

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Biológia Doktori Iskola

Doktori értekezés

**A szálkaperje (*Brachypodium distachyon*) LOB-domain
transzkripciós faktorok géncsaládjának jellemzése, és két
fehérjéjének kölcsönhatás-vizsgálata**



Gombos Magdolna

Témavezető: Dr. Györgyey János

Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpont –
Növénybiológiai Intézet

2017

Szeged

Tartalmi összefoglaló

Kutatásaink középpontjában egy olyan, csak növényekben fellelhető transzkripció faktor család – a LOB-domain (LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN) transzkripció faktorok családja (röviden LBD) - áll, amely központi szerepet tölt be a merisztematikus sejtcsoportok működésének és a belőlük lefűződő sejtek differenciálódásának jól összehangolt szabályozásában. Habár igazoltan részt vesznek szinte minden szervfejlődési folyamatban az embriogeneztől egészen a termésérésig, pontos szerepüket mindezidáig csak néhány esetben sikerült meghatározni. Emellett a rendelkezésre álló információk döntő többsége lúdfűvel (*Arabidopsis thaliana*), mint elsőszámú kétszikű növényi modellszervezettel végzett kutatásokból származik. Egyszikűekben betöltött funkcióik kevésbé ismertek. Célunk az LBD gének szerepének felderítése a szálkaperjével (*Brachypodium distachyon*), mint kalászos gabonaféléink széles körben elfogadott modellnövényével végzett kutatásokon keresztül.

Jelen munkában bemutatásra kerül a szálkaperjében fellelhető LBD gének részletes szekvencia-elemzéssel történő azonosítása, rokonsági kapcsolataik vizsgálata, valamint kifejeződési mintázatuk gyökércsúcstól egészen a hajtáscsúcsig, vegetatív és generatív szervekre egyaránt kiterjedő, valós idejű PCR (quantitative real-time polimerase chain reaction) technikával történő részletes analízise. Szerepelnek továbbá két, az aprólékos vizsgálatok alapján kiválasztott, egymással közel rokon LBD gén (Bd2g34520- BdLBD1C-1 valamint a Bd2g53690- BdLBD1C-2) sejtciklus szabályozásával való összefüggéseire irányuló kutatásaink.

Kulcsfogalmak: szervfejlődés, LBD gén (Lateral Organ Boundaries Domain), LOB-domain (Lateral Organ Boundaries) transzkripció faktor, szálkaperje (*Brachypodium distachyon*), expressziós mintázat, valós idejű polimeráz láncreakció, A2 ciklin, Y2H (élesztő kéthibrid).

Tartalom

Tartalmi összefoglaló	2
Tartalom.....	3
Bevezetés	5
1. Irodalmi áttekintés	7
1.1 A szálkaperje (<i>Brachypodium distachyon</i>), mint modellnövény	7
1.1.1 „Az egyszikűek <i>Arabidopsis thaliana</i> -ja”	7
1.1.2 A szálkaperje rokonsági kapcsolatai	10
1.1.3 A szálkaperje genomja	11
1.1.4 A szálkaperje kutatáshoz nyilvánosan hozzáférhető bioinformatikai források	14
1.1.5 A szálkaperje jelene és jövője modellorganizmusként.....	15
1.2 A LOB-domain transzkripciós faktor család.....	19
1.2.2 Az LBD transzkripciós faktorok szerkezete.....	20
1.2.3 Az LBD transzkripciós faktorok evolúciós eredete és filogenetikai kapcsolatai	21
1.2.4 Az LBD transzkripciós faktorok szerepe a növények egyedfejlődésében	23
1.2.4.1 A levélfejlődés és az LBD transzkripciós faktorok kapcsolata	25
1.2.4.2. A virágfejlődés és az LBD transzkripciós faktorok kapcsolata.....	27
1.2.4.3 Az LBD transzkripciós faktorok és a gyökérfejlődés kapcsolata.....	28
1.2.4.4 LBD transzkripciós faktorok pleiotróp funkciókkal.....	30
1.2.5 Az LBD transzkripciós faktorok és a metabolikus folyamatok kapcsolata.....	31
1.2.6 Az LBD gének kifejeződésének szabályozása	32
1.2.7. Az LBD transzkripciós faktorok és a sejtosztódás szabályozásának kapcsolata.....	33
2. Célkitűzések	37
3. Anyag és módszer	39
3.1 A szálkaperje LBD transzkripciós faktorainak <i>in silico</i> vizsgálatához kapcsolódó módszerek	39
3.1.1 A szálkaperje LBD transzkripciós faktorokainak azonosítása	39
3.1.2 Az LBD transzkripciós faktorok rokonsági kapcsolatainak vizsgálata	39
3.1.3 Genom szintű vizsgálatok: genom synteny és duplikációs események vizsgálata.....	40
3.2 Az LBD gének expressziós profiljának vizsgálatához kapcsolódó módszerek	40
3.2.1 Növények nevelése.....	40
3.2.2 Mintavétel.....	42
3.2.3 Minták feldolgozása: RNS-izolálás, cDNS-szintézis	44
3.2.4 qRT-PCR.....	44

3.3 Az élesztő két-hibrid (Y2H) vizsgálatokhoz kapcsolódó anyagok és módszerek.....	46
3.3.1 Az Y2H rendszerben vizsgálni kívánt jelöltek kiválasztása, a vizsgálatához szükséges konstrukciók létrehozása és ellenőrzése.....	46
3.3.2 Az Y2H kölcsönhatási teszthez használt élesztő törzsek, kompetens sejt készítése	49
3.3.3 Élesztő sejtek transzformálása.....	49
3.3.4 β -galaktozidáz enzimaktivitás mérése.....	51
4. Eredmények és megvitatásuk.....	53
4.1 A szálkaperjében megtalálható LBD transzkripciós faktorok azonosítása és rokonsági kapcsolatai	53
4.2 A szálkaperje LBD génjeinek kromoszomális elhelyezkedése és lehetséges duplikációs kapcsolatai	60
4.3 A szálkaperje LBD génjeinek kifejeződési mintázata.....	61
4.4 A szálkaperje LBD1C-1 és 1C-2 fehérjéinek kapcsolata a sejtciklus szabályozásával	71
4.4.1 A lehetséges kölcsönható partnerek kiválasztása	72
4.4.2 A BdLBD1-C1 és BdLBD1C-2 A2 típusú ciklinekkel való lehetséges kölcsönhatásának vizsgálata.....	77
4.4.3 A BdLBD1C-1 és BdLBD1C-2 homo- és heterodimer képzésének tesztelése Y2H rendszerben .	83
4.5 Perspektívák	85
5. Összegzés	87
6. Summary	92
Rövidítések.....	97
Irodalomjegyzék.....	99
Publikációs lista	116
Köszönetnyilvánítás	117
Nyilatkozat	118
Függelék	119
1. A kísérlet során alkalmazott protokollok	119
2. A kísérletekhez használt primerek	124
3. Az Y2H kísérletekhez használt vektorkonstrukciók	125

Bevezetés

A magasabb rendű edényes növények struktúrája leegyszerűsítve hajtástengelyből, a róla elágazó oldalhajtásokból, az azokon fejlődő vegetatív és generatív szervekből, valamint a központi gyökérből és az oldalgyökerekből épül fel. E szervek létrehozása szinte teljes egészében posztembrionálisan megy végbe, vagyis a növények – a magasabbrendű állati szervezetektől eltérő módon – teljes életciklusuk alatt képesek új szervek, szövetek létrehozására. Ez a kivételesen rugalmas egyedfejlődési program nemcsak bámulatos formagazdagságot és folyamatos növekedést tesz lehetővé, de az állandóan változó környezethez történő alkalmazkodást is biztosítja.

Ez a lenyűgöző plaszticitás részben az osztódóképes merisztematikus sejtcsoportok aktivitásának köszönhető. Ilyen embrionális eredetű merisztémák a hajtáscsúcsban (SAM-shoot apical meristem) és a gyökércsúcsban (RAM-root apical meristem) találhatók. A hajtás esetében ebből a csúcsi merisztémából fűződnek le az oldalszervek, levél-és virágkezdemények építőköveiként szolgáló differenciálódott sejteket létrehozó további merisztémák. A gyökér csúcsi merisztémája pedig folyamatos hosszanti növekedést biztosít és forrása a gyökér három szövettípusát – a bőrszövet, elsődleges kéreg és központi henger vagy sztéle – kialakító másodlagos merisztematikus sejteknek. Emellett megfelelő körülmények között a már differenciálódott sejtek is újbóli osztódásra bírhatók ("reaktíválhatók"), tovább fokozva ezzel a növények plaszticitását. Az osztódóképes sejtek ily módon 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, kialakítva ezzel a növény architektúráját.

A pontos és arányos szervfejlődéshez a növények esetében is nélkülözhetetlen a sejtek osztódásának és az utódsejtek differenciációjának korrekt időbeli és térbeli szabályozása. Ezen folyamatok között kiemelt jelentőséggel bír a merisztémák és a fejlődő új szerv határának kijelölése. Mai ismereteink szerint az osztódó képes szöveti régiók és a belőlük képződő primordiumok közötti határ nem egyfajta filozófiai „vagy merisztéma vagy fejlődő szerv” szélsőséges állapota közötti döntést jelenti, hanem sokkal inkább egy jól definiálható, speciális sejtek alkotta diszkrét választóvonal. A határvonalat meghúzó sejtek lassú osztódási és differenciálódási kapacitással rendelkeznek, és olyan egyedi, csak rájuk jellemző génexpressziós mintázattal jellemezhetők, mely biztosítja a merisztémák indeterminált állapotának fenntartásához szükséges mikrokörnyezetet, ugyanakkor koordinálja az utódsejtek érési folyamatait is (Reddy és mtsai, 2007; Wang és mtsai, 2016).

Jellegzetes, csak a szervhatárokon elhelyezkedő sejtekben kifejeződő gének pl. a CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC), a PETALLOS (PTL) valamint a BLADE ON PETIOLE (BOP) gének (Rast és Simon, 2008), és ilyen, az oldalszervek képződési helyén kifejeződő génként írták le az első LBD gént is (Shuai és mtsai, 2002). A Shuai és mtsai. által azonosított gén valamennyi hajtás apikális merisztémából eredő szerv alapi részének adaxiális sejtcsoportjaiban és az oldalgyökerek iniciális sejtjeiben aktív. Az elnevezés erre a speciális kifejeződési mintázatra utal: LATERAL ORGAN BOUNDARIES, azaz oldalszervek határán működő gén. Az általa kódolt fehérje bár akkor még ismeretlen volt, annyit meg lehetett jósolni, hogy tartalmaz egy konzervált, 100 aminosav hosszú szerkezeti motívumot, a LOB-domaint. Maga a motívum ugyan már a 90'-es évek derekától megtalálható volt különböző genom-adatbázisokban, mint ismeretlen funkcióval rendelkező szerkezeti elem (DUF260 - domain of unknown function), és jó néhány, LBD génekre visszavezethető mutációt írtak le Shuai és mtsai. munkáját megelőzően is (Hetz és mtsai, 1996), az LBD gének intenzív kutatása csak a 2000-es évektől, a családról megjelent első részletes publikáció megjelenése után kezdődött el.

A LOB-domain motívum további 42 másik *Arabidopsis* fehérjében is megtalálható, és később kiderült az is, hogy az algáktól kezdve egészen a zárvatermőkig szinte minden zöld organizmusban előforduló transzkripció faktor-családról van szó (Husband és mtsai, 2007; Majer és Hochholdinger, 2011). Mivel LOB-domainnel vagy hasonló szerkezeti motívummal rendelkező fehérjét növényi adatbázison kívül eddig sehol sem találtak, az ide tartozó fehérjék kétséget kizáróan növényi specifikus folyamatokban vesznek részt. Ezen folyamatok döntő többsége a szervfejlődés irányításával kapcsolatos: eddigi ismereteink alapján az LBD gének részt vesznek a gyökérfejlődésben, a levélmorfológia kialakításában, generatív szervek képződésében és szinte minden, organogenezist érintő folyamatban (Xu és mtsai, 2016).

A több mint tíz éve zajló kutatások ellenére eddig csak néhány LBD gént sikerült részletesen jellemezni, legtöbbjük szerepe máig ismeretlen. Emellett ismereteink jelentős része lúdfüvel (*Arabidopsis thaliana*) végzett kutatásokból származik, az egyszikűekben található LBD gének funkciójáról még kevesebbet tudunk. Átfogó jellemzésük olyan egyszikű modellrendszerekben, mint amilyen a szálkaperje (*Brachypodium distachyon*), kiindulópontként szolgálhat az LBD gének egyszikűek egyedfejlődésében betöltött szerepének megismeréséhez. Az egyszikűek szerfejlődési folyamatait irányító molekuláris mechanizmusok feltárása nemcsak tudományos szempontból releváns kutatási terület, hanem hosszú távon gazdasági szempontból is nagy jelentőséggel bírhat.

1. Irodalmi áttekintés

1.1 A szálkaperje (*Brachypodium distachyon*), mint modellnövény

A fűfélék, közöttük is elsősorban a köztermesztésben lévő kalászos gabonaféléink biológiájának megismerése vitathatatlanul kiemelt jelentőségű. Ugyanakkor a bennük zajló folyamatok megértése nehézkes és hosszadalmas lenne megfelelő modellorganizmusok használata nélkül. A szálkaperje (*B. distachyon*) mintegy másfél évtizeddel ezelőtt került a tudományos érdeklődésközéppontjába - nem véletlenül: ez az egyéves, kalászos fűféle számos olyan előnyös tulajdonsággal rendelkezik, melyek alapján a mai modern növénybiológiai kutatások ideális modellszervezetének tekinthető, amelyet ma már széles körben, több mint 350 laboratóriumban használnak világszerte.

1.1.1 „Az egyszikűek *Arabidopsis thaliana*-ja”

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 és laboratóriumi körülmények között is könnyen kezelhető szervezeteket, mint amilyen pl. a lúdfű (*A. thaliana*). Mivel azonban kétszikű növény, és több mint 150-200 millió évnyi evolúciós távolság választja el a fűféléktől, számos egyszikűekre jellemző sajátosság (pl. az egyszikűek egyed- és szervfejlődésének specifikumai, az ezeket irányító gének és szabályozási hálózatok funkciójának modellezése) tanulmányozásához nem megfelelő objektum (Hayama és Coupland, 2004). Az egyszikűek, azon belül is a fűfélék (*Pooidae*) óriási gazdasági jelentősége okán ugyanakkor egyre nagyobb igény volt egy könnyen kezelhető egyszikű modellrendszer kidolgozására. Erre a célra hosszú ideig több haszonnövényünk, pl. a kukorica (*Zea mays*) vagy a rizs (*Oryza sativa*) is alkalmasnak tűnt, ám ezek egyike sem elégíti ki maradéktalanul a modellszervezetekkel szemben támasztott alapvető követelményeket: kis méret és relatíve egyszerű nevelési feltételek, rövid generációs idő, önbeporzás, kicsi, diploid genom, viszonylag könnyű és hatékony transzformálhatóság (Vogel és Bragg, 2009; Brutnell és mtsai, 2015).

A szálkaperjével (*Brachypodium distachyon*) foglalkozó tanulmányok jelentős része egészen a 2000-es évek fordulójáig ökológiai központú volt (Davis és mtsai, 1985). A *Brachypodium* nemzetség képviselői a világ szinte összes mérsékelt övi régiójában megtalálhatók. Ősi származási helye a Közel-Kelet és a Mediterráneum területére tehető, ugyanarra a régióra, ahonnan termesztett kalászos gabonaféléink döntő többsége is

eredeztethető. Széles elterjedési területének megfelelően számos ökotípusa ismert. Az egyes változatok között eltérések tapasztalhatók a generációs idő hosszában, a növények méretében, a ploiditás mértékében, a virágzás időpontjában, vernalizációs igény tekintetében, betegség-ellenállóság és stressz tolerancia szempontjából is (Opanowitz és mtsai, 2008; Schwartz és mtsai, 2010; Luo és mtsai, 2011). A variánsokból két gyűjteményt is létrehoztak: az egyiket az amerikai USDA-NPGS (United States Department of Agriculture – National Germplasm System), a másikat a walesi Aberyswyth Egyetem (University of Aberyswyth) gondozza (Jenkins és mtsai, 2003; Vogel és Hill, 2008). A több mint 200 ökotípus körének fenntartása és folyamatos bővítése mellett beltenyésztett vonalak előállítása is folyik. Az egyes vonalakat „Bd” előtaggal látják el a tudományos név rövidítéseként, ezt általában két szám követi, kötőjellel elválasztva pl. Bd2-3. Az első szám annak az ökotípusnak az azonosítójára utal, amelyből a vonal ered. A második szám az ugyanabból az ökotípusból származó különböző vonalak elkülönítésére szolgál. A nevezéktanban 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 többségéhez, a teljes genom- és EST (Expressed Sequence Tag) szekvenálási projekthez is ennek a vonalnak a genomja, DNS- és RNS-tartalma szolgált forrásként. Többek között a rendelkezésre álló részletes szekvencia-ismeretek miatt választottuk mi is kísérleteinkhez a Bd21-es vonal növényeit.

A szálkaperje, mint említésre méltó ígéretes modellszervezet csak a 2000-es évek elején került a köztudatba (Babla és mtsai, 1995; Draper és mtsai, 2001; Vogel és mtsai, 2006), elsősorban fizikai jellemzői miatt. Egyszerű nevelési igényei, kis termete (max. 30 cm) valamint rövid generációs ideje (10-18 hét) révén ideális nagy mintaszámot igénylő kísérletekhez: egyedsűrűsége akár 1000 növény/m² is lehet (Vogel és Bragg, 2009). (Összehasonlítás képen ekkora területre *Arabidopsis*-ből 2000, búzából (*Triticum aestivum*) 50, rizsből (*O. sativa*) pedig csak 36 növény ültethető.) Ez a mennyiség üvegházi körülmények között vagy növénynevelő kamrában is fenntartható, lehetővé téve nagy mennyiségű növényi anyag ellenőrzött feltételek mellett történő előállítását. Nevelési igényei meglehetősen egyszerűek (Feuillet és Muehlbauer, 2009). Nem igényel különleges talajkeveréket; a laboratóriumunkban használt, gyökérfejlődési és szárazságtűrési vizsgálatokhoz bevált homok-perlit 2:1 arányú elegyén is jól nevelhető. Optimális nevelési körülmények (20h megvilágítás, 4h sötét fotoperiódus, 21-22°C nappali, 18°C éjszakai hőmérséklet) mellett a legtöbb vonal (pl. a Bd2-3, Bd3-1 és a Bd21-es vonal is) vernalizáció nélkül, már 4-5 hét alatt virágzik. Hosszú nappalos körülmények között így már két hónap elteltével begyűjthetők az érett magok, egy év

alatt pedig akár 6 generáció is felnevelhető (Garvin és mtsai., 2008). Néhány vonal a Bd21-estől eltérően hosszabb-rövidebb vernalizációs periódust is igényel a virágzás indukálásához, amely pár héttel meghosszabbítja a generációs időt. A vernalizáció minimális időtartamában jelentős eltérések tapasztalhatók a különböző ökotípusok között (Schwarz és mtsai., 2010).

A szálkaperje önbeperző, ami megkönnyíti a géntérképezéshez, mutáns analízishez nélkülözhetetlen homozigóta vonalak előállítását. Keresztezése ugyanakkor munkaigényesebb a legtöbb modellként használt növényfajhoz képest. A szálkaperje esetében kalászonként nagy biztonsággal csak egy virág porozható be mesterségesen, és sikeres beporzásonként egyetlen szemtermést kapunk, míg például a lúdfű esetében az utódszám akár 20-30 mag/becő is lehet egy-egy virág sikeres beporzásából. Genommérete az egyik legkisebb az ismert fűfélék között (alig 300 Mb). Összehasonlítva más modellnövényekkel, a szálkaperje tehát mind fiziológiai, mind biológiai és genetikai jellemzői alapján egyaránt eleget tesz a jó modellorganizmusokkal szemben támasztott alapvető követelményeknek (1. Táblázat).

