

# *In vitro* gyökér alapú regenerációs rendszer Arabidopsis-ban

Doktori (Ph. D.) értekezés tézisei

**Bernula Dóra**

Témavezetők:

Prof. Dr. Fehér Attila  
tanszékvezető egyetemi tanár

Pichererné Dr. Gémes Katalin  
egyetemi adjunktus

Szegedi Biológiai Kutatóközpont  
Növénybiológiai Intézet

Szegedi Tudományegyetem  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Biológia Doktori Iskola



UNIVERSITAS SCIENTIARUM SZEGEDIENSIS



UNIVERSITY OF SZEGED

**Szeged  
2020**

# Bevezető

Az elmúlt évtizedekben számos *in vitro* regenerációs rendszert dolgoztak ki a növények vegetatív szaporítására. Ezek egy része a szomatikus embriogenezist (SE), míg más részük a *de novo* organogenezist veszi alapul. Mindkét folyamat történhet direkt vagy indirekt módon. Ha a regeneráció indirekt módon történik, akkor kallusz kialakulásán keresztül, míg ha direkt módon, kallusz kialakulása nélkül, egy vagy néhány sejtől indul el a folyamat.

A regeneráció sikerességét több tényező is befolyásolja, úgymint a megfelelő explantum megléte, a környezeti körülmények, valamint a táptalaj megfelelő összetétele. A stressz és a növényi hormonok, elsősorban az auxin és a citokinin fontosságát a növényi regenerációs folyamatokban több tanulmányban leírták. Az auxin elsősorban a gyökér regenerációját, a citokinin a hajtás regenerációját serkenti, kiegyenlített együttes hatásuk folyamatosan osztódó kallusztenyészetet eredményez.

A szomatikus embriogenezis elindításában a hormonok közül a legjelentősebb az auxinok szerepe. A citokininek hatása a folyamatra változó. A legtöbb kísérleti rendszerben az alacsony citokinin koncentráció kedvez a SE-nek, míg más esetekben a külső citokinin kezelés gátolja azt.

Az elmúlt években számos olyan transzkripciós faktort sikerült azonosítani, melyek részt vesznek az embrióképződés folyamatában. A LEAFY COTYLEDON 1 (LEC1), a LEAFY COTYLEDON 2 (LEC2) és a FUSCA 3 (FUS3) transzkripciós faktorok egymással kölcsönhatásban szabályozzák a mag érése mellett az embrió identitását és az esetek egy részében a SE folyamatát is.

A regenerációs folyamatok sebzés hatására is indukálódhatnak. A sebzés során az egyik elsőként aktiválódó transzkripciós faktor a WOUND-INDUCED DEDIFFERENTIATION 1 (WIND1). A sebzésről és a sebzés által indukált WIND1-ről kimutatták, hogy központi szerepük van a gyökér explantumok megnövekedett regenerációs potenciáljában.

A növényi regenerációs folyamatok megértéséhez nagymértékben hozzájárultak és hozzájárulhatnak azok a kutatások, melyeket a modell növény *Arabidopsis thaliana* (lúdfű) segítségével végeznek, mivel e növény kapcsán nagy mennyiségben állnak rendelkezésre különféle mutáns és transzgénikus vonalak, markerek, génkonstrukciók, ellenanyagok és specifikus információk. Azonban ezek kihasználására a SE kutatásában eddig korlátozott volt a lehetőség, mert nem állt rendelkezésre egy olyan hatékony és rutinszerűen használható sejt- és szövettenyésztési kísérleti rendszer, ami ezt lehetővé tette volna. Bár az *Arabidopsis* érett/éretlen zigotikus embriók tenyésztésén alapuló SE tanulmányozása jelentős betekintést nyújtott ebbe a folyamatba, a

megállapítások általánosítása céljából más explantumok használata (lehetőleg azok, amelyek a zigotikus embrióknál differenciáltabb szövetet tartalmaznak) hasznos lenne. A múlt század 90-es éveinek elején *Arabidopsis* gyökértenyészeteken végzett munkák eredményeként SE útján történő regenerációról vagy legalábbis szomatikus embriószerű struktúrák megjelenéséről számoltak be.

