrium-hipoklorit oldat (4,5% aktív klór tartalmú Domestos) felhasználásával sterilizáltuk, majd steril vízzel mostuk azokat, öt alkalommal 1-1 percig.

Az *in vitro* gyökér alapú regenerációs rendszer felállítása Rosspopoff és munkatársai (2017) munkája alapján, annak kis módosításával történt.

A sterilizált magokat, négyzet alakú műanyag Petri-csészékben, szilárd táptalajon steril körülmények között csíráztattuk, 1% D(+)-szacharózt (Molar Chemicals KFT, Halásztelek, Magyarország), 0,6% agarózt (Electran, DNA pure grade for electrophoresis; VWR International LLC, Radnor, Pennsylvania, Egyesült Államok), és 0,5 g/l 2-(N-Morpholino)-etán-szulfonsav (MES) monohidrátot (Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, Hollandia) tartalmazó Gamborg B5 vitaminokkal kiegészített MS (Murashige és Skoog Medium including B5 vitamins, Duchefa Biochemie) táptalajon (pH=5,8). A táptalajban 1,25 μM 2,3,5-trijód-benzoésav (TIBA) (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Svájc) alkalmazása biztosította a magok csírázásának szinkronizációját. 21 °C hőmérsékletű növénynevelő kamrában (Fitoclima S 600 PLH, Aralab, Portugal), 8 h fény/16 h sötétperiódus és 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitás mellett, melyet Sylvania Luxline Plus (Feilo Sylvania Europe Limited, London, Egyesült Királyság) fénycsővek biztosítottak, a lemezeket vertikálisan tartva a növényeket 6 napig neveltük.

6 nap elteltével a csíranövényeket 43 órán keresztül naftilecetsavval (NES; 3,3 μM) (Duchefa Biochemie) kezeltük, annak érdekében, hogy indukáljuk az oldalgyökér primordiumok megjelenését. Következő lépésben a csíranövényeket citokinin tartalmú táptalajra helyeztük (MS Medium including B5 vitamins, 0,5 g/l MES monohidrát, 2% D(+)-

glükóz (Molar Chemicals), 0,6% agaróz, 8,16 μM 6-(γ,γ -Dimethylallylamino)purine [N6-(2-izopentenil)adenin, 2iP] (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Egyesült Államok) (pH=5,8)), ahol megindult a kompetens oldalgyökér primordiumok funkcionális hajtásmerisztémává történő átalakulása. A növények nevelése a kísérletek teljes időtartama alatt a csíráztatással megegyező hőmérsékleti és fényviszonyok mellett történt.

4.2 Külső kezelések és mintavétel

A külső poliamin, valamint H_2O_2 kezelések esetén törzsoldatot készítettünk, amihez a spermidint, spermint, termospermint feloldottuk és 22 μm pórusátmérőjű szűrő (Merck Millipore; Millex®-GV Filter, 0,22 μm ; Burlington, MA, USA) segítségével sterilen átszűrtük, a H_2O_2 -t Milli-Q® vízben hígítottuk, majd ezeket 100 μM -os végkoncentrációban a táptalajhoz adtuk. A külső NO kezeléshez, NO donorként S-nitrozoglutationt (GSNO) használtunk. Az előzőekben leírtak szerint a GSNO-ból törzsoldatot készítettünk. A törzsoldatot sötétben, fagyasztva tároltuk. A kezelés során a törzsoldatból 10 μM végkoncentrációjú oldatot készítettünk, majd ezt sterilen szűrtük és a növények gyökerére csepegtettük.

A külső kezelések minden esetben a citokinin indukcióval egy időben történtek.

Mintát a citokinin indukciót követő 4 időpontban vettünk: 24 óra (mitotikus osztódási szünet), 48 óra (szervkezdemények megjelenése), 72 óra (korai promerisztéma kialakulása) és 96 óra (késői promerisztéma kialakulása) elteltével.

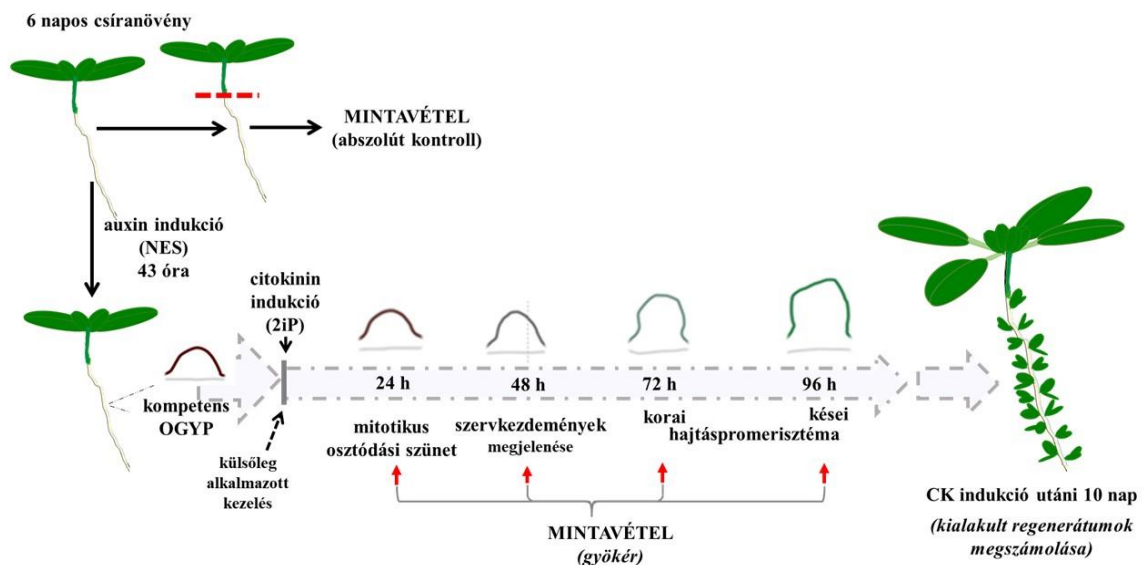
Génexpressziós vizsgálatokhoz és a poliamin tartalom meghatározásához mintákat a csíranövények gyökeréből vettünk, amíg a ROF és a NO szintjének meghatározásához teljes csíranövényeket használtunk. A kísérleteket 3 biológiai ismétlésben végeztük el, biológiai ismétlésenként a génexpressziós vizsgálatokhoz 3, az alkalmazott festési technikák, valamint a regenerációs hatékonyság meghatározásához legalább 20 technikai ismétlést alkalmazva.

Kontrollként a csíráztató táptalajon levő, hatnapos csíranövények gyökerét vagy külsőleg alkalmazott kezelések esetén, a CK táptalajon levő, vad típusú Col-0 növényeket használtuk. Génexpressziós vizsgálatok esetén kontrollként a vad típusú Col-0 hatnapos csíranövények gyökerét használtuk.

4.3 A kísérleti rendszer bemutatása

A gyökér alapú direkt-úton történő hajtás regenerációs rendszerekben magas citokinin koncentrációt alkalmazva organogén eredetű hajtások jönnek létre direkt úton az oldalgyökér primordiumok transzdzifferenciációjával, azok fejlődésének egy meghatározott stádiumában. (Chatfield és mtsai., 2013; Kareem és mtsai., 2016). Miután, ahogy korábban is leírtam, a leghatékonyabb ilyen típusú rendszert Rosspopoff és munkatársai (2017) dolgozták ki, munkánk során mi is ezt a rendszert használtuk, kisebb mértékű módosításokkal. Ilyen módosítás volt az, hogy gyökér explantumok helyett teljes csíranövényeket használtunk, ezáltal elkerülve a sebzés által okozott hatásokat.

A 6 napos csíráztatást követően a csíranövényeket magas auxin tartalmú táptalajra helyeztük, mely indukálta az oldalgyökér primordiumok (OGYP) kialakulását. A 43 órás auxin indukció biztosította, hogy az OGYP-ok a megfelelő fejlődési stádiumba kerüljenek, azaz kompetenssé váljanak a konverzióra. A csíranövényeket ezután magas CK tartalmú táptalajra helyeztük át. A külsőleg alkalmazott kezelések citokinin indukcióval egy időben történtek. Mintákat a teljes növények gyökeréből a CK indukció után 24 órával (mitotikus osztódási szünet), 48 órával (szervkezdemények megjelenése), 72 órával (korai hajtáspromeriszteuma kialakulása) és 96 órával (késői hajtáspromeriszteuma kialakulása) vettünk. A kialakult regenerátumokat a CK indukciót követő 10. napon számoltuk meg (8. ábra).



8. ábra A kísérleteink során használt rendszer bemutatása

Használt rövidítések: NES: naftilecetsav; CK: citokinin; 2iP: 6-(γ,γ -Dimethylallylamino)purine [N6-(2- izopentenil)adenin]; OGY P: oldalgyökér primordium; Rosspopoff és mtsai. (2017) alapján, módosítva

4.4 Molekuláris biológiai módszerek

4.4.1 RNS izolálás

RNS kivonáshoz Quick-RNA™ Miniprep Plus Kitet (Zymo Research, Irvine, Kalifornia, Egyesült Államok) használtunk a gyártó által javasolt protokoll szerint. Az RNS mennyiségének meghatározása a 260 nm-en mért optikai denzitás alapján NanoDrop™ 2000/2000c spektrofotométer segítségével történt. A minták tisztaságára és minőségére az OD260/OD280 és az OD260/OD230 arányból következtettünk, illetve gélelektroforézissel (1%-os agaróz gélben) ellenőriztük az esetleges degradációt.

4.4.2 cDNS szintézis

A tisztított RNS mintákból Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) reagenseinek alkalmazásával végezzük el a komplementer egyszálú DNS (cDNS) szintézisét a gyártó utasításai szerint, 20 µl végtérfogatban. A cDNS terméket 1:10 arányban hígítottuk nukleázmentes AccuGENE® vízzel (Lonza, Verviers, Belgium). A cDNS minőségének ellenőrzését polimeráz láncreakció (PCR) segítségével végeztük el. Kontrollként a *GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE C-2* gént (*AtGAPC-2*; AT1G13440) használtuk. A PCR reakcióhoz Fermentas DreamTaq™ DNA Polymerase enzimet (Thermo Fisher Scientific) használtunk a gyártó által javasolt protokollt követve.

A használt primerek szekvenciái a következők voltak:

AtGAPC-2_F: 5' ACTTGAAGGGTGGTGCTAAA 3'

AtGAPC-2_R: 5' ACATTCCGGTCAATTTTCCATT 3'

4.4.3 Valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-qPCR)

A génspecifikus primereket a Primer3 szoftver (Rozen és Skaletsky, 2000) segítségével terveztük meg. A használt primerek listáját és szekvenciáját az **1. táblázatban** foglaltuk össze. A primer szekvenciákat a Primer3 program (<https://primer3.ut.ee/>) alkalmazásával terveztük meg. Dimerizációra való hajlamukat az OligoAnalyzer™ Tool (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) segítségével vizsgáltuk.

A vizsgálni kívánt gének relatív expresszióját RT-qPCR segítségével, a qTOWER 2.0 (Analytic Jena AG, Life Science, Jéna, Németország), valamint a CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornia, Egyesült Államok) készülékekkel végeztük el. Az adatok normalizálásához az *UBIQUITIN 1 (UBQ1)*, AT3G52590

illetve a *PROTEIN PHOSPHATASE 2A SUBUNIT A3* (*PP2A3*, AT1G13320) háztartási géneket választottuk. A “The Bio-Analytic Resource for Plant Biology” (bar.u-toronto.ca; (Winter és mtsai., 2007)) Arabidopsis Regeneration eFP browser alapján ezek a gének konstans módon expresszálódnak az Arabidopsis gyökérből történő növényregeneráció során, illetve a növény egyéb szerveiben, szöveteiben. A valós idejű PCR során a DNS mennyiségének mérése fluoreszcens detektáláson alapul, amihez kísérleteinkben SYBR Green-t, egy, a kettős szálú DNS-hez kötődő fluoreszcens festéket használtunk. A reakcióelegy végtérfogata 14 μ l, valamint 7 μ l volt, melyben 2 μ l és 1 μ l hígított cDNS, 7 μ l és 3,5 μ l Thermo Scientific TM Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x), 0,42 μ l és 0,21 μ l “forward” primer, 0,42 μ l és 0,21 μ l “reverse” primer volt (az egyes oligonukleotidok 0,33 μ M végkoncentrációban voltak jelen). A reakció 10 perces 95 °C-os hevítéssel kezdődött, majd 40 ciklus következett az alábbi paraméterekkel: 95 °C 15 másodperc, 60 °C 1 perc. Végül hozzáadtuk a disszociációs fázist; 95 °C 15 másodperc, 60 °C 15 másodperc, 95 °C 15 másodperc.

Templátonként és primerenként három technikai ismétlést alkalmaztunk, valamint kontrollként ún. “non template control” -t is használtunk. Az adatokat a qPCRsoft (Analytik Jena AG), valamint a Bio-Rad CFX Maestro (Bio-Rad) szoftverek segítségével értékeltük ki. Az mRNS relatív transzkript szintjét az *UBQ1* és a *PP2A3* gének átlagához viszonyítva kalkuláltuk a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszer segítségével. A minták mRNS tartalmának meghatározása során hatnapos csíranövény mRNS szintjét tekintettük kontrollnak (relatív értéke: 1).

Primer szekvenciák	Gén neve (AGI locus kód)
F: 5' - GAGTCCACAATCTGTTCGGTG - 3' R: 5' - GTTGTTGTTGTTCCCTCGGCT - 3'	<i>AtADC1</i> (AT2G16500)
F: 5' - GTGGTGGTTTGGGGATTGAC- 3' R: 5' - CGGGAGTTGCTTGATGAACC- 3'	<i>AtADC2</i> (AT4G34710)
F: 5' - TCCGCTTCACTTCACACCAA - 3' R: 5' - GCCGCCGTTATCATCCTCTT- 3'	<i>AtSPDS1</i> (AT1G23820)
F: 5' - CTGATCCAATCGGTCCAGCA - 3' R: 5' - GGAACACTGGTCCAAGCGTA- 3'	<i>AtSPDS2</i> (AT1G70310)
F: 5' - TTTTCGGAACCTCACCTCG - 3' R: 5' - CTTTCCGTACGTGGCTGACT - 3'	<i>AtSPMS</i> (AT5G53120)

F: 5' - CTACCGCCTCCGTCATCATC - 3' R: 5' - ACTCTTTACCACCGACACCG- 3'	<i>AtPAO1</i> (AT5G13700)
F: 5' - AGAGGCTTAGGGTTCCAGTG - 3' R: 5' - ATCCAACCTCACCATACCGCT- 3'	<i>AtPAO2</i> (AT2G43020)
F: 5' - GGATGAGCAGGACGAAGACA - 3' R: 5' - GATCCCAACACTTTGCCGAG - 3'	<i>AtPAO3</i> (AT3G59050)
F: 5' - TTCCGCCGCAGTTGGTTA- 3' R: 5' - CGCCATCCCTTCTTGCCT- 3'	<i>AtPAO4</i> (AT1G65840)
F: 5' -TCGGTGGAAAGCCCTGTTTAT - 3' R: 5' -CGGCGTCGGATTGAGAGAT - 3'	<i>AtPAO5</i> (AT4G29720)
F: 5' - CAACACCCTTGACCTTAGCC - 3' R: 5' - GCTTGTATGAGTTCGCTCCA - 3'	<i>AtSAMDC1</i> (AT3G02470.1)
F: 5' TACTTGATGGGCAATGACGA- 3' R: 5' -TGTTGGCAGAAGAAGCAGAG - 3'	<i>AtSAMDC2</i> (AT5G15950.1)
F: 5' - CGAGGTATTGGCGTCTGATT- 3' R: 5' - GGTGAGCAACATTCAACAGTCT- 3'	<i>AtSAMDC3</i> (AT3G25570.1)
F: 5' - CTCTACGACAACGGTCACGA - 3' R: 5' - CACTTGGACGGAAAACATCA - 3'	<i>AtSAMDC4</i> (AT5G18930.1)
F: 5' - TCCTCCTTCTCCACCAACAC - 3' R: 5' - AACGATAAACCACCGTCTGC - 3'	<i>AtESR1</i> (AT1G12980.1)
F: 5' - GCTGACTTCCATGTCTGAAGGA- 3' R: 5' - TCTGCTGCATCTTAGCTGAATC - 3'	<i>AtESR2</i> (AT1G24590)
F: 5' - ACAAAGGCAAAGGCAACTTC- 3' R: 5' - CCACATACATCTCGGTTTCGT- 3'	<i>AtNIA1</i> (AT1G77760)
F: 5' - GCGTGGTGTCCCTCTCTG- 3' R: 5' - TGATGCTCGTTCGGTATTTG- 3'	<i>AtNIA2</i> (AT1G37130)
F: 5' - AGCCTCACGCAATGTCTGTT- 3' R: 5' - TTTCCCTGTTTTCTCAGTTG- 3'	<i>AtGLB1</i> (AT2G16060)
F: 5' - TGAAGTCCCTCACAACAATCC- 3' R: 5' - TCAGCCACTACCACCTTTCC- 3'	<i>AtGLB2</i> (AT3G10520)
F: 5' - ACTGATGGCGGTGTTGACTA- 3'	<i>AtGSNOR1</i> (AT5G43940)

R: 5' - TTGGAACGGACGAGTTGATA- 3'	
F: 5' - TTCTCATCCTCTCCTCACAGTTAC- 3' R: 5' - CACCGACGCTCATCATCTCC- 3'	<i>AtARR4</i> (AT1G10470)
F: 5' - ATGTCCTGATTCTTTCGGCTTAC- 3' R: 5' - AACCCATCTTTGTCACCTCTTG- 3'	<i>AtARR5</i> (AT3G48100)
F: 5' - TATGTCACCTAACCTAACTTC- 3' R: 5' - ACCGCCATTGTCAAACCTCAGA- 3'	<i>AtARR7</i> (AT1G19050)
F:5'-ATCTCCATCATCATCATCAAC-3' R: 5' - ATCTCCATCATCATCATCAAC- 3'	<i>AtARR15</i> (AT1G74890)
F:5'-ATCTCTTCCCCATTGCTCTC-3' R: 5' - TCTCTGGTGATGGTATTTATGATG- 3'	<i>AtARR16</i> (AT2G40670)
F: 5' - CGCAAGTGCTATGCTCGTCTT - 3' R: 5' - GCCTCAACTGGTTGCTGTGA - 3'	<i>UBQ1</i> (AT3G52590)
F: 5' - ATTCCGATAGTCGACCAAGC -3' R: 5' - AACATCAACATCTGGGTCTTCA - 3'	<i>PP2AA3</i> (AT1G13320.1)

1. táblázat: A RT-qPCR során a transzkripciós szintek meghatározásához használt primerek.

4.5 Sztereomikroszkóppal végzett vizsgálatok

A csíranövények gyökerén kialakult hajtások számát Olympus SZX12 sztereomikroszkóppal (Olympus Corporation, Sindzsuku, Tokió, Japán), fehér LED fényforrással (Photonic Optics, Bécs, Ausztria), tízszeres nagyítás mellett határoztuk meg. Fotók készítéséhez Olympus Camedia C7070 digitális kamerát (DScaler szoftver (4.1.15 verzió) használtunk.

4.6 Reaktív oxigén formák és a nitrogén-monoxid detektálása és mennyiségi meghatározása fluoreszcens mikroszkóppal

4.6.1 A reaktív oxigén formák *in situ* detektálása

A reaktív oxigén formák kimutatása 2'-7'-diklórdihidrofluoreszcein diacetát (H₂DCFDA) festék alkalmazásával történt (Benkő és mtsai., 2020; Gémes és mtsai., 2011). A

festés során a mintákat 10 μM H₂DCFDA oldattal, 15 percig, 37 °C-on, sötétben inkubáltuk, majd 20 percen át 4-szer mostuk azokat 2-(N-morfolino)etánszulfonsav/ kálium-klorid MES/KCl (10⁻³ M, pH 6,15) pufferrel.

A DCFDA (2',7'-diklórfluoreszcein diacetát) molekula képes a sejtekbe jutni, ahol az intracelluláris észterázok általi hidrolizáció révén DCF (2',7'-diklórfluoreszcein) molekula szabadul fel, ami a sejten belül csapdázódik. Hidrogén peroxiddal vagy egyéb peroxidokkal, főként hidroperoxidokkal történő reakciója során egy fluoreszcens DCF származék (exc.:480 nm, em.: 530 nm) jön létre (Sandalio és mtsai., 2008).

4.6.2 A nitrogén-monoxid kimutatása

A nitrogén-monoxid szintek meghatározásához DAF-FM DA (4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorfluoreszcein diacetát) festéket használtunk. 10 μM DAF-FM DA oldatban 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk a növényeket, majd Tris-HCl pufferrel (10 mM, pH 7,4) kétszer 5 percig mostuk (Kolbert és mtsai., 2015). A DAF-FM DA képes a sejtekbe jutni, ahol intracelluláris észterázok általi hasítása révén DAF-FM (4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorfluoreszcein) szabadul fel, ami a sejtben csapdázódik. A DAF-FM fluoreszcencia O₂-függő, így feltételezhetően a NO oxidációja során keletkező köztitermékek révén, nem közvetlenül NO által aktiválódik, azonban a reakció NO hiányában nem megy végbe. Egy erősen fluoreszcens termék, triazolofluoreszcein (DAF-FMT) keletkezik, ami fluoreszcens mikroszkóppal lokalizálható és monitorozható, a fluoreszcencia intenzitása függ a jelen lévő NO koncentrációjától (Kojima és mtsai., 1998; Kumari és mtsai., 2022; Namin és mtsai., 2013).

4.6.3 Fluoreszcens mikroszkópia

Az előkészített mintákat minden esetben egy nagy felbontású digitális kamerával (AxioCam HR, HQ CCD kamera, 1300x1030 dpi, Carl Zeiss, Jéna, Németország) is felszerelt Zeiss Axiovert 200M típusú fluoreszcens mikroszkóppal (Carl Zeiss, Németország) vizsgáltuk, 10-es filterszett (excitációs hullámhossz tartomány 450-490 nm, emissziós tartomány: 515-565 nm) használatával.

Tízszeres nagyítás mellett fluoreszcens képeket készítettünk a hajtásmerisztéma kialakulás egyes stádiumaiban, majd Carl Zeiss™ Axiovision Rel. 4.8 szoftverrel a konvertálódó szerv területéhez igazított, változó, a citokinin indukciót követő 24. órában (mitotikus osztódási szünet) 25 μm , 48. órában (szervkezdemények megjelenése) 30 μm , 72. órában (korai promerisztéma kialakulása) 40 μm , 96. órában (késői promerisztéma kialakulása)

50 µm átmérőjű körök területén meghatároztuk a pixelintenzitást (**1. függelék ábra: A pixel intenzitás mérés módját bemutató reprezentatív kép**) amiből következtettünk a NO és ROF szintekre.

4.7 A szabad poliaminok mennyiségének meghatározása HPLC-vel

A szabad poliaminok szintéjek meghatározása (Flores és Galston, 1982) módszerével a Tari és Csiszár (2003) által leírt protokoll szerint történt.

4.7.1 A minták előkészítése

A fagyasztott mintákat 5 %-os perklórsavban, homogenizáltuk 0 °C-on. A mintákat centrifugáltuk (4°C, 20 perc, 12000 rpm), majd 0.5 ml-t a szabad poliaminokat tartalmazó felülúszóból 400 µl 2 M NaOH-al közömbösítettük. A poliaminokat 10 µl benzoil- klorid hozzáadásával származékká alakítottuk. A benzoil-poliaminokat dietil-éterrel extraháltuk. A szerves fázist szárazra pároltuk. A mérésig a mintákat fagyasztóban tároltuk.