A <i>B. distachyon</i> összehasonlítása a <i>Poaceae</i> család jelentősebb tagjaival és a lúdfűvel						
	szálkaperje (<i>Brachypodium distachyon</i>)	lúdfű (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	búza (<i>Triticum aestivum</i>)	kukorica (<i>Zea mays</i>)	rizs (<i>Oryza sativa</i>)	árpa (<i>Hordeum vulgare</i>)
magasság	0,3 m	0,2 m	1 m	2 m	1,2 m	1,2 m
egyedsűrűség¹ (növény/m²)	1000	2000	50	4	36	80-120
nevelési igény²	egyszerű	egyszerű	közepes	igényes	igényes	közepes
reproduktív stratégia	önbeperzás	önbeperzás	önbeperzás	keresztbeperzás/ önbeperzás ³	önbeperzás	önbeperzás
generációs idő (hét)	8-12	8-12	12 (tavaszi) 40+ (ősz)	10-15	12-24	10-20
terméshozam	>1000	100	50-150	200-1000	>1000	150-200
transzformálhatóság	könnyű	könnyű	lehetséges	könnyű	könnyű	könnyű
genomméret (Mb)	300	164	16700	2400	441	5000
kromoszómaszám (2n)	10	10	42	20	24	14
fotoszintézis	C3	C3	C3	C4	C3	C3
T-DNS mutáns vonalak	elérhető	elérhető	nincs	transzpozon alapú	nincs	nincs

1. Táblázat. ¹Az egyedszám laboratóriumi körülményekre vonatkozik. ² A relatív nevelési igény a növény méretének és tűréshatárának függvényében értelmezendő. ³A kukorica természetes szaporodási stratégiája önbeperzás; a keresztbeperzás a hibrid vetőmagok előállítására vonatkozik. (Opanowitz és mtsai, 2008; Brkljacic és mtsai, 2011)

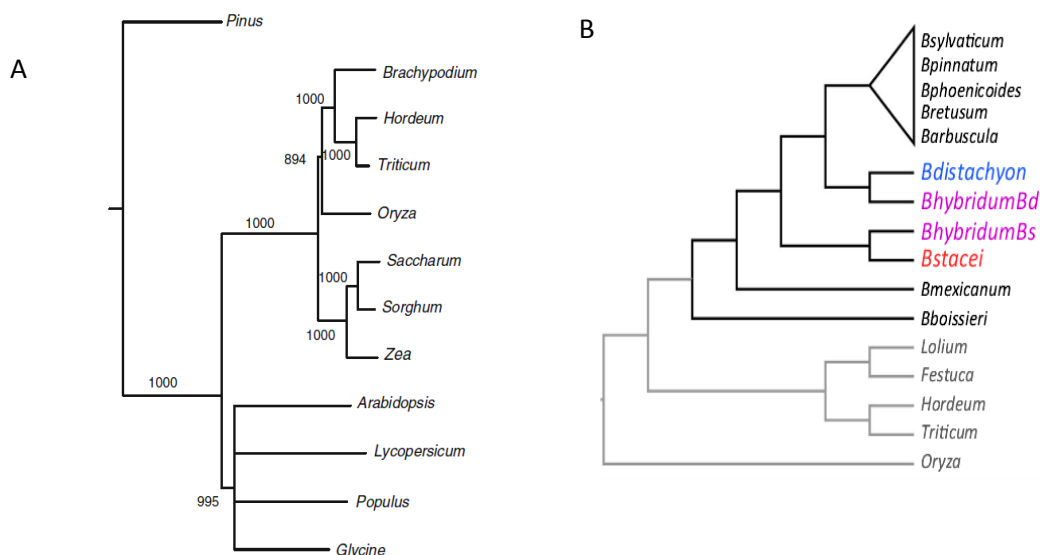
1.1.2 A szálkaperje rokonsági kapcsolatai

A fűfélék (*Poaceae*) családja, ahová a szálkaperje is tartozik, több mint 10000 fajt és több mint 600 nemzetséget foglal magában; ezzel az egyik legnépesebb család a magasabb rendű növények között. A fűfélék három alcsaládja, az *Erhartoideae* [ahová a rizs (*Oryza sativa*) sorolható], a *Panicoidae* [ahová pl. a kukorica (*Zea mays*), a cirok (*Sorghum bicolor*), a cukornád (*Saccharum officinarum*) és a köles (*Panicum miliaceum*) is tartozik] és a *Pooidae* alcsalád (ahová a kalászos gabonafélék is sorolhatók) adja élelmiszer- és takarmánynövényeink döntő többségét, és mint megújuló energiaforrások sem elhanyagolhatók (Kellogg, 2001; Gaut, 2002). Bár a szálkaperje agronómiai jelentősége messze elhanyagolható, filogenetikailag a kalászos gabonaféléink közeli testvérének tekinthető. A szálkaperje (*B. distachyon*), cirok, rizs és búza (*Triticum aestivum*) egymással ortológ génjeinek analízise arra enged következtetni, hogy a *B. distachyon* 32-39 millió évnyi evolúciós távolság választja el a búzától. Becslések szerint ez a távolság a rizs esetében 40-53 millió év, a cirok esetében pedig 45-60 millió év (Vogel és mtsai., 2010). A szálkaperje tehát az egyik (hanem az egyetlen) olyan közeli rokona az egyik legnagyobb ökonómiai jelentőségű gabonafélének, amely rendelkezik a modellszervezetekre jellemző előnyös adottságokkal.

ITS (Internal Transcribed Spacer) és 5.8s rDNA szekvenciákon, a kloroplasztisz *ndhF* génjén, valamint genomi RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) és RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) markereken alapuló filogenetikai vizsgálatok szerint a *Brachypodium* nemzetség a mérsékelt övi gabonaféléinket magában foglaló klád és a rizs között helyezkedik el (Catalán és mtsai, 1995; Catalán és Olmstead, 2000). A kloroplasztisz genom restrikciós helyeit is figyelembe vevő további kutatások alapján a *Brachypodium* génusz a *Pooidae* alcsalád törzsfáján belül a *Triticeae* és *Poaceae* taxonok testvércsoportjának tekinthető (Kellogg, 2001; Döring és mtsai, 2007). 20 különböző, magas szinten kifejeződő gén 11 kb-os homológ szekvenciáinak elemzése szintén alátámasztotta a gabonafélék és a szálkaperje közötti szoros filogenetikai kapcsolatot (1.A ábra, Vogel és mtsai, 2006).

Maga a *Brachypodium* génusz kicsi, nagyjából 20 fajt számlál. Az ide tartozó fajok változatos kariotípussal rendelkeznek ($1n=5,7,8,9$ vagy 10, ahol 'n' a kromoszómák száma). Leírtak közöttük poliploid változatokat, és eltérések tapasztalhatók az egyes fajok között a kromoszómák méretében és morfológiájában is. A nemzetségen belül a *B. distachyon* az egyik legősibb. Divergálása megelőzi legközelebbi fajtársai (*B. arbuscula*, *B. retusum*, *B. rupestre*,

B. phoenicoides, *B. pinnatum*, *B. sylvaticum*) szétválását (1.B ábra, Catalan és mtsai, 2014). Hozzá hasonlóan csak a *B. mexicanum* és a *B. sylvaticum* önbeporzók, de a *B. distachyon* az egyetlen egyéves a nemzetségen belül (Catalán és Olmstead, 2000).



1. Ábra. (A) A *Brachypodium* rokonsági kapcsolatai. A gyökereztetett törzsfá 20, magas szinten kifejeződő gén részleges nukleotid-szekvenciája alapján készült. Az elágazások hossza arányos a szekvenciák divergálásának mértékével. A számok bootstrap értékeket jelölnek. (Vogel és mtsai, 2006) **(B)** A *Brachypodium* génusz rokonsági kapcsolatai a GIGANTHEA (GI) gén szekvenciája alapján (Catalan és mtsai, 2014).

A *B. distachyon* a génusz diploid képviselői közé tartozik, $1n=5$ kromoszómaszámmal, bár a búzához hasonlóan a *B. distachyon* egyes ökotípusai között is léteznek poliploid változatok, ahol a kromoszómák száma $1n=10$ vagy 15 . Az $1n=10$ és $1n=5$ kariotípusú vonalak diploidnak tekinthetők, míg az $1n=15$ kromoszómaszámú vonalak valószínűleg e kettő allotetraploid leszármazottjai (Hasterock és mtsai, 2004), molekuláris vizsgálatok alapján jelenleg három külön fajként kezelik a három eltérő kariotípust (a *B. distachyon* $1n=5$, a *B. stacei* $1n=10$, a *B. hybridum* $1n=15$) (Catalán és mtsai, 2014).

1.1.3 A szálkaperje genomja

A szálkaperje genomjának mérete 272 Mb; alig nagyobb, mint a legkisebb genommérettel rendelkező fűféle, az *Oropetium thomaeum* genomja (244Mb) (Brandham és Bennett, 1995). A *B. distachyon*ról mára már számos genomikai információ rendelkezésünkre áll, beleértve cDNS könyvtárakat, BAC-könyvtárakat, EST- gyűjteményeket, nagy felbontású, részletes

genetikai térképeket és nem utolsó sorban a genom teljes szekvenciáját (Vogel és mtsai, 2010). Az első hozzáférhető információkat a Genebank-ba 2005-ben feltöltött mintegy 20 és félezer EST-szekvencia jelentette, melyhez összesen 6 cDNS könyvtár adatait dolgozták fel, és nagyjából 6000 gén transzkriptumát reprezentálja (Vogel és mtsai, 2006). Később, a genomszekvenálási projekt részeként további 180 ezer EST-szekvenciával bővült az adatbázis (Feuillet és mtsai, 2009).

Az EST- szekvenálásokkal párhuzamosan elkezdődött a BAC-könyvtárak létrehozása is. Összesen hat BAC-könyvtár készült a *B. distachyon* genomból. Ebből kettő a Bd21-es vonal genomját reprezentálja. Közülük a legnagyobb, összesen 184320 klónt számláló, 56x-os lefedettséget biztosító könyvtár is a Bd21-es vonalból született. Nem véletlenül: a különböző ökotípusok és beltenyésztett vonalak között ez az egyik olyan diploid vonal, amely a legkevesebb kromoszómaszámmal rendelkezik ($1n=5$), továbbá a nagyfokú, nyolc generációra visszamenő beltenyésztettség miatt ebben a vonalban igen alacsony a heterozigotitás mértéke (Vogel és mtsai, 2016).

A BAC-kontigok végeinek megszekvenálásával és összeillesztésével 2009-re készült el a *B. distachyon* teljes fizikai térképe. A kapott mintegy 300 Mb-nyi szekvencia - összehasonlítva a rizs genomról ismert adatokkal – arra enged következtetni, hogy a *B. distachyon* genomja 45,9%-os GC-tartalommal rendelkezik, 28%-a repetitív DNS, melyből 11% homológ, 77,3%-a unikális, csak a szálkaperjére jellemző szekvencia, és a genom nagyjából 21%-a alkotja a kódoló régiót (Huo és mtsai, 2006, 2008, 2009; Febrer és mtsai, 2010). A transzpozonok aránya meglehetősen alacsony: a genom 21,4%-át foglalják el retrotranszpozonok (ez az arány rizsben 26%, a cirokban 54%, búzában több mint 80%) (Bennetzen és Kellogg, 1997), 4,77%-át pedig DNS-transzpozonok. Megközelítőleg ugyanekkora arányban vannak jelen DNS-transzpozonok más fűfélék genomjában is (Paterson és mtsai, 2009; Wicker és mtsai, 2009).

A BAC-klónok és ESTk szekvenálásából származó adatok nagyban hozzájárultak a teljes genom szekvencia tökéletesítéséhez. A genomszekvenálás 2007-ben kezdődött el Community Sequencing Program keretein belül. Két év elteltével sikerült nagy pontosságú, 8x-os lefedettségű teljes genom szekvenciát meghatározniuk. A fűfélék között a *B. distachyon* genomja a negyedik, amelyet megszekvenáltak a rizs, a cirok és a kukorica után – és ezzel az első olyan fűféle a *Pooidae* alcsaládon belül, amelynek ismert a teljes genom szekvenciája. A szálkaperje 99,6%-os teljességű genom-szekvenciája a rizs és a lúdfű mellett egyike a legpontosabb és legteljesebb növényi genom-szekvenciáknak (Michael és VanBuren, 2015).

A vizsgálatok eredményeként a *B. distachyon* genomban 25523 fehérjekódoló gént prediktáltak, ami megközelítőleg egy tartományba esik a rizs (28236) és a cirok (*Sorghum bicolor*) (27640) feltételezett fehérjekódoló génjeinek számával (Tanaka és mtsai, 2008; Paterson és mtsai, 2009). Ebből 811 gén (főként transzmembrán receptor kinázok, glikoziltranszferázok, peroxidázok és P450 fehérjéket kódoló gének) sorolható a fűfélék családjára specifikus csoportba (Vogel és mtsai, 2010). A géncsaládok filogenetikai analízise alapján a szálkaperje géncsaládjainak többsége hasonló mértebeli megoszlást mutat a rizs, a cirok és a *Triticae* alcsalád képviselőinek azonos géncsaládjával (Vogel és mtsai, 2010).

A szálkaperje fehérjekódoló génjei közül megközelítőleg 7-8 ezer gén orthológia más fűfélékben, pl. a rizsben, cirokban, búzában és a búza D genomjának ősében, az *Aegilops tauschii*-ban is fellelhető. Az ortológ génpárok 40-45%-a mutat mind elhelyezkedésében, mind sorrendjében teljes konzerváltságot a szálkaperje és a cirok, valamint a szálkaperje és a rizs között (Wang és mtsai, 2012). Ez az arány a szálkaperje és a búza D genomja között 58% (Mayer és mtsai, 2014). A konzerváltnak tekinthető gének magas száma alapján a *B. distachyon* alkalmas modell lehet a fűfélék funkcionális genomikai szempontú kutatásaihoz is.

Bár a genomszekvenálás fókuszában elsősorban a Bd21-es vonal áll, már négy további vonal és két ökotípus teljes genom szekvenciája is ismert: Bd1-1, Bd21-3, Bd3-1, Bd30-1, BdTR12c és Koz-3 (Gordon és mtsai, 2014). Ez a hat variáns morfológiai különbségeken túl jelentős eltéréseket mutat olyan fenotípusos tulajdonságokban, mint pl. a virágzás időpontja, abiotikus stresszhatásokkal szembeni tolerancia, betegségenállóság. A variánsok kiválasztásának elsődleges szempontja az SSR (single sequence repeat) markerek alapján becsült evolúciós távolság volt. E szerint a Bd1-1 az egyik legdivergáltabb a *B. distachyon* variánsok között, a késői virágzású csoportot képviseli. A Bd23-1 és Bd3-1 vonalak állnak genetikailag legközelebb a referenciaként szolgáló Bd21-es vonalhoz, míg a Bd30-1 vonal nagyjából a Bd1-1 és a Bd21 között helyezkedik el divergáltság tekintetében. A BdTRC12 és a Koz-3 ökotípusok habitusukban, fenotípusos jellemzőikben és molekuláris markereik alapján a beltenyésztett vonalaktól eltérő divergálódási csoportot reprezentálnak (Gordon és mtsai, 2014; Tyler és mtsai, 2014).

A kiválasztott variánsok közötti genetikai eltérések alapján a *B. distachyon* ökotípusai közötti genetikai változatosság mértéke nagyságrendileg hasonló a *Medicago truncatula* és az *Arabidopsis thaliana* esetében becsült számokkal (Nordborg és mtsai, 2005; Branca és mtsai, 2011); ugyanakkor nagyobb, mint a rizs, és kisebb, mint a kukorica genetikai polimorfizmusa (Caicedo és mtsai, 2007; Gore és mtsai, 2009). A szálkaperje variánsainak összehasonlító genomikai vizsgálata segíthet a fajon belüli fenotípusos változatosság hátterének

megismeréséhez. Ehhez jelenleg folyamatban van 56 további *B. distachyon* variáns átfogó szekvenálása.

1.1.4 A szálkaperje kutatáshoz nyilvánosan hozzáférhető bioinformatikai források

A fent említett genomikai kutatásokból származó eredmények óriási méretű, folyamatosan növekvő és frissülő adathalmazt jelentenek. A leghasznosabb adatbázisok elérhetőségeit a 2. táblázat foglalja össze (a teljesség igénye nélkül) (Vogel, 2016).

A szálkaperjével kapcsolatos legfontosabb, nyilvánosan is elérhető adatforrások			
Adatbázis	Intézmény	URL	Leírás
Phytozome	DOE Joint Genome Institute	http://phytozome.jgi.doe.gov/	teljes szekvencia- adatbázis, T-DNS inszerciós helyek, genome browser, természetes variánsok (pl. SNP) gyűjteménye, összehasonlító genomikai alkalmazások
BrachyBio	Boyce Thompson Institute for Plant Research	http://bti.cornell.edu/brachybio	TILLING populációk elérhetősége
Brachypodium resources	DOE Joint Genome Institute	http://jgi.doe.gov/our-science/science-programs/plant-genomics/brachypodium/	T-DNS inszerciós vonalak, szálkaperje-vonalak és ökotípusok, protokollok keresztezéshez, mutagenézishez, transzformációhoz
Gramene	Cold Spring Harbor Laboratories	http://gramene.org	összehasonlító genomikai alkalmazások fűfélékre
PlexDB	Iowa State University	http://plexdb.org/	RNAseq és microarray alapú génexpressziós adatok
TILLING database	Unité de Recherche en Génomique Végétale	http://urgv.evry.inra.fr/UTILLdb	TILLING-gyűjtemény
USDA NPGS	USDA	http://www.ars-grin.gov/npgs	szálkaperje-vonalak gyűjteménye

2. Táblázat. (Vogel, 2016)

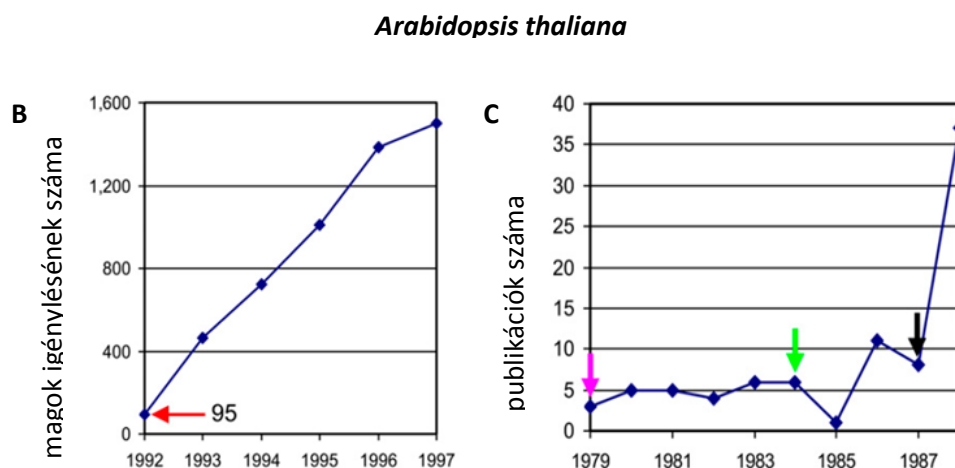
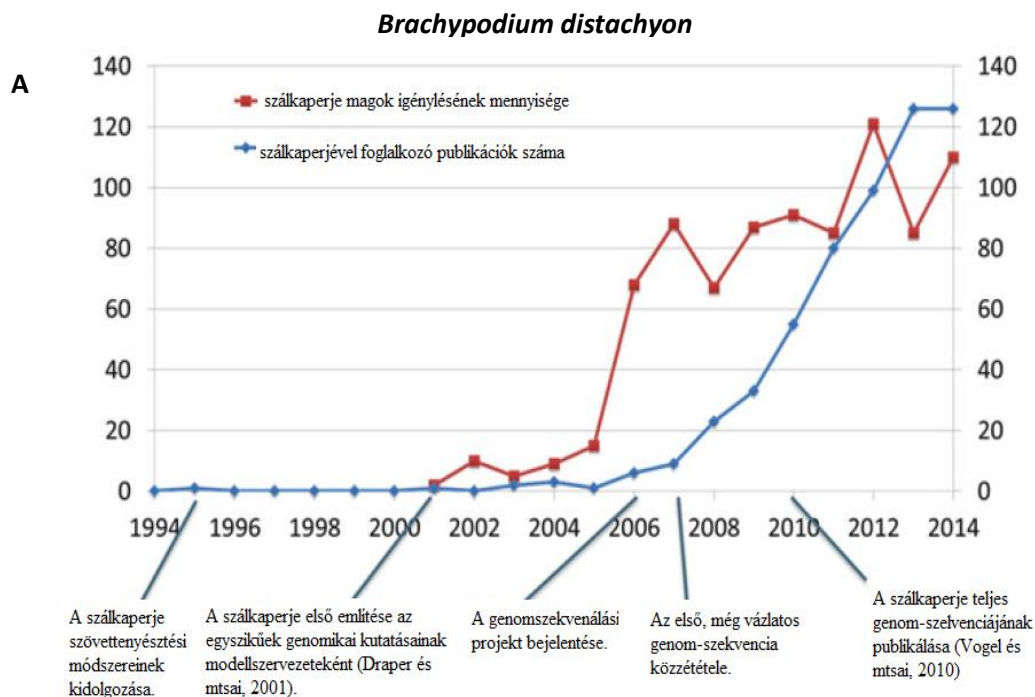
Az eredeti tervek szerint létre kívántak hozni egy, az *Arabidopsis*-kutatások origójának számító TAIR (The Arabidopsis Information Resource) adatbázishoz hasonló egységes adatbázist a szálkaperjéről rendelkezésre álló adatok összegyűjtésére (Huala és mtsai, 2001). Anyagi források hiányában ennek helyét több különböző adatbázis tölti be. Ilyen, leggyakrabban frissülő, átfogó adatbázisok a Phytozome és a Gramene, ahol más növények mellett a szálkaperje teljes összeillesztett genom-szekvenciája, SNP-variánsok, BLAST-portál, T-DNS inszerciós vonalak adatai is megtalálhatók, és *in silico* összehasonlító genomikai analízisekre is lehetőséget nyújtanak.

A szálkaperje hatékony, agrobaktérium közvetítette transzformációjának kidolgozása óta (Pacurar és mtsai, 2008; Vain és mtsai, 2008; Vogel és Hill, 2008) több mint 23 ezer T-DNS inszerciós mutáns érhető el a DOE Joint Genome Institute által. Az eddig azonosított inszerciók összesen 9000 gént érintenek, melyek zöméhez fenotípusos eltérések is köthetők (Bragg és mtsai, 2012). A szálkaperjéből emellett két, kémiai mutagenezissel előállított TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes) -populáció ismeretes (Dalmais és mtsai, 2013). Az egyik, megközelítőleg 6000 vonalat számláló gyűjteményt a franciaországi INRA (<http://urgv.evry.inra.fr/UTILLdb>), a másik, nagyjából 3000 vonallal büszkélkedő kollekción a Boyce Thompson Institute (<http://bti.cornell.edu/brachybio>) hozta létre és gondozza. Bár a mutáns vonalak analízise folyamatban van, de az eddig elemzett mutánsok bármelyik kutatócsoport számára hozzáférhetők.