## Célkitűzések

Annak ellenére, hogy a SE-t széles körben alkalmazzák *in vitro* növényi szaporításhoz, ennek a növény-specifikus tulajdonságnak a biológiai háttere nem teljes mértékben ismert. Az *Arabidopsis* kedvező tulajdonságainak kihasználására a SE vizsgálatában ez ideáig korlátozott volt a lehetőség, mivel nem állt rendelkezésre egy olyan hatékony sejt- illetve szövettenyésztési kísérleti rendszer, ami ezt lehetővé tette volna. Mindezek tükrében munkánk során célunk volt egy olyan hatékony *in vitro* gyökér alapú regenerációs kísérleti rendszer kidolgozása, mely a jelenleg elterjedt zigotikus embriók tenyésztésén alapuló rendszernél egyszerűbb, a zigotikus embrióknál differenciáltabb explantumot használ és megfelelő minőségű, mennyiségű kísérleti anyagot szolgáltat.

Mindezek végett munkánk során célul tűztük ki, hogy:

- létrehozunk egy hatékony, gyökér alapú *in vitro* regenerációs kísérleti rendszert, mely lehetővé teszi *Arabidopsis thaliana* modellnövényen az organogenezis és a SE indukcióját, valamint a két folyamat összehasonlítását.
- Ennek eléréséhez pedig célul tűztük ki, hogy:
  - adaptáljuk a Márton és Browse (1991) által leírt regenerációs protokollt;
  - jellemezzük a Columbia (Col) ökotípust a SE/organogenezis kompetencia és hatékonyság szempontjából;
  - nyomon követjük a sejt- (mikroszkópia) és molekula (RT-QPCR) szintű változásokat térben és időben a regenerációs folyamatok indukciós szakaszában.

Ezen túl meg kívántuk vizsgálni, hogy:

- mi okozhatja az eltérést a teljes csíranövények gyökere, illetve a csíranövényekből származó gyökér explantumok regenerációs képessége között.

# Anyagok és módszerek

## *Arabidopsis thaliana* nevelési körülményei

Kísérleteinkhez *Arabidopsis thaliana* (L.) vad típusú (Heynh Columbia ökotípus, Col) és heterozigóta *leafy cotyledon 1 (lec1)* egyszeres mutáns (AT1G21970) vonalakat használtunk. A növények magjait a Nottingham Arabidopsis Stock Centre bocsátotta rendelkezésünkre.

A Col magokat első lépésben sterilizáltuk, amihez 70%-os etanolt, majd 4%-os hígított nátrium-hipoklorit oldatot (4.5% aktív klorin tartalmú Domestos) használtunk. Ezután steril vízzel mostuk a magokat öt alkalommal 1-1 percre. A sterilizált magok csíráztatása 120×120×17 mm méretű, négyzet alakú műanyag Petri-csészékben történt, 1% szacharózt, 1% plant agar tartalmazó B5 táptalajon (Gamborg B5 Medium Including Vitamins) (pH=5.7) steril körülmények között. 90 magot helyeztünk minden csíráztató lemezre. 21 °C hőmérsékletű növénynevelő szobában, folyamatos megvilágítás mellett a lemezeket horizontálisan tartottuk 1 napig, majd függőleges helyzetben további 6 napig. A fényintenzitás 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  volt.

A *lec1* homozigóta mutáns növények előállításához steril körülmények között becőkből éretlen embriókat preparáltunk, melyeket később 1% szacharózt, 0.5% plant agar és felezett koncentrációjú, B5 vitaminokat tartalmazó Murashige & Skoog ( $\frac{1}{2}$ MS) táptalajon (Murashige & Skoog Medium Including B5 Vitamins) (pH=5.8) csíráztattuk. Szelekciót követően a *lec1* fenotípust mutató csíranövényeket a vad típusnál alkalmazott körülményekkel megegyezően neveltük.

