

Az Arabidopsis CRK5 protein kináz szerepe a gyökérgravitropizmus szabályozásában

Ph.D. Tézisek

Szerző: Rigó Gábor

Témavezetők: Dr. Cséplő Ágnes és Dr. Szabados László

Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Növénybiológiai Intézet Arabidopsis Molekuláris Genetikai Csoport

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia Doktori Iskola

Szeged

2013

BEVEZETÉS

A Föld nehézségi erejét érzékelve a növények hajtásuk és gyökereik ellentétes irányú növekedését a gravitáció irányával párhuzamosan állítják be. A hajtások pozitív és a gyökerek negatív gravitopikus válaszait a növényi auxin hormon aszimmetrikus eloszlása szabályozza. Az auxin sejtek közötti aktív transzportját az AUX/LAX import ill. PINFORMED (PIN) export hordozók irányítják. A gravitációs szignált a keményítőtartamú gyökér kolumella és hajtás endodermisz sejtek érzékelik. A keményítőszintézist, a keményítő tartalmú kloroplasztiszok ill. amiloplasztiszok biogenezisét, és szedimentációjuk során aktin filamentumokkal, endoplazmatikus retikulummal és plazmamembránnal történő kölcsönhatásait befolyásoló mutációk jellemzése földérintette a mechanikai stimulusokat érzékelő ioncsatornák, valamint a calcium/kalmodulin és inozitolfoszfát szignálátviteli utak komponenseinek szerepét a gravitáció érzékelésétől az auxin transzporterek membránlokalizációjának szabályozásáig vezető folyamatokban. Amíg az auxin transzporterek poláris lokalizációját, aktivitását és stabilitását szabályozó faktorokról egyre több ismeret áll rendelkezésükre, sokkal kevesebbet tudunk arról, hogy a gravitációs stimulus érzékelése hogyan vezet az auxin transzport specifikus változásaihoz a Ca^{2+} /kalmodulin jelátvitelben működő faktorok részvételével. E Ph.D. tézisben leírt kísérletek az *Arabidopsis thaliana* Ca^{2+} /kalmodulin-függő kinázaihoz hasonló CRK alcsoportba tartozó CRK5 protein kináz jellemzésével felderítik egy, a Ca^{2+} /kalmodulin szignálátvitelben működő faktor szerepét a gyökér gravitropikus válaszainak szabályozásában. A CRK5 kinázt eredetileg a szplicing apparátust aktiváló NTC (nineteen complex) komplex sejtmagi PRL1 alegységének kölcsönható partnereként azonosították élesztő két-hibrid rendszerben. Hasonlóan az *Arabidopsis* CRK-család hét további tagjához, a CRK5 fehérje (At3g50530) hordoz egy N-terminális MGxC mirisztilációs és/vagy palmitoilációs motívumot, amely konzervált az eddig más fajokban jellemzett plazmamembránhoz kötött CRK kinázokban. A CRK5 N-terminusa tartalmaz egy sejtmagi lokalizációs szignált is, amelyet a szerin/treonin kináz katalitikus doménje követ egy autoinhibitor doménhez és négy degenerált EF-kéz motívumhoz kapcsolva. A CRK kináz eddig ismert tagjaiban az EF-kéz motívumok nem képesek Ca^{2+} kationt kötni, de kalmodulinnal kölcsönhatnak, ami 10-szeresére emeli a CRK5-höz hasonló paradicsom CRK1 kináz aktivációs T-loop foszforilációját, de csak minimálisan növeli annak szubsztrát foszforilációs aktivitását. A CRK kináz család tagjainak funkciói és szubsztrátjai, a munkánk során először jellemzett CRK5 kináz kivételével, jelenleg ismeretlenek.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk célja az *Arabidopsis thaliana* CRK (CDPK Related Kinases) kináz családjába tartozó CRK5 kináz szabályozó funkcióinak felderítése volt. A CRK5 gén funkcióinak jellemzéséhez a következő célokat tűztem ki:

1. Előállítani, ill. azonosítani olyan *Arabidopsis* mutánsokat, ahol a CRK5 gén funkciója hiányzik (null mutáns), és a *crk5* mutáció által indukált fejlődési rendellenességek vizsgálata.
2. A vizsgált *crk5-1* T-DNS inszerciós mutáció gyökérnövekedés gátlása és az oldalgökér differenciálódás stimulációja mellett jelentősen késleltette a gyökér és a hajtás gravitropikus válaszait, ezért további célunk volt annak felderítése, hogy a CRK5 kináz inaktiválása változtatja-e meg az auxin hormon által szabályozott gravitropikus növekedési válaszokat.
3. A *CRK5* gén szabályozásának jellemzése, ill. a CRK5 kináz fehérje szubcelluláris lokalizációjának vizsgálatára célunk volt olyan génkonstrukciók elkészítése, amelyek pontosan megtartják a *CRK5* gén természetes regulációs jellemzőit amellet, hogy lehetőséget biztosítanak a kináz géntermék *in vivo* detektálására GFP (zöld fluoreszcens fehérje) és β -glükuronidáz reporter fehérjékkal fuzionálva. Ezeknek a konstrukciónak a felhasználásával egyben lehetőségünk volt a *crk5* null mutáns genetikai komplementációjára és annak igazolása, hogy az észlelt gravitropikus defektet valóban a *CRK5* gén inaktiválása okozta.
4. A gyökér auxinfüggő gravitropikus válaszában az AUX1 auxin influx, ill. PIN (főleg PIN3 és PIN2) efflux hordozók döntő szerepet játszanak, célunk volt annak felderítése, hogy a CRK5 kináz hiánya hogyan befolyásolja az AUX1 és PIN fehérjék funkcióit, membránlokalizációját, stabilitását és az általuk szabályozott aszimmetrikus auxin eloszlás létrejöttét, amelyet egy auxin-indukált DR5-GFP riporter segítségével terveztünk követni a gravitropikus válasz alatt.
5. Végül a CRK5 protein kináz tisztítását és biokémia jellemzését követően terveztük annak vizsgálatát, hogy a gravitropikus válaszokat szabályozó PIN auxin efflux hordozók aktivitását modulálja-e a CRK5 kináz e fehérjék, mint közvetlen szubsztrátok foszforilációja által.

MÓDSZEREK

Polimeráz láncreakciós szűréssel T-DNS inszerciós mutációkat izoláltunk, majd szekvenálásával megállapítottuk pontos helyzetüket a *CRK5* génben. A *crk5* mutáns allélek transzkripcióját valósídejű PCR (qRT-PCR) tesztekben vizsgáltuk. A *crk5-1* mutáns fenotipikus jellemzésével definiáltuk a mutáció okozta rendellenességeket, amelyeket a gyökér és hajtás gravitropikus válaszainak késleltetése és az oldalgyökér primordiumok számának emelkedése jellemzett. Azt, hogy e változásokat valóban a *crk5-1* mutáció okozta, a mutáció genetikai komplementálásával bizonyítottuk. Ehhez a *CRK5* gén stop kodonjának helyettesítésével olyan génkonstrukciókat állítottunk elő, amelyekről a gén natív szabályozását megtartva a zöld fluoreszcens fehérjével (GFP), ill. β -glükuronidázzal (GUS) fuzionált CRK5 kinázt fejeztettünk ki növényekben. qRT-PCR-rel, ill. a CRK5-GUS fehérje aktivitásának követésével vizsgáltuk a CRK5 gén transzkripcióját, ill. fehérje termelését különböző szövetekben. Konfokális pásztázó lézer mikroszkópiával (KPLM) megállapítottuk, hogy a CRK5-GFP fehérje a plazmamembránban lokalizálódik protoplasztokban ill. transzgenikus növények specifikus sejtjeiben poláris U-formájú mintázatokat mutatva. A CRK5 membránlokalizációját sejtfrakcionálási kísérletekben western immunoblott technikával igazoltuk. Az auxin-indukált DR5-GFP riporter aktivitását KPLM vizsgálatokban követve kimutattuk, hogy a *crk5-1* mutáció megemeli a gyökércsúcsból a megnyúlási zóna felé irányuló auxin exportot és késlelteti a gravistumulált gyökér alsó és felső zónái között kialakuló aszimmetrikus auxin gradiens létrejöttét. qRT-PCR mérésekkel igazoltuk, hogy a gyökércsúcsban lecsökkent auxin, ill. DR5-GFP szintért nem az auxin bioszintézisben és transzportban kulcsszerepet játszó gének gátlása felelős. KPLM hőtérképek készítésével megállapítottuk, hogy a *crk5-1* mutáció nem változtatja meg a fluoreszcens riporterekhez fuzionált AUX1, PIN1, PIN3, PIN4 és PIN7 auxin transzporterek lokalizációját, szemben a PIN2 transzporterrel, amelynek mennyisége és poláris lokalizációja jellegzetesen eltér a *crk5-1* és vad típusú növények bőr és kortex sejtekben. Brefeldin (BFA) exocitózis gátló és FM4-64 membránfesték segítségével kimutattuk, hogy a *crk5-1* mutáció késlelteti a PIN2 exocitózist és megváltoztatja annak mennyiséget és helyes poláris membránlokalizációját. Végül, CRK5 fehérjét His₆ peptidhez fuzionálva Ni²⁺ affinitás kromatográfiával tisztítottuk, majd kináz tesztekben kimutattuk, hogy a CRK5 aktivitása és autofoszforilációja Ca²⁺ független, ill., hogy a CRK5 foszforilálja a PIN2 citoplazmatikus hurok doménjét. His₆.PIN2 hurok fehérjében hat CRK5 foszforilációs helyet azonosítottunk a foszfopeptid tömegspektrometriás vizsgálatával.