1.1.5 A szálkaperje jelene és jövője modellorganizmusként

Alig 15 év elteltével tehát mára már rendelkezésünkre állnak BAC-könyvtárak (Hasterok és mtsai., 2006; Huo és mtsai, 2006), genetikai markerek (Vogel és mtsai., 2009), ismert a genom fizikai térképe (Garvin és mtsai, 2009; Gu és mtsai, 2009), és teljes szekvenciája (Vogel és mtsai, 2010; Catalan és mtsai, 2014); sikerrel adaptálták az alapvető molekuláris biológiai módszereket, mutagenezis technikákat, transzformációs eljárásokat (Vain és mtsai, 2008; Vogel és Hill, 2008; Alves és mtsai, 2009) - hogy a szálkaperje modellnövénné válásához szükséges legfontosabb mérföldköveket említsem.

A szálkaperje elfogadottságát modellként jól tükrözi a hozzá kapcsolódó publikációk folyamatosan növekvő mennyisége, valamint a különböző kutatóhelyek által benyújtott *Brachypodium*-igénylések száma (2. ábra; Brkljacic és mtsai, 2011; Vogel, 2016).



2. Ábra. (A) A szálkaperje (*B. distachyon*) magok igényléseinek és a szálkaperjével kapcsolatos publikációk számának alakulása. A magok igénylésének száma a három fő amerikai forráshoz – NPGS, David Garvin valamint John Vogel laboratóriuma - beérkező megrendelések számát jelenti; az Amerikai Egyesült Államokon kívüli, egyéb forrásokból történő rendelések nem szerepelnek a statisztikában. (B) *Arabidopsis* magok rendelésének alakulása az ABRC adatai alapján, az intézmény megalakulását (1992, piros nyíllal jelölve) követő években. (C) Az *Arabidopsist*, mint modellnövényt vizsgáló publikációk száma 1980 és 1990 között, a lúdfü-kutatás korai éveiben. Először 1979-ben használták az embriogenezis folyamatának modellezéséhez (rózsaszín nyíl). 1984-ben ismerték fel a kisméretű genomjában rejlő lehetőségeket (zöld nyíl). 1987-ben használtak először molekuláris biológiai eszközöket (gének pozicionális klónozását) a lúdfü biokémiai, fiziológiai és fejlődésbiológiai folyamatainak megismeréséhez (fekete nyíl). (Brkljacic és mtsai, 2011; Vogel, 2016)

A *Brachypodium*-magok iránti igény jelentősen 2006 után emelkedett meg, a genomszekvenálási projekt bejelentését követően. A magok három fő amerikai forrásának (a National Plant Germplasm System (NPGS), John Vogel valamint David Garvin laboratóriuma) összesített adatai alapján a genomszekvenálási kísérletek kezdetén nagyságrendileg ugyanannyi szálkaperje-magot rendeltek, mint lúdfűből 1992-ben, egy évvel az Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) megalapítását követően. A teljes genom megszekvenálásának híre a szálkaperjével foglalkozó tudományos munkák számát is fellendítette; 2015-ig összesen 417 olyan publikáció született, melynek címében szerepel a „*Brachypodium*” kifejezés, ebből 389 cikk 2010 és 2015 között jelent meg (Vogel és mtsai, 2016).

Csak néhány példa azokra a kutatási eredményekre, melyek ékesen bizonyítják a szálkaperje sokoldalú alkalmazhatóságát modellnövényként: minthogy a *Pooidae* alcsaládon belül a szálkaperje volt az első, melynek genomját teljes mértékben megszekvenálták, az így kapott genomikai információk lehetőséget nyújtottak (és nyújtanak ma is) összehasonlító genomikai analízisre a fűfélék három nagy, gazdaságilag legjelentősebb alcsaládjának képviselői között, egyszersmind betekintést nyerhetünk a fűfélék genomjának evolúciójába is. Habár már korábban feltételezték, hogy a fűfélék evolúciós folyamataiban és a kromoszómák számának alakulásában nagy szerepe volt teljes kromoszómák más kromoszómák centromerikus régiójába történő inszerciójának, ám erre vonatkozó konkrét bizonyítékot elsőként a szálkaperje és a rizs genomjának összehasonlító elemzése adott (Qi és mtsai, 2010).

Hasonlóan jó példa a hosszúnappalos fűfélék virágzási idejét szabályozó folyamatok vizsgálata: az ismert, virágzási időt és vernalizációt szabályozó gének genom szintű összehasonlítása a szálkaperje, a rizs (mint rövidnappalos fűféle) és a lúdfű között utat nyitott a fűfélék és a lúdfű virágzását időzítő mechanizmusok különbségeinek megértése felé (Higgins és mtsai, 2010).

A szálkaperje alkalmasnak bizonyult olyan, kalászos gabonaféléket érintő gombabetegségek patomechanizmusának modellezéséhez is, mint pl. a *Fusarium* fajok okozta üszkösödés vagy a *Puccinia graminis* okozta feketerozsda (Peraldi és mtsai, 2011; Figuerosa és mtsai, 2013). Ígéretes eredmények születtek szálkaperje felhasználásával az abiotikus stresszorokra adott válaszok molekuláris hátterének megismerése kapcsán is, mint pl. a mérsékelt övi fűfélék alacsony hőmérséklethez történő adaptációját elősegítő gének evolúciójának vizsgálata (Vigeland és mtsai, 2013).

Végül, de nem utolsós sorban a szálkaperje alkalmas a fűfélék szervfejlődési folyamatainak és egyedfejlődésének modellezéséhez is, különös tekintettel a gyökérarchitektúra

kialakulásának tanulmányozására (Watt és mtsai, 2009), a gyökérzet biotikus (pl. *Rhizoctonia*-fertőzés) és abiotikus stressz hatásokra (pl. tápanyaghiány, szárazság) adott válaszfolyamatainak és auxin-homeosztázisának vizsgálatára (Pachecho-Villalobos és mtsai, 2013; Schneebeli és mtsai, 2015), valamint a gyökérzet és az arbuszkuláris mikorrhiza-gombák közötti szimbiotikus kapcsolatok tanulmányozására (Hong és mtsai, 2012).

A jövőbeni kutatások jelentős része a szekvenálásokból nyerhető átfogó adatok bővítése felé mutat. Többek között szerepel a *Brachypodium*-variánsok közötti fenotípusos eltérésekért felelős genetikai különbségek beazonosítása további teljes genom szekvenálásokkal. Hasonlóan nagy projekt a szálkaperje génexpressziójának számos szövettípusra, stresszkörülményre és fejlődési állapotra vonatkozó RNS-szekvenálás alapú vizsgálata, lehetővé téve a microarray alapú kutatásokból származó nagy mennyiségű expressziós adatot pontosítását (Priest és mtsai, 2014) és az alternatív splice-variánsok azonosítását (Walters és mtsai, 2013; Mandadi és Scholthof, 2015). Intenzíven kutatják a szálkaperjében fellelhető mikroRNS-eket is. Alacsony hőmérsékletre (Zhang és mtsai, 2009) vagy vízhiányos körülmények között aktiválódó mikroRNS-ek (Budak és mtsai, 2011; Bertolini és mtsai, 2013), reprodukív folyamatokban részt vevő kis RNS-ek (Wei és mtsai, 2009) jelentős része, valamint néhány szövet specifikus mikroRNS (Jeong és mtsai, 2013) már ismertek. A genomikai kutatások következő lépcsőfokát a funkcióval bíró, de fehérjét nem kódoló genetikai elemek szerepének feltárása jelenti. Ezzel a céllal kezdték el a humán, egér és *Drosophila* ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) projekteket (ENCODE Project Consortium, 2012), és ezzel a céllal hívta életre a DOE/USDA a *Brachypodium* ENCODE projektet. Ez az első, hivatalosan is bejelentett ilyen kezdeményezés a növények között (Lane és mtsai, 2013).

A fentiek alapján látható, hogy a szálkaperje rövid idő alatt lett elfogadott és széles körben használt egyszikű modellnövény, kutatása pedig intenzíven bővül. A fellendülés elsősorban a kivételesen pontos teljes genom szekvenciának köszönhető. Többek között mi is ennek okán választottuk a szálkaperjét, mint modellnövényt egy olyan, csak növényekben előforduló transzkripciós faktor család összehasonlító genomikai analíziséhez, melyről még kétszikűekben is csak keveset tudunk.

1.2 A LOB-domain transzkripciós faktor család

Az LBD (Lateral Organ Boundaries Domain) transzkripciós faktorokat, mint csak növényekben előforduló, oldalszervek képződését irányító fehérjecsalcént írták le még a 2000-es évek elején (Shuai és mtsai, 2002). Közös jellemzőjük egy igen konzervált szerkezeti motívum, a LOB (Lateral Organ Boundaries) domain, mely a transzkripciós faktorokra jellemző alapvető funkciókért (DNS-kötés és fehérjékkel való kölcsönhatás) felelős. Feltételezhető, hogy a szervhatárok kijelölésével és fenntartásával játszanak kulcsfontosságú szerepet a növényi egyedfejlődésben. Számos, a legkülönbözőbb fejlődési folyamatokban – embriogenezisben, gyökér- és levélfejlődésben, virág- és remésképzésben – rendellenes mutáns fenotípus ismeretes, mely összefüggésbe hozható az LBD géncsaláddal. Ebben a fejezetben bemutatásra kerülnek általános jellemzőik és sokrétű funkciójuk.

1.2.1 Határvonalak a növényi egyedfejlődésben

Az LBD család elnevezése beszédes: arra utal, hogy az ide tartozó fehérjék főként a merisztémák és a belőlük kifejlődő oldalszervek határán aktívak. Az osztódóképes szöveti régiókat és a már differenciálódott szervezkezményeket egymástól elválasztó sejtek nélkülözhetetlenek az új szervek képződésének precíz időbeni és térbeli koordinációja szempontjából (Aida és Tasaka, 2006). Az általuk kialakított választóvonal már az organogenezis korai szakaszában megjelenik, szerepük azonban jóval több egy egyszerű fizikai határ megteremtésénél és fenntartásánál. Egyrészt elhatárolják a különböző sejtcsoportokat, pl. a levélkezdemények érett sejtjeit a hajtás apikális merisztéma sejtjeitől, ugyanakkor a közöttük lévő kapcsolat megteremtéséért is felelősek, amely fontos a merisztémák pluripotenciáját biztosító mikrokörnyezet kialakításához és a differenciálódott sejtek determinált állapotának fenntartásához (Rast és Simon, 2008).

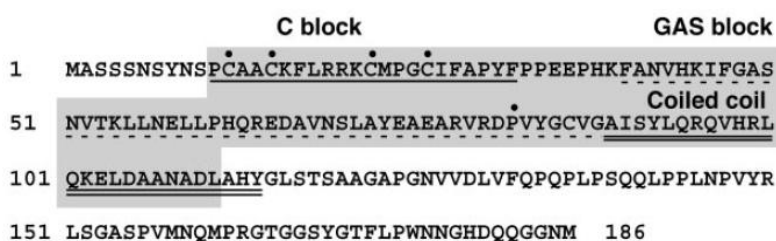
Bár határvonalakat kialakító sejtek a magasabb rendű növények szervezetének számtalan különböző pontján fellelhetők (pl. oldalhajtások, oldalgyökerek, levél- és virágkezdemények stb. határán), alapvetően mégis ugyanazokkal a közös tulajdonságokkal jellemezhetők, elhelyezkedésüktől függetlenül: ritkán osztódnak, növekedésük lassú, amelyet a növekedést serkentő növényi hormonok, az auxin és a brasszinoszteroidok lokálisan alacsony koncentrációja biztosít (Gendon és mtsai, 2012). Továbbá környezetüktől markánsan eltérő, egyedi génexpressziós mintázattal rendelkeznek. A csak itt működő gének jelentős része konzervált funkciójú transzkripciós faktor, melyek eddig még kevésbé ismert, egymással szorosan összefüggő szabályozási hálózatokon keresztül irányítják a szervhatárok kialakulását

és fenntartását. Hiányukban egymással fuzionált oldalszervek, abnormális sejtosztódási események és aberráns fejlődési formák alakulnak ki (Breuil-Boyer és mtsai, 2004, Aida és Tasaka, 2009).

Az *Arabidopsis* végzett eddigi kutatások alapján a legismertebb, szervhatárokat kijelölő transzkripciós faktorok a NAM (NO APICAL MERISTEM), CUC (CUP SHAPED COTYLEDON), LAS (LATERAL SUPPRESSOR), LAF (LATERAL ORGAN FUSION) és RAX (REGULATOR OF AXILLARY MERISTEM) családok tagjai (Aida és mtsai, 1997; Aida és Tasaka, 2006). Ilyen, a határvonalakat kialakító sejtek működésében központi szerepű géncsaládként fedezték fel az LBD géneket is.

1. 2.2 Az LBD transzkripciós faktorok szerkezete

Az LBD-fehérjék egy jellegzetes, N-terminálison elhelyezkedő motívum, a LOB (Lateral Organ Boundary)-domain alapján ismerhetők fel. A nagyjából 100 aminosav hosszú struktúra három nagy szerkezeti egységből épül fel. Tartalmaz egy meglehetősen konzervált, négy cisztein-reziduusból (C) álló egységet (CX₂CX₆CX₃C), ahol a ciszteinek mellett álló aminosavak (X) variábilisak, de a számuk meghatározott. Feltehetőleg ez a régió rendelkezik DNS-kötő aktivitással. Mellette helyezkedik el az ismeretlen funkciójú, központi glicin-alanin-szerin motívummal rendelkező GAS-blokk. A LOB-domain utolsó eleme egy leucin-zipper-szerű motívum (LX₆LX₃LX₆L), amely valószínűsíthetően fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításáért felelős. (3. ábra, Shuai és mtsai, 2002).



3. ábra Az elsőként beazonosított LBD fehérje, az *Arabidopsis* LOB (At5g63090) teljes aminosav-szekvenciája. A családra jellemző domain-struktúra szürke háttérrel, a konzervált motívumok aláhúzással kerültek kiemelésre. A fekete pontok a konzervált cisztein és prolin aminosavak pozícióját jelölik. (Shuai és mtsai, 2002)

Kölcsönható partnereikről ugyan még keveset tudunk, de leírtak már homodimerizációra való képességet néhány LBD esetében (Majer és mtsai, 2012; Lee és mtsai, 2013), és néhány LBD-fehérjék közötti heterodimerizációs kapcsolat is ismert, mint pl. az AtLBD10-AtLBD27

(Kim és mtsai, 2015), AtLBD18-AtLBD33 (Berckmans és mtsai, 2011), AtLBD30-AtLBD6 (Rast és mtsai, 2012) párok.

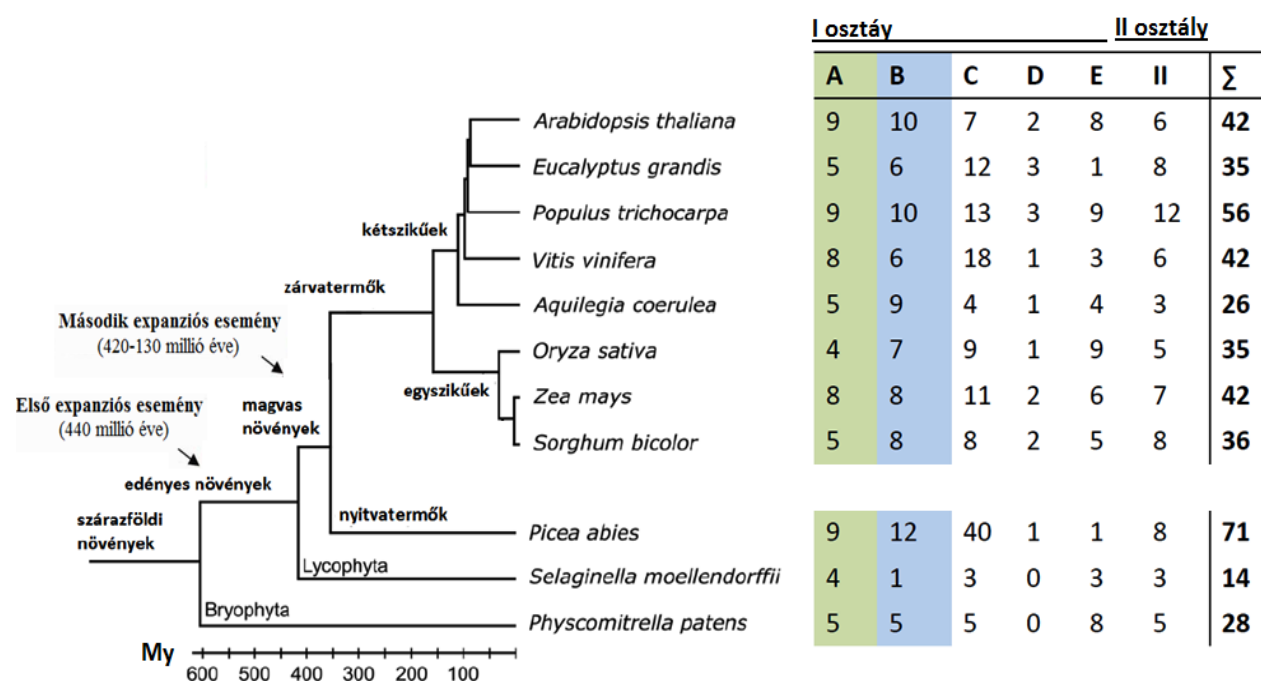
A fehérjék LOB-domain motívumon kívül eső, C-terminális felőli vége viszont meglehetősen variábilis, valószínűleg a célgének transzkripciójának szabályozásában vesz részt. Az azonban nem egyértelmű, hogy transzkripciót aktiváló vagy represszáló szerepe van-e (Liu és mtsai, 2005). A DNS-kötő motívum megléte és a sejtmagi lokalizáció alapján is megjósolható az LBD proteinek elsődleges szerepe: transzkripciós faktorok. Biokémiai funkciójukat elsőként *Arabidopsis*-ban igazolták. Kimutatták, hogy az AtLOB specifikusan kötődik az 5' – GCGGCG – 3' DNS-szekvenciához, és affinitását csökkenti a bHLH 048 (basic helix-loop-helix) transzkripciós faktorról való kölcsönhatás (Husbands és mtsai, 2007).

1.2.3 Az LBD transzkripciós faktorok evolúciós eredete és filogenetikai kapcsolatai

LBD transzkripciós faktorok szinte minden növényfajban megtalálhatók, változó számban. Példának okáért a mohák (*Bryophytae*) közé tartozó *Physcomytrella pratensis*-ben 26, a korpafüvek (*Lycophytae*) közé tartozó *Selaginella moellenderfii*-ben 11, míg a zárvatermők közül borszőlőben (*Vitis vivifera*) 42, *Populus trichocarpaban* 54, rizsben 35, lúdfüben és kukoricában 43 LBD fehérjét kódoló gént azonosítottak. A *Charophytae* algák azok az evolúciós szemszögből legősibb fajok, ahol már megtalálható legalább egy, LBD jellegű szekvencia. Ezek alapján feltételezhető, hogy igen ősi, nagyjából 1,2 milliárd évvel ezelőtt létrejött géncsaládról van szó, mely az évmilliók alatt fokozatos gyarapodáson ment keresztül (4. ábra, Coudert és mtsai, 2012). Valószínűsíthető, hogy az első ilyen expanziós esemény több mint 440 millió évvel ezelőtt következett be a mohák és a korpafüvek divergálását megelőzően. Ez az esemény nagy szerepet játszhatott a növények teresztris, szárazföldi életmódhoz való alkalmazkodását lehetővé tévő molekuláris szabályozási hálózatok evolúciójában (McCourt és mtsai, 2004; Bowman és mtsai, 2007). A második, LBD géneket is érintő expanziós esemény időpontja bizonytalan, de feltehetően az edényes növények megjelenését (420 millió éve) követően, de még az egyszikűek és kétszikűek divergálását (130 millió éve) megelőzően következett be (Cleal és Thomas, 2009; Willis és McElwain, 2014).