## *In vitro* gyökér alapú regenerációs rendszer

A kísérletek során az egy hetes csíranövényeket 24 órán át szilárd 2 ml/l vitamix (555 mM mio-inozitol, 14.8 mM tiamin-HCl, 2.4 mM piridoxin-HCl, 4.1 mM nikotinsav, 13.3 mM glicin, 0.2 mM biotin), 3% szacharóz, 0.8% plant agar, 2.7  $\mu\text{M}$  naftilecetsav (NES) tartalmú, B5 vitaminok nélküli MS táptalajon (Murashige & Skoog Medium Basal Salt Mixture) (pH=5.8) tartottuk négyzet alakú műanyag Petri-csészékben, függőleges helyzetben. A túlzott gyökérszőr növekedés elkerülése érdekében az indukciót 24 óra elteltével leállítottuk és a csíranövényeket hormonmentes (HM) táptalajra [MS Basal Salt Mixture, 2 ml/l vitamix, 3% szacharóz, 0.8% plant agar) (pH=5.8)] helyeztük 3 napra. A regenerációs folyamatok indukciójához a növények egy részénél a hajtást eltávolítottuk az epikotil-hipokotil találkozási pontjánál, majd a gyökér explantumokat (16

db/lemez) - illetve a későbbiekben kontrollként használt vágatlan teljes csíranövényeket (16 db/lemez) - először magas auxin tartalmú ARM I (Arabidopsis regeneration media I; Márton és Browse, 1991) [MS Basal Salt Mixture, 2 ml/l vitamix, 3% szacharóz, 0.8% plant agar, 17.1  $\mu$ M indol-3-ecetsav, 0.7  $\mu$ M 2,4-diklórfenoxi-ecetsav, 2.7  $\mu$ M 6-benziladenin, 1.5  $\mu$ M N<sup>6</sup>-(2-izopentenil)-adenin (2iP) (pH=5.8)], majd 3 nap elteltével magas citokinin tartalmú ARM IIr táptalajra (Arabidopsis regeneration media IIr; Márton és Browse, 1991) [MS Basal Salt Mixture, 2 ml/l vitamix, 3% szacharóz, 0.8% plant agar, 1.1  $\mu$ M NES, 19.7  $\mu$ M 2iP (pH=5.8)] helyeztük. 4 nap citokinin indukció után a teljes növények és a vágott gyökerek egy részét (8-8 db) HM lemezekre [MS Basal Salt Mixture, 2 ml/l vitamix, 3% szacharóz, 0.8% plant agar (pH=5.8)] tettük át.

Teljes csíranövények esetén a hajtásból származó auxin transzportot 5  $\mu$ M koncentrációjú 2,3,5-trijód-benzoésav (TIBA) segítségével gátoltuk. A TIBA-t alacsony olvadáspontú agaróz cseppben a hajtás és a gyökér találkozási pontjára helyeztük az auxin indukcióval egyidőben.

Mintákat vettünk az ARM IIr táptalajon 1-4 napja levő gyökér explantumokból, 5 napja HM táptalajon és 9 napja ARM IIr táptalajon levő citokinin indukált TIBA kezelt, illetve kezeletlen teljes csíranövények gyökeréből, valamint a vágott gyökerekből. Kontrollnak a HM táptalajon 5 napja levő, kezeletlen teljes csíranövények gyökerét, abszolút kontrollnak a csíráztató táptalajon levő, egy hetes csíranövények gyökerét tekintettük. A kísérleteket 3 biológiai ismétlésben végeztük el, legalább 3 párhuzamossal.

