

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Növénybiológiai Tanszék

XXXI. OTDK Biológia Szekció

**A szervfejlődést szabályozó LOB-domén transzkripció  
faktorok génjeinek vizsgálata szálkaperjében**



Gombos Magdolna  
Biológus Msc nappali szakos hallgató

Témavezető: Dr. Györgyey János  
Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpont –  
Növénybiológiai Intézet

Konzulens: Dr. Mainé Dr. Csiszár Jolán  
Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar –  
Növénybiológiai Tanszék

Szeged  
2012

## Tartalmi összefoglaló

A *LATERAL ORGAN BOUNDARY DOMAIN (LBD)* gének csoportja egy növényekre specifikus, konzervált, szervhatárokon működő népes géncsaládot takar. Habár bizonyítottan részt vesznek szinte minden fejlődési folyamatban az embriogenezistől egészen a virágképzésig, pontos szerepüket mindezidáig csak néhány esetben sikerült meghatározni. Emellett a rendelkezésre álló információk nagy része *Arabidopsis*-sal végzett kísérletekből származik, az egyszikűekben betöltött funkciójukról alig vannak ismereteink.

Kutatásaink két olyan *LBD* génre irányultak, melyekről feltételezzük, hogy az oldalgyökerek képződésével és a sejtciklus szabályozásával is kapcsolatba hozhatók. Nevezetesen a *Bd2g53690* és a *Bd2g34520* génekről van szó. Kísérleteinkben ennek a két génnek az expressziós mintázatát kívántuk felderíteni egy alig 10 éve köztudatba került egyszikű modellnövény, a szálkaperje (*Brachypodium dystachion*) segítségével. Különböző növényi szövetekben, a gyökércsúctól egészen a hajtáscsúcsig, vegetatív és generatív szervekben egyaránt vizsgáltuk kvantitatív, valós idejű PCR (Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction) analízissel a két gén transzkripció szintjét.

Továbbá összefüggéseket kerestünk ezen gének és a *Brachypodium* adatbázisból ismert egyetlen A2 típusú ciklinjének kifejeződési mintázata között.

**Kulcsfogalmak:** A2 ciklin, *LATERAL ORGAN BOUNDARY DOMAIN (LBD)* gén, LOB-domén transzkripció faktorok, sejtosztódás, szálkaperje (*Brachypodium dystachion*), szervfejlődés, valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR)

## Tartalom

|                                                                                                          |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tartalmi összefoglaló.....</b>                                                                        | <b>2</b>  |
| <b>Tartalom.....</b>                                                                                     | <b>3</b>  |
| <b>Bevezetés.....</b>                                                                                    | <b>5</b>  |
| <b>1. A szálkaperje (<i>Brachypodium dystachion</i>) bemutatása .....</b>                                | <b>8</b>  |
| 1.1 A <i>Brachypodium dystachion</i> , mint modellnövény.....                                            | 8         |
| 1.4 Nevelési feltételek .....                                                                            | 11        |
| 1.5 Genomikai kutatások.....                                                                             | 12        |
| <b>2. A LOB-domén gének és fehérjék szerkezete, funkciója.....</b>                                       | <b>14</b> |
| 2.1 Határvonalak a növényi egyedfejlődésben.....                                                         | 14        |
| 2.2 Az LBD fehérjék szerkezete és génjeik filogenetikai kapcsolatai .....                                | 14        |
| 2.3 Az LBD fehérjék szerepe a növények egyedfejlődésében .....                                           | 17        |
| 2.3.1 A levélfejlődés és az <i>LBD</i> gének kapcsolata.....                                             | 17        |
| 2.3.2 Az <i>LBD</i> gének és a virágfejlődés kapcsolata .....                                            | 18        |
| 2.3.3 A merisztémafejlődés és a szállítószövetek kialakulásának kapcsolata az <i>LBD</i> -génekkel ..... | 19        |
| 2.3.4 Az <i>LBD</i> gének és a gyökérfejlődés kapcsolata .....                                           | 20        |
| 2.4 A metabolikus folyamatok II-es típusú LBD fehérjék általi szabályozása .....                         | 21        |
| 2.6 Az LBD gének kifejeződésének szabályozása .....                                                      | 22        |
| 2.7 Az LBD proteinek és a sejtciklus szabályozásának kapcsolata.....                                     | 23        |
| <b>3. Célkitűzések .....</b>                                                                             | <b>25</b> |
| <b>4. Anyag és módszer .....</b>                                                                         | <b>26</b> |
| 4.1 Növények nevelése.....                                                                               | 26        |
| 4.2 Mintavétel .....                                                                                     | 27        |
| 4.3 Primerek tervezése .....                                                                             | 29        |
| 4.4 Minták feldolgozása: RNS-izolálás, cDNS szintézis, qRT-PCR .....                                     | 29        |
| <b>5. Eredmények és megvitatásuk .....</b>                                                               | <b>31</b> |
| 5.1 <i>Brachypodium</i> LOB-domén fehérjék rokonsági fája .....                                          | 31        |

|                                               |           |
|-----------------------------------------------|-----------|
| 5.2 Brachypodium ciklinek rokonsági fája..... | 32        |
| 5.1 A Bd2g34520 transzkripció mintázata ..... | 33        |
| 5.2 A Bd2g53690 expresszió mintázata .....    | 34        |
| 5.3 A ciklinA2 expresszió mintázata .....     | 36        |
| <b>Összegzés .....</b>                        | <b>39</b> |
| <b>Rövidítések .....</b>                      | <b>41</b> |
| <b>Irodalomjegyzék .....</b>                  | <b>42</b> |
| <b>Köszönetnyilvánítás.....</b>               | <b>52</b> |
| <b>Melléklet .....</b>                        | <b>53</b> |
| <b>Függelék.....</b>                          | <b>58</b> |
| <b>Nyilatkozat .....</b>                      | <b>62</b> |

## Bevezetés

Egy magasabb rendű, edényes növény felépítése lényegében a hajtástengelyből, a róla elágazó oldalhajtásokból, az azokon fejlődő vegetatív és generatív szervekből, valamint a központi gyökérből és az oldalgyökerekből áll. Az élővilágban egyedülálló módon a szervek organogenezise szinte teljes egészében posztembrionálisan megy végbe, köszönhetően annak, hogy a növények esetében csírázás után is maradnak pluripotens sejtpopulációk, és a már differenciálódott sejtek is képesek dedifferenciálódni és visszanyerni pluripotenciájukat, ezzel együtt osztódóképességüket.

A hajtásban az embrionális eredetű hajtás apikális merisztéma (shoot apical meristem – SAM) hordozza azokat az őssejteket, amelyekről lassú proliferációval fűződnek le az oldalszervek, levél- és virágkezdemények építőköveiként szolgáló sejteket létrehozó másodlagos merisztémák. Ezzel ellentétben a gyökérből hiányoznak az ehhez hasonló, gyökér apikális merisztémából származó másodlagos merisztéma-sejtek. Helyettük a periciklus iniciális sejtjei kezdenek el osztódni, elindítva ezzel az oldalgyökerek fejlődését. Ily módon az osztódásra képes sejtek egy nyitott, folyamatos növekedésre képes rendszert biztosítanak, melynek elemei meghatározott rendben ismétlődnek, és a belőlük fejlődő szövetek, szervek is egymástól diszkrét távolságban és sorrendben követik egymást.

Celluláris szinten tehát bármely más többsejtű organizmushoz hasonlóan a magasabb rendű növényeknél is a sejtek osztódása, az utódsejtek meghatározott sorsa és ezek korrekt térbeli és időbeli elrendeződése határozza meg a testszerveződést. Ennek precíz szabályozását bonyolult folyamatok összetett, sokrétű kapcsolatrendszere biztosítja. A növényi hormonok közül kiemelt szereppel bír ezekben a folyamatokban az auxin és a citokinin, molekuláris szinten pedig a sejtosztódást szabályozó transzkripciós faktorok, ciklinek és ciklin dependens kinázok. Mindenekelőtt azonban a fejlődő új szerv és a merisztémák határának kijelölése az egyik legfontosabb feladat. Mai ismereteink szerint ez a határvonal nem egyfajta filozófiai, „vagy merisztéma vagy fejlődő szerv” szélsőséges állapota közti döntést jelenti, hanem sokkal inkább egy egyedi expressziós mintázattal rendelkező, specializált sejtekből álló önálló entitás. A határvonalat meghúzó sejtek pozícióját a merisztémák centrumában elhelyezkedő indeterminált sejtekből érkező szignálok határozzák meg. Funkciójuk kettős: elválasztani egymástól a merisztémát és a belőle fejlődő szervet, ugyanakkor fenntartani az osztódó szövet és a differenciálódott sejtek közötti kapcsolatot. Ennek megfelelően olyan egyedi, csak rájuk jellemző géneket

működtetnek, amelyek mérséklék a sejtosztódást és az auxin efflux csatornák hatékonyságát, ugyanakkor aktiválják a merisztematikus géneket. Prominens példák a kizárólag szervhatárokon elhelyezkedő sejtekben kifejeződő génekre a lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) *CUP-SHAPED COTYLEDON* (*CUC*) génjei, vagy a *PETALLOSS* (*PTL*), a *BLADE ON PETIOLE* (*BOP*) és nem utolsósorban a *LATERAL ORGAN BOUNDARY DOMAIN* (*LBD*) gének (Rast és Simon, 2008).

Az *LBD*-génekkel kapcsolatos kutatások a 2000-es évek elején kezdődtek. Létezésükre *Arabidopsis* ET22 vonalakkal végzett géncsapdázási (gene trap) kísérletek derítettek fényt (Shuai és mtsai, 2002). A Suahi és munkatársai által talált génről kezdetben csak annyit lehetett tudni, hogy valamennyi hajtás apikális merisztémából eredő szerv adaxiális alapjának sejtsortjaiban valamint az oldalgyökök iniciálisaiban expresszálódik. A neve is innen ered: *LATERAL ORGAN BOUNDARY* (*LOB*).

Az általa kódolt fehérje akkor még ismeretlen volt. Pusztán csak annyit lehetett megjósolni, hogy tartalmaz egy meglehetősen konzervált, nagyjából 100 aminosavból álló szerkezeti motívumot, a *LOB*-domént. E domén szekvenciája még 42 másik *Arabidopsis* génben és számos más növényfajban, pl. szójában (*Glycine max*), lucernában (*Medicago sativa* és *Medicago truncatula*), kukoricában (*Zea mays*), rizsben (*Oryza sativa*), paradicsomban (*Lycopersicon esculentum*), erdei fenyőben (*Pinus sylvestris*), búzában (*Triticum aestivum*) és burgonyában (*Solanum tuberosum*) is fellelhető. Kiderült az is, hogy valójában egy igen sok tagot számláló, nagy géncsaládról van szó (Shuai és mtsai, 2002).

Mivel *LOB*-doménnel vagy hasonló szerkezeti motívummal rendelkező fehérjét növényi adatbázisokon kívül eddig sehol sem találtak, kétséget kizáróan ezek a fehérjék növényi specifikus folyamatokban vesznek részt. Az *LBD*-gének változatos időbeli- és szövetspecifikus kifejeződési mintázata alapján sejthető az is, hogy számos különböző fejlődési folyamat irányításban játszanak szerepet. Aktivitásuk sok más, kulcsfontosságú gén expressziójával átfed. Példaként említve néhányat: a virágképzésért felelős *UNUSUAL FLORAL ORGANS* (*UFO*), az apikális merisztéma sejtjeit szabályozó *NO APICAL MERISTEMLESS* (*NAM*) vagy a *CUP-SHAPED COTYLEDON* gének kifejeződése kísértetiesen hasonlít az *LBD* génekéhez (Souer és mtsai, 1996; Aida és mtsai, 1997; Lee és mtsai, 1997; Zondlo és mtsai, 1999; Takada és mtsai, 2001). Később az is bebizonyosodott, hogy ezen gének együttesen felelősek a szervhatárok kijelöléséért, a

merisztémák és a fejlődő oldalszervek elhatárolását végző sejtek identitásának fenntartásáért.

A több mint egy évtizede zajló kutatások eredményeként ma már azt is tudjuk, hogy a LOB-domain fehérjék transzkripciós faktorok (Husband és mtsai, 2007). Számos esetben az általuk szabályozott gének is ismertek, mint pl. a *KNOTTED-LIKE HOMEODOMAIN* (*KNOX*) gének (Byrne és mtsai, 2000, Ikezaki és mtsai, 2010; Phelps-Durr és mtsai, 2005). Emellett sikerült felderíteni néhány, az LBD gének működését közvetlenül irányító mechanizmusra is, mint pl. az AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) fehérjék által történő közvetlen *LBD*-génaktiváció. Sőt, néhány *LBD* gén promótrében auxinra érzékeny (auxin responsive – AuxRE) szekvencia-elemeket is találtak (Majer és Hochholdinger, 2011).

Sajnos, bár több száz génről feltételezhető, hogy az *LBD* génekhez tartozik, eddig mindössze csak néhányukat sikerült funkcionális szempontból részletesen jellemezni, a legtöbbjük pontos biológiai szerepe máig bizonytalan. Emellett ma még legalább ilyen keveset tudunk az őket szabályozó cisz-ható elemekről és az LBD fehérjék közvetlen targetjeiről is. A viszonylag kevés vagy még részleteiben hiányos információ ellenére azonban vitathatatlanul fontos szerep tulajdonítható az *LBD*-géncsalád tagjainak. Átfogó vizsgálatuk a szervhatárok fenntartása és a növényi hormonokra, környezeti hatásokra adott válaszfolyamatok háttérében álló molekuláris mechanizmusok megértése szempontjából is lényeges.

Kutatásunkkal szeretnénk tovább árnyalni a róluk kialakított képet. Ám még mielőtt rátérnék az eredmények prezentálására, szeretném röviden bemutatni magát a géncsaládot, valamint a vizsgálati objektumul szolgáló *Brachypodium dystachion*t.

## 1. A szálkaperje (*Brachypodium dystachion*) bemutatása

A szálkaperje (*Brachypodium dystachion*) mintegy tíz éve került a tudományos érdeklődés középpontjába. Nem véletlenül: ez az egyéves kis fűféle számos olyan kedvező tulajdonsággal rendelkezik, melyek alapján a mai modern növénybiológiai kutatások ideális modellszervezetének tekinthető. Alig egy évtized alatt sikerült ígéretes és igen hasznos modellnövénné avanzsálni a szálkaperjét. Ma már rendelkezésünkre állnak BAC-könyvtárak (Hasterok és mtsai, 2006; Huo és mtsai, 2006; 2008), genetikai markerek (Vogel és mtsai, 2009a) a genom fizikai térképe (Garvin és mtsai, 2009; Gu és mtsai, 2009), 2009 óta pedig elérhető a *Brachypodium* teljes genom-szekvenciája (Vogel és mtsai, 2010), valamint a molekuláris biológiai vizsgálati módszerek, mutagenesis-technikák, hatékony transzformációs eljárások sikerrel adaptálhatók a szálkaperje esetében is (Vain és mtsai, 2008; Vogel és mtsai, 2006a), hogy csak a legfontosabb eredményeket említsem. Ebben a fejezetben röviden ismertetném magát a növényt, különös tekintettel azokra a sajátságokra, melyek alapján mi is ideális „kísérleti alany” választottuk.

### 1.1 A *Brachypodium dystachion*, mint modellnövény

Az élő szervezetek bonyolultsága, végtelen komplexitása mindig is óriási kihívások elé állította a kutatókat. A biológiai folyamatokat irányító alapvető törvényszerűségek feltárása érdekében kezdtek el használni, és használnak ma is olyan, viszonylag kevésbé összetett szervezeteket, mint pl. az *E. coli*, a fonálférgek (*Nematoda*) közzé tartozó *Caenorabditis elegans*, az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) vagy a növénybiológiában a lúdfű (*Arabidopsis thaliana*). De miként pl. az ecetmuslica sem alkalmas a gerincesekre jellemző speciális folyamatok leírására, akként a lúdfű alkalmazhatóságának is megvannak a maga korlátai. Példának okáért az egyszikűek egyed- és szervfejlődésének, eltérő sejtfalszerkezetének, az interkaláris merisztémák kialakulásának és szerepének modellezéséhez az *Arabidopsis* nem megfelelő objektum.

Mivel azonban a fűfélék óriási szerepet töltenek be mindennapi kenyerünk forrásaként, és várhatóan a jövőben mint energianövények is, egyre nagyobb szükség volt egy könnyen kezelhető, egyszikűekre alkalmazható modellrendszer kidolgozásra. Molekuláris biológiai szempontból ennek a szerepnek a betöltésére korábban a rizs (*Oryza sativa*) alkalmasnak tűnt, viszonylag kis genommérete okán. Sajnos azonban, lévén vizes élőhelyen előforduló trópusi eredetű növény, nehezen alkalmazható pl. a mérsékelt övi gabonafélék

vernalizációs folyamatainak, szárazságtűrésének vagy akár fagytűrő képességének vizsgálatához. Nagy mérete és speciális nevelési igényei pedig tovább nehezítik a rizzsel való kutatómunkát (Vogel és Bragg, 2009b).

Ezzel szemben a *Brachypodium* génusz képviselői a világ szinte összes mérsékelt övi régiójában megtalálhatók. Ősi származási helye a Mediterráneumba és India szubkontinensére tehető. Széles elterjedési területének megfelelően számos ökotípusa ismert: az egyes változatok között eltérések tapasztalhatók a generációs idő hosszában, a növények méretében, a virágzás időpontjában, betegség-ellenállóság és stressztolerancia tekintetében (Luo és mtsai, 2010; Opanowitz és mtsai, 2008; Schwartz és mtsai, 2010). A búzához hasonlóan a *Brachypodium* ökotípusok között is leírtak poliploid változatokat, ahol  $1n$  kromoszómaszám 5 helyett 10 vagy 15. Ez a számsorozat szépen beleilleg egy autoploid sorba: diploid, tetraploid és hexaploid. Fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH) végzett kariotipizálási kísérletek alapján azonban sokkal valószínűbb, hogy az  $1n=10$  és az  $1n=5$  kromoszómaszámú kariotípusok diploidoknak tekinthetők, az  $1n=15$  kromoszóma számúak pedig e kettő allotetraploid leszármazottai (Hasterok és mtsai, 2004). Az allotetraploid növények könnyen elkülöníthetők diploid társaiktól: nagyobb méretűre nőnek, magvaik nagyobbak, nem igényelnek vernalizációt a virágzás indukálásához, és a különböző környezeti hatásokra nézve sokkal toleránsabbak, mint a diploid változatok (Vogel és Bragg, 2009b).

A variánsokból két gyűjteményt is létrehoztak: az egyiket az amerikai USDA (United States Department of Agriculture), a másikat a walesi Aberystwyth University gondozza. A gyűjtemény legnagyobb része Spanyolországból, Franciaországból, Olaszországból, Szlovéniából, Törökországból és Irak területéről származik. A több mint 30 természetes ökotípus fenntartása mellett a két intézményben beltenyésztett vonalak előállításán is fáradoznak. Az egyes vonalakat „Bd” előtaggal illetik, amelyet általában két szám követ, kötőjellel elválasztva, pl. Bd2-3. Az első szám annak az ökotípusnak az azonosítójára utal, amelyből a beltenyésztett vonal származik. A második szám feltüntetése pedig azért szükséges, mert egy ökotípusból általában több különböző beltenyésztett vonalat is létrehoztak, a kötőjel utáni számjegy ezeknek a vonalaknak a megkülönböztetésére szolgál. A nomenklatúrában kivételt képez a Bd21-es vonal: eredetileg egyedüli leszármazottja volt a Bd254867-es ökotípusnak, így második számot nem kapott (Garvin és mtsai, 2008). Ez a vonal azért is különleges, mert a genomikai kutatások többségében, a teljes genom- és

EST-szekvenálási projektekhez is ennek a vonalnak a genomja, DNS és RNS-tartalma szolgált forrásként, éppen azért, mert diploid,  $1n=5$  kromoszóma számú. Többek között a rendelkezésre álló részletes szekvencia-ismeretek miatt választottuk mi is kísérletünkhöz a Bd21-es vonal növényeit.

Kis termete és rövid generációs ideje miatt ideális nagy mintaszámot igénylő kísérletekhez: egyedsűrűsége akár  $1000$  növény/ $m^2$ . Ez az egyedszám könnyen fenntartható üvegházi körülmények között vagy akár növénynevelő kamrában is, lehetővé téve nagy mennyiségű növényi anyag ellenőrzött környezeti feltételek mellett történő előállítását. Összevetésként ugyanekkora területre *Arabidopsis*ből  $2000$ , búzából megközelítőleg  $50$ , rizsből pedig csak  $36$  növény ültethető (Vogel és Bragg, 2009b).

A rizsnél jóval alkalmasabb modellnövénynek tekinthető szerkezeti és funkcionális genomikai vizsgálatok szempontjából is: három, egymástól független kutatócsoport vizsgálatai alapján a *Brachypodium* c-értéke hozzávetőlegesen  $0,36$  pg/haploid genom, összhangban a genomméretre kapott  $300-320$  Mbp körüli nagysággal (Bennett és Leitch, 2005; Vogel és Hill, 2008; Vogel és mtsai, 2006b), ami az egyik legkisebb az ismert fűfélék között. Filogenetikailag is sokkal közelebbi rokonságban áll a legjelentősebb gabonanövényeinkkel (búzával, árpával), mint a rizs. Szekvenciavizsgálatok szerint a *Brachypodium* nemzetség a rizs és a mérsékelt övi gabonaféléket magában foglaló klád között helyezkedik el (Hsaio és mtsai, 1994; Catalán és mtsai, 1995, 2000). A kloroplasztisz genom restrikciós helyeit és a *matK* gén szekvenciáját is figyelembe vevő további kutatások alapján a *Brachypodium* génusz a *Poidae* alcsalád törzsfáján belül a gabona-, takarmány- és pázsitfűfélék leválása előtt helyezkedik el, vagyis a gazdaságilag óriási jelentőséggel bíró gabonanövényeinket tömörítő *Triticae* és *Poeae* taxonok testvércsoportjának tekinthető (Kellogg, 2001; Döring és mtsai, 2007).