Szekvencia hasonlóság alapján a LOB-domain fehérjék két nagy csoportba sorolhatók: az egyik csoport (I-es típus) leucin-zipperhez hasonló motívuma teljes, tartalmazza mind a négy konzervált leucint. A másik csoport tagjai (II-es típus) leu-zip motívuma hiányos, feltehetően nem alkalmas fehérjék közötti coiled-coiled kölcsönhatások kialakítására (Mayer és Hochholdinger, 2011). Az LBD fehérjék többsége az I-es típusba tartozik (fajon belül

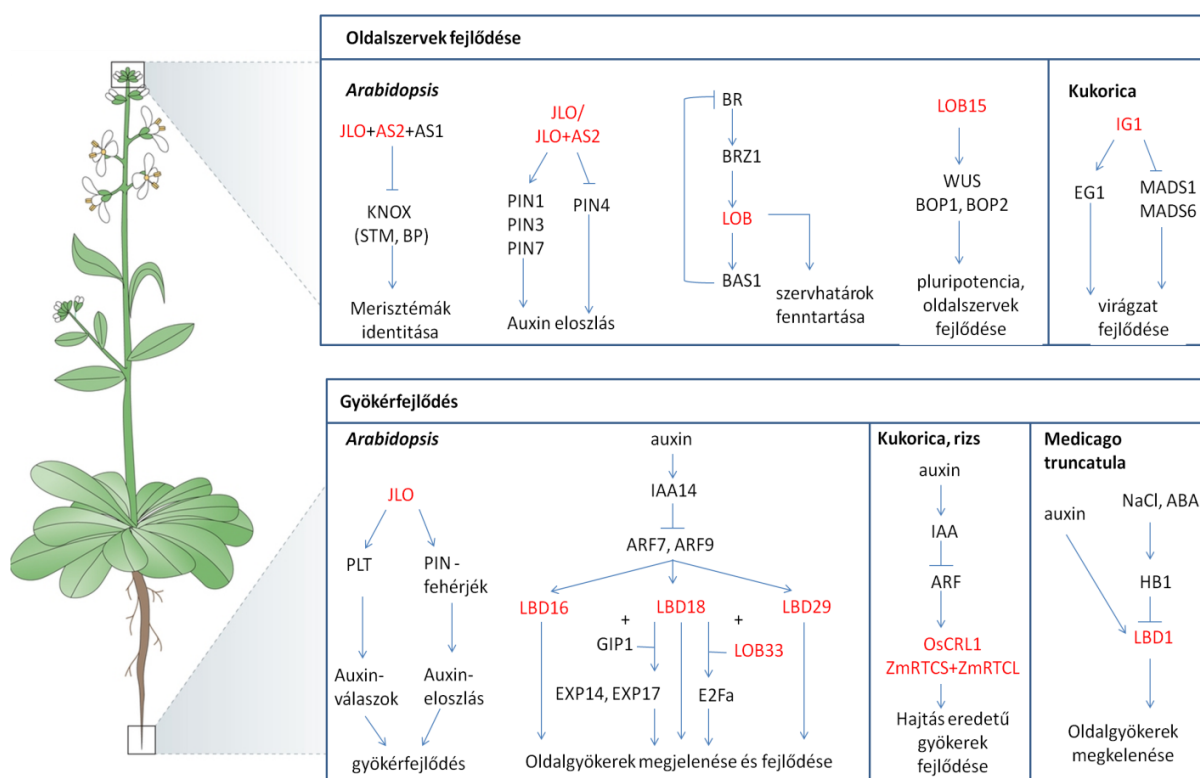
átlagosan az LBD-k 4/5-e). Rokonsági viszonyaik szerint az I-es osztály fehérjéi további öt alosztályra (A-E) bonthatók. Ez a beosztás már a moháknál is megfigyelhető, vagyis az LBD gének diverzifikációja már korán, a soksejtes növények megjelenése idején (több mint 400 millió éve) végbemehetett. Bár az alcsaládok száma alig változott az azóta eltelt évmilliók alatt, az egyes alcsaládok mérete számottevően növekedett a virágos növények kialakulásával párhuzamosan (Chanderbali és mtsai, 2015). Ugyan az egyes alcsaládokhoz eddig nem sikerült egyértelmű funkciót társítani, feltételezik, hogy az alcsaládok diverzifikációja fontos szerepet játszott a hajtásos növényekre jellemző komplex struktúrák, pl. a gyökérarchitektúra és hajtásrendszer kialakulásában.



4. Ábra Az LBD transzkripciós faktorok evolúciójának vázlata. Az ábrához tartozó filogenetikai fa sematikusán reprezentálja a LOB-domain fehérjék eredetének rekonstruálásához használt fajok rokonsági kapcsolatait, valamint jelölésre kerültek az LBD fehérjék szempontjából fontos evolúciós események. A törzsfán feltüntetett kládok divergálásának becsült ideje a törzsfához tartozó idővonalon szerepel, millió években (My). A táblázatban a feltüntetett fajokban azonosított LBD fehérjék összesített száma (Σ), valamint családonkénti megoszlása található. A zöld színnel kiemelt "A" alcsalád elsősorban a levélfejlődés, a kék színnel kiemelt "B" alcsalád a gyökérfejlődés irányításában tölt be fontos szerepet (Coudert és mtsai, 2012; Kong és mtsai, 2017).

1.2.4 Az LBD transzkripciós faktorok szerepe a növények egyedfejlődésében

Ugyan az irodalmi adatok zöme lúdfüvel végzett kísérletekből származik (és az ott található LBD gének alig harmadát sikerült eddig részletesen jellemezni), szerteágazó funkciójuk a csírázástól a termésképzésig számos esetben igazolódott. Néhány, egyszikűekre (rizsre és kukoricára) vonatkozó kutatás alapján az eddig feltárt funkciók konzerválóknak tűnnek. A megértést segítő 5. ábra szemlélteti az eddig feltárt kapcsolatokat, az ismert funkcióval rendelkező LBD transzkripciós faktorokat pedig a 3. táblázat foglalja össze.



5. ábra. Az LBD transzkripciós faktorok részvételével irányított molekuláris mechanizmusok. Az LBD fehérjék pirossal vannak rövidítve. A pozitív szabályozási kapcsolatokat nyíl, a negatív kapcsolatokat zárt vonal jelöli. A feltüntetett fehérjék közötti interakciók „+” jellel vannak feltüntetve. Rövidítések: ABA- abscizinsav, ARF – auxin rezponzív faktorok, AS1/2 – ASYMMETRIC LEAVES1/2, BAS1 – PHYTOCHROME B ACTIVATION TAGGED SUPPRESSOR1, BOP1- BLADE.ON PETIOLE1, BP – BREVIPEDICELLUS, BR – brasszinoszteroid, BRZ1- BRASSINAZOLE-RESISTANT1, CRL1- CROWN ROOTLESS1, EG1- EXTRA GLUME1, HB1- HOMEODOMAIN-ZIP1, IAA- indol acetic acid (auxin) induced protein, IG1-INDETERMINATE GAMETOPHYTE1, JLO- JAGGED LATERAL ORGAN, KNOX- CLASS –I KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN TRANSCRIPTION FACTOR, PIN- PIN-FORMED, PLT- PLETHORAL, RTCL- RTCS-LIKE, RTCS- ROOTLESS CONCERNING CROWN AND SEMINAL ROOT, STM- SHOOT MERISTEMLESS, WUS- WUSCHEL. (Xu és mtsai, 2016)

gén	azonosító	alcsalád	funkció	referencia
<i>Arabidopsis</i>				
AtLOB	At5g63090	I osztály/ A	levélfejlődés	Shuai és mtsai, 2002
AtLBD6/AS2	At1g65620	I osztály/ A	levélfejlődés	Semiarti és mtsai, 2001
AtLBD10	At2g23660	I osztály/ A	pollenképződés	Kim és mtsai, 2015
AtLBD16	At2g42430	I osztály/ B	gyökérfejlődés, in vitro regeneráció	Goh és mtsai, 2012 Fan és mtsai, 2012
AtLBD18	At2g45420	I osztály/ B	gyökérfejlődés, in vitro regeneráció	Lee és mtsai, 2009 Fan és mtsai, 2012
AtLBD20	At3g03760	I osztály/ B	<i>Fusarium oxysporum</i> rezisztencia	Thatcher és mtsai, 2012
AtLBD29	At3g58190	I osztály/ B	gyökérfejlődés, in vitro regeneráció	Okushima és mtsai, 2007 Fan és mtsai, 2012
AtLBD30/JLO	At4g00220	I osztály/ B	embriogenezis, gyökérfejlődés, virágfejlődés	Bureau és mtsai, 2010 Rast és Simon, 2012 Borghi és mtsai, 2007
AtLBD3	At1g16530	I osztály/ C	virágfejlődés	Naito és mtsai, 2007
AtLBD15	At2g40470	I osztály/ C	SAM funkciójának fenntartása	Sun és mtsai, 2013
AtLBD12	At2g30130	I osztály/ D	levélfejlődés	Nakazawa és mtsai, 2003
AtLBD27/SCP	At3g47870	I osztály/ E	pollenképződés	Oh és mtsai, 2010
AtLBD36	At5g66870	II osztály	metabolikus folyamatok	Rubin és mtsai, 2009
AtLBD37	At5g67420	II osztály	metabolikus folyamatok	Rubin és mtsai, 2009
AtLBD38	At3g49940	II osztály	metabolikus folyamatok	Rubin és mtsai, 2009
AtLBD39	At4g37540	II osztály	metabolikus folyamatok	Rubin és mtsai, 2009
AtLBD40	At1g67100	II osztály	metabolikus folyamatok	Zentella és mtsai, 2007
Kukorica				
RA2	AC233943.1	I osztály/ A	virágfejlődés	Bortiri és mtsai, 2006
IG1	Zm2g118250	I osztály/ A	virágfejlődés	Evans és mtsai, 2007
RTCS	Zm2g092542	I osztály/ B	gyökérfejlődés	Taramino és mtsai, 2007
RTCL	AC148918.2	I osztály/ B	gyökérfejlődés	Xu és mtsai, 2015
RTCN	Zm2g092483	I osztály/ B	gyökérfejlődés	Taramino és mtsai, 2007
Rizs				
AS2	Os01g66590	I osztály/ A	levélfejlődés	Ma és mtsai, 2009
ARL1/CRL1	Os03g05510	I osztály/ B	gyökérfejlődés	Inukai és mtsai, 2005
DH1	Os02g57490	I osztály/ B	virágfejlődés	Li és mtsai, 2008
LBD7-1/ LBD37	Os07g40000	II osztály	metabolikus folyamatok	Albinsky és mtsai, 2010

3. Táblázat. Az *Arabidopsis*-ban, kukoricában és rizsben funkcionálisan is jellemzett LBD gének.

Amint az látható, nehéz átfogó képet alkotni a LOB-domain fehérjéről, hiszen szerepük a növényi egyedfejlődés legkülönbözőbb aspektusaiban tetten érhető. A következőkben három nagy szervcsoport, a levelek, a gyökér és a generatív szervek kialakulása köré csoportosítva mégis kísérletet teszünk funkciójuk, ha nem is teljes, de részletes bemutatására.

1.2.4.1 A levélfejlődés és az LBD transzkripciós faktorok kapcsolata

A család elsőként felfedezett tagja, az AtLOB kifejezetten az oldalszervek eredési helyén, az adaxiális felszínen expresszálódik, összefüggésben a levélfejlődés korai stádiumával. Működését a SHOOT MERISTEMLESS (STM) és a BREVIPEDICELLUS (BP) transzkripciós faktorok együtt szabályozzák, lehetővé téve, hogy az AtLOB génjének kifejeződése az őssejtek és a fejlődő levélprimordiumok közötti szűk sejtrétegre korlátozódjon (Dolan és Langdale, 2004). Bár az általa irányított folyamatok kevésbé ismertek, egyik bizonyítottan fontos feladata a brassinoszteroid-koncentráció alacsony szintjének szabályozása, negatív visszacsatolós (feed-back) mechanizmusokon keresztül (Bell és mtsai, 2012). Az AtLOB transzkripciója ugyanis fokozódik brassinoszteroid-jelátvitel egyik kulcsregulátora, a BRZ1 (Brassinazole Resistant1) által. Az AtLOB ugyanakkor közvetlenül aktiválja egy olyan citokróm P450 típusú enzim, a BAS1 (PHY-B ACTIVATION TAGGED SUPPRESSOR) génjét, melynek terméke gátolja a brassinoszteroid szignál-transzdukcióját és sejten belüli akkumulációját (Neff és mtsai, 1999). Az ily módon alacsonyan tartott brassinoszteroid-koncentráció nélkülözhetetlen a szervkezdemények differenciálódásához, nemcsak a levelek, hanem az oldalhajtások fejlődése szempontjából is (Gendron és mtsai, 2012). Jól mutatja ezt, hogy AtLOB hiányában aszimmetrikus levelek kialakulásán túl oldalhajtások képződését érintő aberrációk is megfigyelhetők (Bell és mtsai, 2012).

Az AtLOB-hoz hasonlóan az AtLBD6 is a szimmetrikus levélmorfológia kialakításában vesz részt. Hiányában számos fenotípusos eltérés jelentkezik a leveleken: a levéllemez általában szeldelt, széle csavarodott, dorzovenetrális szimmetriája nem felismerhető, a levelek erezete pedig rendezetlen, destrukturált (Semiarti és mtsai, 2001). A fenotípusos eltéréseket még az LBD géncsalád felfedezése előtt leírták, és az ezért felelős AtLBD6 gént mint aszimmetrikus levélmorfológiát okozó AS2 (ASYMMETRIC LEAVES2) gént írták le. Ezt az elnevezés a géncsalád későbbi nevezéktanában is visszaköszön: az LBD génekre a szakirodalomban szinonimaként használják az ASL (ASYMMETRIC LEAVES LIKE) kifejezést, és az LBD-nomenklatúrához hasonlóan számokkal különítik el a család egyes tagjait. A kettős nevezéktan azonban félrevezető lehet: egyrészt a számozás nem esik egybe a két nevezéktanban, másrészt az AS1 sorszámú, elsőként jellemzett ASYMMETRIC LEAVES

gén valójában nem LBD-transzkripció faktor, hanem a MYB (Myeloblast) transzkripció faktorok családjába tartozó proteint kódol. Az viszont már nem véletlen, hogy az elnevezésük hasonló, hiszen az AtLBD6 és az AtAS1 hiánya hasonló fenóípussal jár (Bryne és mtsai, 2000). Ez sem véletlen: az AtLBD6/AS2 ugyanis kölcsön hat az AtAS1 proteinnel. Közös komplexben végzik a merisztéma sejek identitását meghatározó transzkripció faktorok, pl. a KNOX (KNOTTED LIKE HOMEODOMAIN) családba tartozó STM (SHOOT MERISTEMLESS) és BP (BREVIPEDICELLUS) génjeinek tartós represszálasát, mégpedig a HIRA kromatin remodelling komplex közvetítésével; így tartva determinált stádiumban a levél differenciálódott sejtjeit (Ori és mtsai, 2000; Lin és mtsai, 2003; Iwakawa és mtsai, 2007). A hajtás apikális merisztémájában (SAM- shoot apical meristem) paradox módon az STM transzkripció faktor mind az AtAS1, mind az AtLBD6/AS2 kifejeződését gátolja, ám a SAM és a fejlődő levélkezdemény határán olyan szövetspecifikus transzkripció faktorok, mint a BOP1 (BLADE ON PETIOLE) és BOP2, közvetlenül aktiválják egyebek mellett mind az AtAS1, mind az AtLBD6/AS2 és AtLOB gének kifejeződését. A BOP1 a levélfejlődés későbbi szakaszaiban is fenntartja ezeknek a géneknek a magas szintű expresszióját a levél adaxiális oldalán és a szállítószövetek mentén, és úgy tűnik, hogy ezzel a szabályozási mechanizmussal a BOP1 és BOP2 a levél organogenezisének kulcsfontosságú lépéseit irányítják (Jun és mtsai, 2010).

Az AtLBD6/AS2 feltételezhetően szerepet játszik a miR165/166 mikro RNS poszttranszkripció érésében is. Ez a mikroRNS a levelek abaxiális oldalán fejeződik ki, és az adaxiális oldal identitását meghatározó 3-as típusú homeodomain leu-zip (HD-ZIP) transzkripció faktorok mRNS-eit csendesíti (Williams és mtsai, 2005). Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy az AtLBD6/AS2 további, eddig még ismeretlen funkciókkal és célgénekkel is rendelkezik (Ikezaki és mtsai, 2010).

Az LBD transzkripció faktorok közötti szövevényes kapcsolatokat jól mutatja, hogy a már említett BOP1 és BOP2 géneket és más, SAM identitását meghatározó transzkripció faktorok, pl. a WUS (WUSCHEL) gének kifejeződését egy másik LBD, az AtLBD15 aktiválja (Sun és mtsai, 2013). Az AtLBD15 közvetlen célgénjei között számos cellulóz szintézist végző enzim génje is megtalálható, ezeket viszont represszálja, így biztosítva a pluripotens sejtekre jellemző, differenciálódott sejtekénél rugalmasabb sejttel kialakítását (Zhu és mtsai, 2014).

A fent ismertetett szabályozási folyamatok ugyanakkor nemcsak az *Arabidopsis*ra igazak: kukoricában az AtAS1 ortológja, a ROUGH SEATH2 (RS2) ugyanúgy kölcsön hat a HIRA-kompleksszel valamint a kukorica IG1 (INDETERMINATE GAMETOPHYTE1) fehérjéjével,

mely az AtLBD6/AS2 legközelebbi megfelelője kukoricában; és ugyanúgy KNOX gének represszálasát végzik a levélprimordiumokban (Phelps-Durr és mtsai, 2005), mint lúdfű esetében az AtLBD6/AS2. Vagyis annak ellenére, hogy a lúdfű és a kukorica levelének struktúrája markánsan eltér egymástól, kialakulását mégis hasonló, konzervált mechanizmusok irányíthatják.

1.2.4.2. A virágfejlődés és az LBD transzkripció faktorok kapcsolata

Az LBD transzkripció faktorokra jellemző pleiotróp funkciókat jól példázza, hogy az AtLBD6/AS2 szerepet játszik a virágfejlődésben is. Akárcsak a levélben, a fejlődő virágkezdemények esetében is csak az adaxiális oldalon expresszáldik. Az AtAS1 transzkripció faktorral és egy cink-ujj fehérjével (JAGGED - JAG) közösen biztosítja virágszervek határát kijelölő sejtek identitását. Az *as2 jag* és az *as1 jag* géneket érintő kettős mutációt hordozó növényekben fokozottan expresszáldnak a határsejtekre jellemző CUC1, CUC2 (CUP SHAPED COTYLEDON) és PTL (PETAL LOSS) gének, fenotípusosan pedig kicsi szírom- és csészelevelekkel rendelkeznek. Ez a tulajdonság az *as1 jag ptl* tripla mutációval vagy az *as1 jag cuc1 cuc2* négyszeres mutációjával menekíthető, amely arra enged következtetni, hogy a virágprimordiumokban a szervhatárokat specifikus gének repressziója jelöli ki a csészelevelek és szíromlevelek közötti határokat (Xu és mtsai, 2008). Egy másik LBD gén, az AtLBD36/ASL1 terméke valószínűleg az AtLBD6-tal részben redundáns funkciót tölt be ebben a folyamatban (Calfun-Junior és mtsai, 2005).

Kukoricában és rizsben az AtLBD6/AS2-vel ortológ szerepet betöltő IG1 (INDETERMINATE GAMETOPHYTE1) az AtLBD/AS2-höz hasonlóan szerepet játszik a levélszimmetria kialakításán túl a női gametofiton fejlődésének irányításában is, de más mechanizmusokon keresztül (Evans, 2007). Célgénjei elsősorban olyan MADS-boksz transzkripció faktorok, mint a MADS1/AGAMOUS és MADS6, melyek a virágszervek identitását biztosítják. Ezen gének represszálasa, valamint a jázmonát bioszintéziséért felelős EG1 (EXTRA GLUME1) génjének aktiválása révén tartja az IG1 indeterminált állapotban a virágmerisztéma sejtjeit. Hiányában levélmorfológiai eltérések mellett az embriózsák sejtek abnormális fejlődése tapasztalható, ami a belőlük képződő reproduktív szervek és a teljes termőtáj rendellenességeit vonja maga után (Zhang és mtsai, 2015).

Egy másik, szintén a kukoricából ismert LBD gén, amely a virágfejlődésben játszik szerepet, a Ramosa2 (RA2), az AtLOB ortológja. Kifejeződése csak a virágzat iniciális régiójában, az axilláris merisztémákra korlátozódik. Mutációja aberráns virágzatot

eredményez: a címeres virágzat szerteágazó, és a termős virágzatból fejlődő csőben a szemek elhelyezkedése is abnormalis. Bár az általa irányított folyamatok kevésbé ismertek, feltehetően az axilláris merisztémák növekedésének korlátozásában vesz részt (Vollbrecht és mtsai, 2005; Bortiri és mtsai, 2006). Azt, hogy funkciója mennyiben azonos a lúdfűben megtalálható orthológjával, még nem vizsgálták.

A RA2 rizsben megtalálható legközelebbi rokona, a DEGENERATED HULL (DH1) szintén a virágzat fejlődését szabályozza: hiányában a pelyvalevelek fejletlenek, a bibék és a porzók fedetlenek. Maga a gén csak az axilláris bimbókban, a fejlődő bugában és a fiatal virágokban aktív, kifejeződése a generatív szervekérésével egyre csökken (Li és mtsai, 2008).

1.2.4.3 Az LBD transzkripció faktorok és a gyökérfejlődés kapcsolata

Az LBD transzkripció faktorok egy maroknyi csoportja (összesen öt LBD: az AtLBD16, AtLBD17, AtLBD18, AtLBD29 és AtLBD33, mind a B alcsalád tagjai) az auxin által indukált gyökérfejlődési folyamatokért felelős (Okushima és mtsai, 2007; Lee és mtsai, 2009; Matsumura és mtsai, 2009). *Arabidopsis*-ban az egyik legjobban jellemzett auxin által kiváltott gyökérfejlődési folyamat az oldalgyökerek képződése. Lúdfűben az oldalgyökerek kialakulásának első lépéseként a protoxilém szomszédságában elhelyezkedő periciklusban található kompetens sejtek (periciklus iniciális sejtek) auxin hatására előbb aktiválódnak, amelyet a sejtek polarizációja jelez. Az aktiválódott sejtek aszimmetrikus osztódásával egy kisméretű központi és egy nagyobb, szélső utódsejt keletkezik. Az utódsejtek folyamatos osztódással alakítják ki a fejlődő oldalgyökér primordiumát (De Smet és mtsai, 2007; Fukai és mtsai, 2007; Benková és Bielach, 2010).