## **Alkalmazott módszerek**

- Sztereomikroszkóp használata
- Pásztázó elektronmikroszkóp használata
- RNS tisztítás, cDNS szintézis
- Valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-QPCR)

# Eredmények

## I. Kísérleti előzmények

Arabidopsis gyökér alapú szövettényeszetekkel végzett munkák során korábban már megfigyelték a SE indukcióját, vagy legalábbis embriószerű struktúrák megjelenését. Márton és Browse (1991) rendszerében az előzetesen folyadékkultúrában tenyésztett Col gyökerek felületén auxin indukciót (ARM I táptalaj) követően magas citokinin tartalmú (ARM IIr) táptalajon a gyökerek felületén embriószerű struktúrák képződtek. A rendszer adaptálása során azonban ettől eltérő reakciót tapasztaltunk: az auxin indukciót követően ARMIIr táptalajra helyezett gyökereken embrióképződés helyett kezdetben intenzív gyökérfejlődés, majd zöld kallusz megjelenése volt megfigyelhető. További 1 hét elteltével az explantumok felületén regenerátumok jelentek meg, melyek trichómával rendelkeztek. Miután az organogenezis, illetve a SE morfológiai markereként gyakran használatos az első levélszerű struktúrákon a trichómák meglétének (valódi levél, hajtás organogenezis), illetve hiányának (kotiledon, SE) vizsgálata, feltételeztük, hogy a képződött regenerátumok indirekt hajtás organogenezisből származtak. Kezdetben folyadékkultúrát használtunk a gyökértényeszetek létrehozására, azonban miután folyadékkultúrában a gyökerek kora eltérő és ez a rendszer hatékonyságát, kiszámíthatóságát is negatív módon befolyásolta, továbbá mivel ezekben a kultúrákban fokozottan fennáll a különböző fertőzések kialakulásának esélye, a továbbiakban szilárd táptalajok használatára tértünk át.

## II. A citokinin megfelelő időben történő eltávolítása két regenerációs útvonal megjelenését indukálja

### Sztereomikroszkóppal végzett morfológiai vizsgálatok

Miután egyes esetekben az exogén auxint a tápközegből el kell távolítani ahhoz, hogy a SE meginduljon, megnéztük, hogy mi történik akkor, ha az auxin, majd citokinin indukciót követően a gyökér explantumokat HM tápközegre helyezük. Azt is megvizsgáltuk, hogy van-e szerepe az időzítésnek, azaz annak, hogy mikor történik meg az explantumok átrakása citokinin tartalmú ARM IIr táptalajról HM táptalajra. Vizsgálataink alapján a leghatékonyabbnak a 4 napos citokinin

indukció bizonyult. A 4 napos citokinin indukció után HM lemezen a kalluszképződés korlátozódott és a gyökerek felületén zöld, globuláris struktúrák jelentek meg. További 6 nap elteltével ezek némelyike szomatikus embriószerű struktúrává fejlődött. További 2 hét elteltével a gyökér explantumok felületén regenerátumok alakultak ki. A regenerálódott növények közel fele feltételezhetően embriogén eredetű volt, amit jelzett a trichómák hiánya a sziklevelek felszínén. Ugyanebben a rendszerben, ha a gyökér explantumokat folyamatosan magas citokinin tartalmú ARM IIr táptalajon tartottuk, kezdetben intenzív kalluszképződés volt megfigyelhető. További 2 hét elteltével trichómákkal rendelkező hajtások jelentek meg az explantumok felszínén, utalva azok hajtás organogenezis eredetére.

## Génkifejeződési vizsgálatok

Annak bizonyítására, hogy az előzetesen auxin és citokinin indukált, HM lemezen levő gyökér explantumok felületén képződő trichóma nélküli regenerátumok SE eredményeképpen jöttek létre, megnéztük, hogyan változik az embriogenezis marker gének közül a *LEC1*, a *LEC2* és a *FUS3* relatív expressziós szintje. Azt tapasztaltuk, hogy a kontrollhoz képest mindhárom vizsgált gén expressziója megemelkedett. Azonban, ha a gyökér explantumokat folyamatosan magas citokinin tartalmú táptalajon tartottuk, a vizsgált embriogén gének közül egyiknek sem növekedett az expressziós szintje, mely arra utal, hogy ebben az esetben nem SE, hanem hajtás organogenezis történt. Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a citokinin indukció első 4 napjában hogyan változik az organogenezisben részt vevő gének közül a *CUP-SHAPED COTYLEDON 1 (CUC1)*, *CUP-SHAPED COTYLEDON 2 (CUC2)*, *ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 1 (ESR1)*, *ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 2 (ESR2)*, illetve az embriogenezisben részt vevő *LEC1*, *LEC2* és *FUS3* expressziós szintje. Azt tapasztaltuk, hogy míg a hajtás organogenezisben szerepet játszó gének expressziós szintje emelkedett, addig az embriogenezisben szerepet játszó gének csökkent expressziós szintet mutattak.