4.7.2 A poliamin koncentráció meghatározása

A benzoil-poliaminokat HPLC módszerrel (JASCO HPLC System, Japán), fordított fázisú oszlopon (Apex C18 5 µ; 250x4,6 mm), izokratikus körülmények között, 45:55 (v:v) arányú acetonitril: víz elegyével választottuk el, és UV detektor segítségével 254 nm hullámhosszon azonosítottuk. A minták poliamin koncentrációjának meghatározása ismert mennyiségű, putreszcin, spermidin és spermin standardokkal (Sigma-Aldrich, Germany) való kalibráció segítségével történt. Az oszlopra 20 µl-t vittünk fel a standardokból és a mintákból.

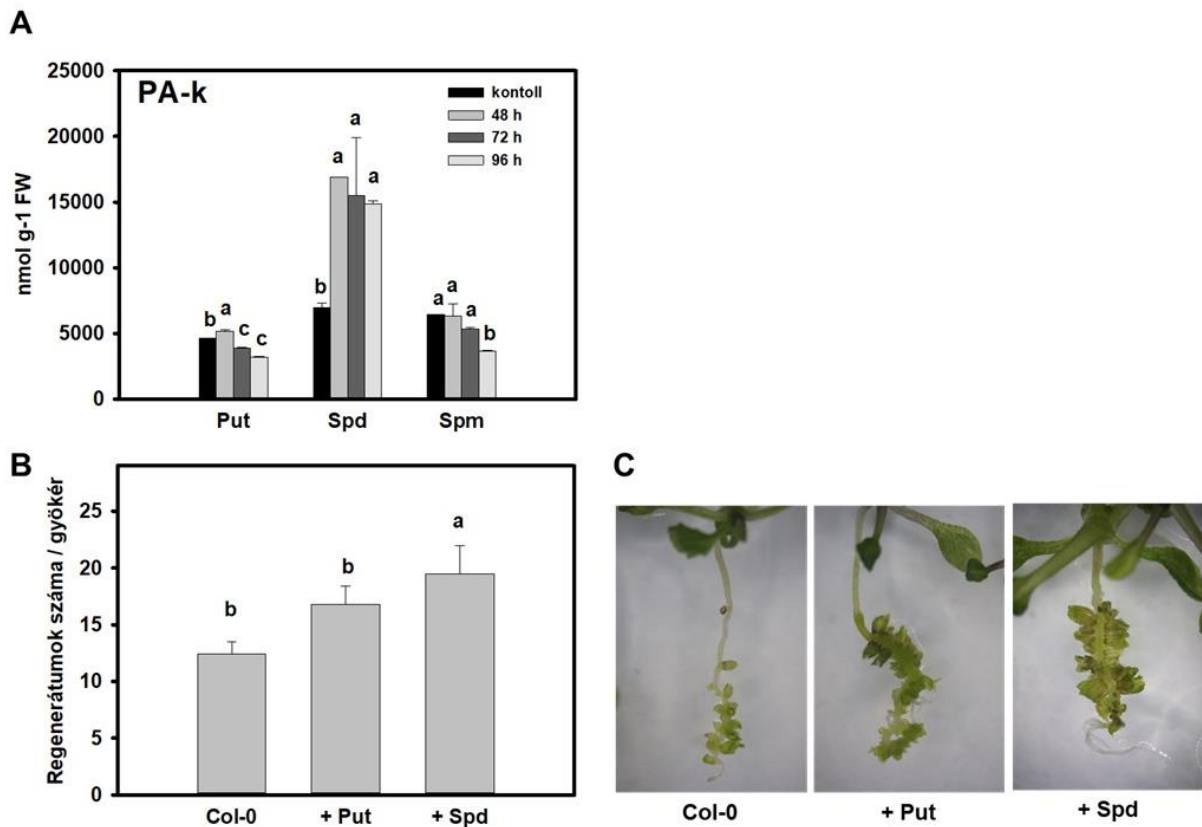
4.8 Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai feldolgozása és kiértékelése SigmaPlot v.12.0 szoftverrel történt. A feltüntetett adatok minden esetben három független biológiai ismétlés átlag- és szórásértékei. A kontrolltól való szignifikáns eltéréseket a varianciaanalízist követően a Duncan-féle teszttel állapítottuk meg. Az azonos betűvel nem jelölt átlagok $P \leq 0,05$ szinten, szignifikánsan különböznek egymástól. Más esetben a szignifikáns különbségek meghatározására Student-féle *t*-tesztet használtuk $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**), vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken.

5. EREDMÉNYEK

5.1 A poliaminok hatása az oldalgyökér primordiumok hajtásmerisztémává történő átalakulására

Az OGYP-HM átalakulás során a három fő poliamin szintje eltérően változott. A Put szintje a 48. órában kis mértékben, de szignifikánsan emelkedett, majd az ezt követő stádiumokban csökkent, míg a Spm szintje kismértékű, fokozatos csökkent. Ezzel ellentétben a Spd koncentrációja jelentősen, közel háromszorosára emelkedett mindhárom vizsgált időpontban a kontrollhoz (6 napos csíranövény) képest (**9. ábra A**). Mindemellett, a külsőleg alkalmazott Put, de különösen a Spd növelte a hajtásregeneráció hatékonyságát, megerősítve ezeknek a poliaminoknak a direkt organogenezisre kifejtett pozitív hatását (**9. ábra B, C**).



9. ábra: A poliaminok hatása az oldalgyökér primordiumok hajtásmerisztémává történő átalakulására.

Az endogén putreszcin (Put), spermidin (Spd) és spermin (Spm) szint a hatnapos vad típusú Col-0 csíranövények gyökerében (kontroll), valamint a citokinin (CK) indukciót követően a szervkezdemények megjelenésének (48 óra), a korai (72 óra) és a kései (96 óra) hajtáspromerisztema kialakulásának fázisaiban (A). A külsőleg alkalmazott 100 μ M Put és Spd

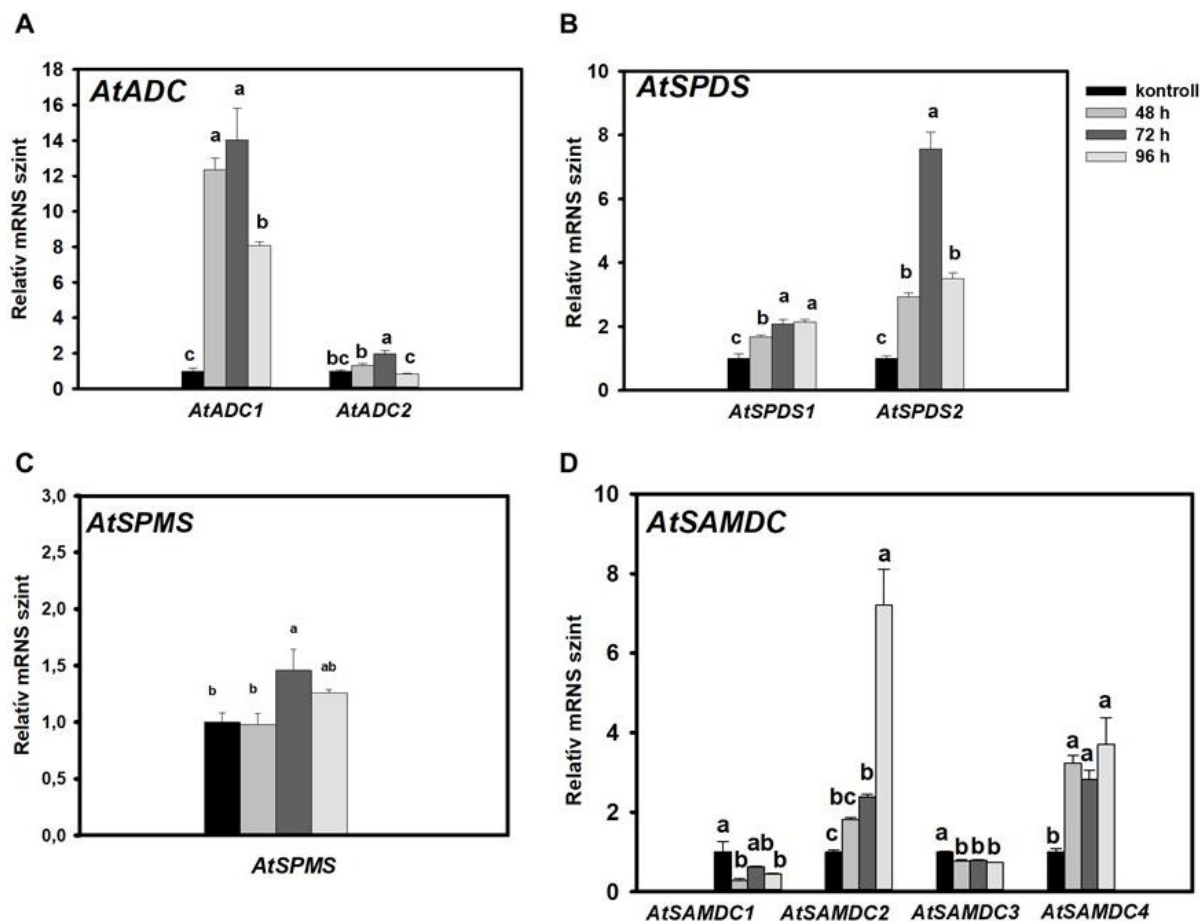
kezelés hatása a regenerációs hatékonyságra vad-típusú Col-0 növények gyökerén a citokinin indukciót követő 10. napon (**B**). A CK kezelt vad típusú Col-0 növényeket, valamint a kezelések hatását bemutató reprezentatív képek (**C**). Az oszlopokon a hibásávok a standard hibát mutatják. Az adatsorok statisztika összehasonlítása Duncan féle teszttel történt. A különböző betűvel jelölt átlagok szignifikánsan különböznek egymástól ($P \leq 0,05$).

5.1.1 A PA metabolizmus gének expressziójának változása az OGYP- HM átalakulás során

Az endogén PA szintek változásának jobb megértése érdekében az OGYP-HM átalakulás egyes szakaszaiban megvizsgáltuk azoknak a géneknek a kifejeződését, amelyek a PA metabolizmusban részt vevő enzimeket kódolják.

Azt tapasztaltuk, hogy az *AtADCI* (**10. ábra A**), expressziója a citokinin indukciót követő 48. órával jelentősen, mintegy 12-szeresen megemelkedett és a hajtásmerisztéma kialakulása során végig magas maradt. A hajtás promerisztémák kialakulása során az *AtADC2* relatív transzkript szintje szintén mutatott kismértékű emelkedést (**10. ábra A**). Ezzel szemben a *SPMS* gén expressziója nem emelkedett meg szignifikánsan (**10. ábra C**), ami összhangban van azzal, hogy a Spm szintje sem emelkedett a hajtás promerisztémák kialakulása során (**9. ábra A**).

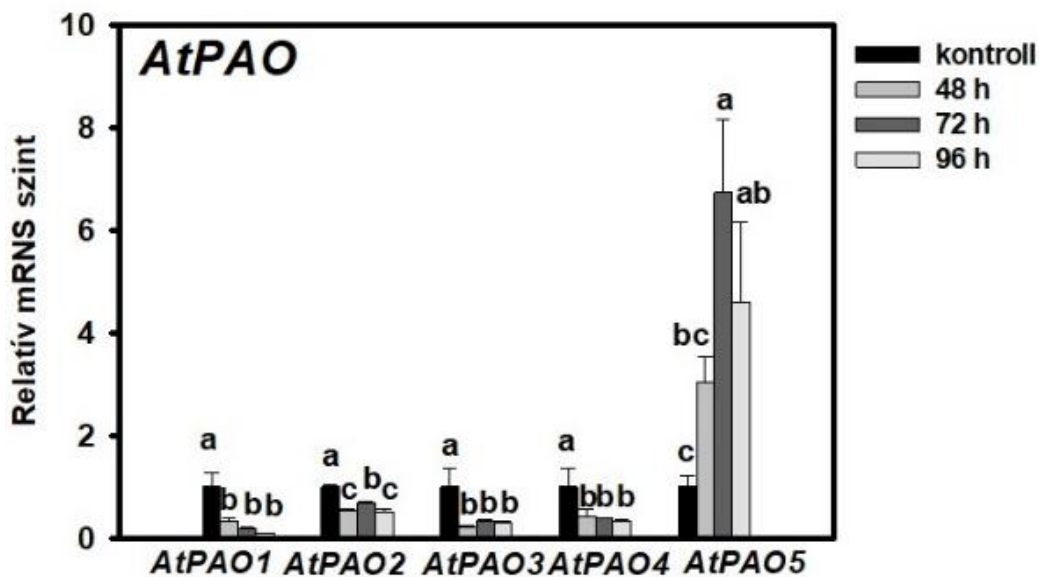
Arabidopsisban 5 SAMDC izoenzimet kódoló gén található. Ezek közül kísérleti rendszerünkben az *AtSAMDC2* és *AtSAMDC4* relatív mRNS szintje emelkedett meg a szervezdemények megjelenése és a hajtás promerisztéma kialakulása során, amíg az *AtSAMDC1* és *AtSAMDC3* mRNS szintje csökkent a kontrollhoz képest. Az *AtSAMDC2* különösen magas, mintegy nyolcszoros expressziót mutatott a kései hajtás promerisztéma kialakulása során (citokinin indukció után 96 órával) (**10. ábra D**).



10. ábra: A poliaminok bioszintézisében szerepet játszó gének kifejeződése

Az arginin-dekarboxilázt (A), spermidin-szintázt (B), spermin-szintázt (C), és S-adenozil-metionin dekarboxilázt, (D) kódoló gének [AtADC1 és AtADC2 (A), AtSPDS1 és AtSPDS2 (B) AtSPMS1 (C) és AtSAMDC1-4 (D)] expressziójának változása a citokinin-indukciót követően az oldalgyökér primordiumokból történő direkt hajtásmerisztéma kialakulása során a szervkezdemények megjelenésének (48 óra), a korai (72 óra) és a kései (96 óra) hajtáspromerisztéma kialakulásának fázisaiban. Kontroll a hatnapos csíranövények gyökerének mRNS szintje (relatív mRNS szint: 1). Az oszlopokon a hibasávok a standard hibát mutatják. Az egyszempontos varianciaanalízist követően a Duncan-féle tesztet alkalmaztuk. A különböző betűvel jelölt átlagok szignifikánsan különböznek egymástól ($P \leq 0,05$).

Ezután megnéztük, miként változik a PA-k visszaalakítását katalizáló PAO gének expressziós mintázata az oldalgyökér primordiumok hajtásmerisztémává történő átalakulása során. Arabidopsisban a poliaminok lebontásában és visszaalakításában részvevő izoenzimeket kódoló gének (AtPAO1, AtPAO2, AtPAO3, AtPAO4, AtPAO5) közül a CK indukciót követő 48 órával csak az AtPAO5 expressziójának szintje emelkedett meg, de az végig magas maradt a hajtás promerisztémák kialakulása során is (11. ábra).



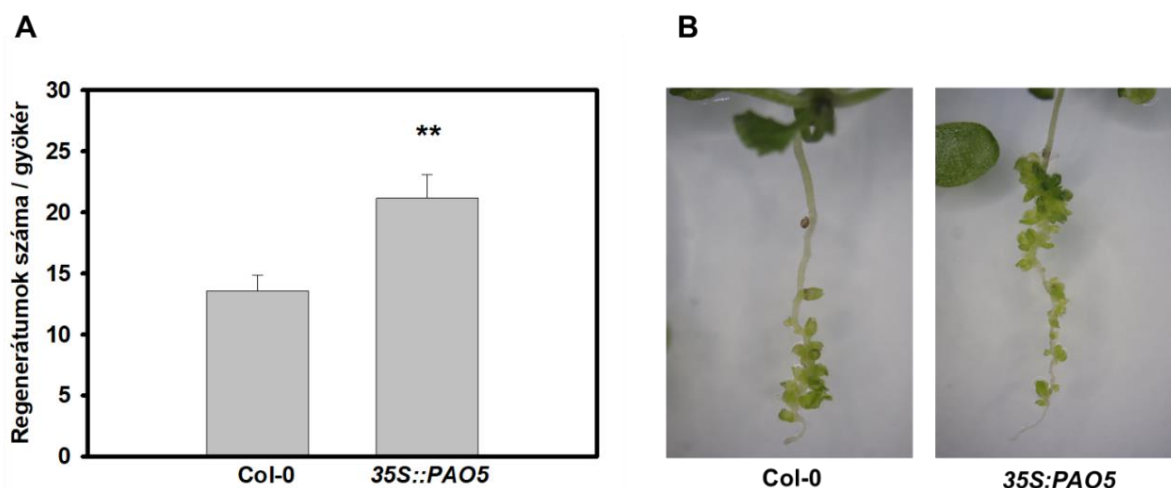
11. ábra: Az *AtPAO* gének kifejeződése

A poliamin-oxidázt kódoló gének (*AtPAO1-5*) expressziójának változása az oldalgyökér primordiumokból történő direkt hajtásmerisztéma kialakulása során a szervezdemények megjelenésének (48 óra), a korai (72 óra) és a kései (96 óra) hajtáspromerisztéma kialakulásának fázisaiban. Kontroll a hatnapos csíranövények gyökerének mRNS szintje (relatív mRNS szint: 1). Az oszlopokon a hibasávok a standard hibát mutatják. Az egyszempontos varianciaanalízist követően a Duncan-féle tesztet alkalmaztuk. A különböző betűvel jelölt átlagok szignifikánsan különböznek egymástól ($P \leq 0,05$).

5.2 Az *AtPAO5* túltermeltetésének hatása az OGYP-HM átalakulásra

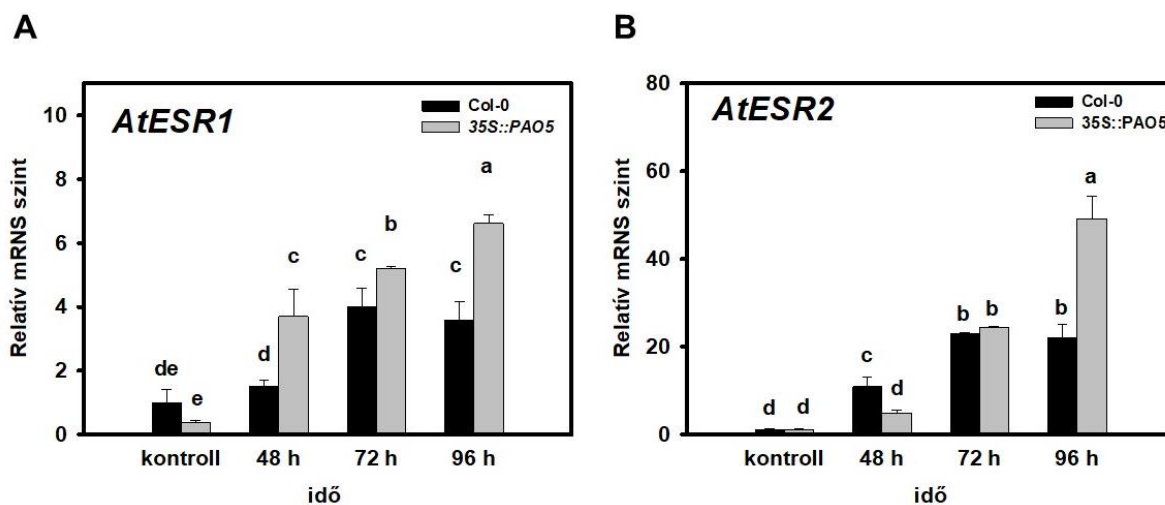
5.2.1 Az *AtPAO5*-túltermelő vonal regenerációs hatékonyságának vizsgálata

Annak igazolására, hogy az *AtPAO5* szerepet játszik a direkt organogenezisben, megvizsgáltuk, hogy miként alakul a regeneráció hatékonysága *AtPAO5*-túltermelő transzgenikus vonalakban (35S::*PAO5*). Azt tapasztaltuk, hogy *AtPAO5*-túltermelő növények esetén több hajtás jelent meg a gyökéren (12. ábra A, B), valamint a hajtás organogenezis marker géneinek tekinthető (Matsuo és mtsai., 2011) *ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 1* és *ESR2* gének magasabb expressziót mutattak a vad típushoz képest (13. ábra A, B).



12. ábra: A *AtPAO5* gén ektópikus túltermeltetésének hatása a regenerációs hatékonyságra

A vad típusú *Col-0* és *AtPAO5*- túltermelő (*35S::PAO5*) növények gyökerén kialakult regenerátumok száma a citokinin indukciót követő 10. napon (A), valamint a növényeket bemutató reprezentatív képek (B). Az oszlopokon a hibásávok a standard hibát mutatják. A szignifikancia meghatározása Student féle *t* teszt *p* értéke alapján történt, ahol a * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$.



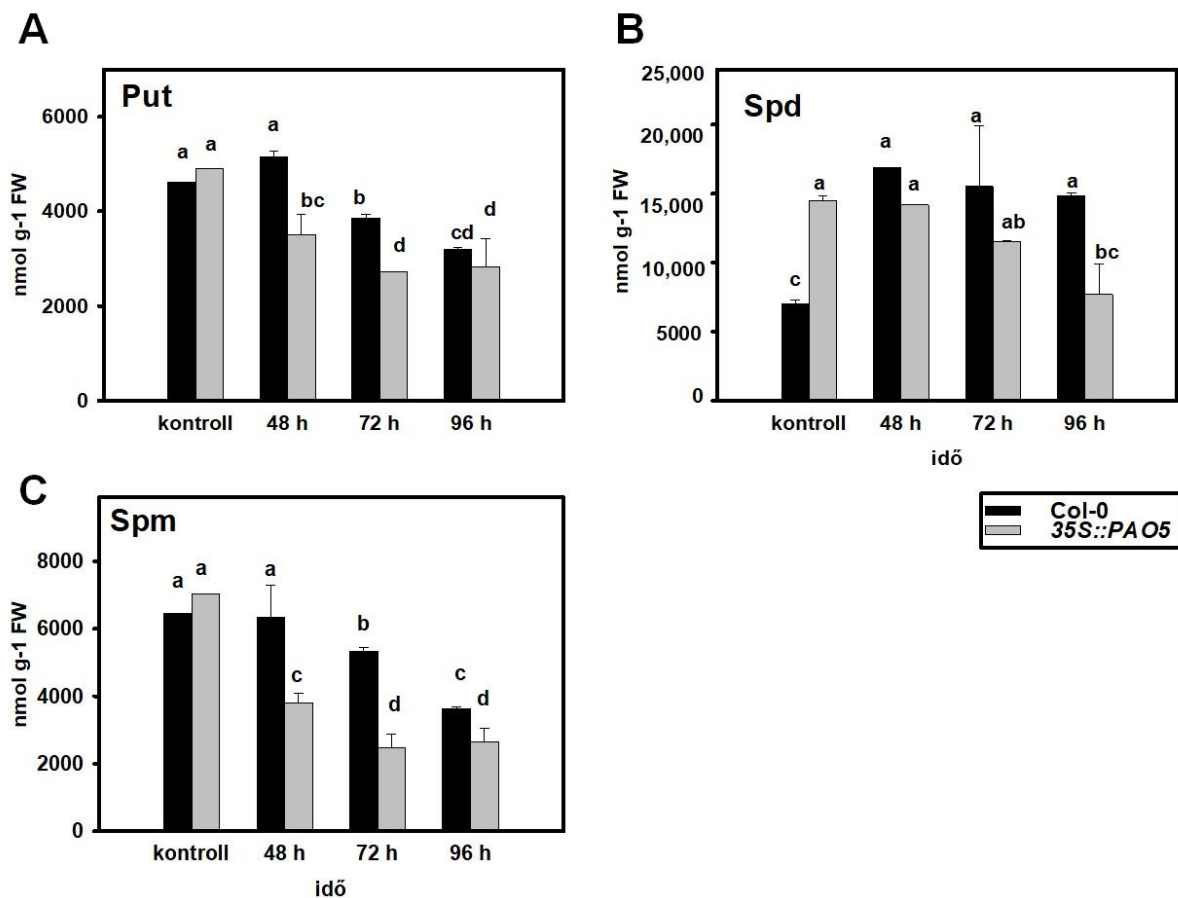
13. ábra Az *AtESR1* és *AtERS2* gének kifejeződése *AtPAO5*- túltermelő növényekben

Az *ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 1* (*AtESR1*) (A) és *AtESR2* (B) gének expressziójának változása a vad típusú *Col-0* és *AtPAO5*- túltermelő (*35S::PAO5*) növényekben a citokinin-indukciót követően az oldalgyökér primordiumokból történő direkt hajtásmerisztéma kialakulása során a szervkezdemények megjelenésének (48 óra), a korai (72 óra) és a kései (96 óra) hajtáspromerisztéma kialakulásának fázisaiban. Kontroll a hatnapos csíranövények gyökerének mRNA szintje (relatív mRNA szint: 1). Az oszlopokon a hibásávok a standard hibát mutatják. Az egyszempontos varianciaanalízist követően a Duncan-féle tesztet

alkalmaztuk. A különböző betűvel jelölt átlagok szignifikánsan különböznek egymástól ($P \leq 0,05$).