Mindemellett önbeporzó, ami megkönnyíti a géntérképezéshez, mutáns analízishez nélkülözhetetlen homozigóta vonalak indítását és fenntartását (Draper és mtsai, 2001).

Összehasonlítva tehát a leggyakoribb modellnövényekkel, a *Brachypodium* mind biológiai, fiziológiai, mind genetikai jellemzői alapján is eleget tesz a jó modellorganizmusokkal szemben támasztott alapvető követelményeknek (1. táblázat, Opanowitz és mtsai, 2008).

**A *Brachypodium* összehasonlítása gazdaságilag hasznos fűféléinkkel és a lúdfűvel**

|                       | <i>Brachypodium<br/>dystachion</i> | <i>Arabidopsis<br/>thaliana</i> | <i>Triticum<br/>aestivum</i> | <i>Zea mays</i>  | <i>Oryza<br/>sativa</i> | <i>Hordeum<br/>vulgare</i> |
|-----------------------|------------------------------------|---------------------------------|------------------------------|------------------|-------------------------|----------------------------|
| kromoszómaszám (2n)   | 10                                 | 10                              | 42                           | 20               | 24                      | 14                         |
| genomméret            | 300 Mb                             | 164 Mb                          | 16700 Mb                     | 2400 Mb          | 441 Mb                  | 5000 Mb                    |
| reproduktív stratégia | önbeporzó                          | önbeporzó                       | önbeporzó                    | keresztbeporzás* | önbeporzó               | önbeporzó                  |
| életciklus (hét)      | 10-18                              | 10-11                           | 12 (tavaszi)<br>40+ (ősz)    | 10+              | 20-30                   | 16+                        |
| magasság              | 0,3 m                              | 0,2 m                           | 1 m                          | 2 m              | 1,2 m                   | 1,2 m                      |
| transzformálhatóság   | könnyű                             | könnyű                          | lehetséges                   | könnyű           | könnyű                  | könnyű                     |
| nevelési igények      | nagyon egyszerű                    | nagyon egyszerű                 | egyszerű                     | egyszerű         | igényes                 | egyszerű                   |

1. táblázat (Opanowicz és mtsai, 2008) \* A kukorica (*Zea mays*) természetes szaporodási stratégiája is eredendően önbeporzás, a beltenyészett vonalakat is így tartják fenn, a keresztbeporzás csak a hibrid vetőmagok előállítására vonatkozik.

#### **1.4 Nevelési feltételek**

A szálkaperje számos erénye közül feltétlenül ki kell emelni könnyű nevelhetőségét. Nem igényel különleges talajkeverékeket. Így a laboratóriumunkban használt, gyökérfejlődési és szárazságtűrési vizsgálatokhoz bevált homok-perlit 2:1 arányú elegyen is jól nevelhető. A perlitnek köszönhetően ennek a keveréknek igen jók a vízháztartási jellemzői, ráadásul összehasonlítva más ültető közeggel, a homok-perlitben vagy homok-vermikulit keverékében nevelt növényeknél ritkábban jelentkezik a *Pythium* okozta gyökérrothadás, amire normál körülmények között a szálkaperje eléggé fogékony (Vogel és Bragg, 2009b).

Az optimális nevelési körülmények (20 h megvilágítás: 4 h sötét fotoperiódus, 24°C-os nappali, 18°C-os éjszakai hőmérséklet) növénynevelő kamrában és üvegházban is egyszerűen biztosíthatóak és kontrollálhatóak (Vogel és Bragg, 2009b). Emellett a virágzás indukálásához az összes eddig ismert vad diploid változat igényel vernalizációs körülményeket. A vernalizáció minimális időtartamában jelentős eltérések tapasztalhatók a különböző ökotípusok között (Schwartz és mtsai, 2010). Általánosan elmondható, hogy a hűvösebb, északabbra fekvő területekről, pl. az Észak-Törökországból származók a virágzáshoz hosszabb, 8-12 hetes hidegkezelést igényelnek, míg a déli területekről, pl. Irakból származóknak 2-3 hét is elegendő. Általában a vernalizációs kezelést

sztratifikációval kombinálva alkalmazzák. A vernalizáció következtében a növények ugyan kisméretűek lesznek, de a hidegkezelést követően gyorsan elkezdnek virágozni (Vogel és Bragg, 2009b).

Állandó, 20-21°C-os hőmérséklet és hosszúnappalos megvilágítás mellett a Bd2-3, a Bd3-1 és a Bd21-es beltenyésztett vonalak vernalizációs periódus nélkül is virágznak (Vogel és mtsai, 2006a; Vogel és Hill, 2008).

### 1.5 Genomikai kutatások

A *Brachypodium*ról már számos genomikai információ a rendelkezésünkre áll, beleértve a cDNS könyvtárakat, BAC-könyvtárakat, EST-gyűjteményeket (Vogel és mtsai, 2006b), nagy felbontású, részletes genetikai térképeket és nem utolsósorban a teljes genom szekvenciát (Vogel és mtsai, 2010). Az első hozzáférhető információkat a Genbank-ba 2005-ben feltöltött mintegy 20440 EST-szekvencia jelentette (Vogel és mtsai, 2006b). Összesen hat cDNS könyvtár adatait használták fel, és nagyjából 6000 gén transzkriptumát reprezentálja. A cDNS klónok random szekvenálásával nyert adatok igen hasznosnak bizonyultak microarray-kísérletekhez, génexpressziós vizsgálatokhoz, genomi szekvenciák annotálásához. Később, a genomszekvenálási projekt részeként az amerikai Department of Energy Joint Genome Institute további 180 ezer EST-szekvenciával bővítette az adatbázist (Vogel és Bragg, 2009b).

Természetesen ahhoz, hogy bepillantást nyerjünk a teljes genomba, az EST-k ismerete nem elegendő. A genom méretének és komplexitásának becsléséhez, fizikai térképének megalkotásához BAC-könyvtárak létrehozása elengedhetetlen, különösen akkor, ha nem áll rendelkezésünkre a teljes genom szekvencia. Ezen kívül megkönnyíti a fajok közötti összehasonlító genomikai vizsgálatokat is. *Brachypodium*ból összesen hat BAC-könyvtárat hoztak létre, ebből kettő a Bd21-es vonalból született (Huo és mtsai, 2007). Ez a két könyvtár 29 haploid genom-ekvivalenst reprezentál, és az egyes génekre 99,99%-os valószínűségű lefedettséget biztosít. A kontigok összerendezésével pedig 2009-ben elkészült a *Brachypodium*-genom fizikai térképe (Gu és mtsai, 2009). Bd21-es könyvtárakat használtak BES (BAC end sequence) szekvenciák meghatározásához is. A kapott 38,2 Mbp-nyi szekvencia - összehasonlítva a rizs genomról ismert adatokkal - arra enged következtetni, hogy a *Brachypodium* genom 45,9%-os GC-tartalommal rendelkezik,

18%-a repetitív DNS, melyből 11% homológ, 7,3% unikális, csak a *Brachypodium*ra jellemző szekvencia, és a genom 21,1%-a alkotja a kódoló régiót (Huo és mtsai, 2007).

Nem utolsó sorban BAC-könyvtárak segítették a kutatókat a teljes genom-szekvencia tökéletesítésében. A szekvenálási kutatások 2007-ben kezdődtek el a Community Sequencing Program keretein belül. Két év elteltével sikerült nagy pontosságú, 8x-os lefedettségű teljes genom-szekvenciát meghatározniuk. A vizsgálatok eredményeként a *Brachypodium* genomban 25523 fehérjekódoló gént prediktáltak, ami nagyjából egy tartományba esik a rizs 28236, és a cirok (*Sorghum bicolor*) 27640 feltételezett fehérjekódoló génjeinek számával (Paterson és mtsai, 2009; Tanaka és mtsai, 2008; Vogel és mtsai, 2010).

A fent említett kutatási eredmények óriási méretű adathalmazt jelentenek. Adatbázisokba gyűjtve már az interneten is hozzáférhetők, s nélkülük elképzelhetetlen lenne a szálkaperje széles körben történő alkalmazása (2. táblázat).

| A <i>Brachypodium</i> -kutatásokhoz nyilvánosan is hozzáférhető adatforrások |                                                |                                                                                 |
|------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Forrás                                                                       | Tartalom                                       | Honlap                                                                          |
| <b>International Brachypodium Initiative</b>                                 | legújabb kutatási eredmények és hasznos linkek | <a href="http://www.brachypodium.org/">http://www.brachypodium.org/</a>         |
| <b>BrachyBase</b>                                                            | a teljes <i>Brachypodium</i> -genom adatbázis  | <a href="http://www.brachybase.org/">http://www.brachybase.org/</a>             |
| <b>Brachypodium Genome Browser</b>                                           | összehasonlító genomikai adatbázis             | <a href="http://www.modelcrop.org/">http://www.modelcrop.org/</a>               |
| <b>USDA-ARS Germplasm Search</b>                                             | ökotípusok, beltenyésztett vonalak adatbázisa  | <a href="http://www.ars-grin.gov/">http://www.ars-grin.gov/</a>                 |
| <b>Gene Discovery bEST Resource</b>                                          | EST-szekvencia adatbank                        | <a href="http://brachypodium.pw.usda.gov/">http://brachypodium.pw.usda.gov/</a> |
| <b>BrachyTAG</b>                                                             | T-DNS tagging adatbázis                        | <a href="http://www.brachytag.org">http://www.brachytag.org</a>                 |

2. táblázat

Nem elhanyagolható a *Brachypodium*mal kapcsolatos publikációk mennyisége sem. A cikkek és review-k egyre növekvő száma egyaránt hitelt érdemlően bizonyítja a szálkaperje alkalmasságát növénybiológiai kutatásokra, és előrevetíti az előtte álló fényes karriert.

## 2. A LBD-domén gének és fehérjék szerkezete, funkciója

A csak növényekben található *LBD* (*Lateral Organ Boundaries Domain*) géncsalád termékei esszenciálisak az oldalszervek képződésének szabályozásában, és szerepet játszanak az antocianidin- és a nirtogén-metabolizmus regulációjában is. Közös tulajdonságuk, hogy tartalmazznak egy jellegzetes szerkezeti motívumot, a LBD-domént. Számos, a legkülönbözőbb növényi fejlődési folyamatokban – embriogenezisben, gyökér-, levél- és virágképzésben – rendellenes mutáns fenotípus ismeretes, amelyek összefüggésbe hozhatók a *LBD* géncsaláddal, alátámasztva sokrétű szerepüket.

### 2.1 Határvonalak a növényi egyéjfejlődésben

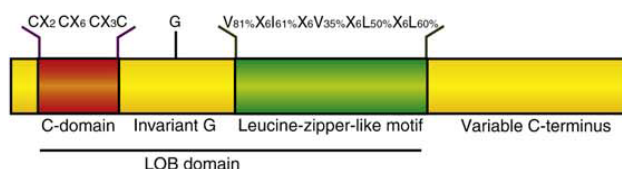
A növényvilág lenyűgöző formagazdagságát az időben és térben precízen koordinált egyedi mintázatok kialakításáért felelős fejlődési programoknak köszönheti. Ezek közül az egyes szervek, valamint a szervek és merisztémák között húzódó határvonalak kijelölése bír a legnagyobb jelentőséggel (Aida és Tasaka, 2006). A határokat fenntartó sejtek a szervkezdemények környékére korlátozódnak, tipikusan ritkán osztódnak, egyszersmind lehetővé teszik az oldalszervek képzését (Breuil-Broyer és mtsai, 2004).

Kitüntetett szerepükből adódóan ezek a sejtek speciális expressziós mintázattal rendelkeznek. Például az embrionális hajtásmerisztéma kialakításában valamint a sziklevelek és a virágkezdemények elhatárolásában szerepet játszó *NAM* (*NO APICAL MERISTEM*), vagy a *CUC* (*CUP-SHAPED COTYLEDON*) gének kifejezetten ezekben a sejtekben expresszálódnak, hasonlóan az *LBD* és hajtáselágazásokat szabályozó *LAS* (*LATERAL SUPPRESSOR*) transzkripciós faktorok génjeihez (Aida és mtsai, 1997; Greb és mtsai, 2003). A továbbiakban azonban csak az *LBD* géncsaládra és termékeikre szorítkoznánk.

### 2.2 Az LBD fehérjék szerkezete és génjeik filogenetikai kapcsolatai

Az *LBD* fehérjék jellegzetes N-terminális *LOB* (*Lateral Organ Boundary*)-doménjükről ismerhetők fel. A struktúra magában foglal egy N-terminálison elhelyezkedő domént. Ez a C-domén négy cisztein-reziduusból (C) álló, meglehetősen konzervatív motívumot tartalmaz: CX<sub>2</sub>CX<sub>6</sub>CX<sub>3</sub>C. A ciszteinek mellett elhelyezkedő többi aminosav (X) variábilis, de a számuk meghatározott. Feltehetőleg ez a domén rendelkezik DNS-kötő funkcióval.

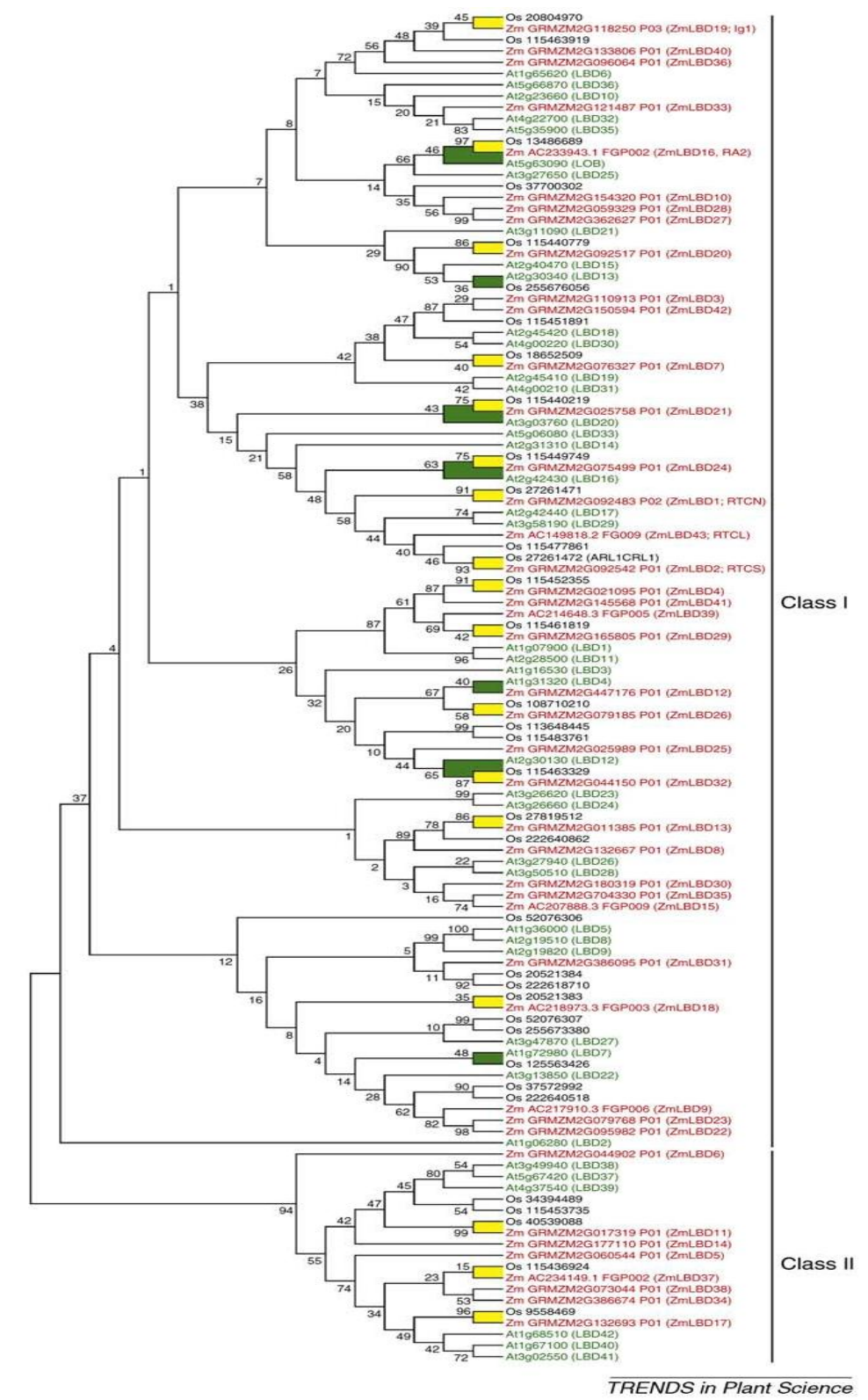
A LOB-domén struktúra emellett tartalmaz egy glicinekből álló konstans régiót és egy leucin-zip struktúrára emlékeztető motívumot is. Ebben a motívumban öt hidrofób aminosav (két valin, egy izoleucin, két leucin) található, egymástól hat, változatos aminosavval elválasztva. Valószínűsíthető, hogy fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításáért felelős (1. ábra, Majer és Hochholdinger, 2011).



1. ábra: a LOB-domén proteinek általános felépítése. A LOB-domén jellegzetessége a DNS-kötésért felelős C-domén, valamint a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat biztosító leucin-zip-hez hasonló motívum. A leu-zip motívumban feltüntetett számok a hidrofób aminosavak gyakoriságának százalékos arányát jelölik a kukorica *LBD* géncsaládja alapján (Majer és Hochholdinger, 2011).

A DNS-kötő motívum megléte és a sejtmagi lokalizáció alapján is megjósolható a LOB-domén proteinek szerepe: kivétel nélkül mind transzkripciós faktorok. Funkciójukat elsőként az *Arabidopsis*-ban igazolták: kimutatták, hogy az ASL4 (AtLOB) fehérje specifikusan kötődik az 5' GCGGCG 3' DNS-szekvenciához, és affinitását csökkenti a bHLH048 (basic helix-loop-helix) fehérjével való kölcsönhatás (Husbands és mtsai, 2007).

*Arabidopsis*-ban az *LBD* géncsalád 43 tagot foglal magában. Rizsből 35, kukoricából pedig 43 *LBD* gént írtak le eddig. Míg a rizs és a kukorica *LBD* gének közül 17, addig *Arabidopsis*-ban mindössze hét bizonyult orthológoknak. (Jó pár *LBD*-gént többször, különböző névvel is annotáltak, ezért a példaként említett gének mellett zárójelben egyéb megnevezésük is olvasható.) E három faj *LBD* génjeinek filogenetikai rekonstrukciója alapján az *LBD* géncsalád két nagy csoportra osztható: az egyik csoport (I-es típus) rendelkezik funkcionális leu-zip-hez hasonló motívummal, míg a másik csoportban (II-es típus) ez a motívum nem működik. A II-es típusú *LBD* fehérjék leu-zip motívuma ugyanis hiányos, így a kölcsönható fehérjékkel nem képes coiled-coil szerkezet kialakítására, ezért valószínűleg funkcióját veszítette. Az *LBD* gének többsége az I-es típusba tartozik (2. ábra, Majer és Hochholdinger, 2011).



2. ábra: az *Arabidopsis* (zölddel jelölve), a rizs (feketével jelölve) és a kukorica (pirossal jelölve) LBD-fehéjtéinek filogenetikai fája. A sárga kiemelés a rizs és kukorica orthológokat, a zöld az *Arabidopsis* orthológokat jelölik (Majer és Hochholdingner, 2011).

## 2.3 Az LBD fehérjék szerepe a növények egyedfejlődésében

Mivel az LBD fehérjék kulcsfontosságú szerepet töltenek be a szervhatárok kijelölésében és fenntartásában, nem meglepő, hogy részt vesznek szinte az összes fejlődési folyamatban az embriogenezistől egészen a virágzásig.

### 2.3.1 A levélfejlődés és az *LBD* gének kapcsolata

A géncsalád elsőként megismert tagja, az *AtASL4* (*AtLOB*) kifejezetten az oldalszervek eredési helyén, az adaxiális felszínen expresszálódik, összefüggésben a levélfejlődés korai stádiumával. Működését a SHOOT MERISTEMLESS és a BREVIPEDICELLUS (BP) transzkrpciós faktorok együtt szabályozzák, lehetővé téve, hogy az *AtLOB* gén kifejeződése az őssejtek és a fejlődő levélprimordiumok közötti szűk sejtrétegre korlátozódjon (Dolan és Langdale, 2004).

Hozzá hasonlóan az *AtAS2* (*AtLBD6*) feladata a szimmetrikus, lapos levélforma kialakítása azáltal, hogy megakadályozza az adaxiális oldalon lévő sejtek proliferációját. Kölcsönható partnere az *AtAS1*. A hajtás apikális merisztémájában (SAM-shoot apical meristem) az STM (SHOOT MERISTEMLESS) mindkettőjüket negatívan szabályozza, ugyanakkor a SAM és a fejlődő levelek határán a BOP1 (BLADE-ON-PETIOLE) és a BOP2 közvetlenül indukálja az *AtAS2* (*AtLBD6*), az *AtASL1* (*AtLBD36*) és az *AtLBD4* (*AtLOB*) gének expresszióját. A BOP1 később is fenntartja a fejlődő levél adaxiális oldalán és a szállítószövetek mentén az *AtAS2* magas transzkripciós szintjét. Az *AtAS2* és az *AtAS1* kölcsönhatva egymással közvetlenül kötődnek a *BP* (*KNAT1*) gén promóterének szabályozó régiójához. Ennek következtében DNS-loop alakul ki, és a HIRA kromatin-remodelling komplexszel közösen a *BP* gén tartós kikapcsolását eredményezik a levélfejlődés során. Később kiderült, hogy az AS1-AS2 komplex a többi 1-es típusú *KNOX* gént, mint pl. *KNAT2*, *KNAT6*, az abaxiális levélfelület identitásáért felelős *ETT/ARF3* és *KNADI2* géneket hasonló módon represszálja, végleges, determinált stádiumban tartva a levél sejtjeit (Iwakawa és mtsai, 2007; Jun és mtsai, 2010, Lin és mtsai, 2003; Ori és mtsai, 2000). Ezzel párhuzamosan a levélben a többi *KNOX* gént az *AtARF6* és az *AtARF8* tartja inaktív állapotban (Tabana és mtsai, 2010).