## *lec1* mutáns vizsgálata

Kíváncsiak voltunk arra is, hogy mi történik abban az esetben, ha *lec1* mutáns csíranövény gyökereit tenyésztjük a fent bemutatott kísérleti rendszerben. *Lec1* gyökér explantumokat folyamatosan citokinin tartalmú táptalajon tartva a vad típushoz hasonló választ kaptunk, azaz zöldülést, kalluszképződést, vastagodást, majd később organogenezis eredetű hajtások megjelenését. Amennyiben a citokinin indukciót követő 4. napon HM táptalajra helyeztük a *lec1*

gyökér explantumokat, a kallusz képződése korlátozódott és a potenciálisan morfogén lókuszek száma a vad típushoz képest közel 50%-kal kevesebb volt. Mindemellett *lec1* gyökerekből csupán trichómával rendelkező regenerátumok képződtek HM táptalajon.

### **III. A hajtáseredetű auxin hatása a gyökér regenerációs folyamataira**

#### **Sztereomikroszkóppal végzett morfológiai vizsgálatok**

Érdekes módon, ha kísérleti rendszerünkben teljes csíranövényeket használtunk gyökér explantumok helyett, elmaradt a regenerátum-képződés. Ha a teljes növényeket folyamatosan magas citokinin tartalmú táptalajon (ARM IIr) tartottuk, azok gyökerei megvastagodtak, zöldültek, de sem kalluszképződést, sem hajtásképződést nem tapasztaltunk. Ha ezeket a növényeket HM táptalajra helyeztük a citokinin kezelést követő 4. napon, a vastagodás és a zöldülés is elmaradt. Megfigyeléseink alapján feltételeztük, hogy a a hajtásból a gyökérbe transzportálódó auxinnak hatása lehet az embrióképződés, illetve a hajtás organogenezis indukciójára. A hajtáseredetű auxin regenerációs potenciálra gyakorolt lehetséges hatásának vizsgálatára auxin transzport inhibitor, TIBA-t használtunk. A gátlószert alacsony olvadáspontú agaróz cseppben, 5  $\mu$ M koncentrációban helyeztük az epikotil-hipokotil találkozási pontjára. TIBA kezelés hatására helyreállt a regenerációs potenciál. A gyökér explantumokhoz hasonlóan a TIBA kezelt csíranövények gyökerei csupán trichómával rendelkező hajtásokat regeneráltak magas citokinin tartalmú ARM IIr lemezekon. Amennyiben a TIBA kezelt növényeket az átmeneti 4 napos citokinin indukciót követően HM lemezekon tenyésztettük, a gyökerek felszínén kifejlődött regenerátumok megközelítőleg 50%-a trichóma nélküli volt.

#### **Génkifejeződési vizsgálatok**

Ezután megnéztük, hogy TIBA kezelés hatására hogyan alakul az embriógenézisben részt vevő gének közül a *LEC1*, a *LEC2* és a *FUS3* expressziós szintje a gyökér explantumokhoz képest. Ezen marker gének expressziós szintje a vágott gyökér explantumokhoz hasonló mértékben megemelkedett, igazolva, hogy a hajtáseredetű auxin gyökérbe irányuló transzportjának gátlása elegendő a csíranövény gyökerében a regenerációs képesség kialakítására és hogy a keletkezett regenerátumok egy része SE eredményeképpen jött létre. Ez utóbbit az is jelezte, hogy a