Molekuláris szinten a magas auxin koncentráció az auxin jelátvitel effektor transzkripció faktorait gátló IAA14 (INDOL-ACETIC ACID INDUCED PROTEIN) gyors degradációját eredményezi, lehetővé téve az ARF (AUXIN RESPONSE FACTOR) transzkripció faktorok, elsősorban az ARF7 és ARF19 aktiválását. Az általuk irányított gének végső soron a periciklus iniciális sejtek osztódásához, és egy új oldalgyökér megjelenéséhez járulnak hozzá (Péret és mtsai, 2009). Az ARF transzkripció faktorok által közvetlenül aktivált gének közé tartoznak az AtLBD16, 18 és 29 gének (Okushima és mtsai, 2007; Lee és mtsai, 2009; Feng és mtsai, 2012). A közös szabályozás ellenére az általuk kódolt LBD fehérjék szerepe más és más. Az AtLBD16 az oldalgyökerek eredési pontján a periciklus sejtek aszimmetrikus osztódását irányítja ott, ahol kellően magas koncentrációban akkumulálódik az auxin (Goh és mtsai, 2012). Az AtLBD29 inkább a periciklus iniciális sejtek kompetenciájának fenntartásáért

felelős (Feng és mtsai, 2012). Az AtLBD18 pedig nemcsak az utódsejtek specializációját, hanem az oldalgyökerek további fejlődését is irányítja (Lee és mtsai, 2009). Az AtLBD18 egy másik LBD transzkripciós faktorral, az AtLBD33-mal közösen az E2Fa génjének, mint a sejtosztódás egyik legfontosabb, pozitív regulátorának aktiválásával közvetlenül irányítja a periciklus-sejtek reaktiválását (Berckmans és mtsai, 2011). Az oldalgyökerek növekedését pedig a sejtfa rigiditását csökkentő EXPANSIN (EXP) gének expressziójának fokozásával segíti elő (Kim és mtsai, 2013; Lee és mtsai, 2013), koaktivátorok, pl. a GIP1 (G-Box binding Factor Interacting Protein1) közreműködésével (Lee és mtsai, 2014). Arról, hogy a többi három LBD (az AtLBD29, AtLBD16, AtLBD17) milyen közvetlen mechanizmusok révén szabályozza a gyökérfejlődést, sajnos nem sokat tudunk. Annyi bizonyos, hogy hiányukban még auxin-analógok hozzáadásával sem váltható ki oldalgyökér-képződés, alátámasztva kulcsfontosságú szerepüket.

A fentebb ismertetett mechanizmusok szoros összefüggésben állnak a növényekre egyedülállóan jellemző regenerálódási képeességgel. A kallusz képződés, mint a szövettényészetből történő *in vitro* növényregenerálás első lépése, az érett sejtek dedifferenciációjával majd intenzív sejtosztódással együtt járó folyamat, szabályozása pedig az oldalgyökerek fejlődését irányító genetikai programmal számos közös vonást mutat (Sugimoto és mtsai, 2010), és szorosan kapcsolódik a gyökérfejlődést irányító LBD gének (AtLBD16, AtLBD17, AtLBD18 és AtLBD29) gyors és dinamikus aktiválásához. Ezek az LBD gének a folyamat során ugyanúgy ARF transzkripciós faktorok révén aktiválódnak, amint azt a gyökérfejlődésnél láthattuk. Szerepük a kallusz képződésben éppúgy a meriszematikus sejtjeinek fenntartását biztosító gének aktiválásában nyilvánul meg, akár csak az oldalgyökerek fejlődésénél (Fan és mtsai, 2012; Liu és mtsai, 2014).

Az LBD gének gyökérfejlődésben játszott szerepe konzerváltnak tűnik: az AtLBD29 megfelelői kukoricában (ZmRTCS- ROOTLESS CONCERNING CROWN AND SEMINAL ROOT) és rizsben (CRL1-CROWN ROOTLESS) az egyszikűekre jellemző járulékos, hajtás eredetű koronagyökerek képződésének ismert szabályozói, expressziójukat pedig az AtLBD29-hez hasonlóan ARF transzkripciós faktorok aktiválják (Inukai és mtsai, 2005; Taramino és mtsai, 2007). Kifejeződésük a koronagyökerek eredési helyére, a koleoptil nódusz parenchimális szöveteire és az oldalgyökerek eredési pontjaira korlátozódik. Figyelemre méltó azonban, hogy míg a rizs és kukorica genomjában megtalálható a ZmRTCS és az OsCRL1 paralóg szekvenciája is (feltehetően genom duplikáció eredményeként), addig *Arabidopsis*-ban nincs paralógja az AtLBD29 génnek. Az eddigi eredmények alapján a ZmRTCS és paralógja,

az RTCL (RTCS-LIKE) egymással kölcsönhatva felelősek a hajtás eredetű gyökerek képződésének indukálásáért. Érdeemes megjegyezni, hogy a ZmRTCS hiánya nem jár együtt az oldalgyökerek számának jelentős változásával, a koronagyökerek viszont fejletlenek vagy hiányoznak (Hetz és mtsai, 1996; Taramino és mtsai, 2007). Ennek magyarázata a ZmRTCS és az RTCL funkcionális redundanciájában keresendő. Az RTCL expressziója a primer oldalgyökerekben kompenzálhatja az RTCS hiányát a gén funkcióvesztéses mutánsaiban, a járulékos gyökerek kialakulásához viszont közösen kellenek (Majer és mtsai, 2012; Xu és mtsai, 2015).

Bár a rizs OsCRL1 génjével paralóg ARL1 (ADVENTITIOUS ROOTLESS) génjéről részletes vizsgálatok hiányában keveset tudunk, de funkcióvesztéses mutációja szintén a járulékos gyökerek hiányával jár együtt. Ebből arra következtethetünk, hogy ezen paralóg LBD gének evolúciós megjelenése nagyban elősegítette az egyszikűekre jellemző, főként járulékos gyökerekre támaszkodó gyökérarchitektúra kialakulását (Coudert és mtsai, 2010).

1.2.4.4 LBD transzkripció faktorok pleiotróp funkciókkal

Amint az a fentiekből is látható, egy-egy LBD transzkripció faktorhoz ritkán rendelhető hozzá egyetlen konkrét funkció, és egy-egy LBD gyakran több szerv, pl. levél és virágzat fejlődésében is részt vesz egyszerre (ld. AtLOB és AtLBD6/AS2), bár ezek az esetek sokkal inkább arra utalnak, hogy a különböző szervek kialakulását szabályozó molekuláris mechanizmusok közös gyökerekkel rendelkeznek. Vannak azonban ennél jóval szélesebb körű funkcióval rendelkező LBD transzkripció faktorok.

Az egyik ilyen szélsőséges példa az AtLBD30/JLO (JAGGED LATERAL ORGAN) esete. Az AtLBD30/JLO úgy tűnik, általános szereppel bír a sejtek specializációjában és az oldalszervek struktúrájának kialakításában, dózistól függő módon. Teljes funkcióvesztése meggátolja a magok fejlődését még a korai stádiumban, és letális az embriókra nézve (Borghi és Simon, 2007; Bureau és mtsai, 2010). Csökkent aktivitása viszont csak a levelek és a virágzat struktúrájának defektusait okozza (Rast és Simon, 2012). Hiányában a merisztémák pluripotens sejtjeinek működését fenntartó KNOX (KNOTTED LIKE HOMEODOMAIN) transzkripció faktorok, mint pl. a már említett STM (SHOOT MERISTEMLESS) és BP (BREVIPEDICELLUS) génjei fokozott és kiterjedtebb aktivitást mutatnak. Az eddigi kutatások szerint a KNOX gének szabályozását az AtLBD30/JLO az AtLBD6/AS2-AtAS1 komplexszel kölcsönhatásban végzi. Az AtLBD30/JLO és az AtLBD6/AS2 fizikai

kölcsönhatása szükséges ahhoz, hogy az AtAS1 kapcsolódhasson a komplexhez, az AtAS2 pedig összeköttetést biztosít az AtLBD30/JLO és az AtAS1 között (Rast és Simon, 2012).

Az AtLBD30/JLO kapcsolata az auxin transzport általános szabályozásával magyarázatul szolgálhat az általa betöltött pleiotróp funkciókra. Ismert, hogy a hajtáscsúcsból a gyökér felé irányuló poláris auxin transzportot a sejtmembránban lokalizálódó auxin influx és efflux carrier fehérjék végzik, és az így fellépő lokális hormonkoncentrációs csúcs határozza meg az oldalszervek képződési helyét (Fukaki és Tasaka, 2009; Robert és Friml, 2009). Az auxin effluxot PIN (PIN-FORMED) fehérjék biztosítják, melyek működését egy auxin által szabályozott visszacsatolósos feed-back mechanizmus kontrollálja (Friml és mtsai, 2002, Heisler és Jönsson, 2006; de Reuille és mtsai, 2006). Az AtLBD30/JLO számos PIN fehérjét kódoló gén expresszióját, pl. a PIN1, PIN3, PIN7 kifejeződésének elősegítését, és a PIN4 represszálását direkt módon szabályozza; ezzel közvetlen hatást gyakorol az auxin lokális eloszlására (Borghi és Simon, 2007; Bureau és Simon, 2008; Bureau és mtsai, 2010; Rast és Simon, 2012). Az AtLBD30/JLO emellett közvetett módon is hat a PIN gének működésére a PLT (PLETHORA) gének pozitív szabályozása révén. A PTL olyan AP2 (APETALA2) típusú transzkripciós faktorokat kódol, amelyek auxin-indukálta feedback-mechanizmusok révén irányítják a PIN gének működését, meghatározzák a gyökércsúcs apikális merisztémájának identitását és a gyökérsejtek differenciációját (Aida és mtsai, 2004; Galinha és mtsai, 2007; Bureau és mtsai, 2010). Az viszont nem tisztázott, hogy ebben a kapcsolatban van-e szerepe az AtLBD6/AS2-AS1 komplexnek.

1.2.5 Az LBD transzkripciós faktorok és a metabolikus folyamatok kapcsolata

Az eddig bemutatott szervfejlődést szabályozó LBD gének mind az I-es típusba sorolhatók. A II-es típusú LBD gének az eddigi vizsgálatok alapján inkább anyagcsere folyamatokban játszanak szerepet. Lúdfüben pl. az antocianinok, mint másodlagos anyagcsere-termékek szintézisét a nitrogén és nitrát (NO_3^-) jelenléte gátolja, mégpedig a II-es csoportba tartozó AtLBD37, AtLBD38 és AtLBD39 gének indukálásával (Rubin és mtsai, 2009; Scheible és mtsai, 2004). Nitrogén-anyagcserében való érintettségüket támasztja alá, hogy ezek az LBD gének erősen indukálódnak nitrát hatására, overexpressziójuk pedig áttételesen az antocianin-szintézis kulcsenzimeinek kikapcsolását okozza. Hiányukban fokozódik az antocianin-és flavonoid termelés, még nitrogénforrás jelenlétében is. Az eddigi kutatások alapján az AtLBD37, AtLBD38 és AtLBD39 olyan MYB-domain transzkripciós faktorok, mint pl. a PAP1 és PAP2 (MYB-TF PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT) génjeinek represszálásával gátolják az antocianin képződését, melyek az antocianin-

bioszintézis kulcsenzimeit kódoló génjeket aktiválják. Ilyen kulcsenzimek egyebek mellett a chalcon-szintáz, a glutathion-S transzferáz és a dihidroxi-flavonol reduktáz (Borevitz és mtsai, 2000; Thoge és mtsai, 2005; Wangwattana és mtsai, 2008). Emellett számos nitrát-felvétellel és hasznosítással kapcsolatos gén működésére is negatívan hatnak. Több mint 50 ilyen N-reszponzív gén ismeretes, köztük a legtöbb nitrát transzportereket és nitrát-reduktázokat kódoló gén (Rubin és mtsai, 2009). Ezen funkciók konzerváltságára utal, hogy a rizs OsLBD37 által kódolt transzkripciós faktor az AtLBD37-hez hasonló módon befolyásolja a nitrogén-metabolizmust (Albinski és mtsai, 2010).

1.2.6 Az LBD gének kifejeződésének szabályozása

Az LBD gének szerepe tehát messze túlmutat azon a kezdeti elképzelésen, miszerint csak az oldalszervek fejlődését irányítják. Funkcióik ennél jóval komplexebbek. Az általuk irányított molekuláris szabályozási útvonalak szoros együttműködése felelős a kifejlett növény architektúráját kialakító számos fejlődési programért. A szervfejlődés és az LBD gének kapcsolata alapján az LBD gének jelentősége az adott hormonális jelek (elsősorban növekedést szabályozó növényi hormonok) megfelelő fejlődési programmá történő konvertálásában keresendő. Jó példa erre az auxin által aktiválódó LBD gének már taglalt, gyökérfejlődést szabályozó csoportja, vagy az AtLOB és a brassinoszteroid-jelátvitel kapcsolata. További példaként említhető a kevésbé ismert AtLBD3, mely a citokinin által kiváltott foszforilációs szignál-kaskád egyik elsődleges effektora lehet. Feltehetően a generatív szervek fejlődése és a citokininek hatásmechanizmusa között teremt kapcsolatot (Natito és mtsai, 2007). A kép azonban ennél sokkal összetettebb...

A legtöbb növényi hormon mellett ugyanis számos környezeti hatás, pl. sóstressz, glükózkoncentráció, patogének vagy sebzés, de még a fény is hatással van az LBD gének működésére. Elsősorban II-es típusú LBD génekkel kapcsolatban demonstrálták, hogy NaCl jelenlétében megváltozik az aktivitásuk, míg néhány, auxinnal kapcsolatba hozható LBD génről (az AtLBD16,17,18,29 és 33 gének) kiderült, hogy glükóz mellett megszűnik az auxin általi szabályozottságuk (Jiang és Deyholos, 2009; Mishra és mtsai, 2009).

A gyökérarchitektúra számos belső és külső hatás következtében képes plasztikus változásokra a megváltozott környezethez történő alkalmazkodás érdekében. Az abiotikus stresszhatásokra adott válaszokat főként az abszcizinsav irányítja. Magas sókoncentráció mellett a gyökérzet hosszanti növekedése visszafogott, az oldalgyökerek képződése azonban fokozódik, elsősorban az abszcizinsav auxinnal antagonista hatásának következtében. *Medicago truncatula*-val végzett kutatások alapján az abszcizinsav represszív hatását sóstressz

esetén egy homeodomain-zip transzkripciós faktor, a HB1 közvetíti. Többek között oly módon, hogy közvetlenül gátolja az auxin által aktivált MtLBD1 kifejeződését (Ariel és mtsai, 2010). Az MtLBD1 II-es típusú LBD, vagyis egy olyan kivételes példa a csoporton belül, amely nem másodlagos metabolitok képződését szabályozza. Azt viszont, hogy hogyan, milyen folyamatok révén hat a gyökérfejlődésre, még nem ismerjük.

Más gyökérfejlődésben részt vevő LBD génről pedig kiderült, hogy a patogénekkal szembeni válaszreakciókban is közreműködnek. Ilyen pl. az AtLBD20, mely a gyökérparazita *Fusarium oxysporum* gombával szembeni rezisztencia negatív regulátoraként ismert. Az AtLBD20 patogének általi aktiválása a jázmonát, mint védekezési hormon, szignalizációs útvonalán keresztül történik. Maga az AtLBD20 viszont számos jázmonátok által aktivált védekezési gén kikapcsolását eredményezi (Tatcher és mtsai, 2012).

A növények egyedfejlődése szempontjából az egyik legmeghatározóbb külső tényező a fény. Az általa kiváltott fotomorfogenetikus válaszok szintén kapcsolatba hozhatók LBD génekkel. Az AtLBD25/DDA1 (DOWN IN DARK AND AUXIN1) a fotomorfogenetikus válaszok közül a hipokotil megnyúlásának szabályozásával vesz részt. Aktivitása sötétben és auxin hatására csökken. Hiányában elmarad a hipokotil sötétre adott megnyúlásos válasza, viszont a többi, sötétben jelentkező fenotípusos válasz, mint az etioláltság, az apikális kampó képződése, a sziklevelek zárt állapota DDA1 hiányában a vad típushoz hasonlóan jelentkeznek. Ezek a megfigyelések arra engednek következtetni, hogy az AtLBD25/DDA1 mind az auxin jelátviteli folyamatainak, mind a fény által szabályozott fejlődési folyamatoknak közös eleme lehet; funkciója pedig vélhetően az auxin által kiváltott megnyúlásos növekedés gátlása a hipokotilban, fény hatására. Ezzel együtt ugyanakkor a direkt kapcsolatot még nem találtak az AtLBD25/DDA1 és a fényszabályozás között. Annyi igazolt, hogy a HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL), mint a fotomorfogenetikus válaszokat közvetítő egyik legfontosabb bZIP típusú transzkripciós faktor, indirekt módon szabályozza az AtLBD25/DDA1 gén aktivitását (Mangeon és mtsai, 2011).

1.2.7. Az LBD transzkripciós faktorok és a sejtosztódás szabályozásának kapcsolata

Celluláris szinten bármely más többsejtű organizmushoz hasonlóan a magasabb rendű növényeknél is a sejtek osztódása, az utódsejtek meghatározott sorsa és korrekt térbeli és időbeli elrendeződése határozza meg a testszerveződést. Az LBD gének rendellenes működése miatt kialakuló abnormális fenotípusok szinte minden esetben sejtosztódási és differenciálódási hibákra vezethetők vissza. Az AtLBD6/AS2 hiányában fellépő aszimmetrikus levélmorfológia pl. az adaxiális/abaxiális szimmetriatengelyt kialakító sejtek dedifferenciációjának és

fokozott proliferációjának köszönhető. A látható eltéréseket az egyenlőtlen auxin-eloszlás okozza, melynek következményeként az adaxiális oldalon megnő a sejtek száma (Iwakawa és mtsai, 2007; Zgurski és mtsai, 2005). A vele ortológ kukorica ZmIg1 génjének hiányában a hasonlóan aberráns levélszerkezet mellett a termőtájat alkotó sejtek abnormális osztódása is megfigyelhető. Normális esetben a zárvatermők embriózsákjának (tulajdonképpen a majdani magkezdemény) kialakulása a sejtmagok többszöri, szabad osztódásával kezdődik, melyet cellularizáció és a sejtek differenciálódása követ. Ig1 hiányában a sejtmagok osztódásának fázisa viszont hosszabb lesz, ami számos rendellenességet idéz elő, pl. extra szinergida sejtek megjelenését és több petesejt kialakulását (Evans, 2007).

Nemrég derült fény arra, hogy lúdfűben az AtLBD27 génnel azonos SCP (SIDECAR POLLEN) a pollenképződést szabályozza, mégpedig a hím gametofitonban található mikrospóra sejtek aszimmetrikus osztódásának koordinálásával (Oh és mtsai, 2011). Zárvatermőkben a hím gametofiton három sejtől áll: egy vegetatív sejtől és két ivarsejttől, melyek a haploid mikrospóra anyasejtek két egymást követő mitotikus osztódásának eredményei. Az első aszimmetrikus osztódás során létre jön egy vegetatív sejt és egy csírasejt. A csírasejt második osztódása hozza létre a két ivarsejtet, míg a vegetatív sejt differenciálódik, és később a pollentömlő kialakításában vesz részt (McCormick, 2004; Borg és mtsai, 2009). AtLBD27/SCP hiányában a mikrospórák első mitotikus osztódása szimmetrikus marad, emiatt a második osztódásnál négysejtes pollen képződik két vegetatív sejttel és két ivarsejttel (Oh és mtsai, 2010, 2011). Funkciójához és sejtmagba történő transzportjához ugyanakkor nélkülözhetetlen a kölcsönhatása egy másik LBD proteinnel, az AtLBD10-zel (Kim és mtsai, 2015). Ezek a megfigyelések alátámasztják az LBD gének és a sejtciklus szabályozásának szoros kapcsolatát, a közöttük lévő közvetlen összefüggésekre azonban még kevés a konkrét bizonyíték.

A sejtosztódást szabályozó biokémia reakciók nagyfokú konzerváltságot mutatnak az eukarióták között. Az eukariótákra univerzálisan jellemző módon a sejtosztódás koordinálása specifikus szerin/threonin kinázok, a ciklin-függő kinázok (CDK – cyclin dependent kinase) pontosan irányított működésén alapszik. Szabályozásuk két alapvető mechanizmuson keresztül történik. Az egyik a tirozin reziduenseiken történő foszforiláció/defoszforiláció: a CDK kinázok két ilyen foszforilációs helyet tartalmaznak, az egyik foszforilációja aktiválja, míg a másiké inaktíválja az enzimet. A szabályozásuk másik lényeges eleme a specifikus ciklin partnerek jelenléte. Nélkülük egyik CDK sem mutat aktivitást, és a ciklinek határozzák meg szubsztrát-specifitását is (Dewitte és Murray, 2003). A ciklinek a sejtciklus egyes fázisainak

megfelelően szekvenciálisan jelennek meg és bomlanak le a proteoszómákban. Sarjadzó élesztőben (*Saccharomyces cerevisiae*) egyetlen CDK és 9 ciklin fehérje vesz részt a sejtciklus irányításában, míg magasabb rendű eukariótákban (így a növényekben is) legkevesebb nyolcféle CDK kináz (CDK1-8) és a ciklinek komplex, minimum 10 csoportba (A-J) sorolható családja áll rendelkezésre ebből a célból (Renaudin és mtsai, 1996).