5.2.2 Az endogén poliamin szintek változása a 35S::PAO5 vonalban

Az endogén poliaminok szintjét mérve azt láttuk, hogy 35S::PAO5 túltermelő növényekben a Spd tartalom a kontrollban magasabb, mint a vad típusú növényekben, azonban a Put és Spm szintek nem mutattak szignifikáns különbséget. A citokinin indukciót követően, mindhárom PA szintje fokozatosan és a vad típusúhoz képest erőteljesebben csökkent (**14. ábra**). Ez alapján elmondható, hogy az *AtPAO5* túltermelése befolyásolja a PA homeosztázist.

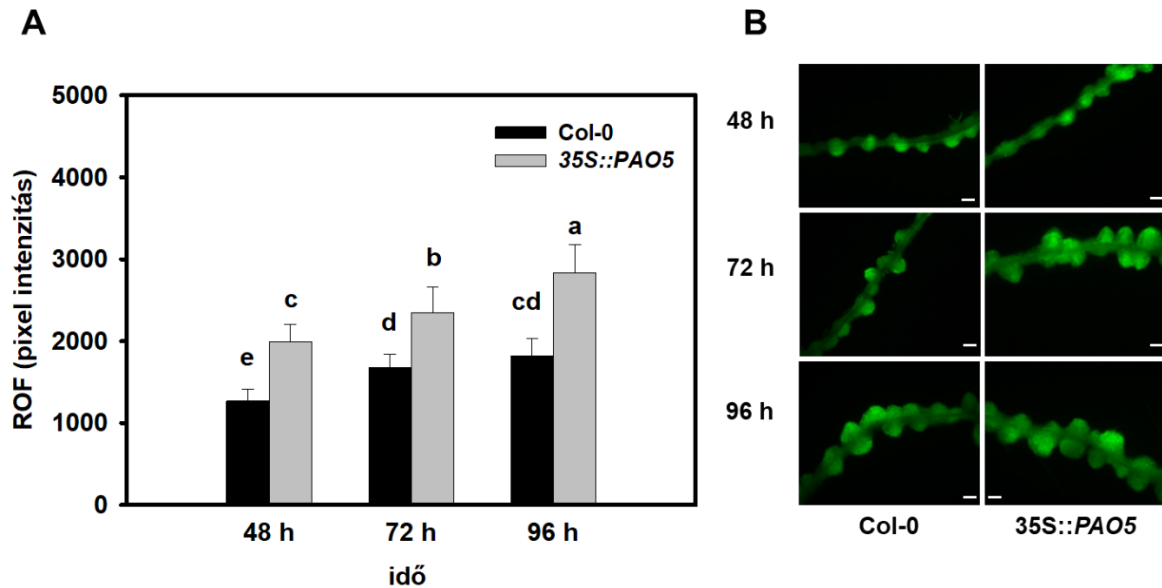


14. ábra: Az endogén poliamin tartalom és annak változása a *de novo* hajtás kialakulás alatt vad típusú és *AtPAO5*- túltermelő növényekben

Az endogén putreszcin (Put) (A), spermidin (Spd) (B), spermin (Spm) (C) szint változása a vad típusú Col-0 és *AtPAO5*- túltermelő (35S::PAO5) növényekben a hatnapos csíranövény gyökerében (kontroll) és a citokinin indukciót követően a szervezdemények megjelenése (48 óra), a korai (72 óra) és a kései (96 óra) hajtás promerisztema kialakulásának fázisaiban. Az oszlopokon a hibasávok a standard hibát mutatják. Az egyszempontos varianciaanalízist követően a Duncan-féle tesztet alkalmaztuk. A különböző betűvel jelölt átlagok szignifikánsan különböznek egymástól ($P \leq 0,05$).

5.2.3 A PAO5 túltermeltetésének hatása a ROF homeosztázisra

Mivel *Atpao5* mutáns növényekben alacsonyabb a ROF szintje (Ferdousy és mtsai., 2020), feltételezhető, hogy az *AtPAO5* befolyásolja a ROF homeosztázist. 35S::*PAO5* túltermelő vonalakban a CK indukciót követő 48 órától a hajtásmerisztéma kialakulásáig végig magasabb volt a ROF szintje a vad típusú növényekhez viszonyítva, ami alátámasztja az *AtPAO5* szerepét a ROF homeosztázis szabályozásában (15. ábra A, B).



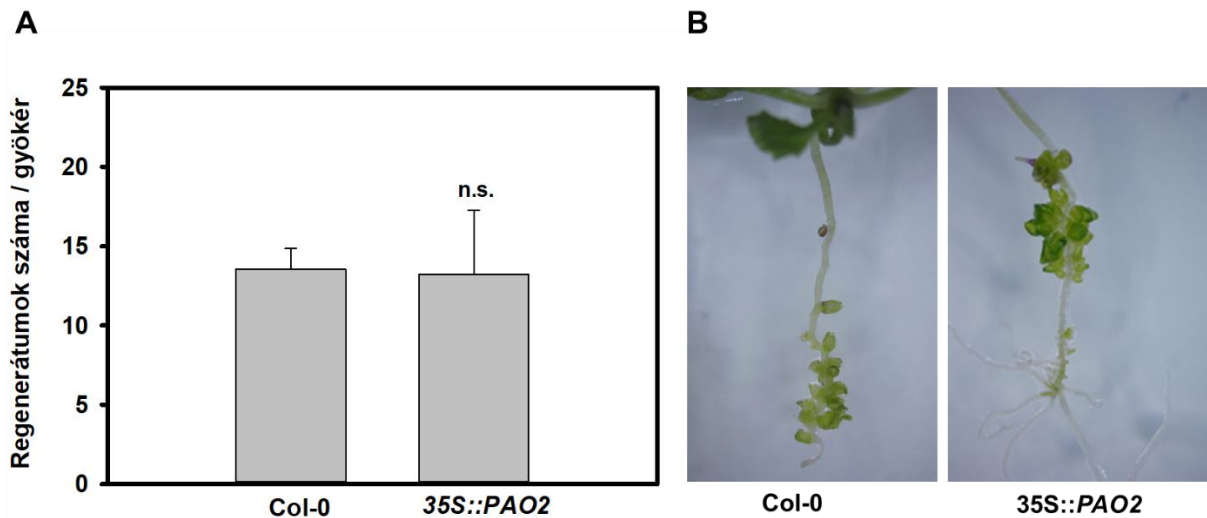
15. ábra: A vad típusú és *AtPAO5*- túltermelő növények ROF szintje

A 2'-7'-diklórdihydrofluoreszcein diacetátból (H_2DCFDA) származó DCF fluoreszcencia alapján számolt pixel intenzitás diagramja (A) és a vad típusú és *PAO5*-túltermelő (35S::*PAO5*) növények reprezentatív képei (B). A képek készítése és a pixel intenzitás mérése a szervkezdemények megjelenésének (48 óra), a korai (72 óra) és a kései (96 óra) hajtás promerisztéma kialakulásának fázisaiban történt. Az oszlopokon a hibasávok a standard hibát mutatják. Az egyszempontos varianciaanalízist követően a Duncan-féle tesztet alkalmaztuk. A különböző betűvel jelölt átlagok szignifikánsan különböznek egymástól ($P \leq 0,05$). Mércse: 100 μm

5.3 Az *AtPAO2* túltermeltetésének hatása az OGYP-HM konverzióra

Megállapítottuk, hogy az *AtPAO5* gén túltermelése hatással van a ROF homeosztázisra (15. ábra). Annak eldöntésére, hogy a PAO-k közül az *AtPAO5* specifikus szerepet tölt-e be a hajtás organogenezis folyamatában, a következőkben megnéztük miként változik az *AtPAO2* gént túltermelő transzgenikus növények (35S::*PAO2*) regenerációs hatékonysága. Az *AtPAO2* a Spm és Spd-né, illetve a Spd Put-né történő visszaalakítása révén (Sagor és mtsai., 2016)

szintén hozzá járul a PA és a H₂O₂ szint módosításához (Benkő és mtsai., 2022). A PAO2-túltermelő vonal regenerációs hatékonysága azonban nem mutatott különbséget a vad típushoz képest (16. ábra).



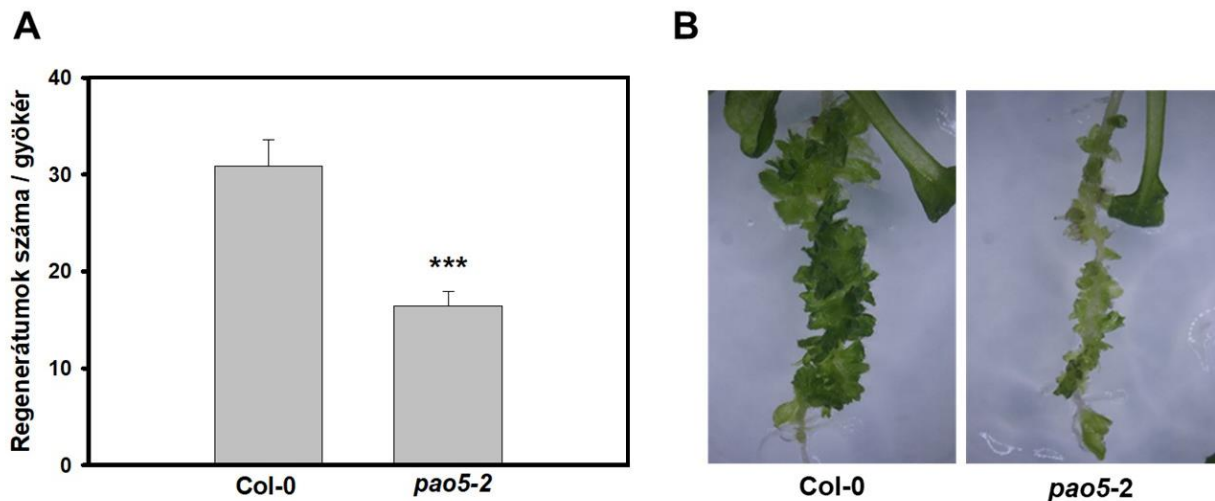
16. ábra: A *AtPAO2* gén ektópikus túltermeltetésének hatása a regenerációs hatékonyságra

A vad típusú *Col-0* és *AtPAO2*-túltermelő (*35S::PAO2*) növények gyökerén kialakult regenerátumok száma a citokinin indukciót követő 10. napon (A), valamint a növényeket bemutató reprezentatív képek (B). Az oszlopokon a hibásávok a standard hibát mutatják. A szignifikancia meghatározása Student-féle *t* teszt *p* értéke alapján történt, ahol a * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; n.s.: nem szignifikáns különbség.

5.4 Az *AtPAO5* funkcióvesztés hatása az OGYP-HM konverzióra

Az előzőekben igazoltuk az *AtPAO5* pozitív hatását az oldalgökér primordiumok hajtásmerisztémává történő direkt átalakulása során. A következőkben azt a mechanizmust vizsgáltuk, ami által ezt a folyamatot az *AtPAO5* szabályozza. Ennek első lépéseként megnéztük, hogy miként változik a regeneráció hatékonysága *pao5-2* T-DNS inszerciós mutáns vonalakban.

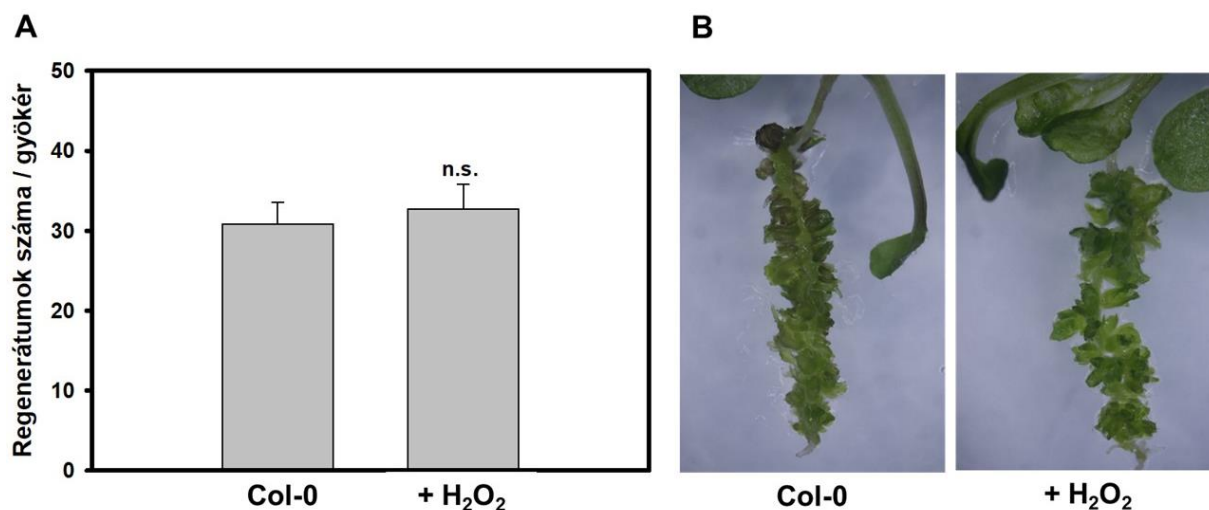
Míg a *35S::PAO5* vonal esetén az *AtPAO5* túltermelése növelte (12. ábra), addig a *pao5-2* mutáns vonalban a génfunkció elvesztése csökkentette a regenerációs hatékonyságot a vad típusú növényekhez képest (17. ábra).



17. ábra: A regeneráció hatékonysága az *Atpao5*-mutáns növényekben

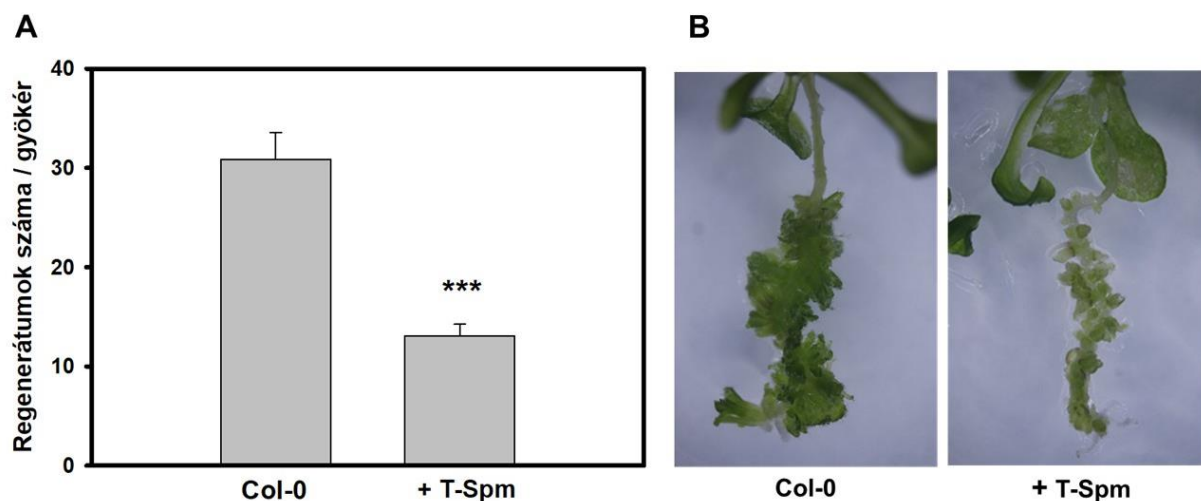
A vad típusú *Col-0* és *Atpao5*-mutáns (*pao5-2*) növények gyökerén kialakult regenerátumok száma a citokinin indukciót követő 10. napon (A), valamint a növényeket bemutató reprezentatív képek (B). Az oszlopokon a hibásávok a standard hibát mutatják. A szignifikancia meghatározása Student félé *t* teszt *p* értéke alapján történt, ahol a * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$.

Annak eldöntéséhez, hogy a PAO5 a H_2O_2 vagy a T-Spm-szint szabályozásán keresztül játszik-e szerepet a direkt hajtásmerisztéma kialakulásban, külső H_2O_2 és T-Spm kezelést alkalmaztunk. A H_2O_2 kezelés nem (18. ábra), viszont a T-Spm kezelés szignifikánsan csökkentette a direkt hajtásmerisztéma képződés hatékonyságát a kontrollhoz képest (19. ábra). Ezzel összhangban a *pao5-2* mutáns növények és a vad típusú növények ROF szintjükben nem mutattak különbséget az OGYP-HM konverzió során (20. ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az AtPAO5 nem a H_2O_2 szintek módosításával, hanem a T-Spm homeosztázis szabályozásán keresztül fejt ki hatását az OGYP-HM-vá történő átalakulása során.



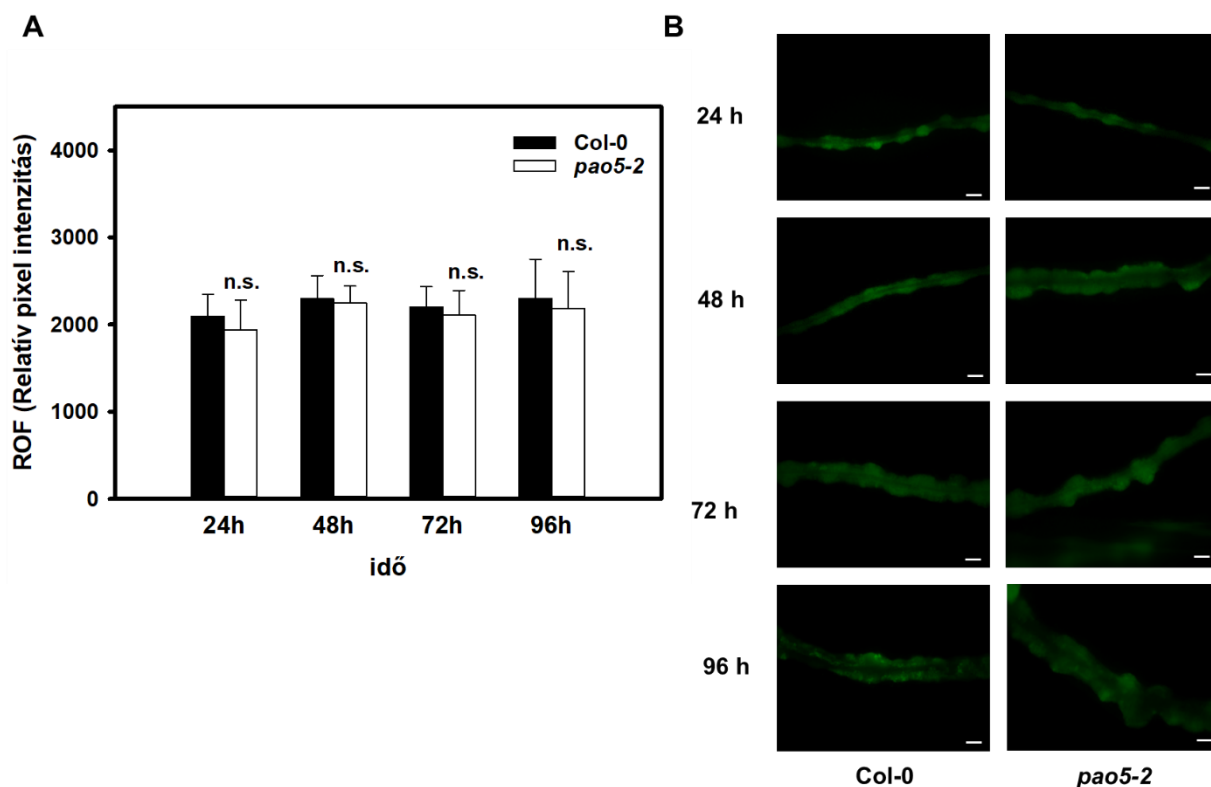
18. ábra: A H₂O₂ kezelés hatása a regenerációs hatékonyságra

A külsőleg alkalmazott 100 μ M H₂O₂ kezelés hatása a regenerációs hatékonyságra vad-típusú Col-0 növények gyökerén a citokinin indukciót követő 10. napon (A). A CK kezelt vad típusú Col-0 növényeket, valamint a H₂O₂ kezelés hatását bemutató reprezentatív képek (B). Az oszlopokon a hibásávok a standard hibát mutatják. A szignifikancia meghatározása Student féle *t* teszt *p* értéke alapján történt, ahol a * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; n.s.: nem szignifikáns különbség.



19. ábra: A termospermin kezelés hatása a regenerációs hatékonyságra

A külsőleg alkalmazott 100 μ M T-Spm kezelés hatása a regenerációs hatékonyságra vad-típusú Col-0 növények gyökerén a citokinin indukciót követő 10. napon (A). A CK kezelt vad típusú Col-0 növényeket, valamint a T-Spm kezelés hatását bemutató reprezentatív képek (B). Az oszlopokon a hibásávok a standard hibát mutatják. A szignifikancia meghatározása Student féle *t* teszt *p* értéke alapján történt, ahol a * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$.