EREDMÉNYEK

A CRK5 kináz funkciójának meghatározása érdekében polimeráz láncreakciós szűrési technikával T-DNS inszerciós mutánsokat azonosítottunk. A mutás allélok transzkripciójának valósidejű PCR (qRT-PCR) vizsgálataival igazoltuk, hogy ezek egyike, a *crk5-1* allél egy null mutációnak felel meg. A mutáns megváltozott morfológiai és fejlődési jegyeinek vizsgálata azt mutatta, hogy a *crk5-1* mutáns gravitációs válasza a vadtypushoz hasonlítva jelentős késést szenved, amely mind a gyökér pozitív, mind a szár negatív geotropizmusát érinti. Ezen kívül, a vadtypushoz hasonlítva, a *crk5-1* mutáns főgyökérének megnyúlása körülbelül 30%-os csökkenést mutatott, amíg a mutáns 30%-al több oldalgyökéret fejlesztett, ami az auxin homeosztázis megváltozására utalt. A *crk5-1* mutánsban a keményítőtartalom Lugol festést követően nem mutatott különbséget a vadtypushoz képest, vagyis a gravitációs válasz késése nem volt magyarázható a gyökérsüveg gravitációs szignált érzékelő sztatocita sejtjeinek rendellenes működésével. Ennek bizonyítására, hogy a gravitropikus válaszban észlelt hibát valóban a *crk5-1* mutáció okozta, genetikai komplementációs tesztekkel végeztünk el. Ezekhez olyan génkonstrukciókat állítottunk elő, amelyekről a gén natív szabályozását megtartva a zöld fluoreszcens fehérjével (GFP) ill. β -glükuronidázzal (GUS) fuzionált CRK5 kinázt fejeztettünk ki növényekben. A CRK5:GUS riporter aktivitásának követésével azt találtuk, hogy *CRK5* gén a növény minden szervében kifejeződik. A legmagasabb CRK5-GUS szinteket a gyökércsúcsi régióban, szállítónyalábok mentén, ill. a virágzatban észleltük. E vizsgálatok eredményeit a *CRK5* mRNS qRT-PCR mérésével is igazoltuk. A sejtszintű fehérjelokalizációs vizsgálatokhoz előállított gCRK5:GFP konstrukcióval sikeresen komplementáltuk vadtypusúra a *crk5-1* mutáns jellegzetes fenotipikus hibáit, ami gyökérmegnyúlás defektjét, a megemelkedett oldalgyökérszámot, ill. a gyökér és hajtás késői gravitropikus válaszait a vadtypusban észlelt szintekre állította vissza.