A sejtciklus összetett szabályozásának gerincét tehát a CDK kinázok alternáló aktivitása képezi, amelyet főként a sejtciklus különböző fázisaira jellemző ciklinek specifikus megjelenése és lebomlása biztosít. A leglényegesebb pontokra leegyszerűsítve a folyamatot, a sejtosztódást beindító láncolat első lépéseként a G1 fázisban jelen lévő CDK kinázok (CDK-A) kapcsolódnak megfelelő ciklin-partnereikkel (a G1 fázisra jellemző D és E típusú ciklinekkel), és ezzel egyidejűleg foszforilálódik a CDK kinázok aktivációs helye is, aktiváló kinázok által. Az így aktív állapotba került CDK-ciklin komplex juttatja át a sejtet a G1-S fázis határán. A sejtciklus G1/S fázisában aktiválódó ciklin-ciklin függő kináz komplexek (elsősorban D-típusú ciklinek és CDK partnerük) többszörösen foszforilálják az RBR (retinoblastoma related protein) fehérjét, ami ennek következtében disszociál az E2F/DP transzkripció faktor komplexről. A gátlás alól ily módon felszabaduló E2F/DP komplex sokrétűen segíti elő a sejtek osztódását: számos replikációhoz szükséges gént aktivál, elősegíti a replikációt követő ellenőrző mechanizmusokban részt vevő fehérjék génjeinek aktiválását és a mitotikus gének transzkripcióját is (Inzé és De Veylder, 2006; Berckmans és De Veylder, 2009). Az S fázis végére a G1 ciklinek degradálódnak, CDK partnerük pedig defoszforilálódik, ezzel inaktív állapotba kerül. Ekkor a sejt belép a G2 fázisba, ahol megtörténik a mitózis szakaszának előkészítése. Ennek részeként megszintetizálódnak a mitózist irányító ciklinek (A és B ciklinek), és kapcsolódnak a megfelelő CDK kinázokkal (CDK-B). A CDK kinázok ugyanakkor még inaktívak: mind az aktivációs, mind a gátló helyei foszforiláltak, valamint inhibitor fehérjék is gátolják a működésüket. A mitózist irányító ciklin-CDK komplexek aktivitásukat közvetlenül a mitózis kezdetén nyerik el, az aktivitást gátló inhibitor fehérjék és az aktivitást gátló foszfátsoport eltávolításával. A mitózis végén a mitotikus ciklinek lebomlanak, a CDK kináz aktivációs kötőhelyén lévő foszfátsoportot lehasítja egy foszfataz, így a CDK ismét inaktív állapotba kerül, miközben megkezdődik a G1 fázis ciklinjeinek akkumulációja, és a sejt újból készen áll egy következő osztódási ciklusra (Inzé és De Veylder, 2006).

Arra vonatkozóan, hogy miként kapcsolódnak be ebbe a folyamatba az LBD transzkripció faktorok, kevés ismeret áll rendelkezésre. Az egyik közvetlen kapcsolatra utaló

megfigyelés az E2Fa transzkripciós faktor génjének már említett, LBD gének által történő, auxin-függő módon kiváltott aktiválása, az oldalgyökek képződése során. Lúdfűben összesen hat E2F típusú transzkripciós faktor ismert, ebből a sejtosztódásra pozitív hatású E2Fa az egyetlen, amelyre is igazolták, hogy kifejeződése LBD transzkripciós faktorok révén is szabályozódik (Berckmans és mtsai, 2011).

A sejtosztódás és az LBD transzkripciós faktorok közvetlen kapcsolatára utalnak munkacsoportunk eddig még nem publikált eredményei is. Élesztő két-hibrid (Y2H – yeast two hybrid) rendszerben végzett kísérleteink arra engednek következtetni, hogy a lucerna (*Medicago sativa*) egyik A2 típusú ciklinjének kölcsönható partnere egy LBD fehérje, az MtCPP1 (*Medicago truncatula* cyclin partner protein1) (Györgyey János, szóbeli közlés). (A mintegy 20 éve végzett kutatás eredeti célja az MsA2 ciklin kölcsönható partnereinek felderítése volt. Mivel akkoriban vált a *Medicago truncatula* a pillangósvirágúak nitrogénkötő szimbiózisát vizsgáló kutatások modellnövényévé, az A2 ciklin kölcsönható partnerének megtalálásához szükséges expressziós könyvtár már ebből a fajból származott.) Ennek a *Medicago truncatula* LBD proteinnek szálkaperjében megtalálható két legközelebbi rokona *in vitro* kináz assay kísérletben pedig foszforilálódott szálkaperje sejtuszuspenzióból izolált ciklin-ciklin függő kináz komplexek által (Horváth Gábor, Zombori Zoltán szóbeli közlése alapján). Azt még nem tudjuk, hogy ezeknek a kapcsolatoknak mi lehet a szerepe a sejtosztódás menetében, ahogyan azt sem, hogy milyen hatása lehet a növény egyedfejlődésére nézve. A jelenlegi ismereteink tükrében feltételezhető, hogy az LBD gének a sejtosztódás és az utódsejtek érési folyamatainak összehangolásában játszanak kulcsfontosságú szerepet. Ezek a mechanizmusok alig ismertek még lúdfűben is, egyszikűekkel kapcsolatban pedig még kevesebbet tudunk. Ennek ismeretében érthető, miért kerültek érdeklődésünk középpontjába az LBD gének és a sejtciklus-szabályozás főszereplői, és miért vizsgáljuk őket egy olyan, mára már elfogadott egyszikű modellrendszerben, mint a szálkaperje.

2. Célkitűzések

Az LBD gének, köszönhetően sokrétű szerepüknek és növény-specifikus voltuknak, az utóbbi évek intenzívebben tanulmányozott génjei közé kerültek. Megismerésük lehetőséget nyújt nemcsak a merisztémák és fejlődő szervek határán működő molekuláris mechanizmusok mélyebb megértéséhez, de minél több növényfajra kiterjedő vizsgálatuk a növényi egyedfejlődés evolúciójába is betekintést enged. Ebből a célból számos átfogó publikáció született az LBD transzkripciós faktorokról, nemcsak lúdfüvel végzett kísérletekből (Shuai és mtsai, 2002), hanem olyan haszonnövényekkel kapcsolatban is, mint pl. az alma (*Malus domestica*) (Wang és mtsai, 2013), paradicsom (*Solanum lycopersicum*) (Wang és mtsai, 2013), a borszőlő (*Vitis vinifera*) (Cao és mtsai, 2016), egyszikűek közül pedig a rizs (*Oryza sativa*) (Yang és mtsai, 2006) és a kukorica (*Zea mays*) (Zhang és mtsai, 2014). Ezzel együtt az egyszikűekben megtalálható LBD génekről igen kevés ismeret áll rendelkezésünkre. Munkánk során egyik célunk éppen ezért a géncsalád feltérképezése a szálkaperjében, mint kalászos gabonaféléink modellnövényében. Ezzel kapcsolatban három lényeges célkitűzésünk volt:

1. Az LBD transzkripciós faktorokat kódoló gének azonosítása a szálkaperje (*Brachypodium distachyon*) genomjában.
2. A szálkaperje LBD transzkripciós faktorainak részletes filogenetikai analízise, rokonsági kapcsolatainak összehasonlítása más fajokban már azonosított LBD transzkripciós faktorokkal.
3. A szálkaperje LBD transzkripciós faktorait kódoló gének szervspecifikus kifejeződésének vizsgálata, részletes expressziós profil készítése és a kapott mintázatok összehasonlítása más növényfajok LBD génjeinek már ismert kifejeződésével.

Bár konkrét bizonyítékokkal még nem támasztották alá, az eddigi kutatások alapján úgy tűnik, a LOB-domain transzkripciós faktorok a sejtosztódási és differenciálódási folyamatok határán teremtenek egyensúlyt. A továbbiakban a szálkaperje azonosított LBD génjei között két olyan génre fókuszáltunk, melyek a legnagyobb homológiát mutatták a *Medicago truncatula* már említett MtCPP1 génjével. Korábbi vizsgálataink tanulsága alapján az MtCPP1 által kódolt LOB-domain transzkripciós faktor kölcsönhatásban állhat a *Medicago* A2 típusú mitotikus ciklinjével. Tekintettel arra, hogy a *Medicago* A2 ciklinje bizonyítottan szerepet játszik a gyökér periciklus sejtjeinek reaktiválásában (Roudier és mtsai, 2003), kapcsolata az LBD transzkripciós faktorokkal meghatározó lehet a gyökérfejlődés szempontjából.

Kíváncsiak voltunk arra, hogy hasonló kapcsolatok lehetnek-e szálkaperjében is? Ennek a kérdéskörnek a vizsgálatához kapcsolódó célkitűzésünk az alábbi volt:

4. A *Medicago sativa* A2 ciklin szálkaperjében megtalálható legközelebbi homológja és a *Medicago truncatula* MtCPP1 szálkaperjében megtalálható legközelebbi homológjai közötti kölcsönhatás tesztelése élesztő kettős-hibrid rendszerben.

3. Anyag és módszer

3.1 A szálkaperje LBD transzkripciós faktorainak *in silico* vizsgálatához kapcsolódó módszerek

3.1.1 A szálkaperje LBD transzkripciós faktorokainak azonosítása

A szálkaperje (*Brachypodium distachyon*) LBD transzkripciós faktorainak azonosításához kétféle megközelítést alkalmaztunk. Elsőként a lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) TAIR10 (<https://www.arabidopsis.org/>) adatbázisában megtalálható LBD transzkripciós faktorok konzervált domain-motívumának aminosav-szekvenciáit használtuk referenciaként a szálkaperje teljes proteom-adatbázisával szembeni átfogó BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) szekvencia-hasonlóságon alapuló analízishez. Az ehhez szükséges szálkaperje proteom a Phytozome v12 (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) portálról hozzáférhető, a *B. distachyon* v3.1 verziójú, legfrissebb genom-illesztésen alapuló szekvencia-adatbázisból származott. A protein BLAST alapú kereséshez a Phytozome v12 portál szekvencia-illesztő programjának alap beállításait használtuk, a találatok maximalizálása érdekében $E=1-e003$ (expected value) határérték megadásával. Második lépésként a BLAST keresés eredményeként kapott lehetséges LBD fehérje-szekvenciákat a Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) és a SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) portál domain-elemző programjainak alap beállításával vizsgáltuk tovább a konzervált szekvencia-motívumok azonosításához. Végeredményül azokat a fehérjéket tekintettük egyértelműen LBD transzkripciós faktornak, melyek a Pfam adatbázis PF03195 (DUF260-domain of unknown function) családjába sorolódtak. A beazonosított fehérjék teljes aminosav-szekvenciái és az őket kódoló gének nukleotid-sorrendje, a gének prediktált szerkezete a disszertáció digitális mellékleteként megtekinthető (elektronikus_melléklet1).

3.1.2 Az LBD transzkripciós faktorok rokonsági kapcsolatainak vizsgálata

Az előző pontban vázolt adatbázis-keresés eredményeként kapott LBD fehérjeszekvenciák ismeretében megvizsgáltuk a közöttük fennálló rokonsági kapcsolatokat. A filogenetikai kapcsolatokat szemléltető törzsfá alapját a szálkaperje LBD transzkripciós faktorok domain-struktúrájának aminosav-szekvenciája adta. A rokonsági fa megalkotása a MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform) szekvencia-illesztő program (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>) által készített illesztés alapján történt. A szekvenciák összerendezéséhez az alábbi paramétereket használtuk: az illesztést befolyásoló, de nem konzervált aminosavak közötti hézagok kiküszöbölése érdekében a hézagok pontozásánál (gap

penalty) magas értékeket állítottunk be (gap open penalty = 3, gap extension penalty = 1), szubsztitúciós modellként a BLOSUM62 (BLOcks SUBstitution Matrix) hasonlósági mátrixot választottuk. Az így kapott szekvencia-illesztés alapján a törzsfát „szomszéd-összevonó” (Neighbour Joining- NJ) módszerrel alkottuk meg. A neighbour joining alapú filogenetikai rekonstrukcióhoz szükséges evolúciós távolság (distance) becsléséhez az un. p-distance paramétert állítottuk be. A törzsfát a MEGA6 szoftver segítségével ábrázoltuk (<http://www.megasoftware.net>) (Tamura és mtsai, 2013). A kapott törzsfa megbízhatóságának tesztelése bootstrap próbával, 1000 ismétlésben történt.

A fent ismertetett módszerekkel azonos módon megvizsgáltuk a szálkaperjében azonosított LBD transzkripciós faktorok és más fajokból már ismert LBD transzkripciós faktorok közötti filogenetikai kapcsolatokat is. A vizsgálathoz a szálkaperje mellé három másik fajt vontunk be: a közeli rokonság miatt a kukoricát (*Zea mays*) és a rizst (*Oryza sativa*), kétszikűek közül pedig a lúdfüvet (*Arabidopsis thaliana*) választottuk ki. Az analízishez ebben az esetben is az említett fajok LBD transzkripciós faktorainak konzervált domain-motívumát reprezentáló aminosav-szekvenciákat használtuk fel.

3.1.3 Genom szintű vizsgálatok: genom synteny és duplikációs események vizsgálata

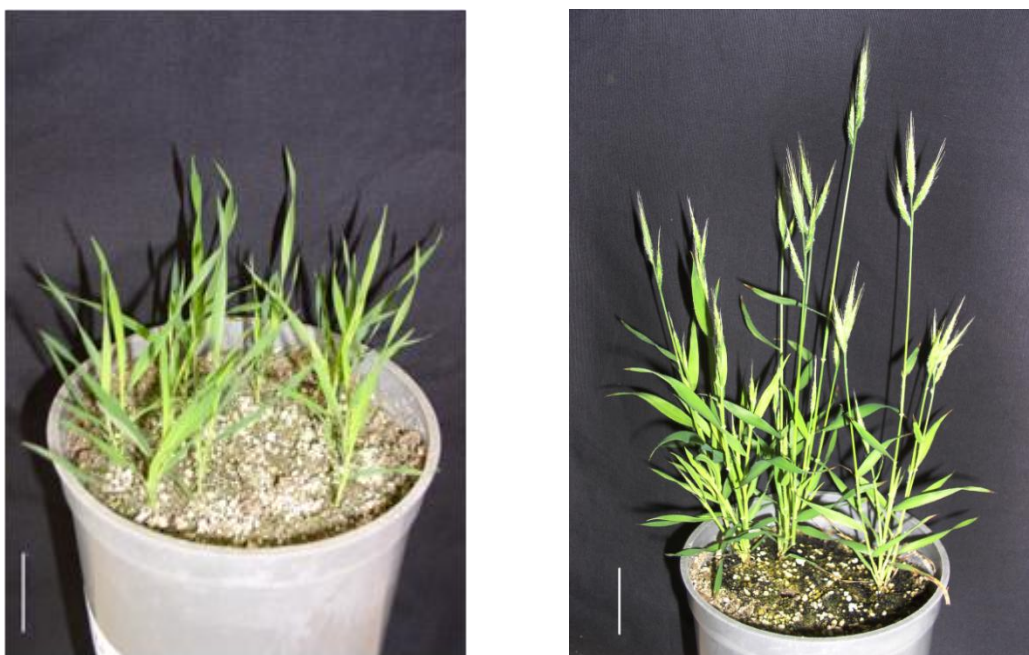
A szálkaperje teljes genomjának synteny-analízise és génduplikációs eseményeinek vizsgálata a Plant Genome Duplication Database (<http://chibba.agtec.uga.edu/duplication>) adatai alapján készültek (Lee és mtsai, 2013). A reprezentatív diagram a PLAZA v3.0 portál online elérhető grafikus eszközével készült (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza>) (Proost és mtsai, 2009, 2015).

3.2 Az LBD gének expressziós profiljának vizsgálatához kapcsolódó módszerek

3.2.1 Növények nevelése

A szálkaperje (*Brachypodium distachyon*) genomjában azonosított LBD gének kifejeződésének vizsgálatához a nagy pontosságú, megszekvenált genommal bíró, mérsékelt stressztoleráns Bd21-es ökotípust választottuk. A magokat a csírázás időpontjának szinkronizálása érdekében kiültetés előtt négy-öt napig sötétben, nedves talajra helyezve, petri csészében, 4°C-on sztratifikáltuk. A magokat ezt követően homok-perlit 2:1 arányú keverékébe ültettük, a növényeket normál körülmények között, növénynevelő kamrában neveltük. Fotoperiódus: 18h megvilágítás/ 6 óra sötét, fényerősség: 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Hőmérséklet: állandó 21-22 °C. Relatív páratartalom: 60-65%. Az optimális vízellátás érdekében a növényeket a mintagyűjtésig a nevelőközeg 80%-os víztartalma mellett neveltük.

(A neveléshez használt homok-perlit relatív 100%-os vízkapacitása 260-265 g/kg). A mintavétel három különböző korú növénypopulációból történt: a vegetatív szervek 14 napos növényekből, a generatív szervek és a zászlóslevél 28 napos növényekből, míg a különböző fejlettségi stádiumú magok 40-45 napos növények kalászaiból származtak (a növények kora alatt a csírázástól eltelt idő értendő) (6. ábra). A minták részletes leírása és a mintavétel menete a 3.2.2 fejezetben kerül ismertetésre.



6. ábra. A) 14 napos *Brachypodium distachyon* növények; B) 27-28 napos, virágzó *Brachypodium distachyon* növények. (A növények kora a csírázástól eltelt időt jelöli.) A fehér vonal 2 cm-t jelöl.

A nedvességtartalom és a megfelelő tápanyagok utánpótlását Hoagland-tápoldattal (0,5x) a nevelés teljes időtartam alatt naponta biztosítottuk.

Hoagland-tápoldat (1x):

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	150 mg/l
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	656 mg/l
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	240 mg/l
KNO_3	606 mg/l
Fe-EDTA	2,5 ml/l
Mikroelem-törzsoldat	1 ml/l

Mikroelem-törzsoldat összetétele:

H_3BO_4	2,86 mg/l
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,08 mg/l
Na_2MoO_4	0,03 mg/l
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,22 mg/l
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	1,81 mg/l

3.2.2 Mintavétel

Összesen 37 különböző növényi részből gyűjtöttünk mintát: 25 növényi részt (1.-25. minták) 14 napos, vegetatív stádiumú növényekből, és 12 növényi részt virágzó, generatív stádiumú növényekből (26.-33. minták és a portok 28 napos növényekből, a 34.-36. minták 40-45 napos növényekből származtak). A minták beazonosítása és begyűjtése sztereomikroszkóp segítségével történt. A mintákat listázva a 4. táblázat tartalmazza, a mintavételi helyeket a 7. ábra szemlélteti.

		Rövidítés	Minta		
vegetatív fázisból származó minták	1.	R1	gyökércsúcs		
	2.	R2	megnyúlási zóna		
	3.	R3	differentiálódási zóna		
	4.	R4	érési/felszívási zóna		
	5.	R5	fiatal oldalgyökér-kezdemény		
	6.	R6	érett oldalgyökér-iniciális		
	7.	SN	szkutelláris gyökerek nódusza		
	8.	CN	koleoptil-nodális gyökerek nódusza		
	9.	N1	első levél nódusza		
	10.	N2	második levél nódusza		
	11.	N3	harmadik levél nódusza		
	12.	IN1	első levél internódiuma (CN és N1 közötti internódium)		
	13.	IN2	második levél internódiuma (N1 és N2 közötti internódium)		
	14.	LH1	első levél hüvelye		
	15.	LH2	második levél hüvelye		
	16.	LH3	harmadik levél hüvelye		
	17.	LL1	első levél ligulája (levélcsukló)		
	18.	LL2	második levél ligulája		
	19.	LL3	harmadik levél ligulája		
	20.	L1	első levél lemeze		
	21.	L2	második levél lemeze		
	22.	L3	harmadik levél lemeze		
	23.	L41	Fejlődésben lévő 4. levél részei	Negyedik levél lemezének bazális szegmense	
	24.	L42		Negyedik levél lemezének középső szegmense	
	25.	L43		Negyedik levél lemezének apikális szegmense	

Az egyes növényi részekből megközelítőleg 200 növény felboncolásával sikerült begyűjteni az RNS-izoláláshoz szükséges minimális 50-100 mg-nyi növényi anyagot. A frissen begyűjtött mintákat folyékony nitrogénben fagyasztottuk, felhasználásig -80°C-on tároltuk. Tekintettel arra, hogy a mintavétel nagy egyedszámból történt, a biológiai ismétlést egy alkalommal, hét mintára korlátozva tettük meg. Ez a hét minta: R1-gyökércsúcs, R3- a gyökér differenciálódási zónája, L2- a második levél lemeze, N3- a harmadik levél nádusza, V1- kifejlett virág 1-2 nappal a pollináció előtt, E3- fejletlen termés 3-4 nappal a pollináció után, portok.