20. ábra: Vad típusú Col-0 és Atpao5-mutáns növényekben mért ROF szintek

A 2'-7'-diklórdihidrofluoreszcein diacetát-ból (H_2DCFDA) származó DCF fluoreszcencia alapján számolt pixel intenzitás diagramja (A) és a vad típusú Col-0 és Atpao5-mutáns (*pao5-2*) növények reprezentatív képei (B). A képek készítése és a pixel intenzitás mérése a mitotikus osztódási szünet (24 óra), a szervezdemények megjelenésének (48 óra), a korai (72 óra) és a kései (96 óra) hajtás promerisztéma kialakulásának fázisaiban történt. Az oszlopokon a hibasávok a standard hibát mutatják. Az egyszempontos varianciaanalízist követően a Duncan-féle tesztet alkalmaztuk ($P \leq 0,05$); n.s.: nem szignifikáns különbség. Mércse: 100 μm

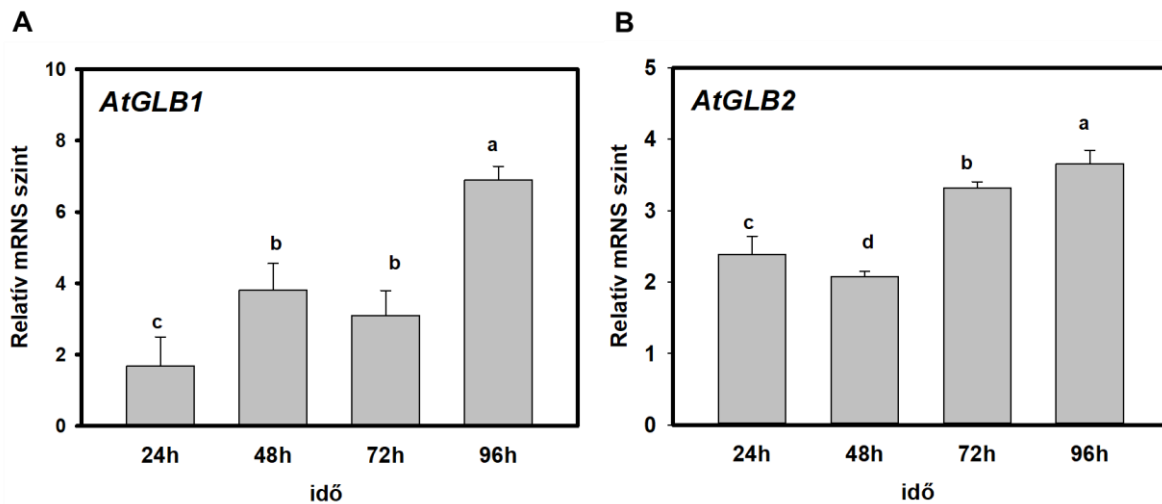
5.4 A PAO5 szerepe a citokinin érzékenység szabályozásában

Alabdallah és munkatársai (2017) kimutatták, hogy a PAO5 T-Spm-függő módon befolyásolja a CK választ a xilém differenciáció során. Annak mechanizmusát, hogy a T-Spm hogyan hat ebben a folyamatban azonban nem vizsgálták (Alabdallah és mtsai., 2017). Miután Arabidopsis indirekt hajtás organogenezise során a növényi hemoglobinok (GLB1 és GLB2) hatással vannak a CK érzékenységre (Wang és mtsai., 2011), feltételeztük, hogy az AtPAO5 a hemoglobinok szabályozása által befolyásolhatja a CK érzékenységet az oldalgöker primordiumok direkt hajtásmerisztémává történő átalakulása során. Hipotézisünk igazolásához megnéztük, hogy a direkt hajtás organogenezis során miként változik a hemoglobint kódoló

gének közül az *AtGLB1* és *AtGLB2* relatív expressziója vad típusú, valamint *pao5-2* mutáns növényekben és T-Spm kezelés hatására vad típusú növényekben.

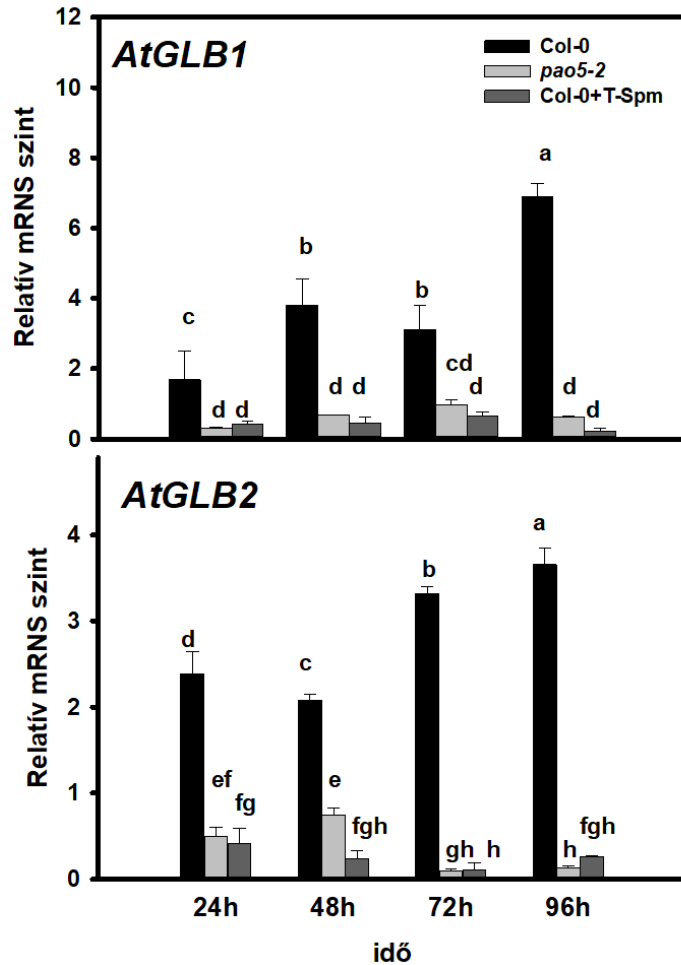
Vad típusú növényeknél mindkét gén expressziós szintje növekedett a CK-indukció után 72-96 órával, azaz a hajtás promerisztémák kialakulásakor. Az *AtGLB2* expressziós szintjének növekedése már a mitotikus osztódási szünet után (CK indukció után 24 órával) megfigyelhető volt (**21. ábra B**), míg az *AtGLB1* relatív transzkript szintje csak a szervezdemények megjelenésekor (CK indukció után 48 órával) emelkedett meg jelentősebb mértékben (**21. ábra A**).

Ezzel ellentétben, mindkét hemoglobin gén relatív transzkript szintje csökkent külső T-Spm kezelés hatására a vad típusú növényekben és *pao5-2* mutánsban a vad típusú kezeletlen növényekhez képest az összes vizsgált időpontban (**22. ábra**).



21. ábra: Az *AtGLB1* és *AtGLB2* kifejeződése vad típusú növényekben

A HEMOGLOBIN 1 (*AtGLB1*) (A) és *AtGLB2* (B) gének expressziójának változása a vad típusú *Col-0* növényekben az oldalgyökér primordiumokból történő direkt hajtásmerisztéma kialakulása során a mitotikus osztódási szünet (24 óra), a szervezdemények megjelenésének (48 óra), a korai (72 óra) és a kései (96 óra) hajtás promerisztéma kialakulásának fázisaiban. Referencia a hatnapos csíranövények gyökerének (kontroll) mRNS szintje, értéke: 1. Az oszlopokon a hibasávok a standard hibát mutatják. Az egyszempontos varianciaanalízist követően a Duncan-féle tesztet alkalmaztuk. A különböző betűvel jelölt átlagok szignifikánsan különböznek egymástól ($P \leq 0,05$).

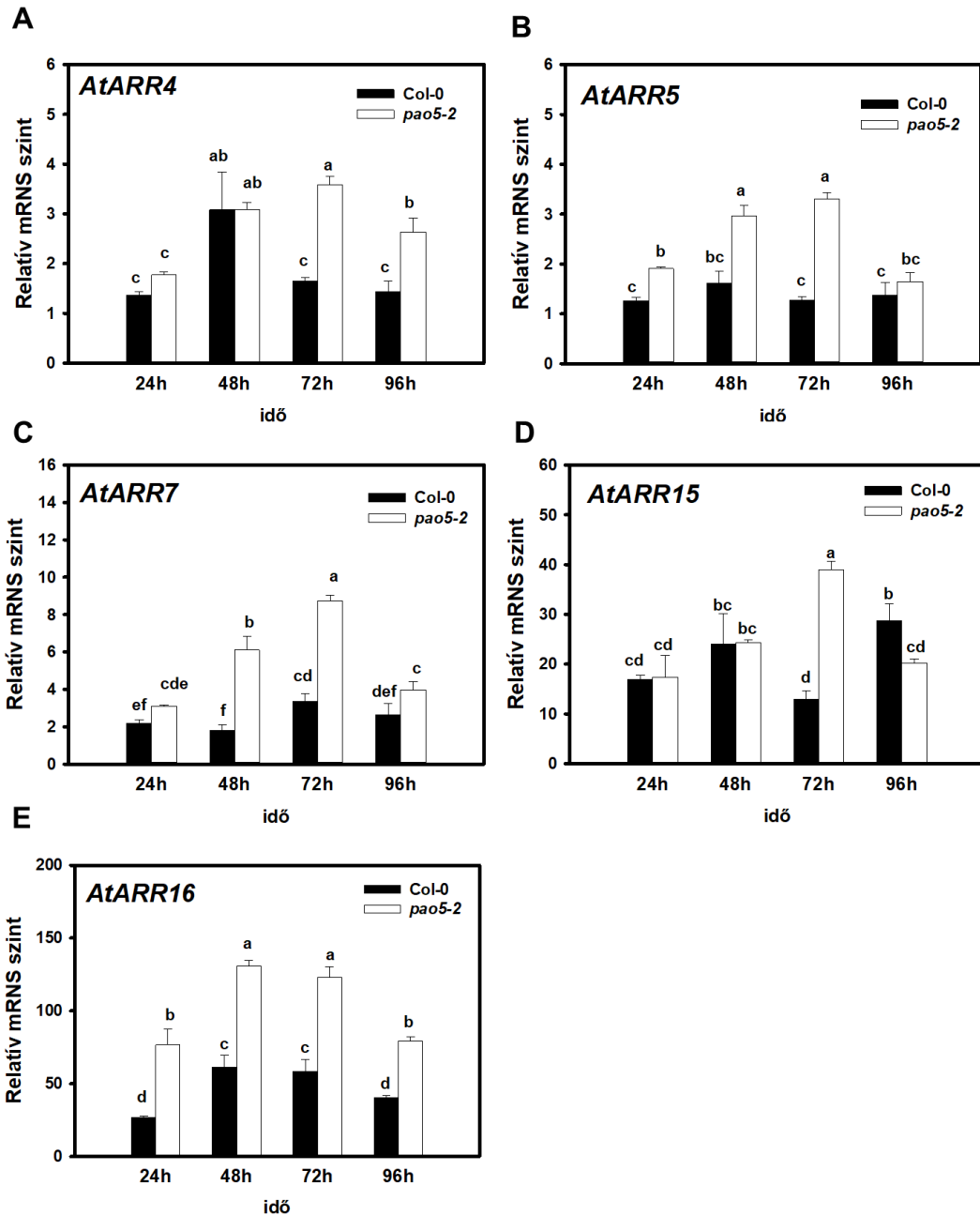


22. ábra: A GLB gének expressziójának változása *Atpao5*-mutáns növényben és T-Spm kezelés hatására

A HEMOGLOBIN 1 (*AtGLB1*) (A) és *AtGLB2* (B) gének expressziójának változása a vad típusú *Col-0* és az *Atpao5*-mutáns (*pao5-2*) növényekben, valamint a vad típusú *Col-0* növényekben 100 μ M T-Spm kezelés hatására az oldalgyökér primordiumokból történő direkt hajtásmerisztéma kialakulása során a mitotikus osztódási szünet (24 óra), a szervezdemények megjelenésének (48 óra), a korai (72 óra) és a kései (96 óra) hajtás promerisztéma kialakulásának fázisaiban. Referencia a hatnapos csíranövények gyökerének (kontroll) mRNS szintje, értéke: 1. Az oszlopokon a hibasávok a standard hibát mutatják. Az egyszempontos varianciaanalízist követően a Duncan-féle tesztet alkalmaztuk. A különböző betűvel jelölt átlagok szignifikánsan különböznek egymástól ($P \leq 0,05$).

Arabidopsis indirekt hajtás organogenezise során a GLB1 és GLB2 a CK érzékenységre az érzékelésben és jelátvitelben szereplő egyes gének kifejeződésének módosítása által hatnak. Kimutatták, hogy ektópikus túltermeltetésük gátolja az A-ARR-ek, a citokinin jelátvitel feedback represszorainak, kifejeződését (Wang és mtsai., 2011).

Ezzel összhangban a vizsgált A-ARR-ek közül az *AtARR5*, *AtARR7* és *AtARR16* (**23. ábra B, C, E**) relatív expressziója a *pao5-2* mutánsban már a CK indukciót követő 24 órával megemelkedett és a kései promerisztemák kialakulásáig (CK indukció után 96 óra) magas maradt a vad típushoz képest. Az *AtARR4* és *AtARR15* mRNS szintje is magasabb volt a mutánsban, mint a vad típusban azonban csak a promerisztema kialakulásának időpontjától (CK indukciót követő 72 óra) (**23. ábra A, D**).



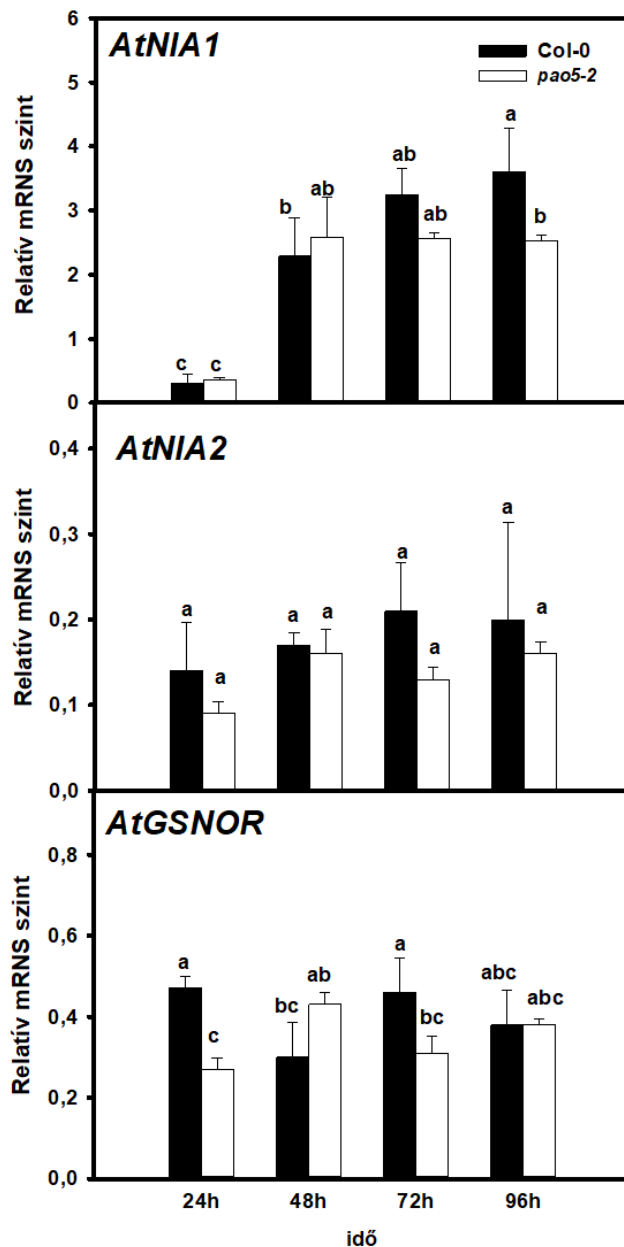
23. ábra: Az A-ARR gének kifejeződése vad típusú és Atpao5-mutáns növényekben

Az A-típusú válaszregulátor (A-ARR) gének kifejeződése a vad típusú Col-0 és Atpao5-mutáns (pao5-2) növényekben az oldalgyökér primordiumokból történő direkt hajtásmerisztéma kialakulása során a mitotikus osztódási szünet (24 óra), a szervezdemények megjelenésének (48 óra), a korai (72 óra) és a kései (96 óra) hajtás promerisztéma kialakulásának fázisaiban. Referencia a hatnapos csíranövények gyökerének (kontroll) mRNS szintje, értéke: 1. Az oszlopokon a hibásávok a standard hibát mutatják. Az egyszempontos varianciaanalízist követően a Duncan-féle tesztet alkalmaztuk. A különböző betűvel jelölt átlagok szignifikánsan különböznek egymástól ($P \leq 0,05$).

5.5 Az NO hatása az AtPAO5 függő OGYP-HM konverzió hatékonyságára

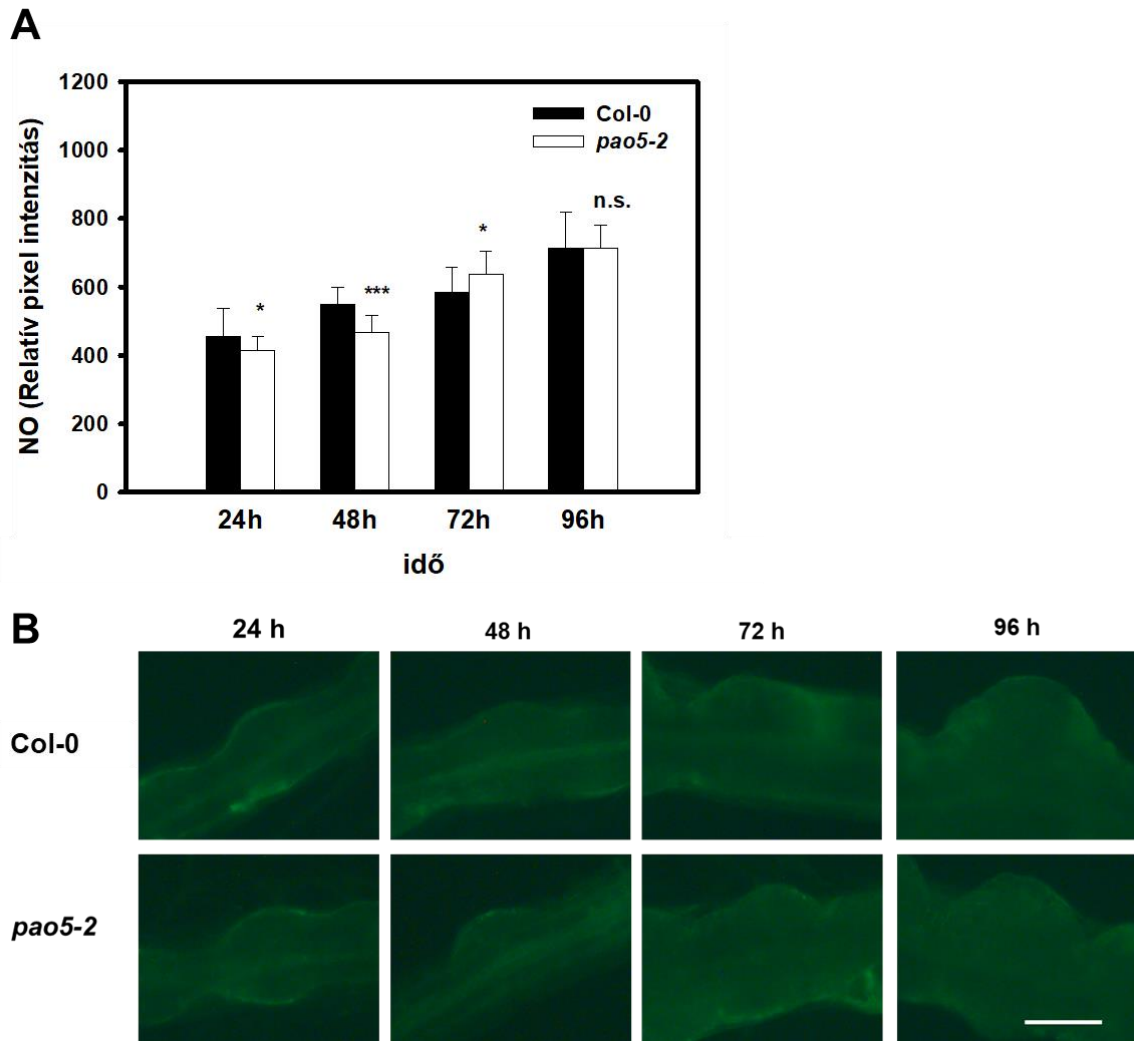
Miután a hemoglobinok *in planta* nitrogén-monoxid (NO) scavengerek (Shen és mtsai., 2013) továbbá a CK és a NO antagonisztikus és szinergisztikus kapcsolata is ismert (Sanz és mtsai., 2015), a következőkben megnéztük, hogy milyen szerepe van a nitrogén-monoxidnak a CK-indukált direkt hajtásmerisztéma kialakulásának folyamatában AtPAO5/ T-Spm-függő módon. Ennek érdekében vizsgáltuk a NO metabolizmusban résztvevő enzimeket kódoló gének expresszióját, illetve azt, hogy miként változik a NO szintje a vad típusú és *pao5-2* mutáns növényekben.

Az *AtNIA1* relatív expressziója szignifikánsan nőtt a HM kialakulásának valamennyi fázisában mind a vad típusú, mind pedig a *pao5-2* mutáns növényekben, bár az utóbbi esetén ez kisebb mértékű volt a késői promerisztémák kialakulása során (CK indukció után 96 óra) (**24. ábra A**). Az *AtNIA2*, valamint az *AtGSNOR1* relatív transzkript szintje nem változott az OGYP – HM konverzió alatt sem a vad típusú sem a *pao5-2* mutáns növényekben (**24. ábra B, C**). A génexpressziós változásokkal megegyezően, NO szintjükben a vad típusú és a *pao5-2* mutáns növények csak kis mértékben és átmenetileg különböztek egymástól (**25. ábra**). Miután az *AtNIA1* relatív expressziója az OGYP-HM konverzió során mind a vad típusú, mind pedig a *pao5-2* mutáns növényekben megemelkedett, a NO szerepe a CK jelátvitelben a direkt hajtásmerisztémák kialakulása során nem igazolható.