regenerátumok közel 50%-ának az első levelei nem rendelkeztek trichómákkal. A sebzésről és a sebzés által indukált WIND1 transzkripció faktoráról kimutatták, hogy központi szerepük van a gyökér explantumok (vágott gyökerek) regenerációs potenciáljában. Az intakt csíranövények vágatlan gyökerei, ahogy azt a fentebbiekben mi is bemutattuk, nem regenerálnak hajtást auxin és citokinin indukciót követően. A WIND1 TF túltermelése a csíranövények gyökerében is lehetővé teszi a regenerációs folyamatok elindulását, hasonlóan a vágott gyökerekhez. Ezért megvizsgáltuk, miként változik a *WIND1* expressziós szintje TIBA kezelés nélküli teljes növények gyökereiben, gyökér explantumokban, illetve TIBA kezelt teljes növények gyökereiben. A sebzéshez hasonlóan (gyökér explantumok), a TIBA kezelés által gátolt auxin transzportnak köszönhetően is magasabb *WIND1* expressziós szintet figyeltünk meg teljes növények gyökerében - a TIBA kezelés eredményeként megnövekedett regenerációs potenciálnak megfelelően. Megfigyeléseink arra engednek következtetni, hogy mind a hajtás, mint auxin forrás eltávolítása, mind a hajtás-gyökér irányú auxin transzport TIBA általi blokkolása megnövekedett *WIND1* expressziót és fokozott kallusz/hajtás/embrióképződést eredményez megfelelő induktív körülmények mellett a gyökérben.

### ***lec1* mutáns vizsgálata**

A TIBA kezelt *lec1* csíranövények gyökerei citokinin indukciós ARM IIr lemezekon, valamint az átmeneti 4 napos citokinin indukciót követően HM lemezekon is csupán trichómával rendelkező növényeket regeneráltak, TIBA kezelés nélkül pedig a vad típushoz hasonlóan elmaradt a regeneráció. A *lec1* mutánssal kapott eredmények megerősítették, hogy a hajtás eltávolítása ("sebzés") és a lokális TIBA kezelés, vagyis a hajtás-gyökér auxin transzport megakadályozása hasonló módon javítja a gyökér regenerációs képességét, függetlenül attól, hogy a regeneráció SE-t vagy hajtás organogenezist jelent.

# Összefoglalás

Munkánk során célunk volt egy olyan *in vitro* gyökér alapú regenerációs kísérleti rendszer kidolgozása, mely lehetővé teszi az organogenezis és a SE kezdeti lépéseinek tanulmányozását és összehasonlítását *Arabidopsis thaliana* növényen. Ebben a rendszerben a regenerációs folyamatok vizsgálatához teljes csíranövényt, illetve gyökér explantumokat használtunk, melyeket szilárd táptalajon tenyésztettünk. Az oldalgyökér képződést auxinnal, a hajtásmerisztéma képződést pedig citokininnel indukáltuk. Ha auxin indukciót követően a gyökér explantumokat magas citokinin tartalmú táptalajon tartottuk, hajtás organogenezis történt. Ha azonban az auxin, majd citokinin indukciót követően egy megfelelő idő intervallumban (4 nap) a gyökereket HM tápközegre helyeztük, a gyökerek felületén közel 50-50%-ban embriogén, illetve organogén eredetű regenerátumok is megjelentek. A SE folyamatát a trichómák meglétének hiánya az első leveleken (SE morfológiai markere), illetve az embriogenezisben részt vevő gének (*LEC1*, *LEC2*, *FUS3*) megnövekedett expressziója támasztotta alá. A SE további bizonyítékeként említendő, hogy a SE-ben gátolt *lec1* homozigóta mutáns gyökér explantumokat a vad típusú növényekhez hasonlóan kezelve/tenyésztve csupán hajtás organogenezist figyeltünk meg.

Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a külsőleg alkalmazott citokinin megfelelő időben történő eltávolítása egyfajta átkapcsolást indukál a hajtás organogenezis és a SE útvonalak között. Hipotézisünk, hogy kezdetben hajtásregeneráció indukálódik, majd a citokinin eltávolítását követően a hajtás primordium embriószerű struktúrává transzdzifferenciálódik, ám mivel a primordiumok fejlődése nem szinkronizált, nem mindegyik esetben tud lezajlani az átalakulás.