Az *AtAS2* ugyanakkor feltételezhetően szerepet játszik a miR165/166 mikroRNS poszttranszkripcionális érésében is. Ez a mikroRNS a levelek abaxiális oldalán fejeződik ki, és az adaxiális oldal identitását meghatározó 3-as típusú homeodomén/leu-zip (HD-ZIP) transzkripciós faktor család mRNS-eit csendesíti (Williams és mtsai, 2005). Ezek az

eredmények azt sugallják, hogy az AtAS2 (AtLBD6) rendelkezik további, eddig még ismeretlen funkciókkal és célgénekkel (Izekai és mtsai, 2010).

Ahogy az AtAS2 a levelek adaxiális-abaxiális szimmetriájának fenntartásáért felel, úgy az AtASL38 (AtLBD41) a levelek dorzsoventrális fejlődését koordinálja. Overexpressziója kakastatéjban (*Celosia cristata*) abaxializált levelek képződéséhez vezet (Meng és mtsai, 2009).

A fent említett folyamatok ugyanakkor nemcsak az *Arabidopsis*-ra igazak: kukoricában az AtAS1 orthológ ROUGH SHEAT2 ugyanúgy kölcsönhat a HIRA-kompleksszel és a kukorica azon LBD-fehérjéivel, melyek közeli rokonságot mutatnak az AtAS2-vel, és ugyanúgy *KNOX* gének represszálasát idézi elő a levélprimordiumokban (Phelps-Durr és mtsai, 2005). A rizs AtAS2 orthológja, az OsAS2 szintén bizonyítottan szerepet játszik a levélfejlődésben (Ma és mtsai, 2009).

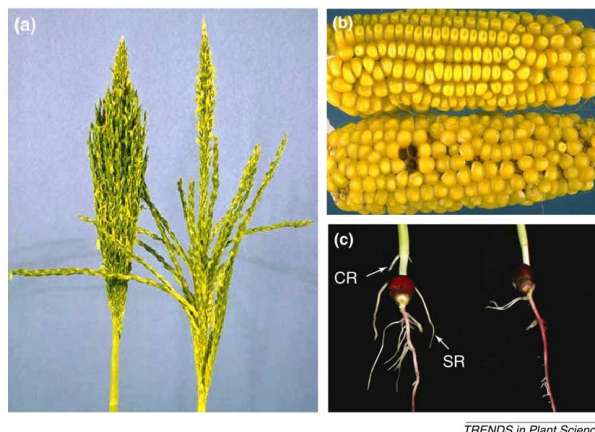
### 2.3.2 Az *LBD* gének és a virágfejlődés kapcsolata

Az AtAS2 gén nemcsak a levélfejlődésben játszik szerepet: akár csak a levélben, a fejlődő virágkezdemények esetében is csak az adaxiális oldalon expresszálódik. Az AS1 és a JAGGED (JAG) fehérjékkel együttesen biztosítja a virágszervek határát kijelölő sejtek identitását. Az *as2 jag* és az *as1 jag* géneket érintő kettős mutációt hordozó növények overexpresszálják a határsejtekre jellemző CUC1, CUC2 és PETAL LOSS (PTL) fehérjéket, fenotípusosan pedig kicsi szírom- és csészelevelekkel rendelkeznek. Ez a tulajdonság az *as1 jag plt* tripla mutációval vagy az *as1 jag cuc1 cuc2* négyszeres mutációval menekíthető, amely arra enged következtetni, hogy a primordiumban a szervhatárokat specifikus gének repressziója jelöli ki a csészelevelek és a szíromlevelek közötti határokat (Xu és mtsai, 2008).

Kukoricában az *Indeterminate gametophyte1 (Ig1)* gén korlátozza a női gametofiton proliferatív fázisának hosszát. Az *Ig1* mutánsok embriózsákja abnormalis fejlődésű, ugyanakkor a levelek adaxiális-abaxiális polaritása is zavart szenved (Evans, 2007, 2009). Kimutatták, hogy a gén terméke, az IG1 protein kölcsönhatásban áll a ROUGH SHEAT2 (RS2) fehérjével, ami a kukoricában az AtAS1 orthológja (Evans, 2009).

Egy másik, szintén a kukoricából ismert *LBD*-gén, amely a virágfejlődésben játszik szerepet, a *Ramosa2 (Ra2)*. Kifejeződése csak a virágzat iniciális régiójában, az axilláris merisztémákra korlátozódik (Bortiri és mtsai, 2006; Vollbrecht és mtsai, 2005). Mutációja rendellenes virágzatot eredményez: a címeres virágzat szerteágazó, és a termős virágzathoz fejlődő csőben a szemek elhelyezkedése is abnormalis (3. ábra, Majer és mtsai, 2011).

Feltételezhetően a *Ra2* szerepe az axilláris merisztémák növekedésének korlátozása a *Ramosa1* (*Ra1*) gén indukálásával (Bortiri és mtsai, 2006).



3. ábra: a kukorica LOB-domén génjeinek mutációi: (a) A *ra2* mutációja elágazó címeres virágzatot eredményez (bal oldalon a vad típus, jobb oldalon a *ra2* mutáns porzós virágzata). (b) A *ra2* mutánsban a kukoricacső is rendellenes (felül a vad típus, alul a *ra2* mutáns kukoricacső). (c) Az *rtcs* (*rootless concerning crown and seminal roots*) gén mutációját hordozó kukorica nem növeszt hajtás eredetű koronagyökereket (crown root - CR) és embrionális magi gyökereket (seminal root – SR) (baloldalon a vad típus, jobb oldalon az *rtcs* mutáns) (Majer és Hochholding, 2011).

Rizsben a *DEGENERATED HULL1* (*DH1*) rendelkezik hasonló szereppel: a mutánsok pelyvalevelei fejletlenek, a bibék és a porzók fedetlenek. Maga a gén csak az axilláris bimbókban, a fejlődő bugában és a fiatal virágokban expresszálódik, kifejeződése a szervekérésével egyre csökken (Li és mtsai, 2008).

### 2.3.3 A merisztémafejlődés és a szállítószövetek kialakulásának kapcsolata az *LBD*-génekkel

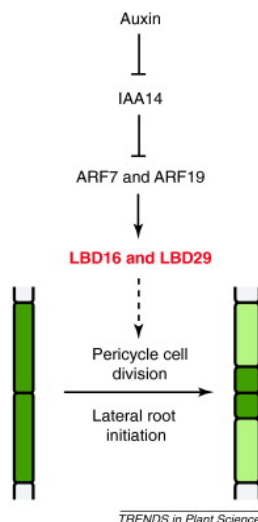
*Arabidopsis*-ban a *jlo-D* (*jagged lateral organ-D*) domináns funkciónyeréses mutációja következtében a növények törpe növéssűek, erősen bokrosodnak, leveleik pedig csipkézettek, rojtosak (Borghi és mtsai, 2007). Ugyanakkor a *JLO* (*AtASL19/ AtLBD30*) és az *asl20* (*lbd18*) kettős knock-out mutációja semmilyen fenotípusos elváltozást nem okozott, míg a *JLO* gén és egy represszor domén fúzionáltatása után a levélfejlődés és a gyökér xilém-elemeinek differenciációja rendellenesnek mutatkozott. Ezzel a megfigyeléssel párhuzamosan kiderült, hogy a *JLO* expressziója a fejletlen trachea-elemekre jellemző, és a vele paralóg *AtASL20* (*AtLBD18*) génnel közösen szabályozzák a szállítónyalábok kialakulását. Az *AtASL20* (*AtLBD18*) auxinnal indukálható, és működése erősen függ az *AtARF7* géntől (Soyano és mtsai, 2008; Okhusima és mtsai, 2005).

A *JLO* gén kifejeződését közvetlenül két NAC-domén transzkripciós faktor, az *AtVND7* és az *AtVND6* szabályozza pozitív feed-back mechanizmusok révén (Yamaguchi

és mtsai, 2010). Maga a *JLO* a *KNOX* (*KNOTTED-LIKE HOMEODOMAIN*) gének közé tartozó *STM* (*SHOOT MERISTEMLESS*) és *BP* (*BREVIPEDICELLUS*) gének transzkripciójának elősegítésével határozza meg a merisztémák sorsát (Borghi és mtsai, 2007; Bureau és Simon, 2008).

#### 2.3.4 Az *LBD* gének és a gyökérfejlődés kapcsolata

Az *LBD* gének nem meglepő módon hatással vannak a gyökérfejlődésre is: mind az egyszikűekben, mind a kétszikűekben befolyásolják az oldalgyökerek képződését (Inukai és mtsai, 2005; Liu és mtsai, 2005; Okushima és mtsai, 2007; Breckmans és mtsai, 2011). *Arabidopsis*-ban az oldalgyökerek kialakulása elsősorban az auxinra érzékeny *AUXIN RESPONSE FACTOR7* (*AtARF7*) és a vele kölcsönható *AtARF19* aktivitásától függ. Termékeik direkt aktivitást fejtenek ki a lúdfű két *LBD*-génjére, az *AtLBD29* (*AtASL16*) és az *AtLBD16* (*AtASL18*) génekre. Valószínűsíthető, hogy mindketten egy auxin által indukált szignáltranszdukciós kaszkád elemei, amelynek végkimenetele az oldalgyökerek fejlődésnek indulása (4. ábra, Majer és Hochholdinger, 2011). Az *AtLBD29* (*AtASL16*) jellemzően az oldalgyökerek képződésének kezdeti szakaszában, a primordiumokban aktív, míg az *AtLBD16* (*AtASL18*) a fiatal oldalgyökerekben mindenütt kifejeződik (Lee és mtsai, 2009).



4. ábra: Az *LBD16* és *LBD29* által kiváltott oldalgyökér-fejlődés *Arabidopsis thaliana*-ban. Magas auxinkoncentráció esetén az *ARF7* (*AUXIN RESPONSE FACTOR*) és *ARF19* fehérjét gátló *IAA14* (*INDOL-ACETIC ACID INDUCED PROTEIN*) gyorsan degradálódik, az *ARF7* és *ARF19* így aktiválni tudja az *LBD16* és *LBD29* gének expresszióját. A képződő *LBD16* és *LBD29* fehérjék aktivitása a periciklus sejtek osztódásához, végső soron az oldalgyökerek képződéséhez vezet. A maximális auxinkoncentrációjú periciklus sejtek sötétzöld színnel jelöltek (Majer és Hochholdinger, 2011).

Az *AtLBD29* (*AtASL16*) legközelebbi rokonai egyszikűekben - az *Rtcs* gén kukoricában, a *Crl1* (*Arl1*) gén rizsben - a koronagyökerek organogenezisében játszanak központi szerepet (Inukai és mtsai, 2005; Liu és mtsai, 2005; Taramino és mtsai, 2007; Hetz és mtsai, 1996). Az *Rtcs* kimondottan a koronagyökerek iniciálisaiban működik, míg rizsbeli orthológja, a *Crl1* (*Arl1*) szintén a koronagyökerek képződési helyén, a koleoptil nódusz parenchima-szövetében és az oldalgyökerek eredési pontjában, a periciklus gyűrű sejtjeiben aktív.

Figyelemre méltó, hogy amíg a *crl1* mutációját hordozó növények mintegy 70%-kal kevesebb oldalgyökeret növesztettek, addig másik alléljában, az *arl1*-ben bekövetkezett mutáció semmilyen lényeges elváltozást nem okozott. Oldalgyökerek tekintetében az *rtcs* mutáns növények sem térnek el fenotípusosan vad társaiktól, viszont koronagyökereik fejletlenek vagy teljesen hiányoznak (Inukai és mtsai, 2005; Taramino és mtsai, 2007). Ennek magyarázata valószínűleg az *rtcs*-vel paralóg *Rtcl* gén funkcionális redundanciájában keresendő. Az *Rtcl* expressziója a primér oldalgyökerekben feltételezhetően kompenzálja az *Rtcs* gén funkcióvesztését a mutánsban (Taramino és mtsai, 2007).

## 2.4 A metabolikus folyamatok II-es típusú LBD fehérjék általi szabályozása

A mostanáig leírt II-es típusú *LBD* gén közül egyik sem vesz részt fejlődési folyamatok koordinálásában, viszont metabolikus folyamatokban szerepet játszanak.

Konkrét példaként *Arabidopsis*-ban a nitrogén és a nitrát meggátolja az antocianinek szintézisét, mégpedig az *AtASL39* (*AtLBD37*), az *AtASL40* (*AtLBD38*) és az *AtASL41* (*AtLBD39*) gének indukálásával. Ezen *LBD*-gének overexpressziója az antocianin-szintézisben részt vevő szabályozó fehérjék génjeinek, a *PAP1* és *PAP2* géneknek, valamint számos nitrogénre érzékeny génnek a teljes kikapcsolását okozza. Ez arra enged következtetni, hogy az *AtASL39* (*AtLBD37*), *AtASL40* (*AtLBD38*) és *AtASL41* (*AtLBD39*) gének az antocianin-bioszintézis és a nitrogén-ellátottságot jelző szignalizációs utak represszoraiként funkcionálnak (Rubin és mtsai, 2009; Scheible és mtsai, 2004).

Rizs teljes hosszúságú cDNS-ét overexpresszáló *Arabidopsis* FOX-vonalak metabolomikai vizsgálatai alapján a rizs *OsLBD37* (gi:115453375) génje hasonló módon befolyásolja a nitrogén-metabolizmust (Albinsky és mtsai, 2010).

## 2.6 Az LBD gének kifejeződésének szabályozása

A legtöbb növényi hormonon, valamint olyan környezeti hatások, mint pl. a sóstressz vagy a glükózkoncentráció számos *LBD* gén működésére hatást gyakorolnak. Összesen hét, I-es típusú *LBD*-génnel kapcsolatban sikerült demonstrálni, hogy NaCl jelenlétében fokozódik az aktivitásuk, míg néhány, auxinnal kapcsolatba hozható *LBD*-génről derült ki, hogy glükóz mellett megszűnik az auxin általi szabályozottságuk (Jiang és Deyholos, 2009; Mishra és mtsai, 2009).

Köztudott, hogy az auxin poláris transzportját a sejtmembrán influx és efflux carrier fehérjéi irányítják. Ezek közül az auxin effluxot elősegítő PIN fehérjék működését egy auxin által szabályozott feed-back mechanizmus kontrollálja (Friml és mtsai, 2002; Heisler és mtsai, 2005; Jönsson és mtsai, 2006; de Reuille és mtsai, 2006). Ismeretes az is, hogy az oldalszervek képződési helyét az irányított auxin transzport következtében kialakuló lokális hormonkoncentrációs csúcs határozza meg, amely tulajdonképpen beindítja az organogenezist (Fukaki és Tasaka, 2009; Robert és Friml, 2009). A már korábban emlegetett *jlo* mutáns törpe *Arabidopsis* feltűnően hasonló fenotípusos elváltozásokat hordoz, mint a *pin1* mutáns. Nem véletlenül, hiszen a JLO (ASL19, LBD30) fehérje a *PIN1*, *PIN3*, *PIN4* és *PIN7* gének represszálásával erősen befolyásolja az auxin-transzportot. Alátámasztja ezt a hipotézist az is, hogy a JLO overexpressziójával 30%-ra csökkenthető az auxin-transzport rátája. Ez alapján valószínűsíthető, hogy a JLO az auxineloszlás szabályozásával hozzájárul az embrionális fejlődés során az apikális-bazális polaritás kialakításához (Borghi és mtsai, 2007; Bureau és mtsai, 2008).

*Arabidopsis*-ban mindössze két, citokininek által szabályozott *LBD* gén ismert: az egyik az oldalhajtások bazális részén aktív *AtASL9* (*AtLBD3*), a másik pedig a legközelebbi rokona, a gyökérben expresszálódó *AtASL6*. Az *AtASL9* gén expresszióját citokininen kívül más növényi hormon nem is indukálja. Az *AtASL9* (*AtLBD3*) overexpressziója megzavarja a rozettalevelek fejlődését, abnormális virágzatot és virágokat eredményez. Működését közvetlenül szabályozzák a citokininekre érzékeny B-típusú ARR transzkripciós faktorok, tehát a citokininek által aktivált foszforilációs szignál-kaszád egyik elsődleges effektora az *AtASL9* lehet (Naito és mtsai, 2007).

*Arabidopsis*-ban igazolták, hogy az *AtASL2* (*AtLBD6*) a *KNOX* gének represszálásával elősegíti a gibberellin-szintézist (Ikezai és mtsai, 2010). Ezen kívül a II-es típusú *LBD*-gének közé tartozó *AtASL37* (*AtLBD40*) működését a gibberellin gátolja, a DELLA proteinek pedig fokozzák (Zentella és mtsai, 2007).

## 2.7 Az LBD proteinek és a sejtciklus szabályozásának kapcsolata

Az eddigiekből is kitűnik, hogy bár sok *LBD*-gén sikerült eddig azonosítani, pontos szerepe csak kis hányaduknak ismert (3. táblázat; Majer és Hochholdinger, 2011).

| Gén                       | Funkció                                          | Referencia                                     |
|---------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <b><i>Arabidopsis</i></b> |                                                  |                                                |
| <i>LBD (ASL4)</i>         | levélfejlődés                                    | Shuai és mtsai, 2002                           |
| <i>LBD3 (ASL9)</i>        | virágfejlődés, citokin-reszponzív                | Naito és mtsai, 2007                           |
| <i>LBD6 (ASL2)</i>        | levélmorfológia meghatározása                    | Semiarti és mtsai, 2001<br>Ori és mtsai, 2000  |
| <i>LBD12 (ASL5)</i>       | levélfejlődés                                    | Nakazawa és mtsai, 2003                        |
| <i>LBD16 (ASL18)</i>      | gyökérképződés, auxin-reszponzív                 | Okushima és mtsai, 2007                        |
| <i>LBD18 (ASL20)</i>      | gyökérképződés, auxin-reszponzív                 | Lee és mtsai, 2009                             |
| <i>LBD27(ASL29)</i>       | pollenképződés                                   | Oh és mtsai, 2010                              |
| <i>LBD29 (ASL16)</i>      | gyökérmorfológia meghatározása, auxin-reszponzív | Okushima és mtsai, 2007                        |
| <i>LBD30 (JLO/ASL19)</i>  | embriogenezis és virágfejlődés                   | Borghi és mtsai, 2007<br>Soyano és mtsai, 2008 |
| <i>LBD36 (ASL1)</i>       | virágfejlődés                                    | Chalfun-Junior és mtsai, 2005                  |
| <i>LBD37 (ASL39)</i>      | metabolikus folyamatok                           | Rubin és mtsai, 2009                           |
| <i>LBD38 (ASL40)</i>      | metabolikus folyamatok                           | Rubin és mtsai, 2009                           |
| <i>LBD39 (ASL41)</i>      | metabolikus folyamatok                           | Rubin és mtsai, 2009                           |
| <i>LBD40 (ASL37)</i>      | gibberellin rezponzív                            | Zentella és mtsai, 2007                        |
| <b><i>Kukorica</i></b>    |                                                  |                                                |
| <i>Rtcs</i>               | hajtás eredetű és valódi gyökerek képzése        | Taramino és mtsai, 2007                        |
| <i>Ig1</i>                | virágfejlődés                                    | Evans és mtsai, 2007                           |
| <i>Ra2</i>                | virágfejlődés                                    | Borti és mtsai, 2006                           |
| <b><i>Rizs</i></b>        |                                                  |                                                |
| <i>ARL (CRL1)</i>         | gyökérképződés                                   | Inukai és mtsai, 2005                          |
| <i>DH1</i>                | virágfejlődés                                    | Li és mtsai, 2008                              |
| <i>LBD37</i>              | metabolikus folyamatok                           | Albinsky és mtsai, 2010                        |
| <i>AS2</i>                | levélfejlődés                                    | Ma és mtsai, 2009                              |

3. táblázat: Az *Arabidopsis*-ban, rizsben és kukoricában funkcionálisan is meghatározott *LBD*-génnek (Majer és Hochholdinger, 2011).

Az *LBD* gének abnormalis működésének hatásaival foglalkozó eddigi vizsgálatok mind rávilágítottak az *LBD* fehérjék rendkívül sokféle fejlődési folyamatban betöltött szerepére. Ugyanakkor molekuláris szinten az *LBD* gének mutációjával összefüggő rendellenes fenotípusok minden esetben az auxinra adott válaszreakciók zavarára illetve sejtosztódási hibákra vezethetők vissza.

Az *asymmetric leaves2 (LBD6)* mutációját hordozó lúdfű eltérő levélmorfológiáját az adaxiális/abaxiális tengelyt kialakító sejtek identitásvesztésének köszönheti. A látható jegyeket az egyenlőtlen auxin-eloszlás okozza, ami aszimmetrikus sejtosztódási mintázatot von maga után, és aminek következtében az adaxiális oldalon megnő a sejtek száma (Zgurski és mtsai, 2007; Iwakawa és mtsai, 2007). A kukorica *Ig1* mutánsa nemcsak a nőivarú virágok fejlődésében tér el vad társától: a mutáció következtében a levélsejtek megőrzik összejt-voltukat, és a levélsejtek állandó proliferációja miatt a levelek alakja is abnormalis lesz (Evans, 2007). Nemrég derült fény arra is, hogy Arabidopsisban az *LBD27 (ASL29)* génnel azonos *SIDECAR POLLEN* a hím gametofiton mikrospóra sejtjeinek aszimmetrikus sejtosztódását irányítja a sejtosztódás idejének és orientációjának a meghatározásával (Oh és mtsai, 2010). Annak felismerése, hogy az *LBD* fehérjék auxin hatására közvetlenül, transzkripcionális szinten aktiválják a sejtosztódás elindítójának egyik fő szabályozóját, a retinoblasztóma (RB) fehérjével kölcsönható E2Fa transzkripciós faktort, osztódásra készítve ez által a periciklus sejteket, szintén a legfrissebb kutatási eredményeknek köszönhető (Berckmans és mtsai, 2011).