24. ábra: Az NO homeosztázisát szabályozó enzimeket kódoló gének expressziója vad típusú és *pao5-2* mutáns növényekben

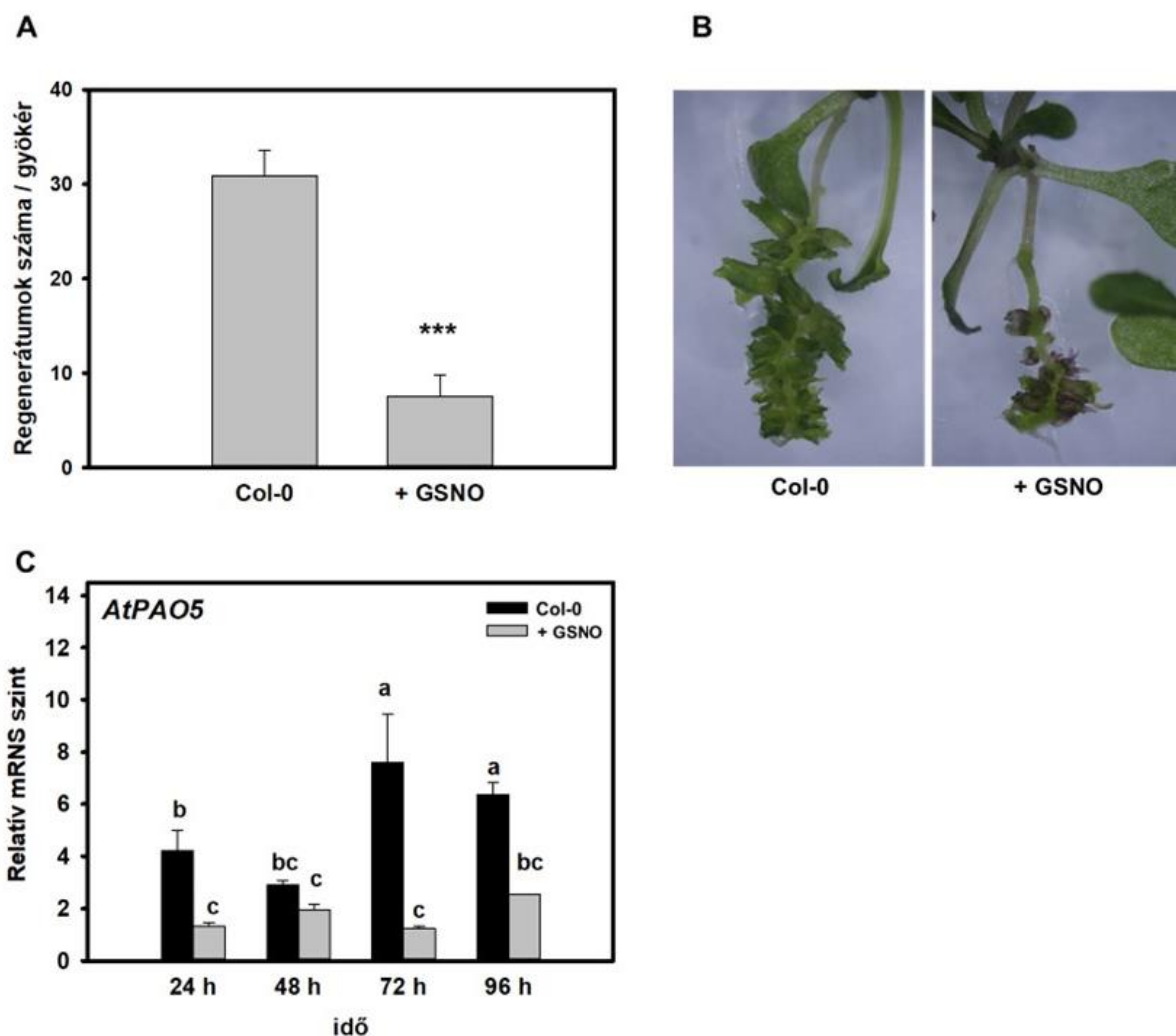
Az *AtNIA1* (NITRATE REDUCTASE 1), *AtNIA2* és *AtGSNOR1* (S-NITROSOGLUTATHIONE REDUCTASE 1) gének kifejeződése a vad típusú *Col-0* és *pao5-2* mutáns növényekben az oldalgyökér primordiumokból történő direkt hajtásmerisztéma kialakulása során a mitotikus osztódási szünet (24 óra), a szervezdemények megjelenésének (48 óra), a korai (72 óra) és a kései (96 óra) hajtás promerisztéma kialakulásának fázisaiban. Referencia a hatnapos csíranövények gyökerének (kontroll) mRNS szintje, értéke: 1. Az oszlopokon a hibasávok a standard hibát mutatják. Az egyszempontos varianciaanalízist követően a Duncan-féle tesztet alkalmaztuk. A különböző betűvel jelölt átlagok szignifikánsan különböznek egymástól ($P \leq 0,05$).



25. ábra: A NO szintjének változása a vad típusú és *Atpao5*-mutáns növényekben

A DAF-FM DA festett vad típusú *Col-0* és *Atpao5*-mutáns (*pao5-2*) növények NO-függő fluoreszcenciájából számolt pixel intenzitás diagramja (A) és reprezentatív képei (B). A képek készítése és a pixel intenzitás mérése a mitotikus osztódási szünet (24 óra), a szervezdemények megjelenésének (48 óra), a korai (72 óra) és a kései (96 óra) hajtás promeriszteuma kialakulásának fázisaiban történt. Az oszlopokon a hibasávok a standard hibát mutatják. A szignifikancia meghatározása Student féle *t* teszt *p* értéke alapján történt, ahol a * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; n.s.: nem szignifikáns különbség. Mércse: 100 μm

Érdekes módon külső NO donor, GSNO kezelés alkalmazása szignifikánsan csökkentette a vad típusú növények gyökerén kialakuló hajtások számát a kontrollhoz viszonyítva (26. ábra A, B) illetve az *AtPAO5* relatív expresszióját (26. ábra C) a mitotikus osztódási szünettől kezdve (CK indukció 24 óra) az összes vizsgált időpontban.



26. ábra: A GSNO kezelés hatása a regenerátum számra és az *AtPAO5* kifejeződésére

A külsőleg alkalmazott 10 μ M GSNO kezelés hatása a regenerációs hatékonyságra vad-típusú Col-0 növények gyökerén a citokinin indukciót követő 10. napon (A). A CK kezelt vad típusú Col-0 növények, valamint a GSNO kezelés hatását bemutató reprezentatív képek (B). Az oszlopokon a hibásávok a standard hibát mutatják. A szignifikancia meghatározása Student féle *t* teszt *p* értéke alapján történt, ahol a * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$. (C) Az *AtPAO5* gén kifejeződése a GSNO kezelt és nem kezelt növényekben a mitotikus osztódási szünet (24 óra), a szervezdemények megjelenésének (48 óra), a korai (72 óra) és a kései (96 óra) hajtás promeriszteuma kialakulásának fázisaiban. Referencia a hatnapos csíranövények gyökerének (kontroll) mRNS szintje, értéke: 1. Az oszlopokon a hibásávok a standard hibát mutatják. Az egyszempontos varianciaanalízist követően a Duncan-féle tesztet alkalmaztuk. A különböző betűvel jelölt átlagok szignifikánsan különböznek egymástól ($P \leq 0,05$).

6. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

A poliaminok szerepét a növényi morfogenezisben és az indirekt organogenezisben számos kísérleti rendszerben bizonyították, azonban részvételüket a direkt organogenezis szabályozásában mindez idáig nem tanulmányozták. Miután a PA-ok, a PAO5, a hemoglobinok és a nitrogén-monoxid is hatással lehetnek a CK jelátvitel szabályozására, munkám során célom volt ennek vizsgálata egy erősen citokinin-függő folyamatban, az oldalgyökér primordiumok CK-indukált direkt úton történő hajtásmerisztémává való átalakulásában, annak is négy szakaszában: a mitotikus osztódási szünet, a szervkezdemények kialakulása, a korai és késői promerisztémák megjelenése során.

Sok növényfajnál sikeresen alkalmaztak külső PA kezeléseket a szomatikus embriogenezis és organogenezis hatékonyságának fokozására genotípus és koncentráció függő módon (Nandy és mtsai., 2022). Ismert továbbá az is, hogy kapcsolat áll fenn a regenerációs képesség és az endogén PA-ok szintje között. Kimutatták, hogy az *AtSAMDC2* csendesítése RNS interferenciával csökkentette a hajtás regenerációt Arabidopsisban (Hu és mtsai., 2006), valamint a SAMDC aktivitás és a spermidin szint növekedése magasabb embriogén választ eredményezett lucernában (Huang és mtsai., 2001). Ezek alapján elmondható, hogy a poliaminok bioszintézisének fokozódása jelentős a regenerációs folyamatok szempontjából.

Korábbi megfigyelésekkel megegyezően (Hu és mtsai., 2006; Lim és mtsai., 2006; Gill és Tuteja, 2010), azt találtuk, hogy a magas endogén Spd/Put arány, kapcsolatban áll a regeneráció hatékonyságával (**9. ábra**). Ezeknek a poliaminoknak (Spd>Put) a külső alkalmazása szintén növeli a regenerációs hatékonyságot, megerősítve szerepüket a folyamatban (**9. ábra B, C**).

Ezzel összhangban, az OGYP-ok HM-vá történő átalakulása során fokozódott a Spd bioszintézissel kapcsolt gének, az *AtADC1*, az *AtSAMDC2* és *AtSAMDC4*, az *AtSPDS1* és *AtSPDS2* relatív expressziója (**10. ábra A, B, D**).

Miután a Put szintje csak kis mértékben és átmenetileg emelkedett meg (**9. ábra A**), feltételeztük, hogy a keletkezett Put gyorsan lebomlott vagy spermidinné alakult. Utóbbi feltételezésünket alátámasztotta az *AtASPDS1* és *AtSPDS2* transzkript szintjének (**10. ábra B**) és az endogén Spd szintjének növekedése (**9. ábra A**) az oldalgyökér primordiumok hajtásmerisztémává történő átalakulása során.

Az endogén poliaminok szintje nemcsak szintézisük, hanem lebontásuk és átalakulásuk által is szabályozott (Lim és mtsai., 2006; Kim és mtsai., 2014; Tavladoraki és mtsai., 2016). A poliaminok konverziójában Arabidopsisban öt poliamin oxidáz (AtPAO1-AtPAO5) vesz részt. A vizsgált PAO-k közül egyedül az *AtPAO5* expressziójának szintje emelkedett meg (**11. ábra**). Mindemellett 35S::PAO5 túltermelő növényekben nőtt a regenerációs hatékonyság (**12. ábra A, B**), illetve fokozódott az *AtESR1* és *AtESR2* relatív expressziós szintje (**13. ábra A, B**), ami megerősítette az *AtPAO5* részvételét és szabályozó szerepét a direkt hajtásmerisztémák kialakulása során. 35S::PAO5 túltermelő növényekben, fiziológias körülmények mellett a Spd szint közel kétszeres volt a vad típushoz képest (**14. ábra**). A túltermelő növényekben mért magas Spd/Put arány szintén alátámaszthatja azt, hogy a PAO5 a T-Spm/Spd homeosztázis szabályozásán keresztül befolyásolja az OGYP-HM átalakulását. Érdekes módon korábban, indirekt organogenezis vizsgálata során azt találták, hogy *AtPAO5*-túltermelő növényekben csökkent a Spd szint, mindez pedig csökkent regenerációs hatékonysággal járt együtt (Lim és mtsai., 2006). Ennek feltehetően az az oka, hogy a PA-k és azok metabolizmusa kontextus függő módon befolyásolja lúdfűben a hajtás regenerációját.

Korábban kimutatták, hogy a ROF akkumulációja kisebb mértékű az *Atpao5* mutánsban, mint a vad típusban (Ferdousy és mtsai., 2020). Ez megerősíti azt az elképzelést, miszerint az *AtPAO5* részt vesz a ROF homeosztázis szabályozásában. Mindez alapján pedig feltételezhető, hogy PAO-k a PA-k lebontásából származó H₂O₂ révén vesznek részt a regenerációs folyamatok szabályozásában. 35S::PAO5 túltermelő növényekben ennek megfelelően az OGYP HM-vá történő átalakulása során nőtt a ROF szintje a vad típushoz képest (**15. ábra A, B**), azonban azt, hogy a PAO5 a megnövekedett ROF szinteken keresztül javítja a regenerációs hatékonyságot, nem sikerült igazolni. Fontos megjegyezni, hogy az *AtPAO1-4* is képes a Spm visszaalakítására és a Spd, valamint a Spm lebontására, így módon pedig ROF termelésre, viszont kísérleti rendszerünkben csak az *AtPAO5* mutatott emelkedett expressziós szintet (**11. ábra**) a direkt HM kialakulása során, a többi *AtPAO* nem.

Mindemellett, az *AtPAO2*-t túltermelő (35S::PAO2) növényekben nem nőtt a regenerációs hatékonyság a vad típushoz képest (**16. ábra A, B**). Ez feltételezi, hogy az *AtPAO5* specifikus szerepet tölt be a direkt hajtásregeneráció folyamatában. Az *AtPAO5* nagy affinitással bír a T-Spm, mint szubsztrát iránt. A PAO5 általában nem a H₂O₂ keletkezésével, hanem a T-Spm homeosztázis szabályozásán keresztül vesz részt a növények növekedési és fejlődési folyamatainak szabályozásában (Kim és mtsai., 2014; Alabdallah és mtsai., 2017;

Wang és mtsai., 2019). Így feltételeztük, hogy az AtPAO5 az OGYP-HM direkt átalakulásra is a T-Spm-szint szabályozásán keresztül hat.

Ennek bizonyításához a vad típushoz képest megközelítőleg kétszeres endogén T-Spm-szinttel rendelkező (Kim és mtsai., 2014) *pao5-2* mutáns vonalat használtunk. A 35S::PAO5 túltermelő növények vizsgálata során kapott eredményekkel összhangban azt találtuk, hogy a *pao5-2* mutáns növényeken a vad típushoz képest kisebb számú regenerátum jelent meg (**17. ábra A, B**). Továbbá a vad típusú növények H₂O₂-dal történő külső kezelése (**18. ábra A, B**) nem, viszont T-Spm-el történő kezelése (**19. ábra A, B**) csökkentette a képződött regenerátumok számát a kezeltlen vad típusú növényekhez képest. ROF szintjükben azonban a vad típusú és a *pao5-2* mutáns növények az OGYP-HM konverzió során nem mutattak különbséget (**20. ábra A, B**). Mindez megerősítette azt a feltételezésünket, hogy az AtPAO5 nem a ROF szintek növelésével, hanem a T-Spm homeosztázis szabályozásával vesz részt az OGYP-HM direkt átalakulás szabályozásában.

A T-Spm-kezelt vad típusú és *pao5-2* növények génexpressziós elemzése kimutatta, hogy a T-Spm homeosztázisban bekövetkező változások számos sejtfolymatot befolyásolnak (Sagor és mtsai., 2021). A szövettani elemzések kimutatták, hogy az AtPAO5 által szabályozott T-Spm-szint specifikusan hozzájárul a szállítószövet differenciálódásához (Alabdallah és mtsai., 2017). Alabdallah és munkatársai (2017) bizonyították, hogy az AtPAO5 szükséges a xilém differenciálódás során a megfelelő auxin- és citokinin-jelátvitel fenntartásához. Vizsgálták többek között a citokinin jelátvitel negatív feed-back szabályozóinak, az A-típusú válaszregulátorok (*ARR 4,5,7,15,16*) expressziós változását, *AtPAO5*-t túltermelő és *pao5-2* mutáns növényekben. Kimutatták, hogy bár normál növekedési körülmények között nincs különbség ezeknek a géneknek a kifejeződésében, citokinin kezelés hatására a vad típushoz képest kevésbé indukálódnak a túltermelő és jobban a mutáns vonalakban. Érdekes módon az *AtGLB1* és *AtGLB2* hemoglobinok ugyanezeknek az ARR represszoroknak az alulszabályozása mellett fokozták a citokinin érzékenységet és növelték a gyökerek indirekt hajtásregenerációs képességét (Wang és mtsai., 2011).

Az AtPAO5 és a GLB-k közötti potenciális kapcsolat megállapítása érdekében a citokinin-által indukált direkt HM kialakulása során, megvizsgáltuk az *AtGLB1* és 2 expresszióját. Azt találtuk, hogy mindkét gén, de különösen az *AtGLB1* erősen expresszálódott a promeriszta kialakulás szakaszában a citokinin kezelt vad típusú növények gyökerében (**21. ábra A, B**), ugyanakkor kifejeződésük csökkent a *pao5-2*, illetve a T-Spm-kezelt vad típusú növényekben az OGYP-HM átalakulás valamennyi szakaszában (**22. ábra A, B**).

Mindemellett, az A-ARR gének relatív expressziója is magasabb volt a *pao5-2* gyökerekben a vad típushoz képest. Mindez azt mutatja, hogy az AtPAO5 az AtGLB-k előtt hat, és a citokinin érzékenységet valószínűleg a T-Spm-szint fenntartásán keresztül szabályozza. Az, hogy a T-Spm és a hemoglobinok milyen jelátviteli útvonalakon keresztül szabályozhatják a génexpressziót, még nem ismert.

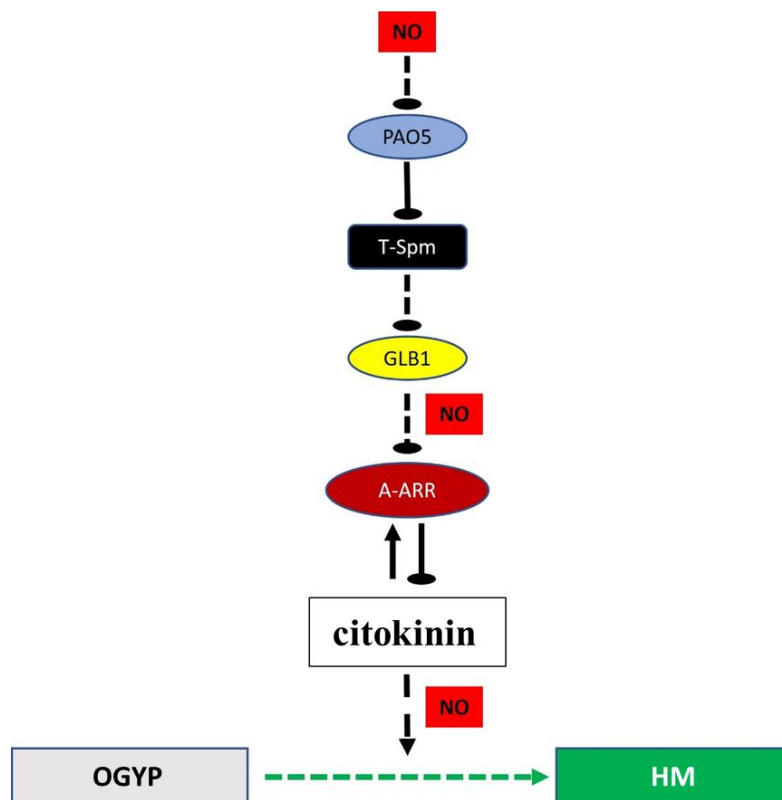
A hemoglobinok a NO ismert scavengerei (Hebelstrup és mtsai., 2013) a NO-ról pedig kimutatták, hogy közvetíti a citokinin génszabályozásra gyakorolt hatását (Shen és mtsai., 2013). Lehetséges, hogy az AtGLB-k a NO-szint szabályozásán keresztül megakadályozzák a citokinin jelátvitel negatív visszacsatolás által történő szabályozását. Azt a lehetőséget azonban, hogy a citokinin jelátvitelben a NO másodlagos hírvivőként szolgál, NO donorral és scavengerrel végzett vizsgálatok nem erősítették meg, legalábbis hatása nem az AtARR5 gén indukcióján keresztül történik. Mindez alapján feltételezhető, hogy a NO más módon hat a citokinin válaszokra (Romanov és mtsai., 2008).

Az NO hatása a citokinin jelátvitelre lehet szinergista vagy antagonist (Sanz és mtsai., 2015). Mindemellett több tanulmányban is kimutatták, hogy a NO anyagcseréjét befolyásolhatják a poliaminok és azok katabolizmusa (Benkő és mtsai., 2020; Tun és mtsai., 2001; Wimalasekera és mtsai., 2011). Ugyanakkor a poliamin anyagcserét is befolyásolhatja a NO (Tailor és mtsai., 2019). Sóstressznek kitett napraforgóban a NO a PA szintézis fokozása révén, valamint a PAO aktivitás csökkentésén keresztül, növelte a Spm-szintet (Tailor és mtsai., 2019).

Kísérleti rendszerünkben a NO metabolizmusban részt vevő gének közül csak az *AtNIAI* relatív mRNS szintje emelkedett meg, mind a vad típusú, mind a *pao5-2* mutáns növényekben a CK-indukált HM képződés során (**24. ábra A**). Bár ez az emelkedés a *pao5-2* vonalban kisebb mértékű volt a promerisztemák kialakulásakor (**24. ábra A**), a két vonal közt a NO szintben nem találtunk különbséget (**25. ábra A, B**).

Az NO-donor GSNO csökkentette az *AtPAO5* expresszióját (**26. ábra C**) és a direkt HM-képződés hatékonyságát (**26. ábra A, B**), ami azt jelzi, hogy a NO negatívan szabályozhatja a citokinin érzékenységet az AtPAO5-öt megelőzően. Azonban úgy tűnik, a NO csak nagy koncentrációban befolyásolhatja közvetve a folyamatot és megfigyelésünk fiziológiai körülmények között kevésbé lehet releváns. Ezt támasztják alá az előzőekben bemutatott eredményeink is, miszerint az endogén NO-szint nem mutat korrelációt a regenerációs folyamattal, és nem mutat különbséget a vad típusú és a *pao5-2* mutáns gyökerek között (**25. ábra A, B**).

A kapott eredményeink alapján felállítottunk egy hipotetikus modellt, mely magyarázhatja az AtPAO5 szerepét a citokinin-indukált direkt HM konverzióban (27. ábra). E szerint az AtPAO5 által fenntartott T-Spm homeosztázis szükséges a laterális OGYP-ből történő hatékony citokinin-indukált HM képződéshez. A magas T-Spm-szint negatívan szabályozza, eddig ismeretlen módon, az *AtGLB1* és *AtGLB2* expresszióját. Ezek a hemoglobinok közismert módon befolyásolják a CK érzékenységet. Az AtPAO5 hiánya, a megnövekedett T-Spm-szint csökkenti az *AtGLB1/2* relatív expresszióját, ugyanakkor növeli az A-ARR gének relatív transzkript szintjét, ami által csökkenti a CK érzékenységet. Habár ez összefüggésben lehet a GLBk NO kioltó képességével, kísérleti rendszerünkben ezt nem tudtuk bizonyítani, viszont azt találtuk, hogy a magas NO szint csökkenti az *AtPAO5* expresszióját és a regeneráció hatékonyságát (26. ábra)



27. ábra: Az *AtPAO5* citokinin-indukált oldalgökér primórdium (OGYP) - hajtásmerisztéma (HM) konverzióban betöltött szerepét bemutató hipotetikus modell

Használt rövidítések: OGYP: oldalgökér primórdium; HM: hajtásmerisztéma, PAO5: poliamin oxidáz 5, T-Spm: termospermin, GLB1: HEMOGLOBIN 1, A-ARR: A-típusú válaszregulátor, NO: nitrogén-monoxid. A hegyes végű nyilak aktivációt, kerek végű nyilak inaktivációt, a szaggatott vonalak nem közvetlen kölcsönhatást jelölnek. Bővebb magyarázat a szövegben.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőimnek, **Prof. Dr. Fehér Attilának** és **Pichererné Dr. Gémes Katalinnak** a témaválasztásért, és hogy szakmai tudásukkal, tanácsaikkal, javaslataikkal és ötleteikkel segítettek szakmai fejlődésem, munkám és a PhD disszertációm megírását.

Külön köszönet illeti Dr. Bernula Dórát és Benkő Pétert. Köszönöm Nektek, hogy bármikor fordulhattam hozzátok tanácsért, segítségért és hogy a napi munka is mindig vidáman telt.

Szeretném megköszönni Dr. Magyar Zoltánnak, a Szegedi Biológiai Kutató Központ Növényi Morfogenezis Szabályozása Csoport vezetőjének, hogy csoportjában lehetőséget biztosított munkám elvégzéséhez.

Köszönet illeti a Növényi Morfogenezis Szabályozása Csoport minden munkatársát mind a szakmai segítségért mind pedig a jó hangulatért. Hálával tartozom Nagy Rózának munkájáért, segítőkészségéért.

Köszönöm a Növénybiológiai Tanszék dolgozóinak, hogy segítettek munkámat.

Köszönöm Dr. Szepesi Ágnes és Ördögné Dr. Kolbert Zsuzsanna segítségét.

Külön köszönet illeti Dr. Molnár Árpádot. Köszönöm a segítséged a munkában, a remek hangulatot és a felejthetetlen pillanatokot.

Hálával tartozom férjemnek és édesapámnak, akik tanulmányaim és munkám során mindvégig kitartottak mellettem. Köszönöm támogatásukat és megértésüket. Köszönöm a családomnak és barátaimnak türelmüket.