Érdekes módon, ha gyökér explantumok helyett a teljes növényeket folyamatosan magas citokinin tartalmú táptalajon (ARM IIr) tartottuk, azok gyökerei megvastagodtak, zöldültek, de esetükben sem kalluszképződést, sem hajtásképződést nem tapasztaltunk. Átmeneti citokinin indukció után HM táptalajra helyezve a növényeket még vastagodás, kalluszosodás sem történt. Mivel a teljes csíranövények gyökerével szemben a gyökér explantumok nagyfokú regenerációs képességet mutattak, figyelmünk a sebzés, valamint a hajtásból gyökérbe irányuló auxin transzport regenerációs folyamatokra gyakorolt hatásának vizsgálatára terelődött. Az epikotil-hipokotil találkozási pontjára cseppentett auxin transzport inhibitor (TIBA, 5  $\mu$ M) tartalmú agaróz csepp segítségével HM lemezekten tenyésztett teljes növények gyökerén is indukálható volt a regeneráció, a vágott gyökerekhez hasonlóan a regenerátumok közel fele embriogén eredetű volt.

Az intakt növények gyökerével ellentétben, gyökér explantumokban a sebzés és a sebzés által indukált WIND1 transzkripciós faktor központi szerepet játszik a regenerációs potenciál

megnövekedésében. Kísérleti rendszerünkben mind a hajtás - mint auxin forrás - eltávolítása, mind a hajtás-gyökér irányú auxin transzport TIBA kezelés általi blokkolása a teljes növények gyökerében megnövekedett *WIND1* expressziót és fokozott kallusz/hajtás/embrióképződést eredményezett megfelelő induktív körülmények alatt. Az endogén, hajtás-gyökér irányú auxin transzport gátlása tehát imitálja a sebzés hatását (hajtás eltávolítása) a gyökerekből történő növényregenerálás során. A hajtásból származó auxin pedig valamilyen módon csökkenti az intakt növények gyökerének regenerációs képességét, illetve citokinin válaszát.

## Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Prof. Dr. Fehér Attilának és Pichererné Dr. Gémes Katalinnak, továbbá szeretném megköszönni mindenkinek, aki bármilyen formában segített a doktori értekezésem elkészítésében. A munkám elvégzését biztosító pályázatok az alábbiak voltak: **NKFI-6 K 108802, GINOP-2.3.2-15-2016-00001.**

## Idézett közlemény

Márton, L., Browse, J. (1991). Facile transformation of Arabidopsis. *Plant Cell Rep*, 10(5):235-239.

## Saját közlemények

**MTMT azonosító: 10051208**

### **A dolgozat alapjául szolgáló tudományos folyóiratcikk:**

**Bernula, D.**, Benkő, P., Kaszler, N., Domonkos, I., Valkai, I., Szöllősi, R., Ferenc, G., Ayaydin, F., Fehér, A., Gémes, K. (2020). Timely removal of exogenous cytokinin and the prevention of auxin transport from the shoot to the root affect the regeneration potential of Arabidopsis roots. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 140(2):327-339. doi: 10.1007/s11240-019-01730-3. IF(2018): 2.200

### **Egyéb tudományos folyóiratcikk:**

Barna, B., Gémes, K., Domoki, M., **Bernula, D.**, Ferenc, G., Bálint, B., Nagy, I., Fehér, A. (2018). Arabidopsis NAP-related proteins (NRPs) contribute to the coordination of plant growth, developmental rate, and age-related pathogen resistance under short days. *Plant Sci*, 267:124-134. doi:10.1016/j.plantsci.2017.11.006. PMID: 29362091 IF(2018): 3.785

Ördög, A., **Bernula, D.**, Wodala, B. (2014). The effect of xanthan gum as an elicitor on guard cell function and photosynthesis in *Vicia faba*. *Acta Biologica Szegediensis*, 58(1):21-26.