Ezek a megfigyelések alátámasztják az *LBD* gének és a sejtciklus szabályozásának szoros kapcsolatát, ennek ellenére még kevés a konkrét bizonyíték. Még nem publikált, élesztő két-hibrid rendszerrel végzett kísérletek arra engednek következtetni, hogy lucernában (*Medicago truncatula*) az A2 típusú ciklin egyik kölcsönható partnere egy *LBD* fehérje, az MtCPP1 (Györgyey János, szóbeli közlés). Annak ismeretében, hogy ennek az A2 ciklinnek a működését közvetetten az auxin, közvetlenül az RB fehérje szabályozza, expressziója pedig az oldalgyökerek osztódó sejtjeire és merisztémáira korlátozódik (Roudier és mtsai, 2000; 2003), nem is olyan meglepő az *LBD* fehérjék érintettsége a folyamatban. Ennek tükrében érthető az is, miért kerültek kísérletünk középpontjába a ciklinek és az *LBD* gének.

### 3. Célkitűzések

Az *LBD*-gének sokrétű szerepköre, ugyanakkor növény-specifikussága miatt az utóbbi évtized egyik igen figyelemreméltó és intenzíven tanulmányozott géncsaládjává váltak. Megismerésük lehetőséget nyújt a különböző szervek és merisztémák határán működő molekuláris mechanizmusok feltárására, valamint az általuk kontrolált folyamatokat befolyásoló hormonok és környezeti tényezők felderítésére.

Munkánk során olyan géneket kerestünk közöttük, melyek egyrészt a sejtosztódás szabályozásában, másrészt az oldalgökök fejlődésének regulációjában vesznek részt. Hosszútávú célunk a sejtosztódás és a szervfejlődés szabályozási folyamatai közötti kapcsolat mélyebb megismerése. Korábbi vizsgálatok tanulsága alapján két olyan génre fókuszáltunk, melyek a legnagyobb homológiát mutatták a *Medicago truncatula* *MtCPP1* génjével. Tekintettel arra, hogy az *MtCycA2* bizonyítottan szerepet játszik a gyökér periciklus sejtjeinek reaktiválásában (Roudier és mtsai, 2003), és az *LBD*-k A2 típusú ciklinekkel való kölcsönhatásuk révén a sejtosztódás szabályozásához is kapcsolódnak, kíváncsiak voltunk, vajon egyszikűekben működnek-e hasonló mechanizmusok?

Konkrét célkitűzésünk tehát három gén: két *LBD*-, valamint egy A2 típusú ciklin gén transzkripciós profiljának elkészítése, valamint a géncsaládok rokonsági kapcsolatainak vizsgálata volt. Ezzel kapcsolatban három lényeges kérdésre kerestük a választ:

- 1) Hogyan alakul a vizsgált gének expressziója különböző növényi szervekben? Tapasztható-e szignifikáns eltérés a különböző növényi részek expressziós mintázata között?
- 2) Egymáshoz viszonyítva van-e jelentős különbség a vizsgált gének kifejeződése között?
- 3) Találunk-e kapcsolatot a vizsgált *LBD*-gének és az A2 típusú ciklinek transzkripciós profilja között?

Mivel a vizsgálni kívánt gének normál körülmények között általában igen alacsony aktivitást mutatnak, a válaszadáshoz kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció tűnt a legalkalmasabb módszernek. Kísérleti objektumul a szálkaperjét (*Brachypodium distachion*) választottuk.

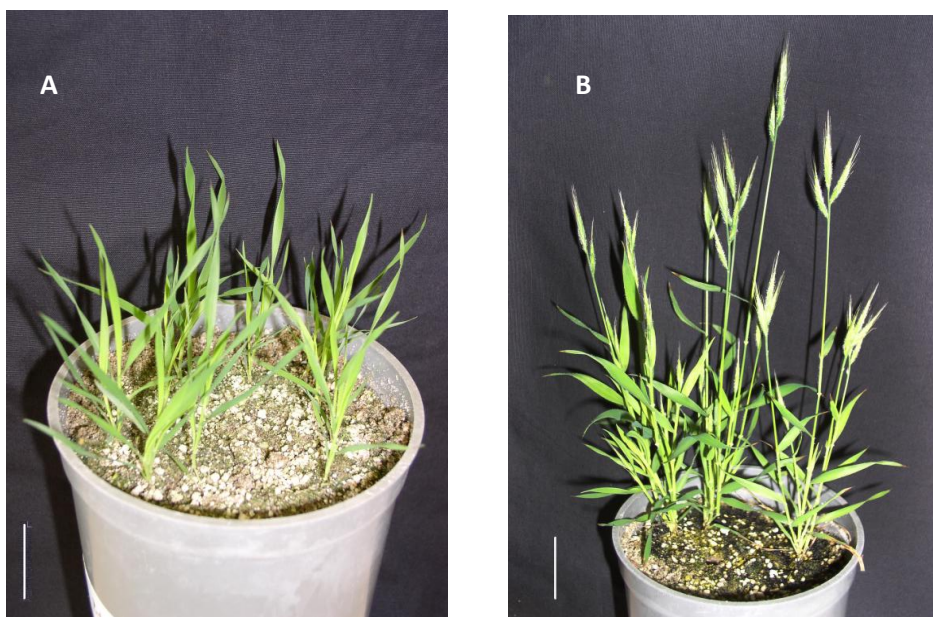
## 4. Anyag és módszer

### 4.1 Növények nevelése

Kísérletünk konkrét célja génexpressziós mintázat feltérképezése volt különböző korú generatív és vegetatív szervekben. Ennek megfelelően egy genetikailag már jól jellemzett, megszekvenált genommal bíró, vernalizáció nélkül is teljes életciklust folytató, mérsékelt stressztoleráns *Brachypodium* vonalat választottunk: a Bd21-est.

A magokat kiültetés előtt négy-öt napig sötétben, 4°C-on, petri csészében nedves, általános virágföldre kihelyezve sztratifikáltuk. Így elősegítettük a magok csírázási időpontjának szinkronitását. A magok a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpont (MTA SZBK) Növénybiológiai Intézetének saját szaporításából származtak.

A magokat ezt követően homok-perlit 2:1 arányú keverékébe ültettük, szabvány méretű cserepekbe (átmérő: 12 cm, űrtartalom: 1,2 l). Egy cserépbe 10 mag került. A cserepek az ültetést megelőzően vízzel telítettük, majd a továbbiakban 80%-os talaj-víztartalom mellett neveltük a növényeket. A nedvességtartalom utánpótlását Hoagland-tápoldattal (0,5x) végeztük, naponta. A növényeket standard körülmények között neveltük növénynevelő kamrában. Fotoperiódus: 20 óra megvilágítás ( $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), 4 óra sötét. Hőmérséklet: állandó 21-22°C. Páratartalom: konstans 60-70%. A fiatal csíranövényeket 4-5 napig polietilén fóliával védtük a párologtatás miatt fennálló kiszáradástól.

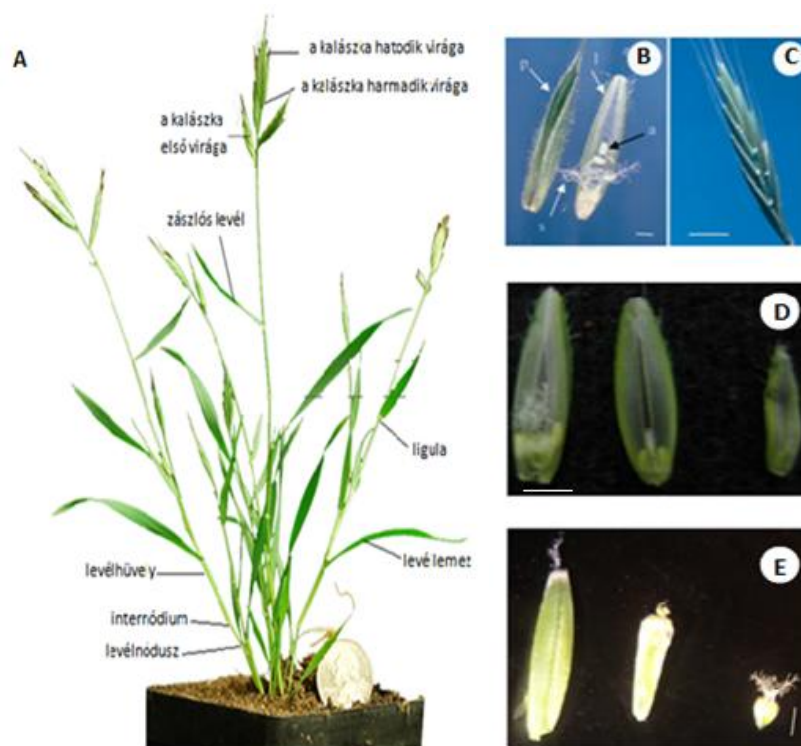


5. ábra: a) három hetes *Brachypodium dystachion* növények; b) egy hónapos, virágzó *Brachypodium dystachion* növények. A fehér vonal 2 cm-t jelöl.

A mintavétel három különböző korú növénypopulációból történt: a vegetatív szervek három hetes növényekből (minta 1-22), a generatív szervek és a zászlóslevél egyhónapos növényekből (minta 23-30), míg a fejlődő magok (minta 31-33) két hónapos növények kalászaiból származtak. (5. ábra - a minták részletes leírását és a mintavétel menetét a következő fejezetben ismertetem.)

## 4.2 Mintavétel

Mintegy 33 különböző növényi részből gyűjtöttünk mintát totál RNS izoláláshoz (4. táblázat, 6. ábra).



6. ábra: A *Brachypodium dystachion* föld feletti vegetatív és generatív szerveinek anatómiája. Kifejlett, virágzó szálkaperje (A) és virágának felépítése (B). Jól látható a szőrös pelyvalevél (palea- p), a toklász (lemma-l), a két porzó (anthera- a) és a bibék (stigma-s). A vonal 1 mm-ert jelöl (Draper és mtsai, 2001) Egy növényen általában 6-10 kalászt hoz, minden egyes kalászkában tipikusan 10 mag fejlődik (C). A vonal 4 mm-t jelöl (Draper és mtsai, 2001). A kalászka aljától a csúcsáig a virágok különböző fejlettségi stádiumot mutatnak (D). Balról jobbra: a kalászka legalsó, fejlett virága, negyedik virága, és a csúcsán lévő legfejletlenebb, hatodik virág. Ennek megfelelően a magok fejlődési stádiumai is különböznek a kalászkán belül (E). Balról jobbra: a kalászka legalsó, legfejlettebb magkezdeménye, a kalászka negyedik magkezdeménye, és a legfejletlenebb, éppen csak megtermékenyült magkezdemény. A vonal a (D) és az (E) ábrán 1 mm-t jelöl.

| Minta száma | Minta                                                                                                             | Minta rövidítése |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 1           | gyökércsúcs                                                                                                       | R1               |
| 2           | megnyúlási zóna                                                                                                   | R2               |
| 3           | felszívási zóna                                                                                                   | R3               |
| 4           | szállítási zóna                                                                                                   | R4               |
| 5           | fiatal oldalgyökér-iniciális                                                                                      | R5               |
| 6           | idősebb oldalgyökér-iniciális                                                                                     | R6               |
| 7           | első levél nódusza                                                                                                | LN1              |
| 8           | első levél internódiuma                                                                                           | IN1              |
| 9           | első levél levélhüvelye                                                                                           | LH1              |
| 10          | első levél levéllemeze                                                                                            | L1               |
| 11          | második levél nódusza                                                                                             | LN2              |
| 12          | második levél internódiuma                                                                                        | IN2              |
| 13          | második levél levélhüvelye                                                                                        | LH2              |
| 14          | második levél ligulája (csukló)                                                                                   | LCS2             |
| 15          | második levél levéllemeze                                                                                         | L2               |
| 16          | harmadik levél nódusza                                                                                            | LN3              |
| 17          | harmadik levél levélhüvelye                                                                                       | LH3              |
| 18          | harmadik levél ligulája (csukló)                                                                                  | LCS3             |
| 19          | harmadik levél levéllemeze                                                                                        | L3               |
| 20          | negyedik levél lemezének bazális szegmense                                                                        | L4/1             |
| 21          | negyedik levél lemezének középső szegmense                                                                        | L4/2             |
| 22          | negyedik levél lemezének csúcsi szegmense                                                                         | L4/3             |
| 23          | zászlós levél                                                                                                     | ZL               |
| 24          | kalásztengely                                                                                                     | KT               |
| 25          | pelyvalevél (palea)                                                                                               | PL               |
| 26          | pelyvalevél szakállja                                                                                             | PSZ              |
| 27          | toklás (lemma)                                                                                                    | ML               |
| 28          | fejlett virág (a kalász legalsó első és második virága, begyűjtés közvetlenül a pollinációt megelőzően; 8 D ábra) | V1               |
| 29          | közepesen fejlett virág (a kalász harmadik és negyedik virága; 8 D ábra)                                          | V2               |
| 30          | fejletlen virág (a kalász csúcsán elhelyezkedő ötödik és hatodik virág; 8 D ábra)                                 | V3               |
| 31          | a kalász alján fejlődő első-második termés (8 E ábra)                                                             | E1               |
| 32          | a kalász harmadik-negyedik virágjából fejlődő termés (8 E ábra)                                                   | E2               |
| 33          | a kalász csúcsán fejlődő ötödik-hatodik termés (8 E ábra)                                                         | E3               |

4. táblázat: a kísérlet során vizsgált különböző növényi szervek. A levelek (az elsőtől a negyedikig) és részeik számozása a levelek megjelenésének sorrendjével azonosak.

A különböző növényi részek beazonosítása és izolálása sztereomikroszkóp segítségével történt. A gyökereket feldolgozás előtt 2x30 mp-ig hajszáritóval szárítottuk ki, így akadályozva meg a minták RNS-tartalmának mintavétel alatti degradálódását, valamint a feldolgozás során keletkező stressz folyamatok kialakulását. A szárítás emellett megkönnyíti az RNS-izolálás során a minták homogenizálását is. A többi minta előkezelés nélkül került begyűjtésre. A mintákat folyékony nitrogénben fagyasztottuk, felhasználásig -80°C-on tároltuk.

#### 4.3 Primerek tervezése

Kísérleti céljainknak megfelelően a *Brachypodium* adatbázisban ([www.brachybase.org](http://www.brachybase.org)) megkerestük a *Medicago MtCPP1* génjével legnagyobb homológiát mutató géneket. A homológok keresését TBLASTX analízissel végeztük (Altschul és mtsai, 1997). Az analízis eredményeként két gént választottunk ki: a *Bd2g53690* (9e-56) és a *Bd2g34250* (9e-49) géneket. Hasonló módon kerestük meg a *Medicago* A2 típusú ciklinjével leginkább homológ *Brachypodium* ciklin gén, a *Bd4g06827* (4e-53) szekvenciáját is. Az adatbázisból kigyűjtött gének kódoló régióira Primer3 (v. 0.4.0) programmal terveztünk specifikus primereket.

Ezen irányelvek szem előtt tartásával és IDT-DNA (Integrated DNA Technologies – Sci Tools OligoAnalyzer 3.1) programmal végzett átfogó analízis alapján választottuk ki a megfelelő primereket, melyek specifikitását NCBI/BLAST analízissel ellenőriztük. A kísérlet során használt primereket a Függelék 1. táblázata tartalmazza. A primerek az MTA SZBK Oligonukleotid Szintetizáló Laboratóriumában készültek.

#### 4.4 Minták feldolgozása: RNS-izolálás, cDNS szintézis, qRT-PCR

A mintákból totál RNS-tartalmat izoláltunk LiCL-módszer alkalmazásával (leírását lásd: mellékletben csatolt protokollok – RNS-izolálás LiCl-dal, DNáz kezelés). Ezt követően 2µg DNáz-kezelt RNS-ből 20µl végtérfogatban, random hexamer primerek felhasználásával, RevertAid H minus M-MuLV reverz transzkriptázzal (Fermentas) cDNS-t szintetizáltunk. Reverz transzkriptáz mentes kontroll reakciókat is összeállítottunk a reakció tisztaságának és a cDNS-ek minőségének ellenőrzése céljából (leírását lásd: mellékletben csatolt protokollok – cDNS-szintézis, Ellenőrző-PCR).

A valós idejű kvantitatív PCR-reakcióhoz 1:45 hígításban használtunk cDNS-t templátként, GoTaq qPCR Master Mix (Promega), 5 pmol forward és 5 pmol reverse

primer hozzáadásával, 10 µl végtérfogatban (a használt primereket ld. a Függelék 1. táblázatában). Minden mintával három párhuzamos mérést végeztünk. A reakció tisztaságának ellenőrzéséhez templátot nem tartalmazó mintákon is lefuttattuk a programot. A qRT-PCR reakció detektálása ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) segítségével, 96 mintahelyes plate felhasználásával történt, a következő beállításokkal: 10 min. 95°C, majd 40 cikluson keresztül 15 sec. 95°C denaturálás, 1 min. 60°C annealing.

Az amplifikáció specifikusságát az alábbi kitériumok teljesítésével igazoltuk: 1) a qRT-PCR termékek olvadási görbéjén kizárólag egy, jól körülhatárolható csúcs látható (ABI Prism Dissociation Curve Analysis Software); 2) agaróz gél elektroforézis vizsgálat során a gélben egyetlen, a prediktált termékméretnek megfelelő méretű sáv látható.

A specifikus primerek használatával nyert adatokból  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  módszerrel határoztuk meg a vizsgált gének relatív transzkripció szintjét (Livak és Schmittgen, 2001). A relatív expressziós szintek megadásához a mért  $C_t$  (threshold cycle) értékekkel számoltuk: ez az a ciklusszám, ahol az amplifikálódó termékek mennyisége elér egy bizonyos fix értéket (threshold-érték), amelyet általánosan az exponenciális fázis kezdetéhez állítunk be. A  $\Delta C_t$  értéket a vizsgált gén és a referenciagén  $C_t$  értékének különbségével kapjuk. A következő lépésben a belső referenciának választott minta (esetünkben a legalacsonyabb relatív transzkript-szintet mutató minta)  $\Delta C_t$  értékének és a vizsgált minta  $\Delta C_t$  értékének különbségéből kapjuk meg a  $\Delta\Delta C_t$  értéket, amit 2 negatív hatványára emelünk.

A normalizáláshoz (1) az UBC18 ubiquitin-konjugáló enzim valamint az EF1 $\alpha$  (elongációs faktor1-alfa) génjeinek transzkripció szintjét és (2) belső referenciaként a vizsgált géneket legkevésbé expresszáló minták transzkript mennyiségét vettük alapul.

Az általunk választott referenciagének  $C_t$  (cycle threshold) értékei egyik minta esetében sem haladták meg az átlagtól való két ciklusos eltérést (Függelék 1. grafikon és a hozzá tartozó táblázat). Ez az érték a referenciagénekre vonatkozó qRT-PCR tapasztalatok alapján hibahatáron belül van. Ennek megfelelően a hozzájuk viszonyítva származtatott, vizsgált génekre kapott relatív transzkript mennyiségek is korrektnek tekinthetők.

A normalizáláshoz az UBC18 és az EF1 $\alpha$   $C_t$  értékek átlagát vettük alapul. A qRT-PCR ismételtetésére vonatkozó korábbi tapasztalatok alapján a vizsgált génekre kapott eredmények közötti legalább kétszeres eltérést szignifikánsnak tekintettük.

## 5. Eredmények és megvitatásuk

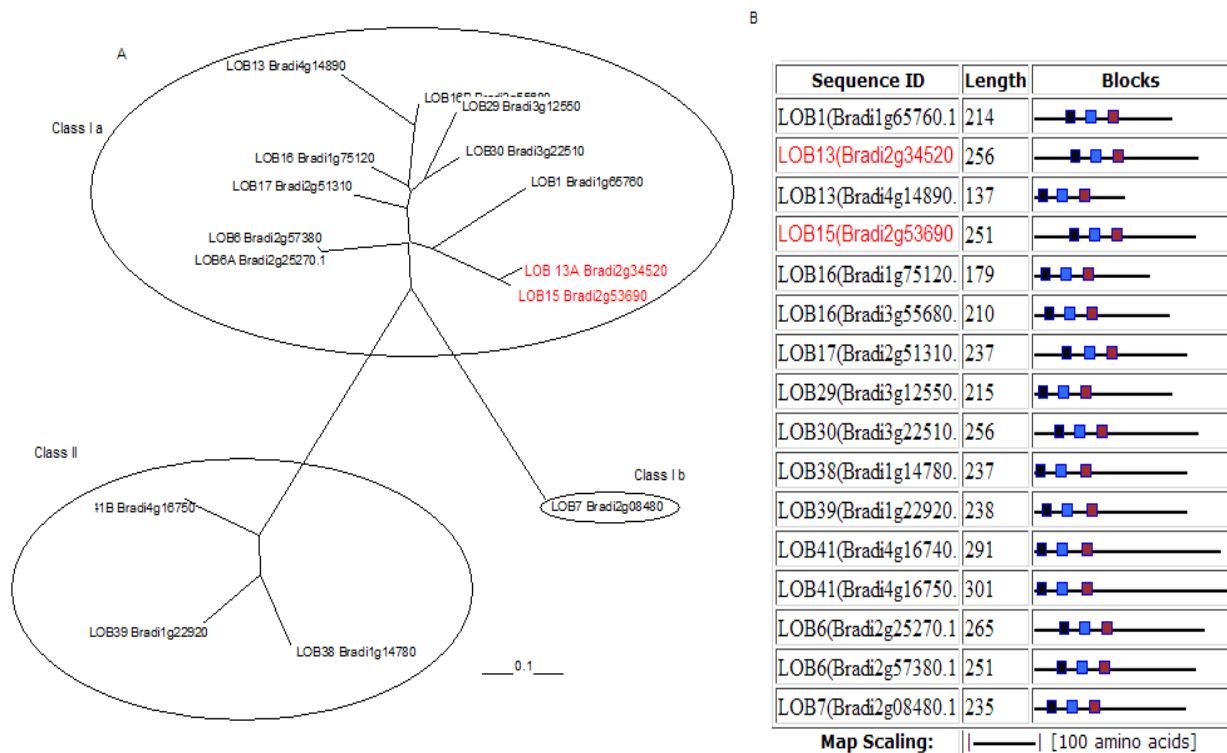
Az *LBD* génekről eddig szerzett ismereteink alapján kiindulásként azt feltételeztük, hogy az általunk vizsgált *LBD* gének is elsősorban fiatal, osztódó szövetekben gazdag szervekben, mint amilyen pl. a gyökércsúcs, vagy a fiatal oldalgyökér iniciálisok, nóduszok és a fejlődő generatív képletek, mutatnak majd erőteljes expressziót. Minthogy a LOB-domén transzkripciós faktorok a sejtciklus szabályozásában inkább represszálo szerepet töltenek be, ezért az A2 típusú ciklinnel kapcsolatban ellentétes kifejeződési mintázat prediktálható. Ezt a negatív korrelációt elsősorban a *Bd2g53690* által kódolt LOB15 esetében feltételezhető, tekintettel arra, hogy a vizsgált *LBD* gének közül a *Bd2g53690* mutat nagyobb homológiát az *MtCPP1* génjével. Erre vonatkozóan azonban munkánk kezdetén nem voltak feltevéseink.