IDÉZETT KÖZLEMÉNYEK

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. *Journal of Experimental Botany*, 65(6), 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. *Journal of Experimental Botany*, 68(5), 997–1012. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw510>

Alamillo, J. M., & García-Olmedo, F. (2001). Effects of urate, a natural inhibitor of peroxynitrite-mediated toxicity, in the response of *Arabidopsis thaliana* to the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *The Plant Journal*, 25(5), 529–540. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.00984.x>

Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., Carrasco, P., & Tiburcio, A. F. (2010). Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta*, 231(6), 1237–1249. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1130-0>

Alcázar, R., García-Martínez, J. L., Cuevas, J. C., Tiburcio, A. F., & Altabella, T. (2005). Overexpression of ADC2 in *Arabidopsis* induces dwarfism and late-flowering through GA deficiency. *The Plant Journal*, 43(3), 425–436. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02465.x>

Alharbi, B., Hunt, J. D., Dimitrova, S., Spadafora, N. D., Cort, A. P., Colombo, D., Müller, C. T., Ghuge, S. A., Davoli, D., Cona, A., Mariotti, L., Picciarelli, P., de Graaf, B., & Rogers, H. J. (2020). Mutation of Arabidopsis Copper-Containing Amine Oxidase Gene AtCuAO δ Alters Polyamines, Reduces Gibberellin Content and Affects Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7789. <https://doi.org/10.3390/ijms21207789>

Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., ... Ecker, J. R. (2003). Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 301(5633), 653–657. <https://doi.org/10.1126/science.1086391>

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*. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00132>

Anwar, R., Mattoo, A. K., & Handa, A. K. (2015). Polyamine Interactions with Plant Hormones: Crosstalk at Several Levels. In *Polyamines* (o. 267–302). Springer Japan. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55212-3_22

Aragão, V. P. M., de Souza Ribeiro, Y. R., Reis, R. S., Macedo, A. F., Floh, E. I. S., Silveira, V., & Santa-Catarina, C. (2016). In vitro organogenesis of *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae): the involvement of endogenous polyamines and carbohydrates on shoot development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 124(3), 611–620. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0919-8>

Asija, S., Seth, T., Umar, S., & Gupta, R. (2022). Polyamines and Their Crosstalk with Phytohormones in the Regulation of Plant Defense Responses. *Journal of Plant Growth Regulation*. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10837-5>

Astier, J., Gross, I., & Durner, J. (2018). Nitric oxide production in plants: an update. *Journal of Experimental Botany*, 69(14), 3401–3411. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx420>

Atta, R., Laurens, L., Boucheron-Dubuisson, E., Guivarc'h, A., Carnero, E., Giraudat-Pautot, V., Rech, P., & Chriqui, D. (2009). Pluripotency of *Arabidopsis* xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown in vitro. *The Plant Journal*, 57(4), 626–644. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03715.x>

Avivi, Y., Morad, V., Ben-Meir, H., Zhao, J., Kashkush, K., Tzfira, T., Citovsky, V., & Grafi, G. (2004). Reorganization of specific chromosomal domains and activation of silent genes in plant cells acquiring pluripotentiality. *Developmental Dynamics*, 230(1), 12–22. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20006>

Baron, K., & Stasolla, C. (2008). The role of polyamines during in vivo and in vitro development. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 44(5), 384–395. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9176-4>

Belda-Palazón, B., Ruiz, L., Martí, E., Tárraga, S., Tiburcio, A. F., Culiáñez, F., Farràs, R., Carrasco, P., & Ferrando, A. (2012). Aminopropyltransferases Involved in Polyamine Biosynthesis Localize Preferentially in the Nucleus of Plant Cells. *PLoS ONE*, 7(10), e46907. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046907>

Beligni, M. V., & Lamattina, L. (2000). Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta*, 210(2), 215–221. <https://doi.org/10.1007/PL00008128>

Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G., & Friml, J. (2003). Local, Efflux-Dependent Auxin Gradients as a Common Module for Plant Organ Formation. *Cell*, 115(5), 591–602. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00924-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00924-3)

- 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), 2488. <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. *Journal of Plant Physiology*, 244, 153085. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.153085>
- Berckmans, B., Vassileva, V., Schmid, S. P. C., Maes, S., Parizot, B., Naramoto, S., Magyar, Z., Kamei, C. L. A., Koncz, C., Bögre, L., Persiau, G., De Jaeger, G., Friml, J., Simon, R., Beeckman, T., & De Veylder, L. (2011). Auxin-Dependent Cell Cycle Reactivation through Transcriptional Regulation of Arabidopsis E2Fa by Lateral Organ Boundary Proteins. *The Plant Cell*, 23(10), 3671–3683. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.088377>
- 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 (PCTOC)*, 140(2), 327–339. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01730-3>
- Bethke, P. C., Badger, M. R., & Jones, R. L. (2004). Apoplastic Synthesis of Nitric Oxide by Plant Tissues. *The Plant Cell*, 16(2), 332–341. <https://doi.org/10.1105/tpc.017822>
- Bethke, P. C., Libourel, I. G. L., & Jones, R. L. (2006). Nitric oxide reduces seed dormancy in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 57(3), 517–526. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj060>
- Birnbaum, K. D., & Sánchez Alvarado, A. (2008). Slicing across Kingdoms: Regeneration in Plants and Animals. *Cell*, 132(4), 697–710. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.040>
- Boerjan, W., Cervera, M. T., Delarue, M., Beeckman, T., Dewitte, W., Bellini, C., Caboche, M., Van Onckelen, H., Van Montagu, M., & Inzé, D. (1995). Superroot, a recessive mutation in Arabidopsis, confers auxin overproduction. *The Plant Cell*, 7(9), 1405–1419. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.9.1405>
- Bredt, D. S., & Snyder, S. H. (1992). Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*, 8(1), 3–11. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90104-L](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90104-L)
- Buechel, S., Leibfried, A., To, J. P., Zhao, Z., Andersen, S. U., Kieber, J. J., & Lohmann, J. U. (2010). Role of A-type ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS in meristem maintenance and regeneration. *European journal of cell biology*, 89(2-3), 279–284. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2009.11.016>

- Chang, W., Guo, Y., Zhang, H., Liu, X., & Guo, L. (2020). Same Actor in Different Stages: Genes in Shoot Apical Meristem Maintenance and Floral Meristem Determinacy in Arabidopsis. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00089>
- Chatfield, S. P., Capron, R., Severino, A., Penttila, P.-A., Alfred, S., Nahal, H., & Provart, N. J. (2013). Incipient stem cell niche conversion in tissue culture: using a systems approach to probe early events in WUSCHEL dependent conversion of lateral root primordia into shoot meristems. *The Plant Journal*, 73(5), 798–813. <https://doi.org/10.1111/tpj.12085>
- Che, P., Lall, S., & Howell, S. H. (2007). Developmental steps in acquiring competence for shoot development in Arabidopsis tissue culture. *Planta*, 226(5), 1183–1194. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0565-4>
- 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. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01945>
- Cheng, W.-H., Wang, F.-L., Cheng, X.-Q., Zhu, Q.-H., Sun, Y.-Q., Zhu, H.-G., & Sun, J. (2015). Polyamine and Its Metabolite H₂O₂ Play a Key Role in the Conversion of Embryogenic Callus into Somatic Embryos in Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01063>
- Corpas, F. J., & Barroso, J. B. (2013). Nitro-oxidative stress vs oxidative or nitrosative stress in higher plants. *New Phytologist*, 199(3), 633–635. <https://doi.org/10.1111/nph.12380>
- Corpas, F. J., Barroso, J. B., Carreras, A., Valderrama, R., Palma, J. M., León, A. M., Sandalio, L. M., & del Río, L. A. (2006). Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta*, 224(2), 246–254. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0205-9>
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M., & Lamattina, L. (2004). Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta*, 218(6), 900–905. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1172-7>
- Crawford, N. M. (2006). Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *Journal of Experimental Botany*, 57(3), 471–478. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj050>
- Crocomo, O. J., Basso, L. C., & Brasil, O. G. (1970). Formation of N-carbamylputrescine from citrulline in *Sesamum*. *Phytochemistry*, 9(7), 1487–1489. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85264-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85264-4)
- Cui, X., Ge, C., Wang, R., Wang, H., Chen, W., Fu, Z., Jiang, X., Li, J., & Wang, Y. (2010). The BUD2 mutation affects plant architecture through altering cytokinin and auxin responses in Arabidopsis. *Cell Research*, 20(5), 576–586. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.51>

Curtis, I. S., Nam, H. G., & Sakamoto, K. (2004). Optimized Shoot Regeneration System for the Commercial Korean Radish 'Jin Ju Dae Pyong'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77(1), 81–87. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000016536.80238.ef>

De Rybel, B., Vassileva, V., Parizot, B., Demeulenaere, M., Grunewald, W., Audenaert, D., Van Campenhout, J., Overvoorde, P., Jansen, L., Vanneste, S., Möller, B., Wilson, M., Holman, T., Van Isterdael, G., Brunoud, G., Vuylsteke, M., Vernoux, T., De Veylder, L., Inzé, D., ... Beeckman, T. (2010). A Novel Aux/IAA28 Signaling Cascade Activates GATA23-Dependent Specification of Lateral Root Founder Cell Identity. *Current Biology*, 20(19), 1697–1706. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.09.007>

De Smet, I., Tetsumura, T., De Rybel, B., Frey, N. F. dit, Laplaze, L., Casimiro, I., Swarup, R., Naudts, M., Vanneste, S., Audenaert, D., Inzé, D., Bennett, M. J., & Beeckman, T. (2007). Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development*, 134(4), 681–690. <https://doi.org/10.1242/dev.02753>

Del Castello, F., Nejamkin, A., Cassia, R., Correa-Aragunde, N., Fernández, B., Foresi, N., Lombardo, C., Ramirez, L., & Lamattina, L. (2019). The era of nitric oxide in plant biology: Twenty years tying up loose ends. *Nitric Oxide*, 85, 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.01.013>

Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A., & Lamb, C. (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 394(6693), 585–588. <https://doi.org/10.1038/29087>

Desikan, R., Griffiths, R., Hancock, J., & Neill, S. (2002). A new role for an old enzyme: Nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(25), 16314–16318. <https://doi.org/10.1073/pnas.252461999>

Dordas, C., Hasinoff, B. B., Igamberdiev, A. U., Manac'h, N., Rivoal, J., & Hill, R. D. (2003). Expression of a stress-induced hemoglobin affects NO levels produced by alfalfa root cultures under hypoxic stress. *The Plant Journal*, 35(6), 763–770. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01846.x>

Du, Y., & Scheres, B. (2017). PLETHORA transcription factors orchestrate de novo organ patterning during *Arabidopsis* lateral root outgrowth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714410114>

Dubrovsky, J. G., Sauer, M., Napsucially-Mendivil, S., Ivanchenko, M. G., Friml, J., Shishkova, S., Celenza, J., & Benková, E. (2008). Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(25), 8790–8794. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712307105>

Elhiti, M., Hebelstrup, K. H., Wang, A., Li, C., Cui, Y., Hill, R. D., & Stasolla, C. (2013). Function of type-2 *Arabidopsis* hemoglobin in the auxin-mediated formation of embryogenic

cells during morphogenesis. *The Plant Journal*, 74(6), 946–958. <https://doi.org/10.1111/tpj.12181>

Fan, M., Xu, C., Xu, K., & Hu, Y. (2012). LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN transcription factors direct callus formation in *Arabidopsis* regeneration. *Cell research*, 22(7), 1169–1180. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.63>

Fehér, A. (2019). Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology? *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>

Fehér, A., Bernula, D., & Gémes, K. (2016). The Many Ways of Somatic Embryo Initiation. In *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications* (o. 23–37). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_3

Ferdousy, N., Arif, T., & Sagor, G. (2020). Polyamine Oxidase 5 (PAO5) mediated antioxidant response to promote salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Bangladesh Agricultural University*, 0, 1. <https://doi.org/10.5455/JBAU.103110>

Fernández-Marcos, M., Sanz, L., Lewis, D. R., Muday, G. K., & Lorenzo, O. (2011). Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PIN-FORMED 1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(45), 18506–18511. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108644108>

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. *Journal of Experimental Botany*, 62(3), 1155–1168. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq341>

Flores, H. E., & Galston, A. W. (1982). Analysis of Polyamines in Higher Plants by High Performance Liquid Chromatography. *Plant Physiology*, 69(3), 701–706. <https://doi.org/10.1104/pp.69.3.701>

Forstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*, 33(7), 829–837. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>

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. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10), 5136. <https://doi.org/10.3390/ijms22105136>

Fuell, C., Elliott, K. A., Hanfrey, C. C., Franceschetti, M., & Michael, A. J. (2010). Polyamine biosynthetic diversity in plants and algae. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(7), 513–520. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.02.008>

- Furchgott, R. F. (1988). Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite. The basis for the proposal that the acid activatable inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. *asodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, and Endothelium*, 401–414.
- Gabaldón, C., Gómez Ros, L. V., Pedreño, M. A., & Ros Barceló, A. (2005). Nitric oxide production by the differentiating xylem of *Zinnia elegans*. *New Phytologist*, 165(1), 121–130. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01230.x>
- Ge, C., Cui, X., Wang, Y., Hu, Y., Fu, Z., Zhang, D., Cheng, Z., & Li, J. (2006). BUD2, encoding an S-adenosylmethionine decarboxylase, is required for Arabidopsis growth and development. *Cell research*, 16(5), 446–456. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310056>
- 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. *Physiologia Plantarum*, 142(2), 179–192. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01461.x>
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 5(1), 26–33. <https://doi.org/10.4161/psb.5.1.10291>
- Gonzalez, M. E., Jasso-Robles, F. I., Flores-Hernández, E., Rodríguez-Kessler, M., & Pieckenstain, F. L. (2021). Current status and perspectives on the role of polyamines in plant immunity. *Annals of Applied Biology*, 178(2), 244–255. <https://doi.org/10.1111/aab.12670>
- Gonzalez, M. E., Marco, F., Minguet, E. G., Carrasco-Sorli, P., Blázquez, M. A., Carbonell, J., Ruiz, O. A., & Pieckenstain, F. L. (2011). Perturbation of spermine synthase Gene Expression and Transcript Profiling Provide New Insights on the Role of the Tetraamine Spermine in Arabidopsis Defense against *Pseudomonas viridiflava*. *Plant Physiology*, 156(4), 2266–2277. <https://doi.org/10.1104/pp.110.171413>
- Gordon, S. P., Chickarmane, V. S., Ohno, C., & Meyerowitz, E. M. (2009). Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the Arabidopsis shoot meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(38), 16529–16534. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908122106>
- Gordon, S. P., Heisler, M. G., Reddy, G. V., Ohno, C., Das, P., & Meyerowitz, E. M. (2007). Pattern formation during de novo assembly of the Arabidopsis shoot meristem. *Development*, 134(19), 3539–3548. <https://doi.org/10.1242/dev.010298>
- Gouvêa, C. M. C. P., Souza, J. F., Magalhães, A. C. N., & Martins, I. S. (1997). NO[•]-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regulation*, 21(3), 183–187. <https://doi.org/10.1023/A:1005837012203>

- Gupta, K. J., Fernie, A. R., Kaiser, W. M., & van Dongen, J. T. (2011a). On the origins of nitric oxide. *Trends in Plant Science*, 16(3), 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.11.007>
- Gupta, K. J., Hebelstrup, K. H., Mur, L. A. J., & Igamberdiev, A. U. (2011b). Plant hemoglobins: Important players at the crossroads between oxygen and nitric oxide. *FEBS Letters*, 585(24), 3843–3849. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.10.036>
- Habib, S., & Ali, A. (2011). Biochemistry of Nitric Oxide. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 26(1), 3–17. <https://doi.org/10.1007/s12291-011-0108-4>
- Hanfrey, C., Elliott, K. A., Franceschetti, M., Mayer, M. J., Illingworth, C., & Michael, A. J. (2005). A Dual Upstream Open Reading Frame-based Autoregulatory Circuit Controlling Polyamine-responsive Translation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(47), 39229–39237. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509340200>
- 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. *The Plant Journal*, 27(6), 551–560. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01100.x>
- Hanzawa, Y. (2000). ACAULIS5, an Arabidopsis gene required for stem elongation, encodes a spermine synthase. *The EMBO Journal*, 19(16), 4248–4256. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.16.4248>
- Hanzawa, Y., Imai, A., Michael, A. J., Komeda, Y., & Takahashi, T. (2002). Characterization of the spermidine synthase-related gene family in Arabidopsis thaliana. *FEBS Letters*, 527(1–3), 176–180. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03217-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03217-9)
- Hao, Y.-J. (2005). Expression of arginine decarboxylase and ornithine decarboxylase genes in apple cells and stressed shoots. *Journal of Experimental Botany*, 56(414), 1105–1115. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri102>
- Harrison, R. (2004). Physiological Roles of Xanthine Oxidoreductase. *Drug Metabolism Reviews*, 36(2), 363–375. <https://doi.org/10.1081/DMR-120037569>
- Hasanuzzaman, M., Alhathloul, H. A. S., Parvin, K., Bhuyan, M. H. M. B., Tanveer, M., Mohsin, S. M., Nahar, K., Soliman, M. H., Mahmud, J. Al, & Fujita, M. (2019). Polyamine Action under Metal/Metalloid Stress: Regulation of Biosynthesis, Metabolism, and Molecular Interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3215. <https://doi.org/10.3390/ijms20133215>
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Rahman, A., Inafuku, M., Oku, H., & Fujita, M. (2018). Exogenous nitric oxide donor and arginine provide protection against short-term drought stress in wheat seedlings. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24(6), 993–1004. <https://doi.org/10.1007/s12298-018-0531-6>

- Hausman, J. F., Kevers, C., & Gaspar, T. (1995). Auxin-polyamine interaction in the control of the rooting inductive phase of poplar shoots in vitro. *Plant Science*, 110(1), 63–71. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(95\)04193-X](https://doi.org/10.1016/0168-9452(95)04193-X)
- He, Y., Tang, R.-H., Hao, Y., Stevens, R. D., Cook, C. W., Ahn, S. M., Jing, L., Yang, Z., Chen, L., Guo, F., Fiorani, F., Jackson, R. B., Crawford, N. M., & Pei, Z.-M. (2004). Nitric Oxide Represses the Arabidopsis Floral Transition. *Science*, 305(5692), 1968–1971. <https://doi.org/10.1126/science.1098837>
- Hebelstrup, K. H., Shah, J. K., & Igamberdiev, A. U. (2013). The role of nitric oxide and hemoglobin in plant development and morphogenesis. *Physiologia Plantarum*, 148(4), 457–469. <https://doi.org/10.1111/ppl.12062>
- Howlett, R. (1998). Nobel award stirs up debate on nitric oxide breakthrough. *Nature*, 395(6703), 625–626. <https://doi.org/10.1038/27019>
- Hu, W.-W., Gong, H., & Pua, E.-C. (2006). Modulation of SAMDC expression in Arabidopsis thaliana alters in vitro shoot organogenesis. *Physiologia Plantarum*, 128(4), 740–750. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00799.x>
- Hu, X., Neill, S. J., Tang, Z., & Cai, W. (2005). Nitric Oxide Mediates Gravitropic Bending in Soybean Roots. *Plant Physiology*, 137(2), 663–670. <https://doi.org/10.1104/pp.104.054494>
- Huang, S., Hill, R. D., & Stasolla, C. (2014). Plant hemoglobin participation in cell fate determination. *Plant Signaling & Behavior*, 9(8), e29485. <https://doi.org/10.4161/psb.29485>
- Huang, X.-L., Li, X.-J., Li, Y., & Huang, L.-Z. (2001). The effect of AOA on ethylene and polyamine metabolism during early phases of somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. *Physiologia Plantarum*, 113(3), 424–429. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1130317.x>
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., & Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(24), 9265–9269. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.24.9265>
- Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Iwase, A., & Sugimoto, K. (2016). Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. *Development*, 143(9), 1442–1451. <https://doi.org/10.1242/dev.134668>
- Imai, A., Akiyama, T., Kato, T., Sato, S., Tabata, S., Yamamoto, K. T., & Takahashi, T. (2004a). Spermine is not essential for survival of Arabidopsis. *FEBS Letters*, 556(1–3), 148–152. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01395-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01395-4)
- Imai, A., Matsuyama, T., Hanzawa, Y., Akiyama, T., Tamaoki, M., Saji, H., Shirano, Y., Kato, T., Hayashi, H., Shibata, D., Tabata, S., Komeda, Y., & Takahashi, T. (2004b). Spermidine

Synthase Genes Are Essential for Survival of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 135(3), 1565–1573. <https://doi.org/10.1104/pp.104.041699>

Joshi, K., Ahmed, S., Ge, L., Phuntumart, V., Kalinoski, A., Morris, P. F. (2022). Compartmentation of Putrescine Synthesis in Plants. *bioRxiv* 2022.09.03.506421; doi: <https://doi.org/10.1101/2022.09.03.506421>.

Takehi, J.-I., Kuwashiro, Y., Motose, H., Igarashi, K., & Takahashi, T. (2010). Norspermine substitutes for thermospermine in the control of stem elongation in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 584(14), 3042–3046. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.05.035>

Kamada-Nobusada, T., Hayashi, M., Fukazawa, M., Sakakibara, H., & Nishimura, M. (2008). A Putative Peroxisomal Polyamine Oxidase, AtPAO4, is Involved in Polyamine Catabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 49(9), 1272–1282. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn114>

Kareem, A., Durgaprasad, K., Sugimoto, K., Du, Y., Pulianmackal, A. J., Trivedi, Z. B., Abhayadev, P. V., Pinon, V., Meyerowitz, E. M., Scheres, B., & Prasad, K. (2015). PLETHORA Genes Control Regeneration by a Two-Step Mechanism. *Current Biology*, 25(8), 1017–1030. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.02.022>

Kareem, A., Radhakrishnan, D., Wang, X., Bagavathiappan, S., Trivedi, Z. B., Sugimoto, K., Xu, J., Mähönen, A. P., & Prasad, K. (2016). Protocol: a method to study the direct reprogramming of lateral root primordia to fertile shoots. *Plant Methods*, 12(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0127-5>

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 Physiology*. <https://doi.org/10.1104/pp.114.242610>

Kim, J., Yang, W., Forner, J., Lohmann, J. U., Noh, B., & Noh, Y. (2018). Epigenetic reprogramming by histone acetyltransferase HAG1/AtGCN5 is required for pluripotency acquisition in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal*, 37(20). <https://doi.org/10.15252/embj.201798726>

Kirch, T., Simon, R., Grünewald, M., & Werr, W. (2003). The DORNROSCHE/ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1 Gene of *Arabidopsis* Acts in the Control of Meristem Cell Fate and Lateral Organ Development. *The Plant Cell*, 15(3), 694–705. <https://doi.org/10.1105/tpc.009480>

Klepper, L. (1974). A Mode of Action of Herbicides: Inhibition of the Normal Process of Nitrite Reduction. The Agricultural Experiment Station University of Nebraska - Lincoln College of Agriculture.