A CRK5 fehérjében azonosított N-terminális mirisztilációs hely jelezte, hogy a CRK5 fehérje valószínű membránlokalizált. Tranziens protoplaszt expressziós rendszerben és transzgénes növényekkel elvégzett konfokális pásztázó lézer mikroszkópos (KPLM) vizsgálatokban a CRK-GFP fehérje plazmamembrán elhelyezkedést mutatott, amit western immunoblott technológia és speciális FM4-64 plazmamembrán festési módszer segítségével is bizonyítottunk. A CRK5-GFP fehérje a főgyökér bórszöveti, cortex, és gyökérsüveg, ill. az oldalgyökerek hasonló sejtjeiben U alakú, a gyökérfelszín felé orientált polaritást mutatott. Brefeldin (BFA) exocitózist gátló gombatoxinnal végzett kezelés során a CRK5 fehérje egy

része vezikuláris BFA testekbe internalizálódott a membránból, de hosszabb idejű kezelés eredményeként a sejtmagba importálódott. A sejtmagi CRK5 lehetséges funkciója még nem ismert, de feltételezhetően összefügg az szplicing aprátust aktiváló ún. NTC (nineteen complex) komplex PRL1 alegységével észlelt kölcsönhatásával.

A gyökér gravitopikus válaszána késése a *crk5-1* mutánsban az auxin homeosztázis lehetséges zavarára utalt. Valóban azt találtuk, hogy az auxin-indukált DR5-GFP riporter aktivitása *crk5-1* mutáns gyökércsúcsi régiójában jóval alacsonyabb, mint a vad típusban, ami magyarázatul szolgált arra, hogy a gyökérmegnyúlás a vad típushoz képest miért csökkent kb. 30%-al a *crk5-1* mutánsban. Amint azt kontroll qRT-PCR méréseink kimutatták, az auxin bioszintézisben és lebontásban szerepet játszó, ill. auxin transzport fehérjéket kódoló gének transzkripciója nem mutatott különbséget a vad típusban és *crk5-1* mutánsban. Azaz, az auxinszint csökkenését a *crk5-1* gyökércsúcsban nem az auxin termelését és transzportját irányító gének expressziójának megváltozása okozta. A gravistimulált gyökerekben kialakuló aszimmetrikus auxin gradiens kialakulását a DR5-GFP riporterrel követve azt észleltük, hogy a gyökerek gravitációs vektor felé eső alsó oldalán kialakuló auxin többlet hatására a DR5-GFP jelintenzitás megnőtt a vad típusú háttérben 1-2 órával a gravistimulációt követően, míg a *crk5-1* mutáns háttérben ezt csak 9 óra múlva tapasztaltuk. Auxin efflux inhibitor (NPA) hatására a *crk5-1* gyökércsúcsban tovább csökkent a DR5-GFP jelintenzitása, amíg a NOA auxin influx inhibitor helyreállította a DR5-GFP jelintenzitást a vad típusú szintre. Ez azt jelezte, hogy a *crk5-1* mutáció fokozza az auxin áramlást a gyökércsúcs felől a kortexen keresztül a szár felé az AUX1 influx hordozó közreműködésével és megmagyarázta, hogy a *crk5-1* mutáció miért emelte meg kb. 30%-al az auxin indukálta oldalgyökerek számát az elongációs zóna fölött.

Az auxin transzport iránya és mértéke a plazmamembránban elhelyezkedő auxin transzporterek poláris elhelyezkedésétől és mennyiségétől függ. Konfokális pásztázó mikroszkópos vizsgálatainkban azt találtuk, hogy a PIN1-GFP, PIN3-GFP, PIN4-GFP és PIN7-GFP auxin efflux, valamint az AUX1-YFP influx hordozók hasonló lokalizációt mutatnak mind függőlegesen nevelt és 135°-kal elforgatott gravistimulált vad típusú és *crk5-1* mutáns gyökerekben. Azaz a *crk5-1* mutáció nem változtatta meg a fenti auxin hordozók sejtbeli lokalizációját. Ezzel szemben, a PIN2 auxin export fehérje, amely a PIN3 és AUX1 mellett döntő szerepet játszik a gyökér gravitopikus válaszána szabályozásában, jellegzetes mennyiségi és lokalizációs változást mutatott a *crk5-1* mutánsban a vad típushoz képest. A PIN2 szintje a *crk5-1* a gyökér bórszöveti sejtek hajtás felé néző felső membránjaiban