### 5.1 *Brachypodium* LOB-domén fehérjék rokonsági fája

A teljes *Brachypodium* genom és a konzervált LOB-domén struktúra szekvenciájának ismeretében az adatbázisból összesen 16 annotált *LBD* gént és ezek fehérje termékeit sikerült azonosítani. A proteinek rokonsági kapcsolatait a LOB-domének aminosav-szekvenciája alapján ClustalW2 analízissel határoztuk meg; a konzervált motívumokat a BlockMaker programmal ([http://blocks.fhcrc.org/blocks/blockmkr/make\\_blocks.html](http://blocks.fhcrc.org/blocks/blockmkr/make_blocks.html)) kerestük meg. Az elkészült rokonsági fát a 7.A ábra szemlélteti, a hozzá tartozó táblázatban a LOB-domének elhelyezkedése látható (7.B).

A rokonsági fa, a LOB-domének helyzete és a leu-zip motívumok aminosav-sorrendjének ismeretében a szálkaperjében eddig megtalált LOB-domén fehérjék között is két nagy csoport különböztethető meg. Az I-es osztály népesebb, összesen 12 fehérjét tartalmaz, és további két csoportra bontható: az a-típusúakra (11 fehérje) és b-típusúakra (1 fehérje). A II osztály mindössze 3 fehérjét foglal magában.

Az általunk vizsgált *LBD* gének, a *Bd2g53690* által kódolt LOB15 és a *Bd2g34520* által kódolt LOB13 is az Ia osztályba tartozik. Mindkettő rendelkezik teljes, funkcióképes leucin-zip-hez hasonló motívummal, tehát várhatóan képesek fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakítására.



7. ábra: A) A *Brachypodium dystachion* LOB-domén fehérjék rokonsági fája. A fa a fehérjék LOB-doménjének konzervált aminosav-motívumai alapján, ClustalW2 analízist követően TreeWiew 1.6.6 verziójú programmal lett vizualizálva. Az egyes ágak hosszúsága a divergencia mértékét tükrözi (az egységet szimbolizáló szakasz 0.1 aminosav pozícionkénti cseréjét jelöli).

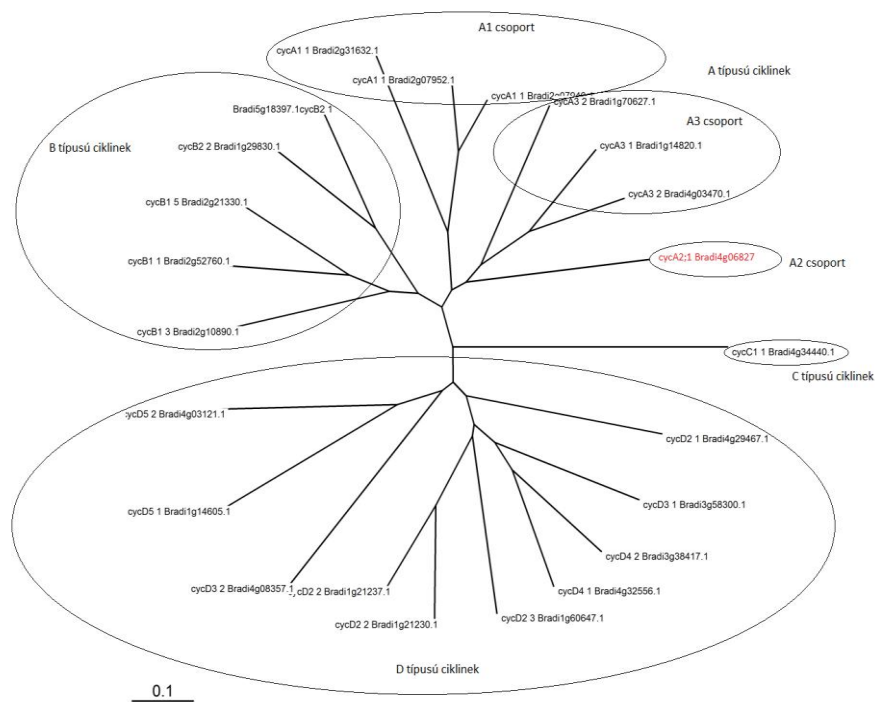
B) A táblázat a LOB-domén egyes fehérjékben belüli helyzetét foglalja össze. A színes négyzetek a konzervált motívumokat jelölik (sötétkék: C-domén; világoskék: G-box; bordó: leu-zip).

A piros színnel kiemelt fehérjék és szekvencia-azonosítók az általunk vizsgált LOB-domén fehérjéket jelölik.

## 5.2 *Brachypodium* ciklinek rokonsági fája

Kutatási célunknak megfelelően ezt követően a *Brachypodium* adatbázisból kigyűjtöttük az A, B, C és D típusú ciklin géneket is, majd az aminosav-szekvenciák ClustalW2 analízisét követően TreeWiew 1.6.6 verziójú programmal ábrázoltuk rokonsági kapcsolataikat (8. ábra). Rajuk kívül további, kisebb, H-, J-, L-, U-, P- és T-típusú ciklinek is megtalálhatók a *Brachypodium* genomban, de ezek nem kerültek bele a rokonsági fába.

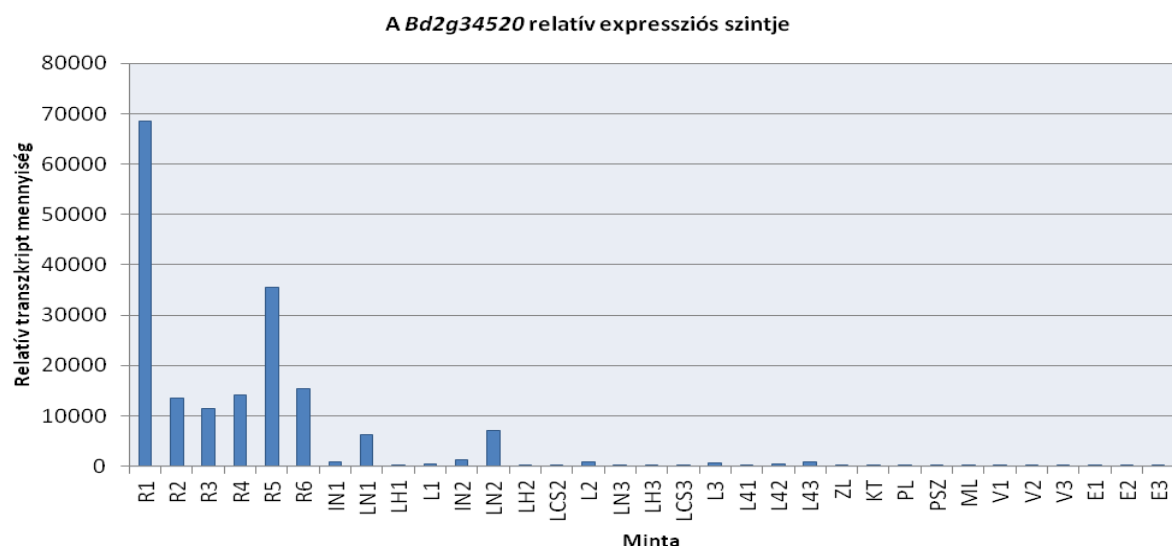
A rokonsági fán jól elkülöníthetők az egyes ciklin alosztályok. Az egyetlen C típusú ciklin kivételével a többi fő ciklin csoport 5-10 tagot számlál. A ciklinek közül a *Medicago sativa* A2 típusú ciklinjével legmagasabb fokú homológiát mutató ciklin, a *Bd4g06827* (4e-53) által kódolt ciklin A2,1 történetesen a *Brachypodium*-ban fellelhető ciklinek közül az egyetlen A2 típusú ciklin.



8. ábra: A *Brachypodium* ciklinek kapcsolatait ábrázoló rokonsági fa. Az egyes ágak hosszúsága a divergencia mértékét tükrözi (az egységet szimbolizáló szakasz 0.1 aminosav pozíciókénti cseréjét jelöli). A pirossal kiemelt fehérje és azonosítója az általunk vizsgált A2 ciklint jelöli.

### 5.1 A *Bd2g34520* transzkripciós mintázata

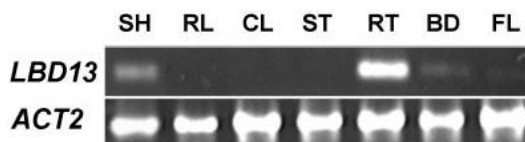
A *Bd2g34520* különböző növényi szervekben kvantitatív PCR-rel mért relatív expressziós szintjeit a Függelék 2. táblázata tartalmazza részletesen, és összesítését az 1. grafikon szemlélteti. A génkifejeződés mértékének összehasonlításához a kalász csúcsán fejlődő 5.-6. szem (E3)  $\Delta Ct$  értékét vettük viszonyítási egységnek.



1. grafikon: a *Bd2g34520* relatív expressziós szintjének alakulása a különböző növényi szervekben.

A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy öt nagyságrendnyi különbség van az általunk kimutatott legmagasabb és a legalacsonyabb mRNS szintek között, ami a gén kiugróan szigorú transzkripció kontrollját mutatja. A *Bd2g34520* kifejezetten a gyökérben expresszálódik, ott is kiemelkedően a fiatalabb részekben, úgymint a gyökércsúcsban és a fiatal oldalgyökér-iniciálisokban. Kisebb mértékű expresszió kimutatható a járulékos, hajtás eredetű gyökerek eredési helyén, az idősebb nóduszokban (az első és a második levél nóduszaiban) is. A többi szervben a *Bd2g34520* kifejeződése ehhez képest elhanyagolható mértékű.

Ez a mintázat összecseng a *Bd2g34520 Arabidopsis*-ban található homológjának, az *LBD13* expressziós analízisének eredményeivel (Shuai és mtsai, 2002; 9. ábra). Bár az *Arabidopsis* génre vonatkozó adat csak szemi-quantitatív eredmény és közel sem olyan részletes, mint a miénk, a két vizsgálat egymást erősíti.

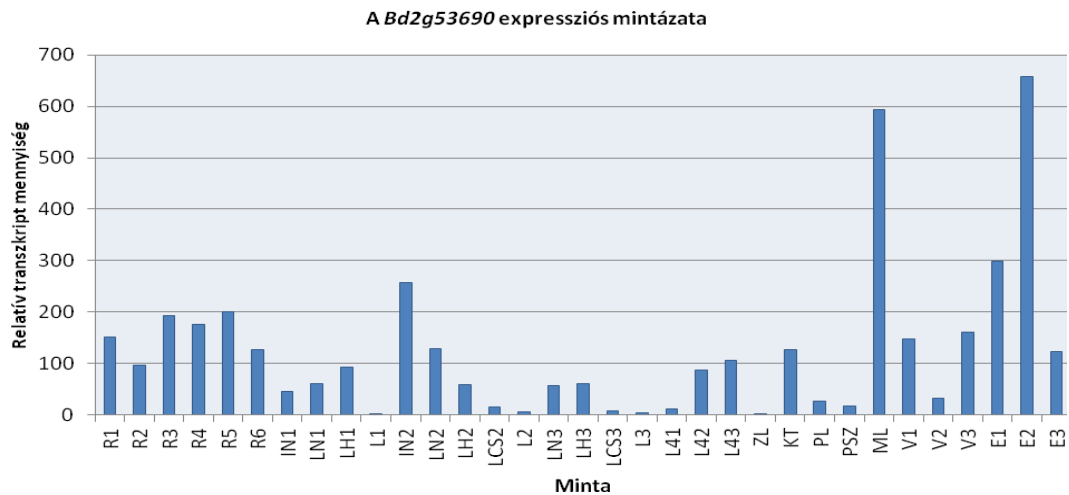


9. ábra: *Arabidopsis LBD13* expressziós profiljának reverz transzkripció kapcsolt PCR- analízise. SH: 12 napos hajtás; RL: rozetta levelek; CL: hajtáson fejlődő levél; ST: virágzati tengely; RT: gyökér; BD: virágbimbó; FL: kifejlett, nyitott virág. Referenciaként az *aktin2* (*ACT2*) szerepel (Shuai és mtsai, 2002).

A hasonló profil mindenképp figyelemre méltó egybeesés, ugyanakkor a *Bd2g34520* által kódolt LOB13 és a lúdfű *LBD13* aminosav-szekvenciájának nagyfokú hasonlósága (2e-46) tükrében nem is annyira meglepő. A tény, hogy a *Brachypodium* LOB13 és az *Arabidopsis* *LBD13* fehérjéje igen magas homológiát mutat egymással, és hogy mindkét fehérje génje a gyökérben expresszálódik, mindenképp arra utal, hogy ezek a gének egymás ortológjai, és olyan, a gyökérfejlődést szabályozó konzervált mechanizmusban játszanak szerepet, amely egyaránt megtalálható az egyszikűekben és kétszikűekben is.

## 5.2 A *Bd2g53690* expressziós mintázata

A *Bd2g53690* különböző növényi szervekben mért relatív expressziós szintjeit a Függelék 3. táblázata tartalmazza részletesen, és összesítve a 2. grafikon szemlélteti. A génkifejeződés mértékének összehasonlításához az első levéllemez (L1)  $\Delta Ct$  értékét vettük viszonyítási egységnek.

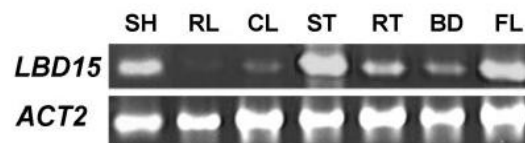


2. grafikon: a *Bd2g53690* relatív expressziós szintjének alakulása a különböző növényi szervekben.

Az eredmények alapján általánosságban megállapítható, hogy az idősebb levelek levéllemezének (L1, L2, L3) és ligulájának (LCS2, LCS3), a negyedik levéllemez bazális szegmensének (L41) valamint a zászlóslevél (ZL) kivételével kisebb-nagyobb mértékben ugyan, de minden növényi részben detektálható volt a *Bd2g53690* kifejeződése. Expresszálódik a gyökér különböző részeiben, aktív a levélnóduszokban, az internódiumokban és a levélhüvelyekben, valamint a fiatal, negyedik levél lemezének középső és csúcsi részében (L42, L43) is. A legerőteljesebb kifejeződés azonban a generatív szervekben és a fejlődő magokban volt megfigyelhető. Tendenciájában a fiatalabb, még osztódó sejteket is tartalmazó szervekben illetve növényrészekben magasabb relatív transzkript mennyiséget kaptunk, mint az idősebb szervekben. Az egyetlen, ennek elsőre ellentmondani látszó eredményünk az, hogy a fiatal, negyedik levél bazális részében, ahol a legtöbb osztódó sejtet feltételezhetjük, alig működik a gén, míg a középső és csúcsi részen ennél egy nagyságrenddel erősebben, noha az egyszikű levelekben itt már több differenciált sejt van jelen. Egy lehetséges magyarázat erre, hogy a negyedik levélben térben jobban elkülönülnek a még osztódó illetve már differenciálódó szövetek, mint a vizsgált egyéb növényrészekben. Így a középső és csúcsi régiójának sejtjei vannak abban a fejlődési fázisban, amikor a merisztematikus állapotból differenciáltba válnak, és ebben játszhat aktív szerepet ez a gén, míg az alapi rész zömmel osztódó sejtjeiben a gén még kevésbé kapcsolódik be. Ennek igazolása természetesen további vizsgálatokat kíván.

Ez a mintázat kiválóan megfeleltethető a *Bd2g53690* *Arabidopsis*-ban található homológjának, az *LBD15*-nek a miénknél kevésbé részletes expressziós analízis eredményeivel (Shuai és mtsai, 2002; 10. ábra). A hasonló profilt a *Bd2g53690* által kódolt

LOB15 és a lúdfű LBD15 aminosav-szekvenciája közötti nagyfokú homológia ( $2e-47$ ) is prediktálta. Az alapján, hogy erőteljesebb kifejeződés inkább a generatív szervekben tapasztalható, valószínűsíthetjük, hogy egyszikűekben és kétszikűekben egyaránt megtalálható, elsősorban virágfejlődésben és embriogenezisben szerepet játszó szabályozási folyamatokban vehetnek részt. Ezt a feltevést támogatja az a microarray-kísérlet is, melyben a magok fejlődésére jellemző transzkripciós faktorokat kerestek lúdfűben. A vizsgálatok eredményeként az AtLBD15/ASL11 génjét mint az embriófejlődés globuláris stádiumában aktív gént aposztrofálták (Le és mtsai, 2010).

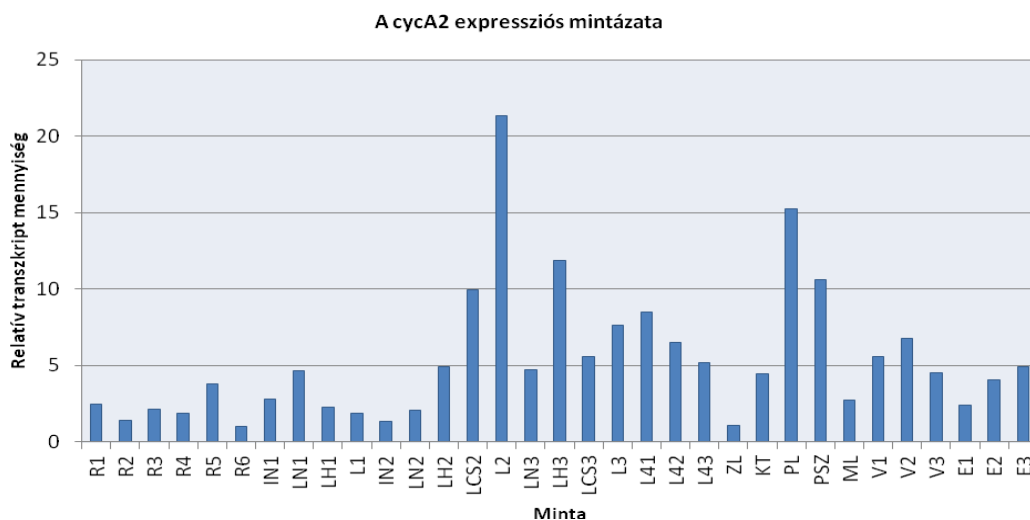


10. ábra: *Arabidopsis* LBD15 expressziós profiljának reverz transzkripció kapcsolt PCR- analízise. SH: 12 napos hajtás; RL: rozetta levelek; CL: hajtáson fejlődő levél; ST: virágzati tengely; RT: gyökér; BD: virágbimbó; FL: kifejtett, nyitott virág. Referenciaként az *aktin2* (ACT2) szerepel (Shuai és mtsai, 2002).

A Bd2g34520-cel összehasonlítva jelentős különbség még, hogy a Bd2g53690 génnél csak 6-700-szoros mRNS szintű különbségek voltak kimérhetők, ez két nagyságrenddel kisebb az előző génnél tapasztaltnál.

### 5.3 A ciklinA2 expressziós mintázata

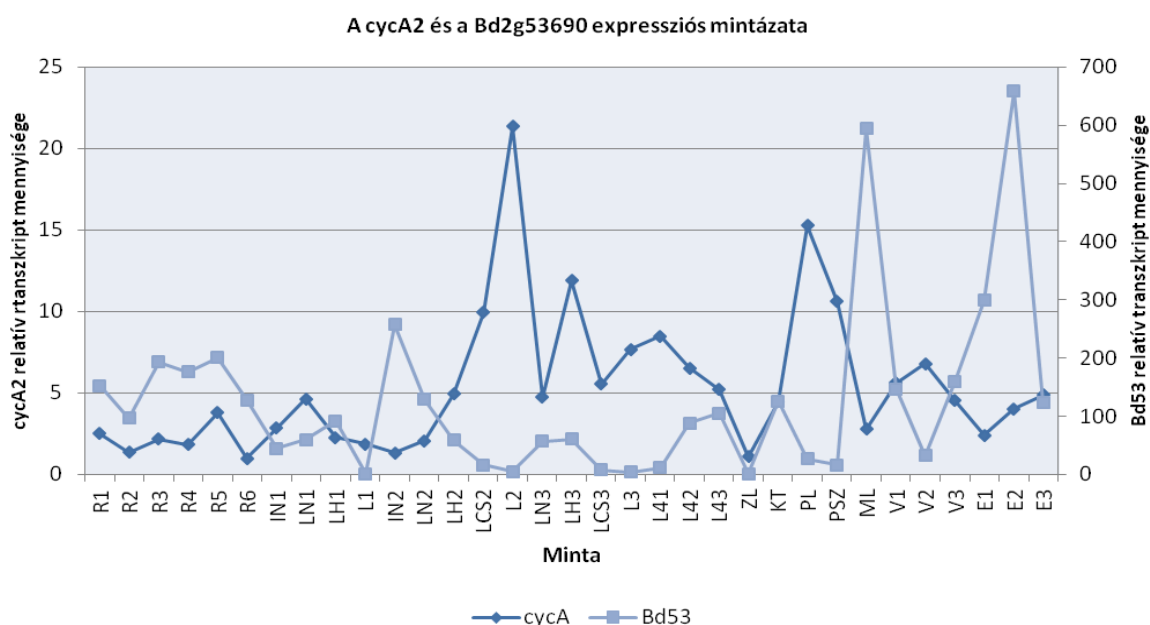
A *ciklinA2* (gi: Bd4g06827.2) különböző növényi szervekben mért relatív expressziós szintjeit a Függelék 4. táblázata tartalmazza részletesen, és összesítve a 3. grafikon szemlélteti. A génkifejeződés mértékének összehasonlításához az idősebb oldalgyökér-iniciális (R6)  $\Delta Ct$  értékét vettük viszonyítási egységnek.