- Klepper, L. (1979). Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO₂) emissions from herbicide-treated soybean plants. *Atmospheric Environment* (1967), 13(4), 537–542. [https://doi.org/10.1016/0004-6981\(79\)90148-3](https://doi.org/10.1016/0004-6981(79)90148-3)
- Knott, J. M., Römer, P., & Sumper, M. (2007). Putative spermine synthases from *Thalassiosira pseudonana* and *Arabidopsis thaliana* synthesize thermospermine rather than spermine. *FEBS Letters*, 581(16), 3081–3086. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.05.074>
- Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y., & Nagano, T. (1998). Detection and Imaging of Nitric Oxide with Novel Fluorescent Indicators: Diaminofluoresceins. *Analytical Chemistry*, 70(13), 2446–2453. <https://doi.org/10.1021/ac9801723>
- Kolbert, Z., Barroso, J. B., Brouquisse, R., Corpas, F. J., Gupta, K. J., Lindermayr, C., Loake, G. J., Palma, J. M., Petřivalský, M., Wendehenne, D., & Hancock, J. T. (2019). A forty year journey: The generation and roles of NO in plants. *Nitric Oxide*, 93, 53–70. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.09.006>
- Kolbert, Z., Pető, A., Lehotai, N., Feigl, G., & Erdei, L. (2015). Copper sensitivity of *nialnia2noal-2* mutant is associated with its low nitric oxide (NO) level. *Plant Growth Regulation*, 77(2), 255–263. <https://doi.org/10.1007/s10725-015-0059-5>
- Krupková, E., & Schmölling, T. (2009). Developmental consequences of the tumorous shoot development1 mutation, a novel allele of the cellulose-synthesizing *KORRIGAN1* gene. *Plant Molecular Biology*, 71(6), 641–655. <https://doi.org/10.1007/s11103-009-9546-2>
- Kuehn, G. D., Rodriguez-Garay, B., Bagga, S., & Phillips, G. C. (1990). Novel Occurrence of Uncommon Polyamines in Higher Plants. *Plant Physiology*, 94(3), 855–857. <https://doi.org/10.1104/pp.94.3.855>
- Kumari, A., Bhatoee, M., Singh, P., Kaladhar, V. C., Yadav, N., Paul, D., Loake, G. J., & Gupta, K. J. (2022). Detection of Nitric Oxide from Chickpea Using DAF Fluorescence and Chemiluminescence Methods. *Current Protocols*, 2(4). <https://doi.org/10.1002/cpz1.420>
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., & Takahashi, Y. (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*, 228(3), 367–381. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0772-7>
- Kusano, T., Kim, D. W., Liu, T., & Berberich, T. (2015). Polyamine Catabolism in Plants. In *Polyamines* (o. 77–88). Springer Japan. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55212-3_6
- Kuznetsov, V. I., Radyukina, N. L., & Shevyakova, N. I. (2006). Polyamines and stress: Biological role, metabolism, and regulation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(5), 583–604. <https://doi.org/10.1134/S1021443706050025>

- Lamattina, L., García-Mata, C., Graziano, M., & Pagnussat, G. (2003). Nitric Oxide: The Versatility of an Extensive Signal Molecule. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 109–136. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134752>
- Laplaze, L., Benkova, E., Casimiro, I., Maes, L., Vanneste, S., Swarup, R., Weijers, D., Calvo, V., Parizot, B., Herrera-Rodriguez, M. B., Offringa, R., Graham, N., Doumas, P., Friml, J., Bogusz, D., Beeckman, T., & Bennett, M. (2008). Cytokinins Act Directly on Lateral Root Founder Cells to Inhibit Root Initiation. *The Plant Cell*, 19(12), 3889–3900. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.055863>
- Lardon, R., & Geelen, D. (2020). Natural Variation in Plant Pluripotency and Regeneration. *Plants*, 9(10), 1261. <https://doi.org/10.3390/plants9101261>
- Lee, H. W., Kim, N. Y., Lee, D. J., & Kim, J. (2009). LBD18/ASL20 Regulates Lateral Root Formation in Combination with LBD16/ASL18 Downstream of ARF7 and ARF19 in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 151(3), 1377–1389. <https://doi.org/10.1104/pp.109.143685>
- Leibfried, A., To, J. P. C., Busch, W., Stehling, S., Kehle, A., Demar, M., Kieber, J. J., & Lohmann, J. U. (2005). WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature*, 438(7071), 1172–1175. <https://doi.org/10.1038/nature04270>
- Leshem, Y. Y., & Haramaty, E. (1996). The Characterization and Contrasting Effects of the Nitric Oxide Free Radical in Vegetative Stress and Senescence of *Pisum sativum* Linn. Foliage. *Journal of Plant Physiology*, 148(3–4), 258–263. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(96\)80251-3](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(96)80251-3)
- Li, L., Hou, X., Tsuge, T., Ding, M., Aoyama, T., Oka, A., Gu, H., Zhao, Y., & Qu, L.-J. (2008). The possible action mechanisms of indole-3-acetic acid methyl ester in Arabidopsis. *Plant Cell Reports*, 27(3), 575–584. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0458-9>
- Lim, T. S., Chitra, T. R., Han, P., Pua, E. C., & Yu, H. (2006). Cloning and characterization of Arabidopsis and Brassica juncea flavin-containing amine oxidases. *Journal of Experimental Botany*, 57(15), 4155–4169. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl193>
- Liu, H., Zhang, H., Dong, Y. X., Hao, Y. J., & Zhang, X. S. (2018a). DNA METHYLTRANSFERASE1-mediated shoot regeneration is regulated by cytokinin-induced cell cycle in Arabidopsis. *New Phytologist*, 217(1), 219–232. <https://doi.org/10.1111/nph.14814>
- Liu, J., Hu, X., Qin, P., Prasad, K., Hu, Y., & Xu, L. (2018b). The WOX11–LBD16 Pathway Promotes Pluripotency Acquisition in Callus Cells During De Novo Shoot Regeneration in Tissue Culture. *Plant and Cell Physiology*, 59(4), 739–748. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy010>

- 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 and Cell Physiology*, 55(6), 1110–1122. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu047>
- Liu, W.-Z., Kong, D.-D., Gu, X.-X., Gao, H.-B., Wang, J.-Z., Xia, M., Gao, Q., Tian, L.-L., Xu, Z.-H., Bao, F., Hu, Y., Ye, N.-S., Pei, Z.-M., & He, Y.-K. (2013). Cytokinins can act as suppressors of nitric oxide in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(4), 1548–1553. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213235110>
- Lou, Y., Ahmed, S., Yan, J., Adio, A. M., Powell, H. M., Morris, P. F., & Jander, G. (2020). *Arabidopsis* ADC1 functions as an N δ -acetylornithine decarboxylase. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62(5), 601–613. <https://doi.org/10.1111/jipb.12821>
- Ludwig-Müller, J. (2011). Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany*, 62(6), 1757–1773. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq412>
- Majumdar, R., Shao, L., Turlapati, S. A., & Minocha, S. C. (2017). Polyamines in the life of *Arabidopsis*: profiling the expression of S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) gene family during its life cycle. *BMC Plant Biology*, 17(1), 264. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1208-y>
- Malik, S. I., Hussain, A., Yun, B.-W., Spoel, S. H., & Loake, G. J. (2011). GSNOR-mediated de-nitrosylation in the plant defence response. *Plant Science*, 181(5), 540–544. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.04.004>
- Marco, F., Altabella, T., Alcázar, R., Cuevas, J. C., C, B., Gonzalez, M., Ruiz, O., Tiburcio, A., & Carrasco, P. (2011). Transcriptome Analysis of Polyamine Overproducers Reveals Activation of Plant Stress Responses and Related Signalling Pathways Tolerance in Plants. In *Omics and Plant Abiotic Stress Tolerance* (Köt. 1, o. 82–90). <https://doi.org/10.2174/97816080505811110101>.
- Maruri-López, I., & Jiménez-Bremont, J. F. (2017). Hetero- and homodimerization of *Arabidopsis thaliana* arginine decarboxylase AtADC1 and AtADC2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 484(3), 508–513. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.083>
- Mason, M. G., Mathews, D. E., Argyros, D. A., Maxwell, B. B., Kieber, J. J., Alonso, J. M., Ecker, J. R., & Schaller, G. E. (2005). Multiple Type-B Response Regulators Mediate Cytokinin Signal Transduction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17(11), 3007–3018. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035451>
- Matsuo, N., Makino, M., & Banno, H. (2011). *Arabidopsis* ENHANCER OF SHOOT REGENERATION (ESR)1 and ESR2 regulate in vitro shoot regeneration and their expressions

are differentially regulated. *Plant Science*, 181(1), 39–46.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.03.007>

Meinke, D. W. (2020). Genome-wide identification of EMBRYO-DEFECTIVE (EMB) genes required for growth and development in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 226(2), 306–325.
<https://doi.org/10.1111/nph.16071>

Meng, W. J., Cheng, Z. J., Sang, Y. L., Zhang, M. M., Rong, X. F., Wang, Z. W., Tang, Y. Y., & Zhang, X. S. (2017). Type-B ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS Specify the Shoot Stem Cell Niche by Dual Regulation of WUSCHEL. *The Plant Cell*, 29(6), 1357–1372.
<https://doi.org/10.1105/tpc.16.00640>

Meyer, C., Lea, U. S., Provan, F., Kaiser, W. M., & Lillo, C. (2005). Is nitrate reductase a major player in the plant NO (nitric oxide) game? *Photosynthesis Research*, 83(2), 181–189.
<https://doi.org/10.1007/s11120-004-3548-3>

Miller-Fleming, L., Olin-Sandoval, V., Campbell, K., & Ralser, M. (2015). Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. *Journal of Molecular Biology*, 427(21), 3389–3406. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.06.020>

Mira, M. M., Adel, E.-S., & Stasolla, C. (2015). Ethylene is integrated into the nitric oxide regulation of *Arabidopsis* somatic embryogenesis. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13(1), 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2015.01.001>

Mira, M. M., Wally, O. S. D., Elhiti, M., El-Shanshory, A., Reddy, D. S., Hill, R. D., & Stasolla, C. (2016). Jasmonic acid is a downstream component in the modulation of somatic embryogenesis by *Arabidopsis* Class 2 phytochrome. *Journal of Experimental Botany*, 67(8), 2231–2246. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw022>

Miyamoto, M., Shima, S., Tong, W., Motose, H., & Takahashi, T. (2019). Effect of Thermospermine on the Growth and Expression of Polyamine-Related Genes in Rice Seedlings. *Plants*, 8(8), 269. <https://doi.org/10.3390/plants8080269>

Moschou, P. N., Sanmartin, M., Andriopoulou, A. H., Rojo, E., Sanchez-Serrano, J. J., & Roubelakis-Angelakis, K. A. (2008). Bridging the Gap between Plant and Mammalian Polyamine Catabolism: A Novel Peroxisomal Polyamine Oxidase Responsible for a Full Back-Conversion Pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 147(4), 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. *Journal of Experimental Botany*, 63(14), 5003–5015.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ers202>

- Motte, H., Vereecke, D., Geelen, D., & Werbrouck, S. (2014). The molecular path to in vitro shoot regeneration. *Biotechnology Advances*, 32(1), 107–121. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.12.002>
- Muñiz, L., Minguet, E. G., Singh, S. K., Pesquet, E., Vera-Sirera, F., Moreau-Courtois, C. L., Carbonell, J., Blázquez, M. A., & Tuominen, H. (2008). ACAULIS5 controls Arabidopsis xylem specification through the prevention of premature cell death. *Development*, 135(15), 2573–2582. <https://doi.org/10.1242/dev.019349>
- Muñoz, A., Mangano, S., González-García, M. P., Contreras, R., Sauer, M., De Rybel, B., Weijers, D., Sánchez-Serrano, J. J., Sanmartín, M., & Rojo, E. (2017). RIMA-Dependent Nuclear Accumulation of IYO Triggers Auxin-Irreversible Cell Differentiation in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 29(3), 575–588. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00791>
- Namin, S. M., Nofallah, S., Joshi, M. S., Kavallieratos, K., & Tsoukias, N. M. (2013). Kinetic analysis of DAF-FM activation by NO: Toward calibration of a NO-sensitive fluorescent dye. *Nitric Oxide*, 28, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2012.10.001>
- Nandy, S., Das, T., Tudu, C. K., Mishra, T., Ghorai, M., Gadekar, V. S., Anand, U., Kumar, M., Behl, T., Shaikh, N. K., Jha, N. K., Shekhawat, M. S., Pandey, D. K., Dwivedi, P., Radha, & Dey, A. (2022). Unravelling the multi-faceted regulatory role of polyamines in plant biotechnology, transgenics and secondary metabolomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(3), 905–929. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11748-3>
- Napieraj, N., Janicka, M., & Reda, M. (2023). Interactions of Polyamines and Phytohormones in Plant Response to Abiotic Stress. *Plants*, 12(5), 1159. <https://doi.org/10.3390/plants12051159>
- Negin, B., Shemer, O., Sorek, Y., & Eshed Williams, L. (2017). Shoot stem cell specification in roots by the WUSCHEL transcription factor. *PLOS ONE*, 12(4), e0176093. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176093>
- Neill, S., Barros, R., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., Morris, P., Ribeiro, D., & Wilson, I. (2008). Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 59(2), 165–176. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm293>
- Okushima, Y., Fukaki, H., Onoda, M., Theologis, A., & Tasaka, M. (2007). ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in Arabidopsis. *The Plant cell*, 19(1), 118–130. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.047761>
- Ötvös, K., Pasternak, T. P., Miskolczi, P., Domoki, M., Dorjgotov, D., Sz'cs, A., Bottka, S., Dudits, D., & Fehér, A. (2005). Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. *The Plant Journal*, 43(6), 849–860. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02494.x>

- Pagnussat, G. C., Simontacchi, M., Puntarulo, S., & Lamattina, L. (2002). Nitric Oxide Is Required for Root Organogenesis. *Plant Physiology*, 129(3), 954–956. <https://doi.org/10.1104/pp.004036>
- 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 Science*, 308, 110923. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.110923>
- Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G., & Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327(6122), 524–526. <https://doi.org/10.1038/327524a0>
- Park, E.-H., Bae, H., Park, W. T., Kim, Y. B., Chae, S. C., & Park, S. U. (2012). Improved shoot organogenesis of gloxinia (*'Sinningia speciosa'*) using silver nitrate and putrescine treatment. *Plant Omics*, 5(1), 6–9. <https://search.informit.org/doi/10.3316/informit.007666393392130>
- Patel, J., Ariyaratne, M., Ahmed, S., Ge, L., Phuntumart, V., Kalinoski, A., & Morris, P. F. (2017). Dual functioning of plant arginases provides a third route for putrescine synthesis. *Plant Science*, 262, 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.05.011>
- Pernisová, M., Klíma, P., Horák, J., Válková, M., Malbeck, J., Souček, P., Reichman, P., Hoyerová, K., Dubová, J., Friml, J., Zažimalová, E., & Hejátko, J. (2009). Cytokinins modulate auxin-induced organogenesis in plants via regulation of the auxin efflux. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(9), 3609–3614. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811539106>
- 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 Biology*, 13(1), 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. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2317. <https://doi.org/10.3390/ijms24032317>
- Procházková, D., Haisel, D., & Pavlíková, D. (2014). Nitric oxide biosynthesis in plants - the short overview. *Plant, Soil and Environment*, 60(3), 129–134. <https://doi.org/10.17221/901/2013-PSE>
- Pulianmackal, A. J., Kareem, A. V. K., Durgaprasad, K., Trivedi, Z. B., & Prasad, K. (2014). Competence and regulatory interactions during regeneration in plants. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00142>

Qiao, W., & Fan, L.-M. (2008). Nitric Oxide Signaling in Plant Responses to Abiotic Stresses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(10), 1238–1246. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00759.x>

Radhakrishnan, D., Kareem, A., Durgaprasad, K., Sreeraj, E., Sugimoto, K., & Prasad, K. (2018). Shoot regeneration: a journey from acquisition of competence to completion. *Current Opinion in Plant Biology*, 41, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.08.001>

Raspor, M., Motyka, V., Kaleri, A. R., Ninković, S., Tubić, L., Cingel, A., & Ćosić, T. (2021). Integrating the Roles for Cytokinin and Auxin in De Novo Shoot Organogenesis: From Hormone Uptake to Signaling Outputs. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8554. <https://doi.org/10.3390/ijms22168554>

Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J., & Kaiser, W. M. (2002). Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *Journal of experimental botany*, 53(366), 103–110. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.366.103>

Romanov, G. A., Lomin, S. N., Rakova, N. Yu., Heyl, A., & Schmülling, T. (2008). Does NO play a role in cytokinin signal transduction? *FEBS Letters*, 582(6), 874–880. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.02.016>

Rosspopoff, O., Chelysheva, L., Saffar, J., Lecorgne, L., Gey, D., Caillieux, E., Colot, V., Roudier, F., Hilson, P., Berthomé, R., Da Costa, M., & Rech, P. (2017). Direct conversion of root primordium into shoot meristem relies on timing of stem cell niche development. *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.142570>

Rozen, S., & Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers. In *Bioinformatics Methods and Protocols* (o. 365–386). <https://doi.org/10.1385/1-59259-192-2:365>

Sagor, G. H. M., Simm, S., Kim, D. W., Niitsu, M., Kusano, T., & Berberich, T. (2021). Effect of thermospermine on expression profiling of different gene using massive analysis of cDNA ends (MACE) and vascular maintenance in Arabidopsis. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27(3), 577–586. <https://doi.org/10.1007/s12298-021-00967-7>

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. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00214>

Salvi, D., & Tavladoraki, P. (2020). The tree of life of polyamine oxidases. *Scientific Reports*, 10(1), 17858. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74708-3>

Salvi, E., Di Mambro, R., Pacifici, E., Dello Ioio, R., Costantino, P., Moubayidin, L., & Sabatini, S. (2018). SCARECROW and SHORTROOT control the auxin/cytokinin balance

necessary for embryonic stem cell niche specification. *Plant signaling & behavior*, 13(8), e1507402. <https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1507402>

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*, 12(3), 652. <https://doi.org/10.3390/plants12030652>

Sánchez-Rangel, D., Chávez-Martínez, A. I., Rodríguez-Hernández, A. A., Maruri-López, I., Urano, K., Shinozaki, K., & Jiménez-Bremont, J. F. (2016). Simultaneous Silencing of Two Arginine Decarboxylase Genes Alters Development in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00300>

Sandalio, L. M., Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M. C., & del Río, L. A. (2008). Imaging of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide In Vivo in Plant Tissues. In *Methods in enzymology* (o. 397–409). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)00825-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)00825-7)

Sanz, L., Albertos, P., Mateos, I., Sánchez-Vicente, I., Lechón, T., Fernández-Marcos, M., & Lorenzo, O. (2015). Nitric oxide (NO) and phytohormones crosstalk during early plant development. *Journal of Experimental Botany*, 66(10), 2857–2868. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv213>

Scofield, S., Dewitte, W., & Murray, J. A. (2014). STM sustains stem cell function in the Arabidopsis shoot apical meristem and controls KNOX gene expression independently of the transcriptional repressor AS1. *Plant Signaling & Behavior*, 9(6), e28934. <https://doi.org/10.4161/psb.28934>

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. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00173>

Shen, Q., Wang, Y.-T., Tian, H., & Guo, F.-Q. (2013). Nitric Oxide Mediates Cytokinin Functions in Cell Proliferation and Meristem Maintenance in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 6(4), 1214–1225. <https://doi.org/10.1093/mp/sss148>

Shin, J., Bae, S., & Seo, P. J. (2020). De novo shoot organogenesis during plant regeneration. *Journal of Experimental Botany*, 71(1), 63–72. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz395>

Stohr, C. (2002). Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplasmic space. *Journal of Experimental Botany*, 53(379), 2293–2303. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf110>

Su, Y. H., & Zhang, X. S. (2014). The Hormonal Control of Regeneration in Plants (o. 35–69). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391498-9.00010-3>

- Sugimoto, K., Jiao, Y., & Meyerowitz, E. M. (2010). Arabidopsis Regeneration from Multiple Tissues Occurs via a Root Development Pathway. *Developmental Cell*, 18(3), 463–471. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.02.004>
- Taylor, A., Tandon, R., & Bhatla, S. C. (2019). Nitric oxide modulates polyamine homeostasis in sunflower seedling cotyledons under salt stress. *Plant Signaling & Behavior*, 14(11), 1667730. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1667730>
- Takahashi, Y., Cong, R., Sagor, G. H. M., Niitsu, M., Berberich, T., & Kusano, T. (2010). Characterization of five polyamine oxidase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 29(9), 955–965. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0881-1>
- Takahashi, Y., Uemura, T., & Teshima, Y. (2019). Polyamine oxidase 2 is involved in regulating excess spermidine contents during seed germination and early seedling development in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 516(4), 1248–1251. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.07.022>
- Takano, A., Kakehi, J.-I., & Takahashi, T. (2012). Thermospermine is Not a Minor Polyamine in the Plant Kingdom. *Plant and Cell Physiology*, 53(4), 606–616. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs019>
- Tan, B. C., Chin, C. F., & Alderson, P. (2013). Effects of sodium nitroprusside on shoot multiplication and regeneration of *Vanilla planifolia* Andrews. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 49(5), 626–630. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9526-8>
- Tari, I., & Csiszár, J. (2003). Effects of NO₂ – or NO₃ – supply on polyamine accumulation and ethylene production of wheat roots at acidic and neutral pH: implications for root growth. *Plant Growth Regulation*, 40(2), 121–128. <https://doi.org/10.1023/A:1024235211395>
- Tassoni, A., Fornalè, S., & Bagni, N. (2003). Putative ornithine decarboxylase activity in *Arabidopsis thaliana*: inhibition and intracellular localisation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(10), 871–875. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(03\)00141-4](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(03)00141-4)
- 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. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00824>
- 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(9), 323. <https://doi.org/10.3390/plants8090323>

- Tran, S., Stephanie Chen, Y.-F., Xu, D., Ison, M., & Yang, L. (2023). Microbial pattern recognition suppresses de novo organogenesis. *Development*, 150(9). <https://doi.org/10.1242/dev.201485>
- Tu, M., Wang, W., Yao, N., Cai, C., Liu, Y., Lin, C., Zuo, Z., & Zhu, Q. (2021). The transcriptional dynamics during de novo shoot organogenesis of Ma bamboo (*Dendrocalamus latiflorus* Munro): implication of the contributions of the abiotic stress response in this process. *The Plant Journal*, 107(5), 1513–1532. <https://doi.org/10.1111/tpj.15398>
- Tun, N. N., Holk, A., & Scherer, G. F. E. (2001). Rapid increase of NO release in plant cell cultures induced by cytokinin. *FEBS Letters*, 509(2), 174–176. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03164-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03164-7)
- Tun, N. N., Santa-Catarina, C., Begum, T., Silveira, V., Handro, W., Floh, E. I. S., & Scherer, G. F. E. (2006). Polyamines Induce Rapid Biosynthesis of Nitric Oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* Seedlings. *Plant and Cell Physiology*, 47(3), 346–354. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci252>
- Tyagi, A., Ali, S., Ramakrishna, G., Singh, A., Park, S., Mahmoudi, H., & Bae, H. (2022). Revisiting the Role of Polyamines in Plant Growth and Abiotic Stress Resilience: Mechanisms, Crosstalk, and Future Perspectives. *Journal of Plant Growth Regulation*. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10847-3>
- Urano, K., Hobo, T., & Shinozaki, K. (2005). *Arabidopsis* ADC genes involved in polyamine biosynthesis are essential for seed development. *FEBS Letters*, 579(6), 1557–1564. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.01.048>
- Urano, K., Yoshiba, Y., Nanjo, T., Ito, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2004). *Arabidopsis* stress-inducible gene for arginine decarboxylase AtADC2 is required for accumulation of putrescine in salt tolerance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(2), 369–375. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.119>
- Viu, A. F. M., Viu, M. A. O., Tavares, A. R., Vianello, F., & Lima, G. P. P. (2009). Endogenous and exogenous polyamines in the organogenesis in *Curcuma longa* L. *Scientia Horticulturae*, 121(4), 501–504. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.03.003>
- Wang, W., Paschalidis, K., Feng, J.-C., Song, J., & Liu, J.-H. (2019). Polyamine Catabolism in Plants: A Universal Process With Diverse Functions. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00561>
- Wang, Y., Elhiti, M., Hebelstrup, K. H., Hill, R. D., & Stasolla, C. (2011). Manipulation of hemoglobin expression affects *Arabidopsis* shoot organogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(10), 1108–1116. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.06.005>