lényegesen csökkent a vadtypushoz képest. A vadtypusú gyökerek cortex sejtsorában a PIN2 fehérje a gyökércsúcsához közelebbi alsó plazmamembránban lokalizálódott, amíg a *crk5-1* mutáns cortex sejteinek többségében a felső sejtmembránban halmozódott föl, és megjelent az endodermisz vaszkulátúra felőli plazmamembránjaiban is. Ez azt jelezte, hogy a *crk5-1* mutánsban a PIN2 újrapozicionálása megváltoztatta az auxin export irányát a gyökércsúctól az elongációs és oldalgökér differenciációs zónák, ill. a vaszkuláris osztódó szövetek felé. A gravitációs inger során kialakuló aszimmetrikus PIN2 mennyiségi eloszlás a gyökér alsó és felső oldala között a *crk5-1* mutáns esetében, a DR5-GFP riporterrel követett aszimmetrikus auxin eloszláshoz hasonlóan, jelentős késést mutatott és ezért hasonlóan késett a gyökér görbülési válasza is a gravitációs jel irányában. Ennek oka az, hogy a PIN2 poláris lokalizációjának megváltozása következtében a kortexen át a gyökércsúcs felé irányuló normális auxin reciklizáció folyamata hibás és ezért az auxintranszport a gyökércsúcsból az elongációs zóna irányába megemelkedik a *crk5-1* mutánsban. A PIN2 megváltozott lokalizációs mintázata a *crk5-1* mutánsban hasonló ahhoz, amit alacsony koncentrációjú BFA kezelés okoz vadtypusú gyökerekben, ahol a PIN2 bazális membránlokalizációja a hajtás felé néző felső membrán felé tolódik el a kortexben és ez által gátolja a gravitropikus válasz kialakulását. További kísérleteinkben valóban az találtuk, hogy a *crk5-1* gyökerek átmeneti zónájának epidermisz sejteiben nemcsak lecsökkent a felső plazmamembránban lokalizált PIN2 fehérje szintje, hanem felgyorsult a PIN2 brefeldin-érzékeny internalizációja is.

A PIN fehérjék membrán reciklizálását, poláris lokalizációját és degradációját a citoplazmás ún. hurok doménjüknek foszforilációja szabályozza. Tisztított His₆-CRK5 és szubsztrát fehérjékkal elvégzett *in vitro* kináz tesztekben azt találtuk, hogy a CRK5 kináz a PIN2 fehérjét a központi hidrofíli hurkon foszforilálja hat különböző pozícióban. Az azonosított CRK5 foszforilációs helyek közül három csak a PIN2 fehérjében található meg, ami föltehetően magyarázattal szolgál arra, hogy a *crk5-1* mutáció miatt csak a PIN2 funkcióját változtatja meg. Ennek bizonyítása a jövőbeli kísérletek egyik fontos célja.

ÖSSZEFOGLALÁS

CRK5 az *Arabidopsis thaliana* Ca^{2+} /kalmodulin függő kinázokhoz hasonló eddig nem jellemzett CRK kináz család egyik tagja. Munkánkban kimutattuk, hogy a CRK5 inaktiválása gátolja az főgyökér megnyúlását és késlelteti a gyökér és hajtás gravitropikus görbülési válaszait. Az auxin-indukált DR5-zöld fluoreszcens fehérje (GFP) riportter csökkent aktivitása a vadtypushoz hasonlítva alacsonyabb auxinszintet jelez *crk5-1* mutáns gyökércsúcsi régiójában. Azonban, ez nem eredményezi a gyökércsúcs elhalását és a *crk5-1* mutáció nem változtatja meg az auxin bioszintézisben és lebontásban szerepet játszó kulcsgének, ill. az AUX1/LAX (AUXIN TRANSPORTER/AUXIN TRANSPORTER-LIKE PROTEIN auxin influx és PIN (PIN-FORMED) efflux hordozókat kódoló gének transzkripcióját sem. Amíg az AUX1, PIN1, PIN3, PIN4 és PIN7 auxin transzporterek vadtypusú lokalizációt mutatnak, addig a PIN2 transzporter mennyisége lecsökken a bőrsejtek felső membránjában és lokalizációja eltolódik a kortex sejtek felső membránjaiból az alsó membránokba a *crk5-1* mutáns gyökerek átmeneti zónájában. Ez, együtt a *crk5-1* mutáció által okozott oldalgyökérszám emelkedésével arra utal, hogy a *crk5-1* mutáció lényegesen megemeli az auxin aktív transzportját a kortexen át a gyökér elongációs zónája felé. A CRK5 egy plazmamembrán kötött kináz, amely U formájú, a gyökér felszíne felé orientált mintázatot mutat az bőr, kortex és kolumella sejtekben. Az excitózis gátlása a brefeldin (BFA) gombatoxinnal stimulálja a CRK5 internalizálódását BFA testekbe, majd további importját a sejtmagba. CRK5 foszforilálja *in vitro* a PIN2 fehérje citoplazmikus hidrofil hurok doménjét és ezzel valószínű szabályozza a PIN2 membrán lokalizációját, ami brefeldin jelenlétében jelentősen felgyorsul a vadtypushoz képest a *crk5-1* mutánsban. Ezért a *crk5-1* mutánsban észlelt késleltetett gravitropikus válasz valószínű a CRK5-specifikus PIN2 foszforiláció hiányának és az ez által lelassított brefeldin-érzékeny PIN2 membrán reciklizációnak tulajdonítható.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