3. grafikon: a *Brachypodium* ciklinA2 relatív expressziós szintjének alakulása a különböző növényi szervekben.

A kapott eredményekből megállapítható, hogy erőteljes expresszió tapasztalható a fiatalabb levelekben és ezek különböző szegmenseiben, a pelyvavevélben, a pelyvavevél szakállában, valamint a közepesen fejlett virágokban (V2). A többi növényi szervben, ill. szövetben alacsonyabb a relatív transzkript mennyiség, de tendenciáját tekintve általánosan igaz, hogy a fiatalabb szervekben mért expressziós szint magasabb, mint a fejlettebb, idősebb növényi részekben kapott értékek. Az általunk kapott eredmények összhangban vannak azokkal a korábbi tapasztalatokkal, melyek szerint a növényi A2 típusú ciklinek génjei túlnyomóan a hajtásban expresszálódnak (Kouchi és mtsai, 1995; Szarka és mtsai, 1995).

Összehasonlítva a vizsgált *LBD* gének expressziójával, a *Brachypodium ciklinA2* kifejeződése nem mutat hasonlóságot a *Bd2g34520* transzkripció mintázatával. Ugyanakkor a *Bd2g53690* és a *cycA2* kifejeződése között úgy tűnik, hogy negatív korreláció áll fenn (4. grafikon).



4. grafikon: a *Brachypodium ciklinA2* és a *Bd2g53690* expressziós mintázatának összehasonlító diagramja.

Általánosságban megállapítható, hogy ahol a *Bd2g53690* expressziója magasabb, ott a *ciklinA2* transzkripció szintje alacsonyabb. Ez természetesen fordítva is igaz. Az eltérések a föld feletti növényi részek esetében a legszembetűnőbbek. Kiugróan magas a *ciklinA2* relatív transzkript mennyisége a második és harmadik levél lemezében, a negyedik levél lemezének különböző szegmenseiben, a pelyvavevélben és a közepesen fejlett virágokban (V2), éppen ott, ahol a *Bd2g53690* expressziója a legalacsonyabb. Ugyanakkor azokban a

szervekben, ahol a *Bd2g53690* kifejeződése erőteljes (mint pl. a toklász és a különböző fejlődési stádiumú magok), ott a *ciklinA2* expressziója nagyon alacsony.

Ez az összefüggés azt sejteti, hogy a *Bd2g53690* által kódolt LOB15 negatív hatást gyakorol a *ciklinA2* kifejeződésére. Ismerve azt, hogy a LOB-domén fehérjék, és általában a transzkripciós faktorok között gyakoriak a feed-back szabályozási mechanizmusok, vélhetően ebben az esetben is egy negatív visszacsatolási folyamat állhat a háttérben.

Ennek értelmében feltételezhető, hogy az A2 ciklin elősegítheti a LOB15 expresszióját, vagy cdk partnerével szabályozhatja a transzkripciós faktor aktivitását, a LOB15 viszont represszálhatja a ciklin A2 transzkripcióját. Az expressziós mintázat tükrében ez a hipotetikus szabályozási kör a levélfejlődésben és a generatív szervek organogenezisében játszhat szerepet. Fontos azonban kihangsúlyozni, hogy ez, mint munkahipotézis szolgálhat további kísérletek tervezéséhez. A kapott eredmények semmiképp sem bizonyítják a fentebb vázolt szabályozási kör meglétét, legfeljebb csak felvetik a lehetőségét. Ehhez további, részletes vizsgálatok kellenek.

Még összetettebbé teszi a képet, hogy irodalmi adatok alapján a lúdfű *LBD15/ASL11* génje lehetséges targetje a xilém elemek differenciációjáért felelős VND7 (VASCULAR RELATED NAC-DOMAIN7) transzkripciós faktornak (Yamaguchi és mtsai, 2011). valamint kakastaréjjal (*Celosia cristata*) végzett kísérletek alapján is arra lehet következtetni, hogy a lúdfű *LBD15/ASL11* génje szerepet játszik a SAM normális működésének fenntartásában és a szállítónyalábok kialakulásában (Sun és mtsai, 2010a). A gén túlműködtetése kakastaréjban (*Celosia cristata*) jelentős elváltozásokat idézett elő: a transzformáns növények levelei gyűröttek, lebenyesek, a paliszád parenchima nehezen felismerhető, a hajtás apikális merisztéma pedig hegyes, túszerű morfológiát mutat, és hiányoznak belőle a szervkezdemények. Ezeket a defektusokat a *KNOX* gének rendellenes aktivitásával magyarázták, amelynek háttérében az *AtLBD15/ASL11* fokozott működése állhat. (Sun és mtsai, 2010b). Tehát az *AtLBD15/ASL11* szerepet játszhat a homeobox gének szabályozásában is. Az viszont még kérdéses, hogy egyszikűekben is hasonló funkcióval bír-e az *AtLBD15* homológja.

## Összegzés

Jelenlegi kutatásaink a szervfejlődést és a sejtosztódást irányító mechanizmusok közötti kapcsolatok mélyebb megismerésére irányulnak. Érdeklődésünk középpontjában egy olyan növény-specifikus transzkripciós faktor család áll, amelyek organogenezisben és sejtosztódás szabályozásában betöltött szerepét már sokrétűen bizonyították. Habár a felfedezésük óta eltelt egy évtized alatt a szóban forgó LOB-domén fehérjéről igen széles ismeretanyag gyűlt össze, pontos funkciójuk azonban java részt még tisztázatlan, emellett tapasztalataink zöme kétszikűekkel végzett kutatásokból származik. Meglehetősen kevés az egyszikűekkel kapcsolatos vizsgálat, jóllehet hatalmas gazdasági jelentőségük okán az egyszikűekben is legalább olyan fontos e folyamatok megismerése.

Munkánkhöz egy, a gabonanövényeinkkel szoros rokonságban álló fajt, a szálkaperjét (*Brachypodium dystachion*) választottuk, amely minden szempontból eleget tesz a jó modellszervezetekkel szemben támasztott követelményeknek. Konkrét vizsgálataink pedig azon LOB-domén fehérjékkel kapcsolatosak, melyek korábbi tapasztalatok alapján közvetlen kapcsolatba hozhatók a sejtciklus szabályozásával, és a sejtosztódást irányító ciklinekkel. Célkitűzésünk két *LBD* gén, a *Bd2g34520* és a *Bd2g53690*, valamint egy A2 típusú ciklin (*Bd4g06827.2*) transzkripciós profiljának elkészítése volt. Ezen gének expresszióját tanulmányoztuk qRT-PCR (quantitative real-time polimerase chain reaction) analízissel 33 különböző növényi szervben, a gyökércsúctól egészen a fejlődő magokig.

Vizsgálatunk során jelentős eltéréseket tapasztaltunk az egyes gének kifejeződése között: a *Bd2g34520* (*LOB13*) transzkripciója kimondottan a gyökér különböző részeire jellemző, míg a *Bd2g53690* (*LOB15*) inkább a fejlődő magokban és a toklászban aktív, de expresszálódik a gyökérben és a második levél internódiumában is. Ezek az eredmények egybehangzanak a két gén *Arabidopsis*-ban fellelhető homológjaival végzett reverz transzkripció kapcsolt PCR-analízis eredményeivel (Shuai és mtsai, 2002), valamint azokkal a kutatásokkal, amelyekben mag specifikus transzkripciós faktorokat kerestek (Le és mtsai, 2010). Az egybeesés arra enged következtetni, hogy az általunk vizsgált gének egy meglehetősen konzervált, egyszikűekben és kétszikűekben is hasonlóan működő szabályozási folyamat részei lehetnek.

Eddig ismert szerepe és expressziós mintázata alapján az A2 típusú ciklin feltételezhetően résztvevője lehet a *LOB15* által irányított folyamatoknak: génjének

aktivitása azokban a növényi részekben (elsősorban a fiatalabb levelekben és a pelyvalevélben) a legmagasabb, ahol a *LOB15* relatív transzkript mennyisége a legalacsonyabb. Hasonló összefüggéseket a *LOB13* és az A2 ciklin transzkriptciója között nem tapasztaltunk, tehát nagy valószínűséggel a *LOB13* nincs hatással az A2 ciklin kifejeződésére, ugyanakkor a *LOB15* negatívan befolyásolja az A2 ciklin génjének működését.

Összességében megállapítható, hogy egyrészt a kapott eredmények a várakozásoknak megfelelően alakultak, másrészt e három génre minden eddiginél részletesebb transzkripciós mintázatot határoztunk meg. A vizsgált LOB-domén gének expressziója inkább a fiatalabb szervekre jellemző, markáns, több nagyságrendnyi mRNS-szint különbség van az egyes szervek között, és az is igazolódni látszik, miszerint az A2 ciklin kifejeződése a *LOB15* aktivitásával mutat negatív korrelációt. Ez az összefüggés felveti a lehetőségét egy, az A2 ciklin és a *LOB15* között fennálló negatív feed-back szabályozási mechanizmus létezésének. Kizárólag ezekre az eredményekre támaszkodva kijelenteni azt, hogy egy ilyen szabályozási mechanizmus létezik, túlzottan messzemenő és elrugaszkodott következtetés lenne. Ennek bizonyítása, a *LOB15* pontos funkciójának meghatározása további vizsgálatokat igényel. Egyrészt szükséges további gének szekvencia és transzkripciós szintű vizsgálatával, mutáns növények analízisével még több, a hipotetikus szabályozási kör létezését alátámasztó bizonyítékokat szolgáltatni. Másrészt szükséges a mechanizmus esetleges további résztvevőinek megtalálása, és végül, de nem utolsó sorban választ adni arra a kérdésre, hogy mindez milyen szereppel bír a növény életében.

## Rövidítések

|                                              |                                                           |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| ARF: Auxin Response Factor                   | KNOX: Knotted-Like Homeodomain                            |
| ARL: Adventitious Roots Less                 | LAS: Lateral Suppressor                                   |
| ARR: Arabidopsis Response Regulator          | LBD: Lateral Organ Boundary Domain                        |
| AS: Asymmetric Leaves                        | LOB: Lateral Organ Boundary                               |
| ASL: Asymmetric Leaves-like                  | NAC-domain: NAM, ATAF1/2 and CUC2 domain                  |
| AuxRE: auxin responsive                      | NAM: No Apical Meristemless                               |
| BAC: Bacterial Artificial Chromosome         | PAP: purple acid phosphatase                              |
| BES: BAC End Sequence                        | PIN: pin-formed protein                                   |
| bHLH: Basic Helix-loop-Helix                 | PTL: Petal-Loss                                           |
| BOP: Blade On Petiole                        | qRT-PCR: Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction |
| BP: Brevipedicellus                          | Ra: Ramosa                                                |
| CSK: ciklin dependens kináz                  | RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA             |
| CPP: Cystein-rich Polycomb-like Protein      | RB: retinoblastoma                                        |
| Crl: Crown Rootless                          | RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism            |
| CUC: Cup-Shaped Cotyledon                    | RS: Rough Sheat                                           |
| DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole          | RTCL: rtcs-like protein - rtcs gén paralogja              |
| DH: Degenerated Hull                         | Rtcs: rootless concerning crown and seminal roots         |
| EST: Expressed Sequence Tag                  | SAM: Shoot Apical Meristem – hajtás apikális mersztéma    |
| FISH: Fluorescent In Situ Hybridization      | STM: Shoot Meristemless                                   |
| HD-ZIP: Homeodomain Leucin-Zipper            | UFO: Unusual Floral Organs                                |
| HIRA: histone regulatory complex A           | VND: Vascular-Related NAC-domain                          |
| IAA: Indol-Acetic Acid Induced protein       |                                                           |
| Ig: Indeterminate Gametophyte                |                                                           |
| ITS: Internal Transcribed Spacer             |                                                           |
| JAG: Jagged                                  |                                                           |
| JLO: Jagged Lateral Organ                    |                                                           |
| KNAT: Knotted-Like form Arabidopsis thaliana |                                                           |

## Irodalomjegyzék

- Aida, M. and Tasaka, M.(2006) Morphogenesis and patterning at the organ boundaries in the higher plant shoot apex. *PlantMol.Biol.* 60, 915–928
- Aida, M., T. Ishida, H. Fukaki, H. Fujisawa and M. Tasaka (1997) Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell* 9,841–857
- Albinsky, D., M Kusanoa, M. Higuchia, N. Hayashia, M. Kobayashia, A. Fukushimaa, M. Morib, T. Ichikawaa, K. Matsui, H. Kurodaa, Y. Horiia, Y. Tsumotoa, H. Sakakibaraa, H. Hirochikab, M. Matsui and K. Saito (2010) Metabolomic screening applied to rice FOX Arabidopsis lines leads to the identification of a gene-changing nitrogen metabolism. *Mol.Plant* 3,125–142
- Altschul, S F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 1997, Vol. 25, No. 17 3389–3402
- Bennett, M.D. and Leitch, I.J. (2005) Nuclear DNA amounts in Angiosperms: progress, problems and prospects. *Ann. Botany* 95, 45–90.
- Berckmans, B., V. Vassileva, S. P.C. Schmid, S. Maes, B. Parizot, S. Naramoto, Z. Magyar, C. L. A. Kamei, Cs. Koncz, L Bögner, G. Persiau, G. De Jaeger, J. Friml, R. Simon, T. Beeckman and L. DeVeylder (2011) Auxin-Dependent Cell Cycle Reactivation through Transcriptional Regulation of Arabidopsis E2Fa by Lateral Organ Boundary Proteins. *The Plant Cell*, Vol.23:3671–3683, doi:10.1105/tpc.111.088377
- Borghi, L., M. Bureau and R. Simon (2007) Arabidopsis JAGGED LATERAL ORGANS is expressed in boundaries and coordinates KNOX and PIN activity. *PlantCell* 19,1795–1808
- Bortiri, E., G. Chuck, E. Vollbrecht, T. Rocheford, R. Martienssen and S. Hake (2006) *ramosa2* encodes a LATERAL ORGAN BOUNDARY domain protein that determines the fate of stem cells in branch meristems of maize. *PlantCell* 18,574–585
- Breuil-Broyer, S., Morel, P., Janice De Almeida-Engler, Coustham, V., Ioan Negrutiu, I., Trehin, C. (2004) High-resolution boundary analysis during Arabidopsis thaliana flower development. *PlantJ.* 38,182–192
- Bureau, M. and Simon, R.(2008) JLO regulates embryo patterning and organ initiation by controlling auxin transport. *PlantSignal. Behav.*3, 145–147

- Byrne, M.E., R. Barley, M. Curtis, J. M. Arroyo, M. Dunham, A. Hudson & R. A. Martienssen (2000) Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in Arabidopsis. *Nature* 408,967–971
- Catalán, P. and Olmstead, R. G. (2000) Phylogenetic reconstruction of the genus *Brachypodium* P. Beauv. (Poaceae) from combined sequences of chloroplast *ndhF* gene and nuclear ITS. *Plant Syst. Evol.* 220, 1–19.
- Catalán, P., Ying, S., Armstrong, L., Draper, J. and Stace, C. A. (1995) Molecular phylogeny of the grass genus *Brachypodium* P.Beauv. based on RFLP and RAPD analysis. *Botanical J. Linn. Soc.* 117, 263–280.
- Chalfun-Junior, A., J. Franken, J. J. Mes, N. Marsch-Martinez, A. Pereira and G. C. Angenent (2005) ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE1 gene, a member of the AS2/LOB family, controls proximal-distal patterning in Arabidopsis petals. *PlantMol.Biol.* 57,559–575
- De Reuille, P. B., Isabelle Bohn-Courseau, K. Ljung, H. Morin, N. Carraro, C. Godin, J. Traas (2006) Computer simulations reveal properties of the cell-cell signaling network at the shoot apex in Arabidopsis. *PNAS* January 31, 2006 vol. 103 no. 5 1627-1632, doi: 10.1073/pnas.0510130103
- Dolan, L. and Langdale, J. A. (2004) New insights into plant development in New England. *Development* 131,5215–5220
- Döring, E., Schneider, J., Hilu, K.W. and Röser, M. (2007) Phylogenetic relationships in the Aveneae/Poeae complex (Pooideae, Poaceae). *Kew Bull.* 62, 407–424.
- Draper, J., Mur, L. A. J., Jenkins, G., Ghosh-Biswas, G.C., Bablak, P., Hasterok, R. and Routledge, A .P.M. (2001) *Brachypodium distachyon*. A new model system for functional genomics in grasses. *Plant Phys.* 127, 1539–1555.
- Evans, M.M. (2007)The indeterminate gametophyte1 gene of maize encodes a LOB domain protein required for embryosac and leaf development. *PlantCell* 19,46–62
- Evans, M.M. (2009) Indeterminate gametophyte1 (*ig1*), mutations of *ig1*, orthologs of *ig1*, and uses thereof. USPatent Application20090151025
- Friml, J. et al. (2002) AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradient and root patterning in Arabidopsis. *Cell* 108,661–673
- Fukaki, H. and Tasaka, M. (2009) Hormone interactions during lateral root formation. *PlantMol.Biol.* 69,437–449

- Garvin, D. F., Gu, Y.Q., Hasterok, R., Hazen, S.P., Jenkins, G., Mockler, T.C., Mur, L. A.J., Vogel, J.P. (2008) Development of genetic and genomic research resources for *Brachypodium distachyon*, a new model system for grass crop research. *Crop Sci.* 48, S-69–S-84
- Garvin, D. F., N. McKenzie, J P. Vogel, T C. Mockler, Z. J. Blankenheim, J Wright, J. J.S. Cheema, J. Dicks, N. Huo, D. M. Hayden, Y. Gu, C. Tobias, J. H. Chang, A. Chu, M. Trick, T. P. Michael, M. W. Bevan, J. W. Snapeb (2009) An SSR-based genetic linkage map of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Genome* 53, 1–13. 53(1): 1-13, 10.1139/G09-079
- Greb, T., O Clarenz, E Schäfer, D Müller, R Herrero, G Schmitz, and K Theres (2003) Molecular analysis of the LATERAL SUPPRESSOR gene in *Arabidopsis* reveals a conserved control mechanism for axillary meristem formation. *GenesDev.* 17, 1175–1187
- Gu, Y. Q, Y. Ma, N. Huo, J. P Vogel, F. M You, G R Lazo, W M Nelson, C. Soderlund, J. Dvorak, O D Anderson and M-C Luo (2009). A BAC-based physical map of *Brachypodium distachyon* and its comparative analysis with rice and wheat. *BMC Genomics* 10, 496
- Hasterok, R., Draper, J. and Jenkins, G. (2004) Laying the cytotaxonomic foundations of a new model grass, *Brachypodium distachyon* (L.) beauv. *Chromosome Res.* 12, 397–403.
- Hasterok, R., Marasek, A., Donnison, I.S., Armstead, I., Thomas, A., King, I.P., Wolny, E., Idziak, D., Draper, J. and Jenkins, G. (2006) Alignment of the genomes of *Brachypodium distachyon* and temperate cereals and grasses using bacterial artificial chromosome landing with fluorescence in situ hybridization. *Genetics* 173, 349–362
- Heisler, M.G., C. Ohno, P. Das, P. Sieber, G. V.Reddy, J. A. Long and E. M. Meyerowitz (2005) Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *Curr.Biol.* 15, 1899–1911
- Hetz W, Hochholdinger F, Schwall M, Feix G. (1996) Isolation and characterization of *rtcs* a maize mutant deficient in the formation of nodal roots. *Plant J* 10: 845–857.
- Hong, S-Y., P. J. Seo, M-S Yang, F Xiang and C-M Park (2008) Exploring valid reference genes for gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR. *BMC Plant Biology* 2008, 8:112 doi:10.1186/1471-2229-8-112
- Hsaio, C., Chatterton, N. J., Asay, K.H. and Jensen, K. B. (1994) Phylogenetic relationships of 10 grass species: an assessment of phylogenetic utility of the internal