3.2.3 Minták feldolgozása: RNS-izolálás, cDNS-szintézis

A szálkaperje LBD génjeinek különböző növényi részekben mérhető relatív transzkript-mennyiségét valós idejű, kvantitatív polimeráz-láncreakcióval (qRT-PCR) kívántuk meghatározni. Ehhez a begyűjtött növényi mintákból totál-RNS tartalmat izoláltunk LiCl (Lithium-Chloride) módszerrel, Jaakola és mtsai. (Jaakola és mtsai, 2001) protokollját követve, kis módosításokkal. Az izolált RNS-eket ezt követően DNase kezeléssel mentesítettük az esetleges genomi DNS-től, majd 1% agaróz gélen történő elektroforézissel ellenőriztük az izolált RNS integritását. Az izolált RNS minták koncentrációját fotometrálassal határoztuk meg (NanoDrop; Thermo Scientific). Összesen 1 µg totál RNS-ből 20 µl végtérfogatban RevertAid H minus M-MuLV reverz transzkriptázzal (Thermo Scientific), random hexamer primerek felhasználásával szintetizáltunk cDNS-t. A cDNS-szintézis tisztaságának ellenőrzése céljából reverz transzkriptáz nélküli kontroll reakciókat is összeállítottunk. Az RNS-izolálás, DNase kezelés, cDNS-szintézis és az ellenőrzéshez használt PCR reakció részletes leírását a Függelék „Protokollok” fejezete tartalmazza.

3.2.4 qRT-PCR

A valós idejű kvantitatív PCR reakcióhoz 1:45 hígításban használtuk a cDNS-t templátként, a Life Technologies által forgalmazott 2x SYBR Green PCR Master Mix, 5 pmol forward és 5 pmol reverse primer hozzáadásával, 15 µl végtérfogatban. A reakció során képződő termékek mennyiségének detektálása az ABI Prism 7900-HT Fast Real-Time készülékkel történt. A PCR amplifikációt három technikai párhuzamos reakcióval, standard két lépésben, az alábbi beállításokkal futtattuk le: 10 min. 95°C, majd 40 cikluson keresztül ismétlődő 95°C denaturáció (15 sec.) és 60°C annealing+elongáció (1 min.). Az reakciók specifikusságát az alábbi kritériumok teljesülésével igazoltuk: a) a termékek olvadási (disszociációs) görbájén kizárólag egy, jól körülhatárolható csúcs látható és b) a termékek 2%-os agaróz gélben végzett

elektroforézis vizsgálata során a gélben reakciónként csak egy, a termék prediktált méretnek megfelelő méretű sáv látható.

A célgének fehérjekódoló régióira tervezett specifikus primerpárok szekvenciáit a Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) online elérhető program segítségével terveztük meg, az alábbi irányelvek figyelembe vételével: a primerek mérete 16-23 nukleotid közzé essen; lehetőség szerint a primerpárok egyik tagja exon-intron határt fedjen át; az olvadási hőmérséklet (T_m) 59-62 °C között legyen, ahol a Wallace szabály értelmében $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$; a primerpár két tagjának olvadási hőmérséklete között ne legyen 2 °C-nál nagyobb különbség; a primerpárok GC-tartalma 60% alatti legyen; a termék mérete 85-220 nukleotid között legyen. A tervezésnél törekedtünk arra, hogy a primerek önmagukkal és primerpárjukkal képzett másodlagos szerkezetek és dimerizációs kapcsolatok száma alacsony legyen (kevesebb, mint 5), a struktúrák kialakulásával járó szabadenergia-felszabadulás értéke alacsony legyen (lehetőség szerint a szabadenergia-változás ΔG értéke -4 feletti legyen). A szerkezetek kialakulásának eshetőségét és az ezzel járó szabadenergia-változást az IDT DNA (Integrated DNA Technologies) portáljáról elérhető Oligo Analyzer (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) alkalmazással ellenőriztük. A primerpárok specifikusságát az NCBI portáljának PrimerBlast alkalmazásával (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) teszteltük, a *Brachypodium distachyon* Refseq mRNA-adatbázisával szembeni kereséssel. A primerpárok átlagos amplifikációs hatékonyságát az adott primerhez tartozó qRT-PCR reakciók amplifikációs görbéjének meredekségéből számítottuk ki az alábbi egyenlet szerint: $E = 10^{(-1/\text{slope})}$, ahol „E” az amplifikációs hatékonyságot, a „slope” a görbe meredekségét jelöli (Pfaffl, 2001; Svec és mtsai, 2015). Az általunk használt primerek a számított értékek alapján magas, 1,98 és 2,023 közé eső hatékonysággal rendelkeznek. Szekvenciájuk, az általuk amplifikált termék méretét és az egyes primerpárhoz tartozó amplifikációs hatékonyságot a Függelék „qRT-PCR méréshez használt primerek” táblázata tartalmazza.

A specifikus primerek használatával nyert adatokból $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszerrel (Livak és Schmittgen, 2001) határoztuk meg a vizsgált LBD gének relatív transzkript szintjét az adott mintákban, ahol a C_t azt a ciklusszámot jelöli, amikor az amplifikálódó termékek mennyisége elérte az exponenciális fázis kezdetéhez beállított un. threshold határértéket. A normalizáláshoz első lépésként a ΔC_t értéket egy adott mintára a vizsgált gén és a referenciaként választott egységesen magas kifejeződést mutató gén C_t értékének különbségével kaptuk. Jelen esetben két, Hong és mtsai (Hong és mtsai, 2008) által bizonyítottan alkalmas referenciagén, az UBC18 ubiquitin-konjugáló enzim és az EF1 α elongációs faktor gének C_t értékének átlagát használtuk a

normalizáláshoz. A következő lépésben belső referenciapontként az összes LBD gén összes mintára kapott ΔC_t értékének átlaga (az LBD gének átlagos kifejeződésének relatív értéke) és az adott minta ΔC_t értékének különbségéből származtattuk a $\Delta\Delta C_t$ értéket. A kapott eredmények „heat-map” ábrázolása a HemI v1.0 (Heat map Illustrator) programmal készült (<http://hemi.biocuckoo.org/>) (Deng és mtsai, 2014), az eredmények csoportosításához az alábbi klaszterező eljárások alkalmazásával kiegészítve: Euklidészi hasonlósági mátrix kombinálva a „maximum linkage” (maximális kapcsoltság) klaszterezési módszerrel.

3.3 Az élesztő két-hibrid (Y2H) vizsgálatokhoz kapcsolódó anyagok és módszerek

3.3.1 Az Y2H rendszerben vizsgálni kívánt jelöltek kiválasztása, a vizsgálatához szükséges konstrukciók létrehozása és ellenőrzése

A korábbi kísérletek alapján kölcsönható partnernek bizonyuló *Medicago truncatula* MtCPP1 (MTR_5g083960) és *Medicago sativa* MsA2;2 ciklin (CAB46083 – a továbbiakban MsCYC-A2) szálkaperjében megtalálható legközelebbi homológjait TBLASTX analízissel azonosítottuk be, a szálkaperje genom adatbázisával szembeni kereséssel (Altschul és mtsai, 1997). Az analízis alapján a szálkaperje egyetlen A2 típusú ciklinjét (Bd4g06827 – a továbbiakban BdCYC-A2) és két LBD transzkripciós faktort kódoló génjét (Bd2g34520 – a továbbiakban BdLBD1C-1 és Bd2g53690 – a továbbiakban BdLBD1C-2) választottuk ki az Y2H vizsgálatokhoz.

A jelöltek kiválasztásához kapcsolódóan elkészítettük a szálkaperje fontosabb ciklinjeinek (A, B és D-típusú ciklinek) rokonságát illusztráló törzsfát és megvizsgáltuk a BdCYC-A2 kifejeződési mintázatát is. A szálkaperje ciklinek reprezentatív filogenetikai vizsgálata teljes hosszúságú aminosav-szekvenciák illesztése alapján, a LOB-domain fehérjék rokonsági kapcsolatainak vizsgálatánál használt paraméterekkel megegyezően készült. A BdCYC-A2 kifejeződési mintázatának feltérképezéséhez a LOB-domain transzkripciós faktorok expressziós mintázatának analízisének ismertetett növényi mintákat és módszereket alkalmaztuk.

A kölcsönhatások teszteléséhez használt konstrukciókat az 5. táblázat tartalmazza. A Clontech által forgalmazott vektorok térképei a Függelék „Y2H teszthez használt vektorok” bekezdésében találhatók.

bait („csali”)		pray („préda”)	
konstrukció	klónozási hely	konstrukció	klónozási hely
pGBK-T7: BdCYC-A2	NdeI-SalI	pGAD-T7: BdLBD1C-1	EcoRI-SalI
pGBK-T7: BdCYC-A2Δ	NdeI-SalI	pGAD-T7: BdLBD1C-2	EcoRI-SalI
pGBT9: BdCYC-A2	BamHI-PstI	pGAD-424: BdLBD1C-1	EcoRI-SalI
pGBT9: BdCYC-A2Δ	BamHI-PstI	pGAD-424: BdLBD1C-2	EcoRI-SalI
pBD-GAL4: MsCYC-A2Δ *	EcoRI-SalI	pAD-GAL4: MtCPP1 *	EcoRI-SalI
pGBK-T7:BdLBD1C-1	EcoRI-SalI		
pGBK-T7:BdLBD1C-2	EcoRI-SalI		

5. táblázat. Az Y2H kölcsönhatási teszthez létrehozott konstrukciók. Δ jellel tüntettük fel az un. destrukciós motívum nélküli, trunkált fehérjét hordozó konstrukciókat. * jellel tüntettük fel a teszthez használt, de nem a szerző által létrehozott konstrukciókat.

A konstrukciók létrehozásához a kiválasztott szálkaperje-gének kódoló régióját szálkaperje embriogén kalluszból izolált totál RNS-ből készült cDNS templátként történő felhasználásával amplifikáltuk. Az embriogén kallusz létrehozása Alves és mtsai (Alves és mtsai, 2009) leírása alapján történt. Az RNS izolálása és a cDNS szintézise a korábban ismertetett protokollok alapján történt. A cDNS-szintézishez ebben az esetben oligo-dT oligonukleotidot használtunk primerként random hexamer helyett, 0,13 µg-os végkoncentrációban, templátként pedig 5 µg RNS-t adtunk a 20µl végtérfogatú reakcióhoz.

A kiválasztott szálkaperje-gének kódoló szekvenciáinak amplifikációhoz a proofreading aktivitással rendelkező Phusion TAQ Hot Start II (Thermo Scientific) enzimet használtuk 50µl végtérfogatú, a gyártó által ajánlott összetételű reakcióelegyben. Az A2 ciklin esetében klónozásra került egy, a fehérje gyors lebomlásáért felelős un. destrukciós motívumot nem tartalmazó rövidebb (trunkált) „Δ” változat is, a protein stabilitásának növelése érdekében. Ez a konstrukció a szálkaperje A2 ciklin esetében a 81-501 aminosavat kódoló régiót jelenti, míg a lucerna A2;2 ciklin esetében a 121-484 aminosavat kódoló régiót takarja (Roudier és mtsai, 2000; a publikációban Δ2 változatként feltüntetve). Az amplifikációhoz használt primerpárokat a Függelék "A Y2H konstrukciók létrehozásához használt primerek" táblázata tartalmazza. Az amplifikáció az alábbi PCR programmal történt: 10 min. 95 °C inkubáció a "hot start" enzim aktiválásához, ezt követően 40 cikluson keresztül: 95 °C 30 másodpercig a templát denaturálásához ("annealing"), 63 °C 30 másodpercig a templát és a primerek hibridizálásához, majd 72 °C 1 percen keresztül a PCR termék szintéziséhez. A reakciót a 40. ciklus után egy 5 percig tartó 72 °C szakasz zárta a termékek szintézisének teljes befejezése érdekében.

A reakciók termékét és a megfelelő vektorokat a ligálást megelőzően egy éjszakán át emésztettük a megfelelő restrikciós emésztő enzimekkel. A vektorba történő ligálás T4 DNA Ligase (Thermo Scientific) enzimmel történt, a gyártó ajánlásának megfelelő reakcióelegyben és reakciókörülmények között, 22°C-on, egy órás inkubációval. Az *E. coli* XL1 Mr^r Blue - Stratagene ($\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIqZ Δ M15 Tn10 (Tetr)]) törzsének kompetens sejtjeit a ligátummal az alábbi protokoll alapján transzformáltuk: 200 μ l kompetens sejtet 30 percen keresztül, jégen inkubáltuk 5 μ l ligátummal, majd 1 perc 42 °C hő sokk után a sejteket jégen lehűtöttük, ezt követően 800 μ l LB (Luria-Bertani) tápoldat hozzáadásával, 45 percen keresztül 37 °C-on inkubáltuk a sejteket, 200 rpm rázatással. A kultúrából az inkubációt követően 100 μ l-nyit a megfelelő antibiotikumot tartalmazó szelektív LB agar lemezre szélesztettünk, és 37°C-on egy éjszakán át növesztettük a sejteket. A transzformációhoz használt kémiai kompetens sejtek előállítására Sambrook és mtsai (Sambrook és mtsai, 1989) által kidolgozott rutin eljárást használtuk. Az *E. coli* sejtek tenyésztéséhez használt LB összetétele (pH=7.0-7.2): 10 g/l tripton, 5 g/l élesztő kivonat és 10 g/l NaCl. A szilárd táptalajhoz 1,5% (v/w) bakteriológiai agart is hozzáadtunk. A transzformáns kolóniák szelektálásához az alábbi antibiotikumokat alkalmaztuk: a pGBK-T7 vektorkonstrukciókat hordozó kolóniákhoz kanamicint 50 μ g/ml végkoncentrációban, a pGAD-T7, pGAD424 és pGBT9 vektorkonstrukciókat hordozó kolóniákhoz ampicillint 100 μ g/ml végkoncentrációban használtunk.

A klónozás sikerességét a szelektív táptalajon felnövő baktériumtelepekről végzett kolónia PCR segítségével ellenőriztük 2x Dream Taq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific) felhasználásával, a gyártó által javasolt összetételű reakcióelegyben, 20 μ l végtérfogatban. A reakcióhoz a vektorokat forgalmazó Clontech által ajánlott tesztelő primereket használtuk: 5'-BD: 5'-TCATCGGAAGAGAGTAGT -3' és 3'-BD: 5'- CGTTTTAAACCTAAGAGTCAC-3' a „bait” konstrukciók teszteléséhez, 5'-AD: 5'-CTATTCGATGATGAAGATACCCCA -3 és 3'-AD: 5'-GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGA -3' a „pray” konstrukciók teszteléséhez. Egy-egy reakcióhoz egy kacsnyi baktérium-sejtet adtunk templatként. Az amplifikációhoz az alábbi PCR programot használtuk: 10 min 95 °C, majd 30 cikluson keresztül 30 sec. 95 °C, 30 sec. 55 °C, 45 sec. 72 °C, végül a 30. ciklus után 5 min. 72 °C. A PCR alapján pozitívnak mutató kolóniákból a BIO Basic INC EZ-10 Spin Column Plasmid DNA MiniPreps Kit segítségével a készletben található protokoll alapján plazmid DNS-t izoláltunk. A kinyert plazmidok szekvenálásával bizonyosodtunk meg a klónozás sikerességéről. A

szekvenáláshoz a fent említett tesztelő primereket használtuk. A szekvenálást az MTA-SZBK Szekvenáló Platformjának munkatársai végezték.

3.3.2 Az Y2H kölcsönhatási teszthez használt élesztő törzsek, kompetens sejt készítése

Az élesztő-két hibrid kölcsönhatási teszthez a *Saccharomyces cerevisiae* AH109 (MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3::MEL1 UAS-MEL1TATA-lacZ, MEL1) és PJ69-4A (MATa trp1- Δ 901, leu2-3,112 901, ura3-52, his3- Δ 200, gal4 Δ , gal8 Δ , GAL2-ADE2 LYS2::GAL1-HIS3 met2::GAL7-lacZ) törzseit használtuk. A kompetens sejtek előállítása az alábbi protokoll alapján történt: legfeljebb 5 napos, YPAD agar lemezre szélesztett élesztő kolóniából indított starter kultúrát 20 ml YPAD tápoldatban növesztettünk egy éjszakán keresztül, 30°C-on, 250-300 rpm rázatással. A starter kultúrát OD₆₀₀=0,17-0,20 értékre hígítottuk vissza YPAD oldattal; 100 ml-nyi visszahígított kultúra 20 transzformációhoz elegendő mennyiségű élesztősejtet eredményez. A kultúrát tovább növesztettük 30°C-on OD₆₀₀=0,6-0,7 érték eléréséig, ahol OD₆₀₀ a kultúra 600 nm fényhullámhosszon mért optikai denzitását jelenti. OD₆₀₀=0,6-0,7 érték megközelítőleg 10⁷ sejt/ml sejtsűrűséget jelent. Az élesztő sejteket 700g-vel (3000 rpm) 5 percig centrifugáltuk, majd a tápoldatot leöntöttük a sejtekről, és 100 ml-nyi kiindulási kultúra esetén 50 ml steril tridesztillált vízben visszaszuszpendáltuk a sejteket. Az élesztő tenyésztéséhez használt YPAD (yeast pepton adenin dextrose) tápközeg összetétele (pH=6.8): 1% (w/v) élesztő kivonat, 2% (w/v) Bacto®-pepton, 2% (w/v) glükóz, 0.01% (w/v) adenin hemiszulfát. A szilárd táptalajhoz 1,5% (v/w) agart is hozzáadtunk.

3.3.3 Élesztő sejtek transzformálása

A desztillált vízben szuszpendált sejteket transzformáció előtt lecentrifugáltuk (3000 rpm, 5 min.), eltávolítottuk a felülúszót, majd 1 ml 100 mM lítium-acetát (Li-Ac) oldatban szuszpendáltuk vissza az élesztő sejteket (100 ml kiindulási kultúra esetén). Egy-egy transzformációhoz 50 μ l élesztő-szuszpenziót használtunk fel, vagyis egy transzformálási elegybe megközelítőleg 5x10⁷ kompetens sejt került. Közvetlenül a transzformáció előtt a sejtekről 30 sec. 3000 rpm centrifugálást követően eltávolítottuk a 100 mM Li-Ac oldatot, és a sejtekre rárétegeztük a transzformációs puffert, szigorúan az alábbi sorrendben: 240 μ l 50% PEG 3350, 36 μ l 1M Li-Ac, 25 μ l hővel denaturált single-stranded (egyszálú) carrier DNS (2 mg/ml salmon sperm DNA, Sigma Aldrich), 1-1 μ g bait és prey vektorkonstrukció 50 μ l-re kiegészítve steril desztillált vízzel. Az élesztő sejteket alapos vortexeléssel felfuszpendáltuk a

transzformációs elegyben, majd 30 percig 30 °C-on inkubáltuk. Ezt követően 25 percre 42 °C-on inkubáltuk az elegyet, majd centrifugálással (5 min. 3000 rpm) összegyűjtöttük az élesztő sejteket, és eltávolítottuk a transzformációs oldatot. A sejteket ezután 1 ml steril desztillált vízben szuszpendáltuk fel, és a megfelelő szelekciós un. SD (selective dropout) táptalajra szélesztettük ki. A sejteket 30 °C-on neveltük legfeljebb egy hétig.

A transzformáns élesztők szelekciója a kísérletben használt élesztő törzsek aminosav auxotrófiájának komplementálásán alapul. Az Y2H kísérlethez választott vektorkonstrukciókban a „bait” vektoron kódolt TRP1 gén a triptofán bioszintézisének hiányát hidalja át, míg a „pray” vektorokon kódolt LEU2 gén a leucin aminosav bioszintézisének mutációját komplementálja. Sikeres kotranszformáció esetén az élesztő sejtek képesek nőni triptofánt (W) és leucint (L) nem tartalmazó SD táptalajon (SD-WL). Amennyiben a bait és pray vektorok együttes betranszformálása megfelelően hatékony, megközelítőleg 10^4 transzformáns kolóniát kell kapnunk 1-1 µg vektor bejuttatásával. A kotranszformációs hatékonyság az alábbi képlet alapján határozható meg a SD-WL táptalajon felnövő transzformáns kolóniák számából:

$$\frac{\text{kolóniák száma} \times \text{a szuszpenzió teljes térfogata (ml)}}{\text{a lemezre kiszélesztett mennyiség (µl)} \times \text{a hígítás aránya} \times \text{a transzformáló DNS mennyisége (µg)}} = \text{transzformáns sejtek mennyisége/ µg DNS}$$

Az egyenletben a transzformáló DNS mennyisége kotranszformáció esetén is csak az egyik vektorra vonatkozik. Esetünkben 100 µl élesztő kultúrát szélesztettünk SD-WL táptalajra, 1:10 hígításban, a szuszpenzió teljes térfogata 1ml volt, a transzformációhoz 1-1 µg vektort használtunk. Vagyis megközelítőleg 100 sejtet kell számolnunk a lemezen egy megfelelően hatékony kotranszformáció után.

$$\frac{100 \times 1 \text{ ml} \times 10^3 \text{ µl/ml}}{100 \text{ µl} \times 0.1 \times 1 \text{ µg}} = 10^4$$

A kölcsönhatás teszteléséhez a rendszer a *S. cerevisiae* Gal4 transzkripciós faktorának DNS-kötő (BD-binding domain) és aktivátor (AD-activation domain) motívumait használja fel. A „bait” konstrukcióban a BD motívum fúziós partnerként egyszerre képződik az un. „csali” fehérjével, melynek kölcsönható partnerét/partnereit keressük. A „préda” (pray) konstrukció esetében az aktivátor motívum (AD) szintetizálódik a kölcsönható partnerrel fúziós fehérjeként. A vizsgált fehérjék erős kölcsönhatása esetén a motívumok működőképes egységgé állnak össze, és elősegítik az adenin (A) és hisztidin (H) auxotrófia komplementációjához szükséges gének transzkripcióját. Ez praktikusán azt jelenti, hogy a kérdéses fehérjék interakciójának

esetén a transzformáns élesztők SD-WLHA minimál táptalajon is képesek növekedni (Fields és Song, 1989; Chien és mtsai, 1991).