Rigó G, Ayaydin F, Tietz O, Zsigmond L, Kovács H, Páy A, Salchert K, Darula Z, Medzihradszky KF, Szabados L, Palme K, Koncz C, Cséplő Á. (2013) Inactivation of plasma membrane-localized CDPK-RELATED KINASE 5 decelerates PIN2 exocytosis and root gravitropic response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**: 1592-1608. (IF: 10.125)

Rigó G, Papdi C, Szabados L. (2012) Transformation using controlled cDNA overexpression system. *Methods Mol. Biol.* **913**: 277-290. Könyvfejezet

Zsigmond L, Szepesi A, Tari I, **Rigó G**, Király A, Szabados L. (2012) Overexpression of the mitochondrial PPR40 gene improves salt tolerance in Arabidopsis. *Plant Sci.* **182**: 87-93.
(IF: 2.945)

Zsigmond L, Tomasskovics B, Deák V, **Rigó G**, Szabados L, Bánhegyi G, Szarka A. (2011) Enhanced activity of galactono-1,4-lactone dehydrogenase and ascorbate-glutathione cycle in mitochondria from complex III deficient Arabidopsis. *Plant Physiol. Biochem.* **49**: 809-815.
(IF: 2.838)

Rigo, G., Ayaydin, F., Kovacs, H., Szabados, L., Cseplo, A., (2010) AtCRK5, a CDPK-related Serine/threonine Protein Kinase may Participate in Regulation of Salt Tolerance in Arabidopsis Thaliana. In: Palocz-Andresen M, Nemeth R, Szalay D (szerk.) Proceedings of the Conference "Protection of the Environment and the Climate": TÁMOP-Humboldt Colleg for Environment and Climate Protection, Sopron, Hungary 3rd December 2009 & 1st October 2010. Sopron: University of West Hungary, 2011. pp. 70-74.

Zsigmond L, **Rigó G**, Szarka A, Székely G, Ötvös K, Darula Z, Medzihradszky KF, Koncz C, Koncz Z, Szabados L. (2008) Arabidopsis PPR40 connects abiotic stress responses to mitochondrial electron transport. *Plant Physiol.* **146**: 1721-1737. (IF: 6.110)

Székely G, Ábrahám E, Cséplő A, **Rigó G**, Zsigmond L, Csiszár J, Ayaydin F, Strizhov N, Jásik J, Schmelzer E, Koncz C, Szabados L. (2008) Duplicated *P5CS* genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant J.* **53**: 11-28. (IF: 6.493)

Rigó G., Ayaydin F., Szabados L., Koncz C., Cséplő A. (2008). Suspension protoplasts as useful experimental tool to study localization of GFP-tagged proteins in Arabidopsis thaliana. *Acta Biol. Szeged.* **52**: 59–61.

Ábrahám E, **Rigó G**, Székely G, Nagy R, Koncz C, Szabados L. (2003) Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* **51**: 363-372. (IF: 3.795)

**A dolgozat alapjául szolgáló közlemény.