- transcribed spacer region in nuclear ribosomal DNA in monocots. *Genome* 37, 112–120.
- Huo, N., G. R. Lazo, J. P. Vogel, F. M. You, Y. Ma, D. M. Hayden, D. Coleman-Derr, T. A. Hill, J. Dvorak and O. D. Anderson, et al (2008). The nuclear genome of *Brachypodium distachyon*: analysis of BAC end sequences. *Funct. Integr. Genomics* 8, 135–147. DOI: 10.1007/s10142-007-0062-7
- Huo, N., Gu, Y., Lazo, G., Vogel, J., Coleman-Derr, D., Luo, M., Thilmony, R., Garvin, D. and Anderson, O. (2006) Construction and characterization of two BAC libraries from *Brachypodium distachyon*, a new model for grass genomics. *Genome* 49, 1099–1108.
- Huo, N., Lazo, G.R., Vogel, J.P., You, F.M., Ma, Y., Hayden, D.M., Coleman-Derr, D., Hill, T. A., Dvorak, J., Anderson, O.D., Luo, M. and Gu, Y.Q. (2007) The nuclear genome of *Brachypodium distachyon*: analysis of BAC end sequences. *Funct. Integr. Genomics* 8, 135–147.
- Husbands, A., E. M. Bell, B. Shuai, H. M.S. Smith and P S. Springer (2007) LATERAL ORGAN BOUNDARIES defines a new family of DNA-binding transcription factors and can interact with specific bHLH proteins. *NucleicAcidsRes.* 35,6663–6671
- Ikezaki, M., M. Kojima, H. Sakakibara, S. Kojima, Y. Ueno, C. Machida, Y. Machida (2010) Genetic networks regulated by ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1) and AS2 in leaf development in *Arabidopsis thaliana*: KNOX genes control five morphological events. *PlantJ.* 61,70–82
- Inukai, Y., T. Sakamoto, M. Ueguchi-Tanaka, Y. Shibata, K. Gonia, I. Umemura, Y. Hasegawa, M. Ashikari, H. Kitano and M. Matsuoka (2005) Crown rootless1, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in auxin signaling. *PlantCell* 17,1387–1396
- Iwakawa, H., Mayumi Iwasaki, S. Kojima, Y. Ueno, T. Soma, H. Tanaka, E. Semiarti, Y. Machida, C. Machida (2007) Expression of the ASYMMETRIC LEAVES2 gene in the adaxial domain of *Arabidopsis* leaves represses cell proliferation in this domain and is critical for the development of properly expanded leaves. *PlantJ.* 51,173–184 DOI: 10.1111/j.1365-313X.2007.03132.x
- Jiang, Y. and Deyholos, M.K. (2009) Functional characterization of *Arabidopsis* NaCl-inducible WRKY25 and WRKY33 transcription factors in abiotic stresses. *PlantMol.Biol.* 69,91–105
- Jönsson, H., M. G. Heisler, B. E. Shapiro, E. M. Meyerowitz, and E. Mjolsness (2006) Aauxin-driven polarized transport model for phyllotaxis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 103,1633–1638

- Jun, J. H., C M Haa and J. C. Fletcher (2010) BLADE-ON-PETIOLE1 coordinates organ determinacy and axial polarity in Arabidopsis by directly activating ASYMMETRICLEAVES2. *PlantCell* 22,62–76
- Kellogg, E. A. (2001) Evolutionary history of the grasses. *Plant Phys.* 125, 1198–1205.
- Kouchi, H., M. Sekine and S. Hata (1995) Distinct Classes of Mitotic Cyclins Are Differentially Expressed in the Soybean Shoot Apex during the Cell Cycle. *The Plant Cell* August 1995 vol. 7 no. 8 1143-1155doi: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.7.8.1143>
- Le, B. H., C Chenga, A. Q. Buia, J A. Wagmaistera, K F. Henrya, J Pelletierb, L Kwongb, M Belmonteb, R. Kirkbrideb, S Horvathc, G N. Drewsd, R L. Fischere, J K. Okamurof, J J. Haradab, and R B. Goldberga (2010) Global analysis of gene activity during Arabidopsis seed development and identification of seed-specific transcription factors. *PNAS* May 4, 2010 vol. 107 no. 18 8063-8070. doi: 10.1073/pnas.1003530107
- Lee I, Wolfe DS, Nilsson O, Weigel D (1997) A LEAFY co-regulator encoded by UNUSUAL FLORAL ORGANS. *CurrBiol* 7: 95–104
- Lee, H. W., N. Y. Kim, D. J. Lee and J. Kim (2009) LBD18/ASL20 regulates lateral root formation in combination with LBD16/ASL18 downstream of ARF7 and ARF19 in Arabidopsis. *PlantPhysiol.* 151,1377–1389
- Li, A., Y. Zhang, X. Wu, W. Tang, R. Wu, Z. Dai, G. Liu, H. Zhang, C. Wu, G. Chen, X. Pan (2008) DH1, a LOB domain-like protein required for glume formation in rice. *PlantMol.Biol.* 66,491–502
- Lin, W. C., B Shuai and P.S. Springer (2003) The Arabidopsis LATERAL ORGAN BOUNDARIES-domain gene ASYMMETRICLEAVES2 functions in the repression of KNOX gene expression and in adaxial-abaxial patterning. *PlantCell* 15,2241–2252
- Liu, H., S. Wang, X. Yu, J. Yu, X. He, S. Zhang, H. Shou, P. Wu (2005) ARL1, a LOB-domain protein required for adventitious root formation in rice. *PlantJ.* 43,47–56
- Livak, K J and. Schmittgen T D (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *METHODS* 25, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Luo, N., Liu, J., Yu, X., Jiang, Y. (2010) Natural variation of drought response in *Brachypodium distachyon*. *Physiol.Plant*, ISSN 0031-9317, doi: 10.1111/j.1399-3054.2010.01413.x

- Ma, Y., F. Wang, J. Guo and X. S. Zhang (2009) Rice OsAS2 gene, a member of the LOB domain family, functions in the regulation of shoot differentiation and leaf development. *J.PlantBiol.* 52,374–381
- Majer, C., F. Hochholdinger (2011) Defining the boundaries: structure and function of LOB domain proteins. *Trends in Plant Science.* Volume 16, Issue 1, Pages 47–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2010.09.009>.
- Meng, L-S. H-L Liu, X. Cui, X-D Sun and J Zhu (2009) ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE38 gene, a member of AS2/LOB family of Arabidopsis, causes leaf dorsoventral alternation in transgenic cockscomb plants. *ActaPhysiol.Plant.* 31.1301–1306
- Mishra, B.S., M. Singh, P. Aggrawal, A. Laxmi (2009) Glucose and auxin signaling interaction in controlling Arabidopsis thaliana seedlings root growth and development. *PLoSOne* 4,e4502
- Naito, T., Yamashino T., Kiba T., Koizumi N., Mizuno T., Kojima M., Sakakibara H. (2007) A link between cytokinin and ASL9 (ASYMMETRIC LEAVES2 LIKE9) that belongs to the AS2/LOB (LATERAL ORGAN BOUNDARIES) family genes in Arabidopsis thaliana. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 71,1269–1278
- Nakazawa, M., T. Ichikawa, A. Ishikawa, H. Kobayashi, Y. Tsuhara, M. Kawashima, K. Suzuki, S. Muto, M. Matsui (2003) Activation tagging a novel tool to dissect the functions of a gene family. *PlantJ.* 34,741–750
- Oh, S.A, K. S. Park, D. Twell and Soon Ki Park (2010) The SIDECAR POLLEN gene encodes a microspore-specific LOB/AS2 domain protein required for the correct timing and orientation of asymmetric cell division. Blackwell Publishing Ltd, *The Plant Journal*, (2010), 64,839–850, doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04374.x
- Okushima, Y. et al. (2007) ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in Arabidopsis. *PlantCell* 19,118–130 DOI: 10.1111/j.1365-313X.2005.02434.x
- Okushima, Y., P. J. Overvoorde, K. Arimaa, J M. Alonso, A. Chana, C. Changa, J. R. Ecker, B. Hughes, A. Luja, D. Nguyen, C. Onodera, H. Quacha, A. Smith, G. Y. and A. Theologis (2005) Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in Arabidopsis thaliana: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. *PlantCell* 17, 444–463
- Opanowicz, M., P. Vain, J. Draper, D. Parker and J. H. Doonan (2008) Brachypodium distachyon: making hay with a wild grass. 1360-1385. 2008 Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.tplants.2008.01.007

- Ori, N., Y. Eshed, G. Chuck, J. L. Bowman and S. Hake (2000) Mechanisms that control *knox* gene expression in the *Arabidopsis* shoot. *Development* 127,5523–5532
- Paterson, A. H. et al. (2009) The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature* 457, 551–556
- Phelps-Durr, T. L., J. Thomas, P. Vahab and M.C.P. Timmermans (2005) Maize rough sheath2 and its *Arabidopsis* orthologue ASYMMETRIC LEAVES1 interact with HIRA, a predicted histone chaperone, to maintain *knox* gene silencing and determinacy during organogenesis. *PlantCell* 17,2886–2898
- Rast, M. I., R. Simon (2008) The meristem-to-organboundary: more than an extremity of anything. *Current Opinion in Genetics & Development*. Volume 18, Issue 4, August 2008, Pages 287–294. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jde.2008.05.005>
- Robert H S and J C Friml (2009) Auxin and other signals on the move in plants. *Nature Chemical Biology* 5, 325 - 332 (2009) Published online: 17 April 2009 | doi:10.1038/nchembio.170
- Roudier F, Fedorova E, Györgyey J, Feher A, Brown S, Kondorosi A, Kondorosi E (2000) Cell cycle function of a *Medicago sativa* A2-type cyclin interacting with a PSTAIRE-type cyclin dependent kinase and a retinoblastoma protein. *Plant J* 23: 73–83
- Roudier, F., E. Fedorova, M. Lebris, P. Lecomte, J. Györgyey, D. Vaubert, G. Horvath, P. Abad, A. Kondorosi, and E. Kondorosi (2003) The *Medicago* Species A2-Type Cyclin Is Auxin Regulated and Involved in Meristem Formation But Dispensable for Endoreduplication-Associated Developmental Programs. *Plant Physiology*, March 2003, Vol. 131, pp. 1091–1103
- Rubin, G., T. Tohge, F. Matsuda, K. Saito and W-R Scheible, (2009) Members of the LBD family of transcription factors repress anthocyanin synthesis and affect additional nitrogen responses in *Arabidopsis*. *PlantCell* 21,3567–3584
- Scheible, W. R., R. Morcuende, T. Czechowski, C. Fritz, D. Osuna, N. Palacios-Rojas, D. Schindelasch, O. Thimm, M. K. Udvardi and M. Stitt (2004) Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *PlantPhysiol.* 136,2483–2499
- Schwartz, C.J., Doyle, M.R., Manzaneda, A.J., Rey, P.J., Mitchell-Olds, T., Amasino, M.R. (2010) Natural variation of flowering time and vernalization responsiveness in *Brachypodium distachyon*. *Bioenerg.Res.* (2010) 3:38-46, doi: 10.1007/s1255-009-9069-3

- Semiarti, E., Y. Ueno, H. Tsukaya, H. Iwakawa, C. Machida and Y. Machida (2001) The ASYMMETRIC LEAVES2 gene of *Arabidopsis thaliana* regulates formation of asymmetric lamina, establishment of venation and repression of meristem-related homeobox genes in leaves. *Development* 128,1771–1783
- Shuai, B., C. G. Reynaga-Peña and P. S. Springer (2002) The lateral organ boundaries gene defines a novel, plant-specific gene family. *PlantPhysiol.* 129,747–761
- Souer, E., A. Houwelingen, D. Kloos, J. Mol, R. Koes (1996) The no apical meristem gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell* 85,159–170
- Soyano, T., S. Thitamadee, Y. Machida and N-H Chua (2008) ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE19/LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN30 and ASL20/LBD18 regulate tracheary element differentiation in *Arabidopsis*. *PlantCell* 20, 3359–3373
- Sun, S. L. Meng, X. Sun and Z. Feng (2010a) Using high competent shoot apical meristems of cockscomb as explants for studying function of ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE11 (ASL11) gene of *Arabidopsis*. *Molecular Biology Reports*. Volume 37, Number 8, 3973-3982, DOI: 10.1007/s11033-010-0056-8
- Sun, S. L. Meng, Z. Feng, J. Zhu (2010b) ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE11 gene, a member of the AS2/LOB family of *Arabidopsis*, causes pleiotropic alteration in transgenic cockscomb (*Celosia cristata*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Volume 101, Number 2, 193-200, DOI: 10.1007/s11240-010-9676-x
- Szarka, S., M. Fitch, S. Schaefer and M. Moloney (1995) Classification and expression of a family of cyclin gene homologues in *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology*, Volume 27, Number 2, 263-275, DOI: 10.1007/BF00020182
- Tabata, R., M. Ikezaki, T. Fujibe, M. Aida, C. Tian, Y. Ueno, K. T. Yamamoto, Y. Machida, K. Nakamura and S. Ishiguro (2010) *Arabidopsis* auxin response factor6 and 8 regulate jasmonic acid biosynthesis and floral organ development via repression of class1 KNOX genes. *PlantCellPhysiol.* 51,164–175
- Takada S, Hibara K-I, Ishida T, Tasaka M (2001) The CUP-SHAPED COTYLEDON1 gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. *Development* 128: 1127–1135
- Takada, S. and Tasaka, M. (2002) Embryonic shoot apical meristem formation in higher plants. *J. Plant Res.* 115,411–417
- Tanaka, T. et al. (2008) The rice annotation project database (RAP-DB): 2008 update. *Nucleic Acids Res.* 36, D1028–D1033 (2008)

- Taramino, G., M. Sauer, J. L. Stauffer Jr, D. Multani, X. Niu, H. Sakai, F. Hochholdinger (2007) The maize (*Zeamays* L.) RTCS gene encodes a LOB domain protein that is a key regulator of embryonic seminal and post-embryonic shoot-borne root initiation. *PlantJ.* 50,649–659
- Traas, J. (2006) Computer simulations reveal properties of the cell-cell signaling network at the shoot apex in *Arabidopsis*. *Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 103,1627–1632
- Vain, P. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of the temperate grass *Brachypodium distachyon* (genotype Bd21) for T-DNA insertional mutagenesis. *Plant Biotechnol. J.* 6, 236–245 (2008)
- Vogel, J P., D. F. Garvin, T. C. Mockler, J. Schmutz, D Rokhsar, M. W. Bevan (Principal investigators, International Brachypodium Initiative) et al (2010) Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature*, doi:10.1038/nature08747, 763-768
- Vogel, J. and Hill, T. (2008) High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* inbred line Bd21-3. *Plant Cell Rep.* 27, 471–478.
- Vogel, J. P., M. Tuna, H. Budak, N. Huo, Y. Q Gu and M. A Steinwand (2009a) Development of SSR markers and analysis of diversity in Turkish populations of *Brachypodium distachyon*. *BMC Plant Biol.* 9, 88. doi:10.1186/1471-2229-9-88
- Vogel, J., Bragg, J., C. Feuillet, G.J. Muehlbauer (eds.) (2009b) *Genetics and Genomics of the Triticeae*, *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models* 7, DOI 10.1007/978-0-387-77489-3\_16, \_ Springer Science+Business Media, LLC 2009
- Vogel, J. P., Garvin, D.F., Leong, O.M. and Hayden, D.M. (2006a) *Agrobacterium*-mediated transformation and inbred line development in the model grass *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 85, 199–211.
- Vogel, J. P., Gu, Y., Twigg, P., Lazo, G., Laudencia-Chingcuanco, D., Hayden, D., Donze, T., Vivian, L., Stamova, B. and Coleman-Derr, D. (2006b) EST sequencing and phylogenetic analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Theor. Appl. Genet.* 113, 186–195.
- Williams, L., S. P. Grigg, M. Xie, S. Christensen and J. C. Fletcher (2005) Regulation of *Arabidopsis* shoot apical meristem and lateral organ formation by microRNA miR166g and its AtHD-ZIP target genes. *Development* 132,3657–3668
- Xu, B., Z. Li, Y. Zhu, H. Wang, H. Ma, A. Dong and H. Huang (2008) *Arabidopsis* genes AS1, AS2, and JAG negatively regulate boundary-specifying genes to promote sepal and petal development. *PlantPhysiol.* 146,566–575

- Yamaguchi, M., N. Mitsuda, M Ohtani, M Ohme-Takagi, K Kato, T Demura (2011) VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN 7 directly regulates the expression of a broad range of genes for xylem vessel formation. *The Plant Journal*. Volume 66, Issue 4, pages 579–590, May 2011. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04514.x
- Zentella, R., Z-L Zhang, Mehea Park, S. G. Thomas, A. Endo, K Murase, C. M. Fleet, Y. Jikumaru, E. Nambara, Y. Kamiya and T. Sun (2007) Global analysis of DELLA direct targets in early gibberellin signaling in Arabidopsis. *PlantCell* 19,3037–3057
- Zgurski, J.M., Sharma, R., Bolokoski, D.A., and Schultz, E.A. (2005). Asymmetric auxin response precedes asymmetric growth and differentiation of asymmetric leaf1 and asymmetric leaf2 Arabidopsis leaves. *PlantCell* 17: 77–91.
- Zondlo SC, Irish VF (1999) CYP78A5 encodes a cyto-chrome P450 that marks the shoot apical meristem boundary in Arabidopsis. *PlantJ* 19: 259–268

### **Köszönetnyilvánítás**

Ez úton szeretném megköszönni az MTA-SZBK Növénybiológiai Intézet Növényi Sejtosztódási és Stressz Adaptációs Csoport vezetőjének, Dr. Horváth V Gábornak, aki lehetővé tette, hogy a csoportban dolgozzak. Köszönet illeti Sándor Györgyit, Dr. Szécsényi Máriát és Zombori Zoltánt az áldozatkész szakmai és gyakorlati segítségnyújtásért, továbbá a Sejtosztódási és Stresszadaptációs csoport minden kedves tagját a közös munkáért és tapasztalatokért. Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Györgyey Jánosnak aki biztosította a dolgozatom elkészüléséhez szükséges feltételeket is, valamint konzulens tanáromnak, Dr. Csiszár Jolán docensasszonynak ösztönző és türelmes munkájukért, szakmai és személyes támogatásukért, mely nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

## Melléklet

### A növényneveléshez használt Hoagland-tápoldat összetétele

| Hoagland-tápoldat (1x):                                |          | Mikroelem-törzsoldat összetétele:      |           |
|--------------------------------------------------------|----------|----------------------------------------|-----------|
| NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>         | 150 mg/l | H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>         | 2,86 mg/l |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O | 656 mg/l | CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O | 0,08 mg/l |
| MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O                 | 240 mg/l | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>       | 0,03 mg/l |
| KNO <sub>3</sub>                                       | 606 mg/l | ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O | 0,22 mg/l |
| Fe-EDTA                                                | 2,5 mg/l | MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O | 1,81 mg/  |
| Mikroelem-törzsoldat                                   | 1 ml/l   |                                        |           |

### A kísérlet során alkalmazott protokollok

#### RNS-izolálás LiCl-dal

- 1) Felhasználás előtt 20 µl/ml β-merkapthoetnolt adunk az extraháló pufferhez, majd 65°C-ra melegítjük, majd alaposan vortexeljük.

DEPC kezelt extraháló puffer összetétele (100 ml vízben oldva):

|                      |         |
|----------------------|---------|
| CTAB (2%)            | 2 g     |
| Tris (1M; pH 8.0)    | 10 ml   |
| NaCl (2M)            | 11,6 g  |
| Spermidine (0,5 g/l) | 0,005 g |
| EDTA (0,5M)          | 4 ml    |

- 2) 100 mg folyékony nitrogénben, kvarchomokkal, dörzsmozsárban alaposan homogenizált növényi mintához 0,5 ml extraháló puffert adunk, majd alaposan vortexeljük.
- 3) A mintát 56°C-on, 2 percig inkubáljuk, majd ismét vortexeljük.
- 4) A mintát jégen lehűtjük, majd 0,5 ml fenol: kloroform: izoamilalkoholt (25:24:1) adunk hozzá, ezután vortexeljük.

- 5) 5 percig 13000 rpm-en, szobahőmérsékleten centrifugáljuk.
- 6) A felső fázist átpipettázzuk egy új eppendorfba, és a térfogatával megegyező mennyiségű kloroformot adunk hozzá, majd alaposan vortexeljük.
- 7) 3 percig 13000 rpm-en, szobahőmérsékleten centrifugáljuk.
- 8) A felső fázist átpipettázzuk egy új eppendorfba, és a térfogata 1/3-ának megfelelő mennyiségű 8M DEPC-kezelt, autoklávozott LiCl-oldatot adunk hozzá, majd finoman összerázzuk. (Ügyeljünk, hogy ennél a lépésnél semmiképp se pipettázzunk az alsó fázisból vagy az interfázisból!)
- 9) A mintát 4°C-on overnight inkubáljuk.
- 10) A mintát 20 percig centrifugáljuk 4°C-on, 13000 rpm-en.
- 11) A pelletről eltávolítjuk a felülúszó frakciót, majd 400 µl DEPC-kezelt, autoklávozott 2M LiCl-dal mossuk a csapadékot.
- 12) A csapadékot visszaoldjuk 300 µl 0,5% DEPC-kezelt SDS-oldatban.
- 13) A mintához 300 µl kloroform:izoamilalkoholt (24:1) adunk., majd 3 percig 13000 rpm-en, szobahőmérsékleten centrifugáljuk.
- 14) A felső fázist átpipettázzuk egy új eppendorfba, majd a térfogata 1/10-ének megfelelő mennyiségű 3M Na-acetátot (DEPC-kezelt, pH:4.8) és a térfogata háromszorosának megfelelő mennyiségű RNázmentes 96% EtOH-t adunk hozzá.
- 15) A mintát -20°C-on overnight inkubáljuk.
- 16) A mintát 20 percig centrifugáljuk 4°C-on, 13000 rpm-en.
- 17) A pelletről eltávolítjuk a felülúszó frakciót, majd 400 µl 75% EtOH-val mossuk.
- 18) Az etanol eltávolítása után a pelletet jégen szárítjuk, majd 50 µl DEPC-kezelt vízben feloldjuk.
- 19) Koncentrációmérés Nanpdroppal (2 µl minta), majd a minta integritásának ellenőrzése gélelektroforézissel, 1% agaróz gélen (1 µl minta + 9 µl DEPC-kezelt víz + 2 µl 6x loading buffer)

20) A mintát ezután  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároljuk felhasználásig.

### **DNáz kezelés**

1) A következő reakcióelegy összeállítása, 60  $\mu\text{l}$  végtérfogatra:

|                   |                                           |
|-------------------|-------------------------------------------|
| 30 $\mu\text{g}$  | RNS ( $\sim 46 \mu\text{l}$ )             |
| 6 $\mu\text{l}$   | DNase puffer ( $\text{Mg}^{2+}$ tartalmú) |
| 6 $\mu\text{l}$   | DNase                                     |
| 0,5 $\mu\text{l}$ | RNase inhibitor                           |
| 1,5 $\mu\text{l}$ | DEPC-kezelt víz                           |

2) A mintát 30 percig  $37^{\circ}\text{C}$ -on inkubáljuk.