### **Könyvrészlet:**

Fehér, A., **Bernula, D.**, Gémes, K. (2016). The Many Ways of Somatic Embryo Initiation. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N (szerk.) *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*. Dordrecht, Hollandia: Springer, (2016) pp: 23-37. (ISBN: 978-3-319-33704-3)

### **Poszterek:**

Borák, N., Ördög, A., **Bernula, D.**, Wodala, B. (2014). Photosynthetic activity of poplar lines under copper stress. 11th Congress of the Hungarian Society of Plant Biology, 27-29 August, 2014, Szeged, Biological Research Centre. BOOK OF ABSTRACTS, pp: 68.

**Bernula, D.**, Fehér, A., Gémes, K. (2016). *In Vitro* Somatic Embryogenesis on Arabidopsis Root Explants. VISCEA International Conference – „Plant Cells *in Vitro*: Theory and Practice”, 8-9 February, 2016, Vienna. Programme and Abstracts, pp: 36.

**Bernula, D.**, Fehér, A., Gémes, K. (2016). *In Vitro* Somatic Embryogenesis on Arabidopsis Root Explants. Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája „FIBOK 2016”. 2016. március 21-22., Gödöllő, Szent István Egyetem. Program és összefoglalók, pp: 84.

**Bernula, D.**, Gémes, K., Benkő, P., Domonkos, I., Ferenc, G., Ayaydin, F., Fehér, A. (2017). Az auxin gátolja a szomatikus embriogenezis folyamatát indukált Arabidopsis gyökéren. A Magyar Növénybiológiai Társaság XII. Kongresszusa, 2017. augusztus 30.-szeptember 1., Szeged, Szegedi Biológiai Kutatóközpont. PROGRAM - ÖSSZEFOGLALÓK, pp: 42. (ISBN: 978-963-12-9736-2)

**Bernula, D.**, Gémes, K., Benkő, P., Domonkos, I., Ferenc, G., Ayaydin, F., Fehér, A. (2017). How to induce somatic embryogenesis in Arabidopsis roots? STRAUB-DAYS, 24-25 May, 2017, Szeged, Biological Research Centre.

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

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

Kaszler, N., **Bernula, D.**, Szepesi, Á., Fehér, A., Gémes, K. (2018). Role of polyamines during plant regeneration of *Arabidopsis thaliana*. STRAUB-DAYS, 10-11 May, 2018, Szeged, Biological Research Centre.

Kaszler, N., **Bernula, D.**, Szepesi, Á., Fehér, A., Gémes, K. (2018). *In vitro* plant regeneration from *Arabidopsis* root explants. II. The effect of polyamines. 3rd National Conference of Young Biotechnologists, 28-29 March, 2018, Budapest, Eötvös Loránd University, Faculty of Science. Book of Abstracts, pp: 121.

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

Kaszler, N., **Bernula, D.**, Szepesi, Á., Fehér, A., Gémes, K. (2019). Polyamines affected regeneration processes in *Arabidopsis*. VISCEA International Conference – „Plant Cells & Tissues *in Vitro*”, 1-2 July, 2019, Vienna. Programme and Abstracts, pp: 26.

### **Egyéb közlemények:**

Wodala, B., Borák, N., **Bernula, D.**, Ördög, A. (2013). Impact of PEG-induced osmotic stress on the photosynthesis of three Poplar lines studied by gas-exchange, chlorophyll fluorescence and P700 absorbance. HUSRB/1002/214/036”OXIT”, Characterization and oxidative stress tolerance in plants: from models to trees, BOOK OF FINAL REPORT, pp: 24-37.

Wodala, B., Borák, N., **Bernula, D.**, Ördög, A. (2013). Impact of zinc and copper stress on the photosynthesis of three Poplar lines studied by gas-exchange, chlorophyll fluorescence and P700 absorbance. HUSRB/1002/214/036”OXIT”, Characterization and oxidative stress tolerance in plants: from models to trees, BOOK OF FINAL REPORT, pp: 38-49.