- Wendehenne, D., Durner, J., & Klessig, D. F. (2004). Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4), 449–455. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.04.002>
- Wimalasekera, R., Tebartz, F., & Scherer, G. F. E. (2011). Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Science*, 181(5), 593–603. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.04.002>
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V., & Provart, N. J. (2007). An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS ONE*, 2(8), e718. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000718>
- Xu, L., & Huang, H. (2014). Genetic and Epigenetic Controls of Plant Regeneration (o. 1–33). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391498-9.00009-7>
- Xu, S., Guerra, D., Lee, U., & Vierling, E. (2013). S-nitrosogluthatione reductases are low-copy number, cysteine-rich proteins in plants that control multiple developmental and defense responses in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00430>
- Yoshimoto, K., Takamura, H., Kadota, I., Motose, H., & Takahashi, T. (2016). Chemical control of xylem differentiation by thermospermine, xylemin and auxin. *Scientific Reports*, 6(1), 21487. <https://doi.org/10.1038/srep21487>
- Yu, M., Lamattina, L., Spoel, S. H., & Loake, G. J. (2014). Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution. *New Phytologist*, 202(4), 1142–1156. <https://doi.org/10.1111/nph.12739>
- Yu, Z., Jia, D., & Liu, T. (2019). Polyamine Oxidases Play Various Roles in Plant Development and Abiotic Stress Tolerance. *Plants*, 8(6), 184. <https://doi.org/10.3390/plants8060184>
- Zafarghandi, M. S. R., & Rahmati-Joneidabad, M. (2020). Indirect shoot organogenesis and in vitro root formation of *Antirrhinum majus* L. by using of sodium nitroprusside. *Advances in Horticultural Science*, 34(1), 105–111. <https://doi.org/10.13128/ahsc-8406>
- 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 & Environment*, 40(4), 527–542. <https://doi.org/10.1111/pce.12714>
- Zhang, T.-Q., Lian, H., Zhou, C.-M., Xu, L., Jiao, Y., & Wang, J.-W. (2017a). A Two-Step Model for de Novo Activation of WUSCHEL during Plant Shoot Regeneration. *The Plant Cell*, 29(5), 1073–1087. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00863>

Zhang, Z., Tucker, E., Hermann, M., & Laux, T. (2017b). A Molecular Framework for the Embryonic Initiation of Shoot Meristem Stem Cells. *Developmental Cell*, 40(3), 264-277.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.01.002>

ÖSSZEFOGLALÁS

Számos kísérleti rendszerben kimutatták már, hogy a poliaminok metabolizmusa fontos szerepet játszik a növények növekedésének és fejlődésének szabályozásában. Munkám során bizonyítottam, hogy részt vesznek teljes növények oldalgökér primordiumainak (LRP-k) citokinin által indukált közvetlen (kalluszképződés nélküli) átalakulásában hajtásmerisztémákká. A hatékony regeneráció magas endogén Spd/Put aránnyal és ezzel összefüggésben a Spd szintézisét (*AtADC1,2*, *AtSAMDC2,4*, *AtSPDS1,2*) illetve a T-Spm/Spm Spd-né történő visszaalakítását (*AtPAO5*, de nem *AtPAO1-4*) végző enzimeket kódoló gének emelkedett expressziójával volt jellemezhető. Bár 35S::PAO5 túltermelő növényekben nőtt, *pao5-2* mutáns növényekben nem változott a ROF szintje a direkt hajtásmerisztémák kialakulása során a vad típushoz képest. Mindemellett a külső H₂O₂ kezelés nem, viszont a T-Spm kezelés növelte a regeneráció hatékonyságát vad típusú növényekben. Ezek az eredmények, valamint a 35S::PAO5 túltermelő növényekben mért magas Spd/Put arány mind alátámasztották azt a feltételezésünket, mely szerint az *AtPAO5* nem a ROF szintek, hanem a T-Spm/Spd homeosztázis szabályozásán keresztül fejt ki hatását az OGYP-HM átalakulás során. Megállapítottuk, hogy az *AtPAO5* által fenntartott T-Spm homeosztázis szükséges a citokinin által indukált hatékony hajtásmerisztéma képződéshez az oldalgökér primordiumokból, hatása pedig a GLB-ken, mint egyik lehetséges szabályozási útvonalon keresztül érvényesül. A magas T-Spm-szint negatívan szabályozta a hemoglobin géneket, ugyanakkor növelte az A-ARR gének relatív expresszióját, melyen keresztül csökkentette a citokinin érzékenységet.

Bár a GLB-k hatása a direkt hajtásmerisztémák kialakulása során nem a NO kioltásán keresztül valósult meg, a külsőleg alkalmazott NO csökkentette a direkt hajtásmerisztémák kialakulásának hatékonyságát és az *AtPAO5* relatív expresszióját. A jövő fontos feladata azon jelátviteli lépések elemeinek megnevezése, melyek a T-Spm-et és az *AtGLB1/2*-t a génextpresszió szabályozásához kapcsolják.

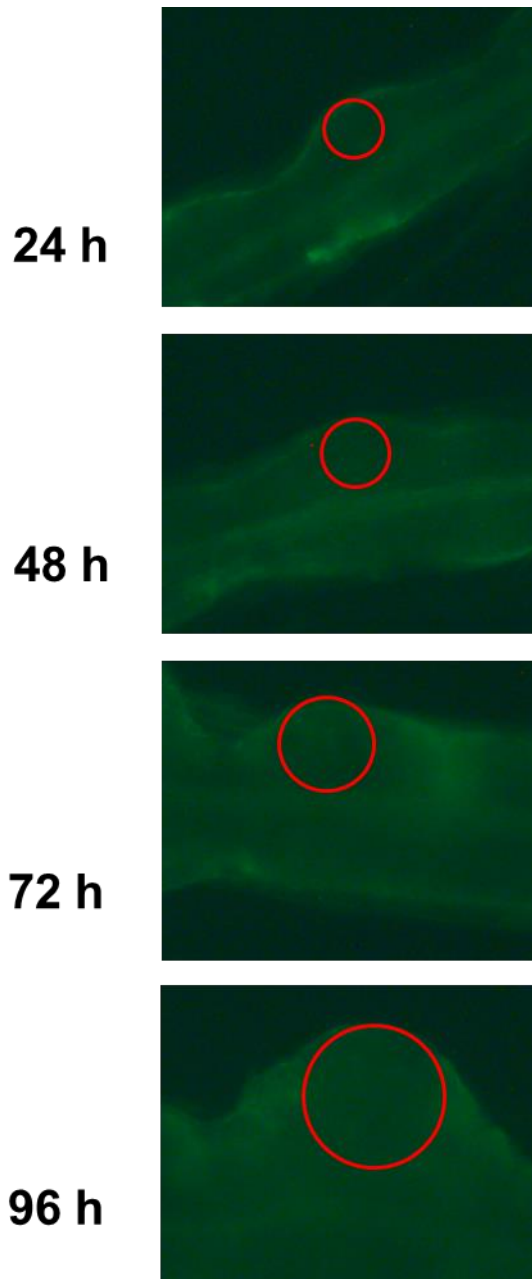
SUMMARY

The importance of polyamine metabolism in the regulation of plant growth and developmental processes was demonstrated in several studies. In this work, its involvement in the cytokinin-induced direct (without callus formation) shoot meristem formation from lateral root primordias (LRPs), was proved. Regeneration rate was correlated with a high endogenous Spd/Put ratio. In agreement, the expression of the genes related to Spd synthesis (*AtADC1,2*, *AtSAMDC2,4*, *AtSPDS1,2*) and the back-conversion of T-Spm/Spm to Spd (*AtPAO5*, but not *AtPAO1-4*) was enhanced following the cytokinin treatment. Although, ectopic expression of *AtPAO5* resulted in elevated ROS level, in *pao5-2* mutants it was not changed during the formation of direct shoot meristems compared to the wild type plants. Furthermore, not exogenously applied H₂O₂, but T-Spm decreased the regeneration potential in wild-type plants in comparison to the untreated controls. These results, as well as the high Spd/Put ratio in 35S::*PAO5* overexpressing plants, are in line with our hypothesis that *AtPAO5* influences the shoot regeneration potential not through the regulation of ROS levels but controlling the T-Spm/Spm homeostasis. We concluded that T-Spm homeostasis which is maintained by *AtPAO5* is required for efficient cytokinin-induced shoot meristem formation from LRPs. Furthermore, expression of GLB genes (*AtGLB1* and *AtGLB2*) was negatively regulated by high T-Spm levels, while that of coding of A-type ARRs augmented and the cytokinin sensitivity was lowered.

Although the effect of GLBs on the formation of direct shoot meristems was not related with NO scavenging activity, high NO level inhibited the relative expression of *AtPAO5* and shoot meristem formation. An important task that remains for the future is naming the elements of the signalling steps that link T-Spm and *AtGLB1/2* to gene expression regulation.

FÜGGELÉK

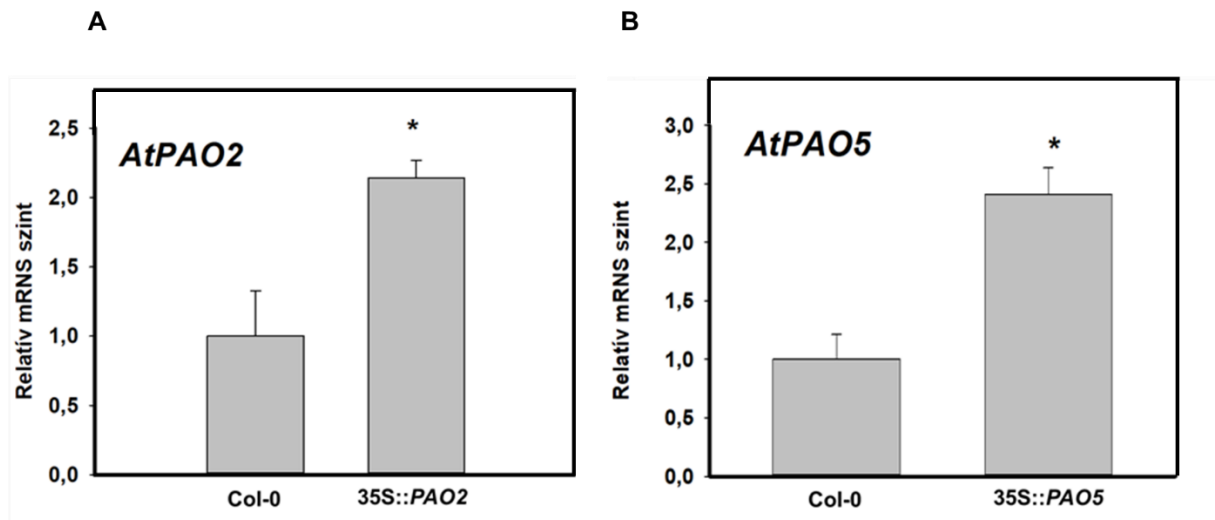
F.1 A pixel intenzitás mérés módja



1. függelék ábra: A pixel intenzitás mérés módját bemutató reprezentatív kép

A pixelintenzitást a konvertálódó szerv területéhez igazított, változó, a citokinin indukciót követő 24. órában (mitotikus osztódási szünet) 25 μm , 48. órában (szervezdemények megjelenése) 30 μm , 72. órában (korai promerisztéma kialakulása) 40 μm , 96. órában (késői promerisztéma kialakulása) 50 μm , átmérőjű körök területén határoztuk meg.

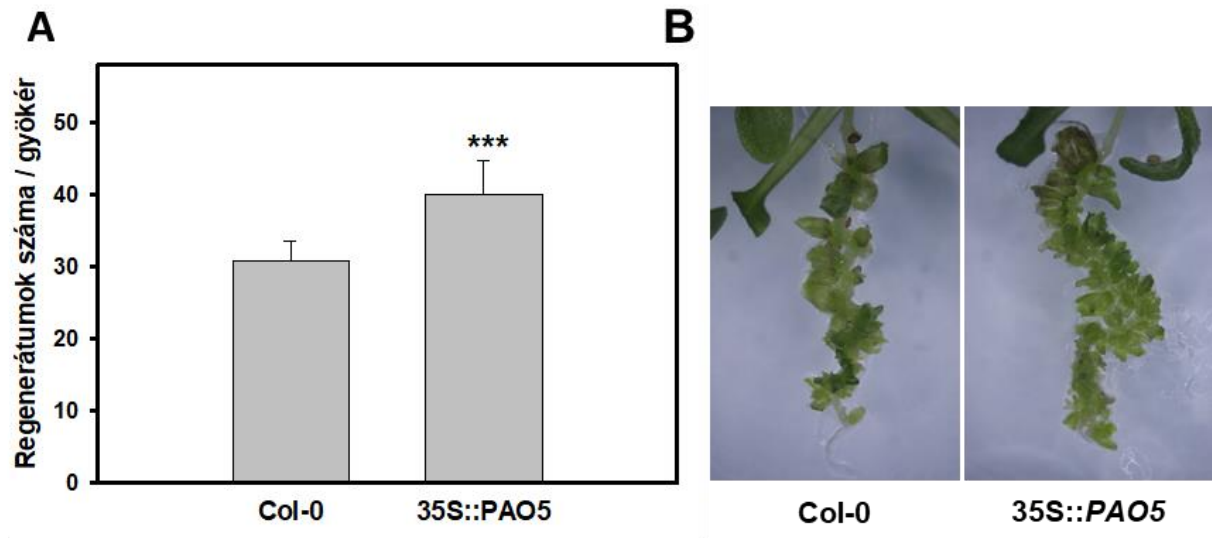
F.2 Az *AtPAO5* kifejeződése 35S::*PAO5*, és az *AtPAO2* kifejeződése a 35S::*PAO2* vonalban



2. függelék ábra: *APA02* és *PA05* kifejeződése az azokat túltermelő vonalakban

A 35S::*PAO2* vonalban az *AtPAO2* és a 35S::*PAO5*-ben az *AtPAO5* gén expressziója a 6 napos csíranövények gyökerében. Referencia a hatnapos vad típusú Col-0 csíranövény gyökerének mRNS szintje (relatív mRNS szint: 1). Az oszlopokon a hibásávok a standard hibát mutatják. A szignifikancia meghatározása Student féle t teszt p értéke alapján történt, ahol a * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$.

F.3 A 35S::PAO5 vonal regenerációs hatékonysága



3. függelék ábra: A 35S::PAO5 regenerációs hatékonyságának ellenőrzése

A vad típusú Col-0 és AtPAO5- túltermelő (35S::PAO5) növények gyökerén kialakult regenerátumok száma a citokinin indukciót követő 10. napon (A), valamint a növényeket bemutató reprezentatív képek (B). Az oszlopokon a hibasávok a standard hibát mutatják. A szignifikancia meghatározása Student féle t teszt p értéke alapján történt, ahol a * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$.

F.4 A poliaminok lebontásában szerepet játszó enzimek főbb tulajdonságai

név (korábbi név) AGI locus kód	L	szöveti szintű kifejeződés	szubsztrát	ismert fiziológiai funkció	kifejeződését indukálja			kifejeződését gátolja
					hormon	stressz	PA	
<i>AtCuAOa1</i> <i>At1g31670</i>								
				x				
<i>AtCuAOa2</i> (<i>AtCuAO8</i>) <i>At1g31690</i>	P	- szikleveél (sztóma) - gyökércsúcs - tranzíciós, elongációs és érés zóna (protoxilém)	x	Az argináz aktivitás szabályozásán keresztül befolyásolja a só stressz és elicitor indukált NO képződést és az elsődleges gyökér növekedést.	IES MeJA	árasztás sebzés	Spd	ABS SA
<i>AtCuAOa3</i> (<i>AtCuAO2</i>) <i>At1g31710</i>	P	- stipulák - hipokotil - hipokotil-gyökér találkozási pont - gyökér maturációs zóna	Put Spd	x	IES MeJA	árasztás sebzés	Put	ABS SA
<i>AtCuAOβ</i> (<i>AtAO1</i>) <i>At4g14940</i>	A	x	Put Spd	MeJA-indukált szállító szövet fejlődés* sebzés-indukált szállító szövet fejlődés levélben*	MeJA	sebzés	x	x

<i>AtCuAOγ1</i> (<i>AtCuAO1</i>) <i>At1g62810</i>	A	- sziklelevél és a növekvő levelek apikális zónáiban (hidatódák és szállítószövetek) - hipokotil (szállítószövetek) - gyökér tranzíciós zóna	Put Spd	NO képződés indukciója révén szerep az ABS-mediált csírázás és gyökér növekedés gátlásban*. SA-szignalizációs úton keresztül történő patogénekkal szembeni védekezési válaszok aktivációja*	IES ABS SA MeJA	árasztás sebzés fertőzés (flagellum)	Put	x
<i>AtCuAOγ2</i> <i>At3g43670</i>	A	- sziklelevél és növekvő levelek (hidatódák) - stipulák - gyökércsúcs - gyökér maturációs zóna (alapszövetek)	x	x	IES	árasztás sebzés	Put	MeJA ABS SA
<i>AtCuAOδ</i> (<i>AtCuAOδ2</i>) <i>At4g12290</i>	V	x	x	ABS-indukált sztóma záródás* A PA homeosztázis megváltoztatásán keresztül részt vesz a GA által szabályozott fejlődési folyamatokban (csírázás, levél fejlődés, virágzás ideje)	ABS	x	x	x
<i>AtCuAOε1</i> (<i>AtCuAOε</i>) <i>At4g12270</i>	x							

név / AGI locus kód	L	szubsztrát	szöveti szintű kifejeződés			funkció (vagy feltételezett funkció)	Ref.
			2-5 napos csíranövény	5-8 napos csíranövény	virág		
<i>AtPAO1</i> <i>At5g13700</i>	citoszol	Nor-Spm T-Spm Spm	- gyökér tranzíciós zóna - SAM -sziklevél -újonnan kialakuló levelek	- gyökér tranzíciós és maturációs zóna (minden szövetben) -sziklevek és a kifejlett levelek csúcsa - hidatódák - stipulák	- portok (tapétum, mikrospórák: Később csak a mikrospóra anyesejtben marad erős kifejeződés - később portok porzószáll kapcsolódási pont - vacok, szár (szállító szövetekben)	- stressz válaszok - tolerancia fokozása (só, árasztás) - gyökér fejlődés - fertilitás	a, d, g, i
<i>AtPAO2</i> <i>AT2G43020</i>	peroxiszóma	Spm Spd Nor-Spm T-Spm N1-acetyl-Spm	- gyökérsüveg (a QC-hez közelebbi sejtekben, kolumella iniciálisokban) - gyökér elongációs és differenciációs zóna - hipokotil-gyökér kapcsolódási ponton (minden szövetben) - hipokotil	- A gyökérben történő kifejeződése a 2-5 napos csíranövényével megegyező marad. - RAM, SAM - stipulák - fejlődő levelek: főként a szállító szövetek körül és a levélnyelben (Ez a mintázat a későbbi	- A korai virágfejlődés során megjeleik. - termő (bibe és magkezdemény fala) - későbbi fejlődés során eltűnik - érett pollenszem: a pollináció és pollencső növekedés során megmarad - nektáriumok -csészelevelek zárósejtjei	- gyökér fejlődés - levélér fejlődés -hajtás fejlődés -csírázás - csíranövény korai fejlődése	a, d, f, g, h, i

				fejlődés során eltűnik.) -hidatódák - zárósejtek			
AtPA03 <i>At3g59050</i>	peroxiszóma	Spm Spd Nor-Spm T-Spm N ¹ -acetyl-Spm	- gyökércsúcs, gyökérsüveg (LRC sejtek, kolumella) - gyökér elongációs és differenciációs zóna (minden szövet kivétel az endodermisz) - hipokotil-gyökér kapcsolódási pont mellett - sziklevelek	A mintázat a hipokotilban és gyökérben a korábbiakhoz hasonló marad. - stipulák - trichómák - zárósejtek	- A fiatal virágrügyekben már megjelenik. - Későbbi fejlődés során: a termőben és portokban, prozoszálban, pollenszembben. - A pollináció és pollencső növekedés során megmarad	- gyökér és levél fejlődés - fertilitás -védekezési válaszok - ROS homeosztázis	a, b, d, f, g, i
AtPA04 <i>At1g65840</i>	peroxiszóma	Spm Spd T-Spm Nor-Spm	Legerősebb a kifejeződés: gyökér, virág (a szíromlevel kivételével), sziklevél. A vizsgált 7 és 14 napos csíranövények minden szervében és szövetében kifejeződik.			-sötét indukálta szenescencia - gyökér fejlődés - fertilitás	a, d, f, g, i
AtPA05 <i>At4g29720</i>	citoszol	T-Spm Spm Nor-Spm N1-acetil-Spm	- sziklevél - hipokotil - hipokotil-gyökér kapcsolódási pont	A mintázat a hipokotilban, sziklevélben és gyökérben a korábbiakhoz	- A fiatal, még teljesen zárt virágrügyekben már megjelenik: főként a portok tapétum sejtjeiben	-xilém differenciáció - szár megnyúlása	c, d, e, g, i, j

			<ul style="list-style-type: none"> - gyökér (tranzíciós zónától a hipokotil irányába): kortikális és szállítószöveti sejtekben - gyökér maturációs zóna: specifikusan a szállítószövetben 	<p>hasonló marad, a későbbi fejlődés során erőssége csökken.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Az újonnan kialakuló levelek disztális részén majd a teljes levélre kiterjed. -trichómák alapi részén 	<ul style="list-style-type: none"> - Későbbi fejlődés során a portok és porzószáll kapcsolódási pontjára és a porzószáll felső részére korlátozódik. - csésze-, és szíromlevelek - termő: bibe, septum (pollináció után jelentősen csökken) 	<ul style="list-style-type: none"> - rozetta levelek és levél erek fejlődése - tolerancia fokozása (só, ársztás) - vegetatív-reproduktív átmenet 	
--	--	--	---	---	--	---	--

2. függelék táblázat: Az Arabidopsis PAO-k főbb jellemzői

Az egyes poliamin-oxidázok szerv és szövet szintű kifejeződése AtPAO:: β -glükuronidáz (GUS) transzgenikus vonalak segítségével lett meghatározva (Fincato és mtsai., 2011), Használt rövidítések: QC: nyugvó centrum, quiescent center; LRC: lateral root cap; RAM: gyökér apikális merisztéma, root apical meristem; SAM: hajtásmerisztéma, shoot apical meristem; L: sejten bellüli lokalizáció; Ref.: referenciák; (a) Fincato és mtsai. (2011), (b) Podia és mtsai. (2023), (c) Zarza és mtsai. (2017), (d és e) Sagor és mtsai. (2016, 2021), (f) Kamada-Nobusada és mtsai. (2008), (g és h) Takahashi és mtsai (2010, 2019), (i) Andronis és mtsai (2014), (j) Kim és mtsai. (2014) alapján, további hivatkozások a forrásokon belül.