3) A mintákat 10 percig  $65^{\circ}\text{C}$ -on inkubáljuk az enzimek inaktiválása érdekében.

4) A reakcióelegyhez 150  $\mu\text{l}$  DEPC  $\text{H}_2\text{O}$ -t, 150  $\mu\text{l}$  fenolt (NEM pH 4-es fenolt!) és 150  $\mu\text{l}$  kloroformot adunk, majd alaposan vortexeljük.

5) Centrifugálás 10 percig 13000 rpm-en,  $4^{\circ}\text{C}$ -on.

6) A felülúszóhoz 200  $\mu\text{l}$  kloroformot adunk.

7) Alapos vortexelés után a mintákat 10 percig 13000 rpm-en,  $4^{\circ}\text{C}$ -on centrifugáljuk.

8) A felülúszóhoz 20  $\mu\text{l}$  Na-acetátot (1/10 térfogata a felülúszónak) és 550  $\mu\text{l}$  96%-os etanolt adunk.

9)  $-20^{\circ}\text{C}$ -on overnight inkubáljuk.

10) Centrifugálás 20 percig 13000 rpm-en,  $4^{\circ}\text{C}$ -on.

11) Óvatosan leöntjük a felülúszót a csapadékról, majd 70%-os etanollal 2x mossuk a csapadékot.

12) Csapadék szárítása jégen, 10-15 percig, majd 25-30  $\mu\text{l}$  DEPC  $\text{H}_2\text{O}$ -ben visszaoldjuk a csapadékot.

13) Koncentrációellenőrzés Nanodroppal (2  $\mu$ l minta), futtatás 1% agaróz gélben (1  $\mu$ l minta + 9  $\mu$ l DEPC-kezelt víz + 2  $\mu$ l 6x loading buffer).

Amikor a mintánk integritása megfelelő, genomi DNS-től mentes, nem degradálódott, akkor a gélfotón látnunk kell a 18 S és a 28S riboszomális RNS-ek két élesen elkülönülő sávját, hajtásból nyert minták esetén pedig a plasztiszok riboszomális RNS-einek plusz két sávját is.

Ha a minta tartalmaz genomi DNS-t is, akkor ezt a közvetlenül a zsebek alatt megjelenő sáv formájában látjuk, és ekkor szükséges a DNáz kezelés megismétlése.

### cDNS-PCR

1) Reakcióelegy összeállítása:

|             |                |
|-------------|----------------|
| 2 $\mu$ g   | RNS-templát    |
| 1,3 $\mu$ l | random hexamer |

Kiegészítés 13,8 $\mu$ l végtérfogatra DEPC-kezelt vízzel.

2) A reakcióelegyet 5 percig 70°C-on inkubáljuk, majd 5 percig jégen hűtjük.

3) Az elegyhez hozzámérünk:

|             |                               |
|-------------|-------------------------------|
| 5 $\mu$ l   | reakció puffer (5x RT-puffer) |
| 2,5 $\mu$ l | dNTP mix (10mM)               |
| 0,5 $\mu$ l | RNase inhibitor               |
| 2,7 $\mu$ l | DEPC-kezelt víz               |

4) Az elegyet 5 percig 25°C-on inkubáljuk, majd 0,5 $\mu$ l reverz transzkriptázt adunk minden pozitív mintához. Az enzim bemérése előtt negatív kontrollként 5 $\mu$ l-t kiveszünk a mintából, ehhez nem adunk reverz transzkriptázt. A negatív kontroll beiktatásával a későbbiekben ellenőrizni tudjuk a reakcióelegy és a minták tisztaságát.

5) Az elegyet 1 óráig 42°C-on inkubáljuk, majd 10 percig 25°C-on tartjuk, végül 10 perc 70°C-os inkubálással inaktiváljuk az enzimeket.

## Ellenőrző PCR

Ahhoz, hogy megbizonyosodjunk a cDNS szintézis során kapott termék minőségéről, feltétlenül szükséges egy konzervatív, konstitutívan expresszáldó gén primerpárjával végzett ellenőrző PCR reakció elkészítésére. A kísérlet során mi az UBC18 génre tervezett primerpárt haszáltuk

1) Reakcióelegy összeállítása egy mintához, 20  $\mu$ l végtérfogatban

|              |                                |
|--------------|--------------------------------|
| 0,46 $\mu$ l | steril desztvíz                |
| 2 $\mu$ l    | Taq-puffer ( $Mg^{2+}$ mentes) |
| 2 $\mu$ l    | dNTP mix (2mM)                 |
| 0,75 $\mu$ l | reverz primer (10 $\mu$ M)     |
| 0,75 $\mu$ l | forvard primer (10 $\mu$ M)    |
| 0,04 $\mu$ l | Taq polimeráz (5U/ $\mu$ l)    |
| 12 $\mu$ l   | templát DNS                    |

PCR reakció:

- 3 perc 95°C – Taq-polimeráz aktiválása
  - 30 mp. 95°C – templát DNS meltingje
  - 45 mp. 60°C – primer és templát hibridizálása
  - 1,5 min. 72°C – szintézis
  - 7 perc 72°C – reakció terminálása
- } ciklusszám: 35

A PCR-reakciót elvégezzük a reverz transzkriptázt tartalmazó pozitív mintán, és a hozzá tartozó enzimmentes negatív kontrollon is. Minta helyett steril vizet tartalmazó, un. vizes próbán, valamint egy, korábban már pozitívnak minősült cDNS-en (un. pozitív próbán) is lefuttatjuk a reakciót. Így ellenőrizhetjük, hogy a reakcióelegy tiszta, és a reakcióelegy valamint a használt enzimek működőképesek.

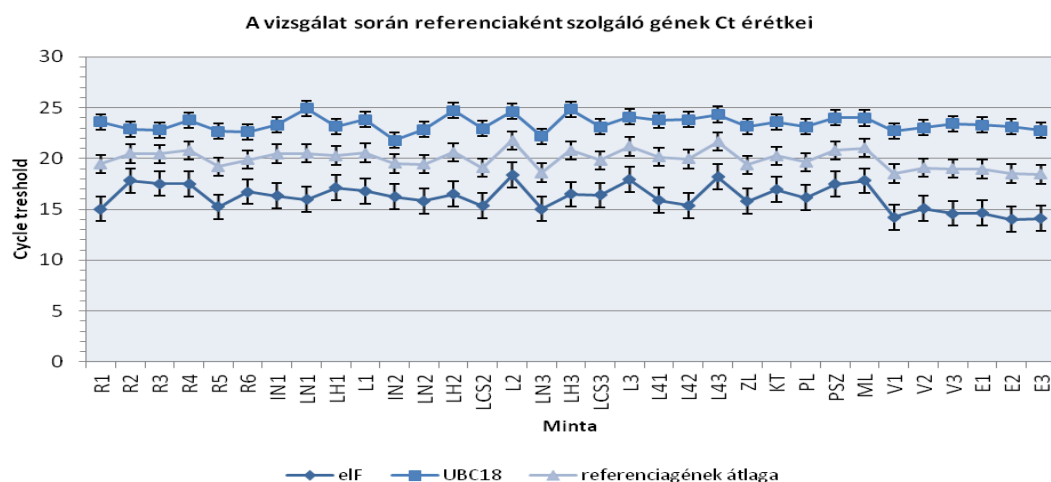
Ellenőrzés: ampikonok futtatása 2% agaróz gélben (15  $\mu$ l reakciótermék + 3 $\mu$  6xloading puffer)

## Függelék

**1. táblázat: az qRT-PCR-hez használt génspecifikus primerek**

| gén szimbóluma                  | génbank azonosító | polaritás | primer szekvenciája            | termékméret |
|---------------------------------|-------------------|-----------|--------------------------------|-------------|
| <i>EF1<math>\alpha</math></i> * | DV482887          | forward   | 5' -CCATCGATATTGCCTTGTGG-3'    | 184 bp      |
|                                 |                   | reverse   | 5' -GTCTGGCCATCCTTGGAGAT-3'    |             |
| <i>UBC18</i> *                  | DV481689          | forward   | 5' -GGAGGCACCTCAGGTCATTT-3'    | 197 bp      |
|                                 |                   | reverse   | 5' -ATAGCGGTCATTGTCTTGCG-3'    |             |
| <i>CYC A2;1</i>                 | Bradi4g06827.2    | forward   | 5' -CGTCTGTGCTCTACGGGAAT-3'    | 114 bp      |
|                                 | LOC100824825      | reverse   | 5' -GTAAACTCAAGCAGCAAATGGTG-3' |             |
| <i>Bd2g53690</i>                | LOC100844657      | forward   | 5' -GACAACAGCCATCAAGCAGT-3'    | 117 bp      |
|                                 |                   | reverse   | 5' -ACCACAAAACGTCAAACAA-3'     |             |
| <i>Bd2g34520</i>                | LOC100835831      | forward   | 5' -CCCTTCAACACGATGACG-3'      | 165 bp      |
|                                 |                   | reverse   | 5' -CACCTCCAGGAGCATCTTG-3'     |             |

A \* jel ellátott primereket Shin-Young Hong és munkatársainak publikációja alapján választottuk ki és szintetizáltattuk meg (Hong és mtsai, 2008)



| Referenciagén          | Ct értékek átlaga | Szórás      |
|------------------------|-------------------|-------------|
| UBC18                  | 23,42709094       | 0,756396427 |
| EF1 $\alpha$           | 16,19797027       | 1,237658901 |
| referenciagének átlaga | 19,94723128       | 0,912003172 |

**1. grafikon:** a referenciagének Ct értékeinek alakulása a különböző mintákban. A grafikonhoz tartozó táblázatban a különböző mintákban mért, az egyes referenciagénekre vonatkozó Ct értékek átlaga és szórása látható.

**2. táblázat: A Bd2g43520 relatív expressziós szintjei**

| Minta rövidítése | Referenciagének Ct értékeinek átlaga | Bd2g43520 Ct értékei | $\Delta Ct$ | $\Delta\Delta Ct$ | $2^{\Delta\Delta Ct}$ |
|------------------|--------------------------------------|----------------------|-------------|-------------------|-----------------------|
| R1               | 19.46718517                          | 22.66234             | 3.195155    | -16.0639          | 68504.68              |
| R2               | 20.49528917                          | 26.03511             | 5.539818    | -13.7193          | 13486.72              |
| R3               | 20.43660883                          | 26.21306             | 5.77645     | -13.4826          | 11446.51              |
| R4               | 20.79017967                          | 26.25684             | 5.466664    | -13.7924          | 14188.22              |
| R5               | 19.20147183                          | 23.34416             | 4.142685    | -15.1164          | 35521.02              |
| R6               | 19.887453                            | 25.24492             | 5.357462    | -13.9016          | 15303.86              |
| IN1              | 20.45396633                          | 30.14834             | 9.694376    | -9.56469          | 757.2859              |
| LN1              | 20.5037795                           | 27.17365             | 6.669869    | -12.5892          | 6162.08               |
| LH1              | 20.27884583                          | 33.82022             | 13.54137    | -5.7177           | 52.62584              |
| L1               | 20.548431                            | 31.42871             | 10.88028    | -8.37879          | 332.8652              |
| IN2              | 19.507973                            | 28.45446             | 8.946489    | -10.3126          | 1271.734              |
| LN2              | 19.43340325                          | 25.8965              | 6.463098    | -12.796           | 7111.667              |
| LH2              | 20.62430958                          | 32.13058             | 11.50627    | -7.7528           | 215.6878              |
| LCS2             | 19.08860725                          | 32.28484             | 13.19623    | -6.06284          | 66.84911              |
| L2               | 21.7710415                           | 31.21283             | 9.441787    | -9.81728          | 902.1874              |
| LN3              | 18.58805133                          | 30.08672             | 11.49867    | -7.7604           | 216.8275              |
| LH3              | 20.78507633                          | 38.10113             | 17.31605    | -1.94302          | 3.84509               |
| LCS3             | 19.8094985                           | 35.37635             | 15.56685    | -3.69222          | 12.92615              |
| L3               | 21.19075483                          | 31.3325              | 10.14175    | -9.11732          | 555.3774              |
| L41              | 20.15170867                          | 31.7449              | 11.59319    | -7.66588          | 203.0763              |
| L42              | 19.95195083                          | 30.44461             | 10.49266    | -8.76641          | 435.4649              |
| L43              | 21.66127933                          | 31.34348             | 9.682205    | -9.57686          | 763.7015              |
| ZL               | 19.372981                            | 35.98463             | 16.61165    | -2.64742          | 6.265448              |
| KT               | 20.26911617                          | 34.50782             | 14.2387     | -5.02037          | 32.45493              |
| PL               | 19.6442925                           | 33.37875             | 13.73445    | -5.52462          | 46.03365              |
| PSZ              | 20.79701683                          | 37.46367             | 16.66666    | -2.59241          | 6.031064              |
| ML               | 21.04339783                          | 35.24794             | 14.20454    | -5.05453          | 33.23269              |
| V1               | 18.5140595                           | 37.1297              | 18.61564    | -0.64343          | 1.562042              |
| V2               | 19.090219                            | 34.73759             | 15.64737    | -3.6117           | 12.22444              |
| V3               | 19.00558058                          | 35.52158             | 16.516      | -2.74307          | 6.694941              |
| E1               | 18.942844                            | 31.81942             | 12.87657    | -6.3825           | 83.43011              |
| E2               | 18.51473817                          | 34.3968              | 15.88206    | -3.37701          | 10.3892               |
| E3               | 18.43752183                          | 37.69659             | 19.25907    | 0                 | 1                     |

**3. táblázat: Bd2g53690 relatív expressziós szintjei**

| Minta<br>rövidítése | Referenciagének Ct<br>értékeinek átlaga | Bd2g53690<br>Ct értékei | $\Delta Ct$ | $\Delta\Delta Ct$ | $2^{\Delta\Delta Ct}$ |
|---------------------|-----------------------------------------|-------------------------|-------------|-------------------|-----------------------|
| R1                  | 19.46718517                             | 28.18956                | 8.722374    | -7.24964          | 152.1803              |
| R2                  | 20.49528917                             | 29.8742                 | 9.378911    | -6.5931           | 96.54309              |
| R3                  | 20.43660883                             | 28.81707                | 8.380458    | -7.59155          | 192.8792              |
| R4                  | 20.79017967                             | 29.30031                | 8.510135    | -7.46188          | 176.2986              |
| R5                  | 19.20147183                             | 27.52609                | 8.324615    | -7.6474           | 200.4915              |
| R6                  | 19.887453                               | 28.86466                | 8.977204    | -6.99481          | 127.5402              |
| IN1                 | 20.45396633                             | 30.93876                | 10.48479    | -5.48722          | 44.85582              |
| LN1                 | 20.5037795                              | 30.57194                | 10.06816    | -5.90385          | 59.87368              |
| LH1                 | 20.27884583                             | 29.72469                | 9.445841    | -6.52617          | 92.16652              |
| L1                  | 20.548431                               | 36.52044                | 15.97201    | 0                 | 1                     |
| IN2                 | 19.507973                               | 27.47193                | 7.963957    | -8.00806          | 257.4334              |
| LN2                 | 19.43340325                             | 28.39817                | 8.964766    | -7.00725          | 128.6445              |
| LH2                 | 20.62430958                             | 30.7129                 | 10.08859    | -5.88342          | 59.03185              |
| LCS2                | 19.08860725                             | 31.07753                | 11.98893    | -3.98309          | 15.81351              |
| L2                  | 21.7710415                              | 35.42794                | 13.6569     | -2.31511          | 4.976433              |
| LN3                 | 18.58805133                             | 28.73263                | 10.14458    | -5.82743          | 56.78479              |
| LH3                 | 20.78507633                             | 30.82943                | 10.04436    | -5.92766          | 60.86985              |
| LCS3                | 19.8094985                              | 32.86916                | 13.05966    | -2.91236          | 7.528464              |
| L3                  | 21.19075483                             | 35.17771                | 13.98696    | -1.98505          | 3.95877               |
| L41                 | 20.15170867                             | 32.5761                 | 12.42439    | -3.54762          | 11.69341              |
| L42                 | 19.95195083                             | 29.47004                | 9.518088    | -6.45392          | 87.6647               |
| L43                 | 21.66127933                             | 30.91558                | 9.254299    | -6.71771          | 105.2527              |
| ZL                  | 19.372981                               | 35.292                  | 15.91902    | -0.05299          | 1.037413              |
| KT                  | 20.26911617                             | 29.26353                | 8.994413    | -6.9776           | 126.0279              |
| PL                  | 19.6442925                              | 30.88398                | 11.23968    | -4.73233          | 26.58109              |
| PSZ                 | 20.79701683                             | 32.75623                | 11.95921    | -4.0128           | 16.14263              |
| ML                  | 21.04339783                             | 27.80152                | 6.758127    | -9.21389          | 593.8214              |
| V1                  | 18.5140595                              | 27.28752                | 8.773461    | -7.19855          | 146.8858              |
| V2                  | 19.090219                               | 30.03228                | 10.94206    | -5.02995          | 32.67133              |
| V3                  | 19.00558058                             | 27.65164                | 8.646058    | -7.32595          | 160.4471              |
| E1                  | 18.942844                               | 26.69005                | 7.747207    | -8.22481          | 299.1665              |
| E2                  | 18.51473817                             | 25.12458                | 6.609843    | -9.36217          | 658.1027              |
| E3                  | 18.43752183                             | 27.46408                | 9.026561    | -6.94545          | 123.2506              |

**4. táblázat: A cycA2 (Bd4g06827) relatív expressziós szintjei**

| Minta rövidítése | Referenciagének Ct értékeinek átlaga | cycA2 Ct értékei | $\Delta Ct$ | $\Delta\Delta Ct$ | $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ |
|------------------|--------------------------------------|------------------|-------------|-------------------|--------------------------|
| R1               | 19.46718517                          | 29.60925         | 10.14207    | -1.3161           | 2.4899242                |
| R2               | 20.49528917                          | 31.49617         | 11.00088    | -0.45729          | 1.3729564                |
| R3               | 20.43660883                          | 30.78449         | 10.34788    | -1.11029          | 2.1588946                |
| R4               | 20.79017967                          | 31.36603         | 10.57585    | -0.88232          | 1.8433333                |
| R5               | 19.20147183                          | 28.73855         | 9.537077    | -1.92109          | 3.7870973                |
| R6               | 19.887453                            | 31.34562         | 11.45817    | 0                 | 1                        |
| IN1              | 20.45396633                          | 30.41145         | 9.957486    | -1.50068          | 2.8297671                |
| LN1              | 20.5037795                           | 29.74857         | 9.244795    | -2.21338          | 4.6375896                |
| LH1              | 20.27884583                          | 30.56415         | 10.2853     | -1.17287          | 2.2545927                |
| L1               | 20.548431                            | 31.09872         | 10.55029    | -0.90788          | 1.8762826                |
| IN2              | 19.507973                            | 30.56584         | 11.05786    | -0.40031          | 1.3197870                |
| LN2              | 19.43340325                          | 29.85371         | 10.42031    | -1.03786          | 2.0531839                |
| LH2              | 20.62430958                          | 29.77589         | 9.151578    | -2.30659          | 4.9471280                |
| LCS2             | 19.08860725                          | 27.23164         | 8.143037    | -3.31513          | 9.9530101                |
| L2               | 21.7710415                           | 28.81176         | 7.040715    | -4.41745          | 21.369103                |
| LN3              | 18.58805133                          | 27.80045         | 9.212401    | -2.24577          | 4.7428985                |
| LH3              | 20.78507633                          | 28.67238         | 7.887301    | -3.57087          | 11.883344                |
| LCS3             | 19.8094985                           | 28.79277         | 8.983271    | -2.4749           | 5.5592843                |
| L3               | 21.19075483                          | 29.7106          | 8.519841    | -2.93833          | 7.6652269                |
| L41              | 20.15170867                          | 28.5252          | 8.373488    | -3.08468          | 8.4836297                |
| L42              | 19.95195083                          | 28.70141         | 8.749464    | -2.70871          | 6.5373495                |
| L43              | 21.66127933                          | 30.73709         | 9.075807    | -2.38236          | 5.2138985                |
| ZL               | 19.372981                            | 30.71204         | 11.33906    | -0.11911          | 1.0860636                |
| KT               | 20.26911617                          | 29.56827         | 9.29915     | -2.15902          | 4.4661132                |
| PL               | 19.6442925                           | 27.1709          | 7.526612    | -3.93156          | 15.258675                |
| PSZ              | 20.79701683                          | 28.84887         | 8.051851    | -3.40632          | 10.602398                |
| ML               | 21.04339783                          | 31.03769         | 9.994287    | -1.46388          | 2.7584971                |
| V1               | 18.5140595                           | 27.48762         | 8.973562    | -2.48461          | 5.5968231                |
| V2               | 19.090219                            | 27.7837          | 8.693477    | -2.76469          | 6.7960320                |
| V3               | 19.00558058                          | 28.2848          | 9.279215    | -2.17895          | 4.5282520                |
| E1               | 18.942844                            | 29.12607         | 10.18323    | -1.27494          | 2.4198920                |
| E2               | 18.51473817                          | 27.96283         | 9.44809     | -2.01008          | 4.0280436                |
| E3               | 18.43752183                          | 27.60737         | 9.169852    | -2.28832          | 4.8848609                |

### **Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez**

Alulírott *Gombos Magdolna*, a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Biológus MSc. szakjának nappali tagozatos hallgatója, kijelentem, hogy a dolgozatomban foglaltak saját munkám eredményei, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, módszerek, eszközök stb.) használtam fel.

Kijelentem, hogy a kísérletes munka során részt vettem a növények nevelésében, a mintavételben, RNS izolálásban, cDNS szintézisben, primerek tervezésében valamint a valós idejű polimeráz láncreakció összálaítsában, a kapott eredmények analízisében, a vizsgált gének rokonsági kapcsolatainak vizsgálatában.

-----  
aláírás

2012. április 16.