A vizsgálathoz használt SD táptalaj összetételtele (pH=5.8): 1,7 g/l yeast nitrogen base wo. ammonium sulfate and amino acids (Sigma Aldrich); 5 g/l ammónium-szulfát; 0,61 g/l CSM-ADE-HIS-LEU-TRP (MP Biomedicals), 20 g/l agar, 2% glükóz. 1 l SD-WL táptalajhoz kiegészítésként 100-100 ml/l L-hisztidin és L-adenin aminosav-oldatot is adtunk (200 mg/l koncentrációjú törzsoldatból).

3.3.4 β -galaktozidáz enzimaktivitás mérése

Az Y2H rendszerben vizsgált fehérjekölcsönhatások kimutatásának másik lehetősége a LacZ riportergén termékének biokémiai detektálásán alapul. A LacZ gén egy bakteriális β -galaktozidáz enzimet kódol, mely a galaktóz, mint tápanyagforrás hasznosításáért felelős. Az Y2H teszteléshez használt élesztő törzsekbe integrálásra került, ahol aktivitást csak akkor mutat, ha a „bait” és „prey” vektorba klónozott fehérjék kölcsön hatnak egymással. A β -galaktozidáz enzim jelenlétét a Clontech élesztő kéthibrid kézikönyvben (Yeast Protocols Handbook) leírt ONPG (orto-nitrophenyl- β -D-galactopiranoside) módszerrel végeztük (Schneider és mtsai 1996) kis módosításokkal, ismétlésként három független transzformációból származó 1-1 élesztő kolóniából.

Az enzimaktivitás méréséhez a transzformáns élesztő kolóniát egy éjszakán át növesztettük SD-WL tápoldatban, 250 rpm rázatással, 30°C-on. A starter kultúrát másnap $OD_{600}=0,15-0,2$ értékig hígítottuk és tovább növesztettük YPAD tápoldatban $OD_{600}=0,6-0,7$ érték eléréséig. Az élesztősejteket lecentrifugáltuk (10000g, 30 sec), majd a pelletet 300 μ l Z-pufferben szuszpendáltuk vissza. A sejtek feltárása a Yeast Protocols Handbook kézikönyvben leírtak szerint, Z-pufferoldatban felsuszpendált sejtek folyékony nitrogénben történő többszöri lefagysztásával-kiolvasztásával történt. A feltárást követően a sejteket lecentrifugáltuk (10000g, 10 min, 4 °C), a felülúszó frakcióból fehérjekoncentrációt mértünk Bradford-reagenssel történő fotometrálással (OD_{595}). A β -galaktozidáz enzim aktivitásának meghatározásához 100 μ g fehérjét adtunk a Yeast Protocols Handbook kézikönyvben leírt reakcióelegyhez: 0,7 ml Z-puffer β -merkaptóetanollal kiegészítve (100 ml Z-pufferhez 0,27 ml β -merkaptóetanol hozzáadása szükséges közvetlenül az enzimaktivitás mérése előtt) és 160 μ l ONPG, Z-pufferben oldva (4 mg/ml koncentrációban, közvetlenül az enzimaktivitás mérése előtt elkészítve). A reakcióelegyet 30 °C-on inkubáltuk egészen az élénksárga szín megjelenéséig. A sárga szín megjelenését követően az elegyhez 400 μ l Na_2CO_3 (1M) oldatot adtunk az enzimreakció gátlása

céljából, majd OD₄₂₀ nm-en fotometrálni meghatározzuk az enzimreakció során képződő termék mennyiségét. A fotometrálnival mért termék mennyiségének képződéséhez szükséges időből arányosan az alábbi egyenlettel adható meg a reakcióhoz adott egységnyi β-galaktózidáz enzim aktivitása („Unit”):

$$\frac{OD_{420}}{T} \times 20 = Unit$$

ahol OD₄₂₀ a fotométerrel mért optikai denzitás értéke 420 nm-en, T a sárga szín megjelenéséig eltelt idő percben megadva, 20 pedig az un. hígítási faktor.

A reakcióhoz használt Z-puffer összetétele (pH=7.0): 16,1 g/l Na₂HPO₄·7H₂O; 5.5 g/l NaH₂PO₄·H₂O; 0,75 g/l KCl; 0,246 g/l MgSO₄·7H₂O.

4. Eredmények és megvitatásuk

Az LBD génekről rendelkezésre álló ismeretekből kiindulva feltételezhetjük, hogy szálkaperjében is népes családot alkotnak, kifejeződésük várhatóan más növényekben előforduló LBD génekhez hasonlóan elsősorban fiatal, osztódóképes sejteket nagy arányban tartalmazó szervekben, növényi részekben a legmagasabb, mint amilyen pl. a gyökércsúcs, a fiatal oldalgyökér-kezdemények, a hajtás eredetű járulékos gyökerek és levelek nóduszai vagy a fejlődő generatív képletek. A géncsaládról eddig feltárt funkcionális sokféleség alapján a szálkaperje LBD génjeinek esetében is nagyon heterogén kifejeződési mintázat várható. Ugyan a sejtciklus szabályozása és az LBD transzkripciós faktorok közötti kapcsolatokra eddig még kevés a konkrét bizonyíték, az eddigi tapasztalatok alapján feltételezhető a kapcsolat a sejtosztódás központi szabályozói és az LBD transzkripciós faktorok között a szálkaperje esetében is, bár erre vonatkozóan munkánk kezdetén csak hozzávetőleges feltevéseink voltak.

4.1 A szálkaperjében megtalálható LBD transzkripciós faktorok azonosítása és rokonsági kapcsolatai

A lúdfüből (*A. thaliana*) már ismert konzervált LOB-domain motívum szekvenciájával a szálkaperje (*B. distachyon*) teljes proteom adatbázisával szemben végzett BLAST-analízis eredményeként összesen 28 LBD transzkripciós faktort sikerült azonosítani. Ezzel a szálkaperje rendelkezik az egyik legkevesebb számú LOB-domain proteinnel az eddig vizsgált magasabb rendű növények között. A szálkaperje LBD transzkripciós faktorait kódoló gének azonosítói, genomi pozícióját valamint a teljes hosszúságú fehérjeszekvenciák hasonlósága alapján rizsben (*Oriza sativa*), kukoricában (*Zea mays*) és lúdfüben (*Arabidopsis thaliana*) legközelebbi homológoknak tekinthető LBD transzkripciós faktorok listáját a 6. táblázat tartalmazza.

Amint azt korábban láttuk, az LBD géneket vagy az okozott fenotípus vagy legtöbbször az annotálás sorrendje és a genomi pozíció alapján számozva nevezték el. Minthogy lúdfüben írták le elsőként a géncsaládot, gyakran nevezik el az LBD transzkripciós faktorokat lúdfüben megtalálható homológjaik alapján is. Az adatbázisok jelentős része, így pl. az NCBI és a PHANTER is ez utóbbi elvet követi a szálkaperje LBD transzkripciós faktorainak elnevezéséhez. Ez a nevezéktan azonban gyakran félrevezető lehet: egyrészt nem minden szálkaperjében található LBD fehérjét kódoló génnek van lúdfüben fellelhető párja, másrészt egy-két lúdfüben megtalálható LBD génnek több homológja is lehet szálkaperjében, vagyis a nevezéktan néhány esetben redundáns. A nevezéktan hiányosságainak kiküszöbölése érdekében kidolgoztunk egy jól követhető, a fehérjék rokonsági kapcsolatait is tükröző nomenklatúrát a

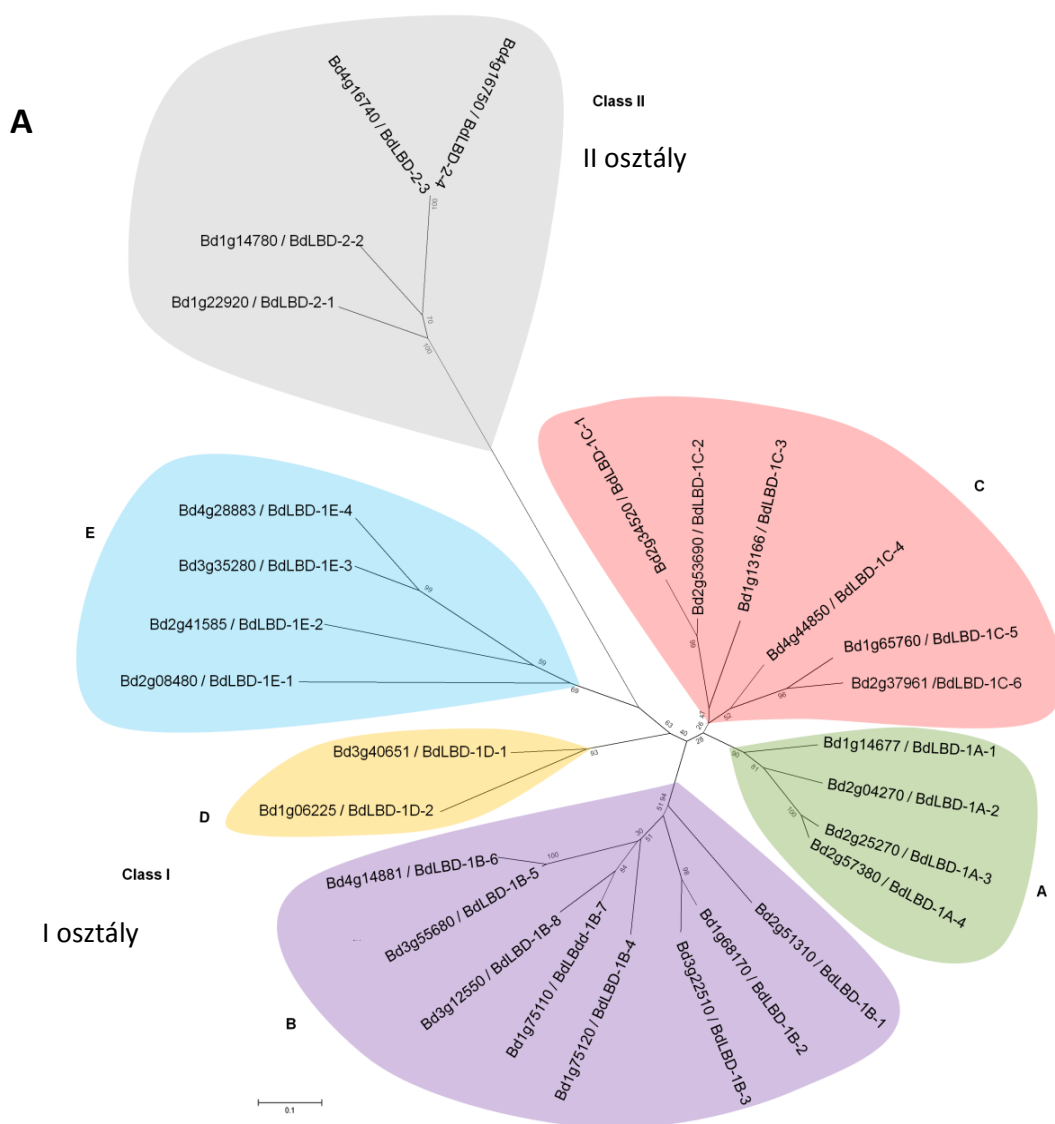
szálkaperje LOB-domain transzkripció faktorainak elnevezéséhez. Az általunk alkalmazott elnevezések az alábbi sémát követik: pl. BdLBD1A-1, ahol a faj tudományos nevének monogramját és a géncsalád rövidítését követő szám az osztályt, az utána következő betű pedig az alosztályt jelöli, ahová az adott fehérje tartozik. A kötőjel utáni szám az adott fehérje filogenetikai fán elfoglalt helyére utal; az adott alosztályon belül a legkorábban divergált tag kapja az 1 számot, a legkésőbb divergált pedig a legmagasabbat. Az általunk bevezetett elnevezéseket az adatbázisokban fellelhető nevezéktannal együtt szintén a 6. táblázat foglalja össze.

Génazonosító és elnevezés	Genomi pozíció	Legközelebbi homológ rizsben	Legközelebbi homológ kukoricában	Legközelebbi homológ lúdfűben
Bd1g14677* BdLBD1A-1	Bd1:11638427 ..11642108	Os03g41600.1* OsLBD3-5 (37.5%)	GRMZM2G154320_T01 (40.4%)/LBD6	AT5G66870.1 LBD36/ASL1 (36.8%)
Bd2g04270* BdLBD1A-2 (Ramosa2)	Bd2:3004918.. 3007300	Os01g07480.1* OsLBD1-1 (67.9%)	AC233943.1_FGT002 * Ramosa2/LBD16 (63%)	AT5G63090.2* LOB /ASL4 (36.6%)
Bd2g25270 BdLBD1A-3	Bd2:23195649 ..23200184	Os05g34450.1 OsLBD1-5 (68.2%)	GRMZM2G118250_T05 (60.2%)lg1/LBD17	AT1G65620.3 LBD6/AS2 (31.1%)
Bd2g57380* BdLBD1A-4	Bd2:55601869 ..55604636	Os01g66590.3* OsLBD1-9/AS2 (73.6%)	GRMZM2G118250_T05* lg1/LBD17 (63.2%)	AT1G65620.3 LBD6/AS2 (34%)
Bd2g51310* BdLBD1B-1	Bd2:50973581 ..50974400	Os01g56530.1* OsLBD1-7 (60.2%)	GRMZM2G025758_T01* (41.5%)/LBD19	AT3G03760.1 LBD20/ASL21 (44.1%)
Bd1g68170* BdLBD1B-2 (LBD18)	Bd1:66961988 ..66963648	Os03g14270.1* OsLBD3-3 (76.5%)	GRMZM2G110913_T01* (76.9%)/LBD10	AT2G45420.1 LBD18/ASL20 (61.2%)
Bd3g22510 BdLBD1B-3 (LBD18)	Bd3:21692420 ..21693954	Os03g14270.1 OsLBD3-3 (52.5%)	GRMZM2G150594_T01 (71.8%)/LBD42	AT4G00220.1 LBD30/ASL22/JLO (47.5%)
Bd1g75120* LBD1B-4 (LBD17)	Bd1:72376111 ..72377166	Os03g05500.1* OsLBD3-1/CRL1 (77.5%)	GRMZM2G092483_T02* RTCN/LBD1 (61.2%)	AT3G58190.1 LBD29/ASL16 (42.1%)
Bd3g55680* BdLBD1B-5	Bd3:55904170 ..55905970	Os02g57490.1* OsLBD2-1/DH1 (68.4%)	GRMZM2G075499_T01* (74.2%)/LBD22	AT2G42430.1 LBD16/ASL18 (33.5%)
Bd4g14881 BdLBD1B-6	Bd4:15566162 ..15568944	Os02g57490.1 OsLBD2-1/DH1 (41.6%)	GRMZM2G075499_T01 (38.9%)/LBD22	AT2G42430.1 LBD16/ASL18 (30.5%)
Bd1g75110* BdLBD1B-7 (LBD17)	Bd1:72372649 ..72373696	Os03g05510.1* OsLBD3-2/CRL1 (58.5%)	GRMZM2G092542_T01* RTCS/LBD2 (69.3%)	AT3G58190.1 LBD29/ASL16 (39%)
Bd3g12550* BdLBD1B-8	Bd3:11230072 ..11232349	Os08g44940.1* OsLBD8-4 (85%)	GRMZM2G092542_T01 RTCS/LBD2 (38.3%)	AT3G58190.1 LBD29/ASL16 (54.2%)

Bd2g34520* BdLBD1C-1 (LBD15)	Bd2:34601112 ..34603600	Os05g07270.1* OsLBD5-2 (32.8%)	GRMZM5G868471_T01 (34.4%)/LBD40	AT2G30340.1* LBD13/ASL10 (37.9%)
Bd2g53690* BdLBD1C-2	Bd2:52840198 ..52841742	Os01g60960.1* OsLBD1-8 (72.4%)	GRMZM2G092517_T01* (70.8%)/LBD18	AT2G40470.1 LBD15/ASL11 (52%)
Bd1g13166 BdLBD1C-3 (LBD3)	Bd1:9975575.. 9980256	Os03g45750.1 OsLBD3-6 (39%)	GRMZM2G079185_T01 (55.1%)/LBD25	AT1G16530.1 LBD3/ASL9 (45.5%)
Bd4g44850 BdLBD1C-4 (LBD12)	Bd4:48072688 ..48076289	Os05g27980.1 OsLBD5-3 (37%)	GRMZM2G044150_T01 (36.5%)/LBD28	AT2G30130.1 LBD12/ASL5/PCK1 (38%)
Bd1g65760* BdLBD1C-5	Bd1:64959728 ..64960790	Os03g17810.1* OsLBD3-4 (67.1%)	GRMZM2G021095_T01 (69.5%)/LBD11	AT1G07900.1 LBD1/ASL8 (54.9%)
Bd2g37961 BdLBD1C-6	Bd2:38319864 ..38320712	Os03g17810.1 OsLBD3-4 (37.4%)	GRMZM2G165805_T01 (42.7%)/LBD31	AT2G28500.1 LBD11/ASL7 (37%)
Bd3g40651 BdLBD1D-1 (LBD23)	Bd3:42851542 ..42852220	Os03g57670.1 OsLBD3-7 (40.9%)	GRMZM2G165805_T01 (32.3%)/LBD31	AT3G26660.1 LBD24/ASL13 (35.5%)
Bd1g06225* BdLBD1D-2 (LBD23)	Bd1:4167363.. 4168030	Os03g57670.1* OsLBD3-7 (65.7%)	GRMZM2G011385_T01* (58.7%)/LBD9	AT3G26660.1 LBD24/ASL13 (65%)
Bd2g08480 BdLBD1E-1 (LBD2)	Bd2:6872314.. 6873018	Os01g14030.1 OsLBD1-2 (34.2%)	GRMZM2G180319_T02 (25.6%)/LBD33	AT1G06280.1 LBD2/ASL32 (17.9%)
Bd2g41585 BdLBD1E-2 (LBD27)	Bd2:41622009 ..41623732	Os01g39150.1 OsLBD1-4 (21%)	GRMZM2G386095_T01 (21.3%)/LBD32	AT3G13850.1 LBD22/ASL30 (21.6%)
Bd3g35280 BdLBD1E-3 (LBD22)	Bd3:37624400 ..37626350	Os08g31080.1 OsLBD8-2 (45.3%)	AC217910.3_FGT006 (52.2%)/LBD5	AT3G13850.1 LBD22/ASL30 (16.8%)
Bd4g28883 BdLBD1E-4 (LBD22)	Bd4:34350771 ..34351919	Os08g31080.1 OsLBD8-2 (34.3%)	AC217910.3_FGT006 (38.2%)/LBD5	AT3G13850.1 LBD22/ASL30 (14.4%)
Bd1g22920 BdLBD2-1	Bd1:18432098 ..18433449	Os07g40000.1 OsLBD7-1 (57.4%)	GRMZM2G177110_T01 (69.2%)/LBD14	AT4G37540.1 LBD39/ASL41 (55.3%)
Bd1g14780* BdLBD2-2	Bd1:11708595 ..11710543	Os03g41330.1* OsLBD3-9 (82.6%)	GRMZM2G017319_T01* (80.9%)/LBD7	AT5G67420.1 LBD37/ASL39 (39.8%)
Bd4g16740 BdLBD2-3 (LBD40)	Bd4:17613573 ..17614868	Os01g32770.1 OsLBD1-11 (74.1%)	GRMZM2G073044_T01 (44.5%)/LBD37	AT3G02550.1 LBD41/ASL38 (38.6%)
Bd4g16750 BdLBD2-4 (LBD40)	Bd4:17617853 ..17619050	Os01g32770.1 OsLBD1-11 (68.3%)	GRMZM2G073044_T01 (47.3%)/LBD37	AT3G02550.1 LBD41/ASL38 (44%)

6. Táblázat. A szálkaperjében található LBD gének és legközelebbi megfelelői rizsben, kukoricában és lúdfűben. A szálkaperje LBD gének zárójelben feltüntetett elnevezése a Phytozome v12 adatbázisból származik; a zárójel előtt szereplő név az általunk adott elnevezés. A rizsben, kukoricában és lúdfűben megtalálható legközelebbi rokon fehérjékkel mutatott hasonlóság %-os értéke szintén a Phytozome v12 adatbázisból származik, a feltehetően othológ párok * jellel kerültek megkülönböztetésre.

Az LBD transzkripciós faktorok filogenetikai analizisénél gyakori probléma a fehérjék domain-motívumon kívüli aminosav-sorrendjének nagyfokú variabilitása, ezért a rokonsági kapcsolatok vizsgálata során általános gyakorlat, hogy csak a konzervált LOB-domain motívum hasonlóságát veszik alapul (Majer és Hoccholdinger, 2011). A szálkaperje LOB-domain fehérjéinek rokonsági kapcsolatait mi is a részletes szekvencia-elemzések alapján meghatározott domain-motívumra korlátozva határoztuk meg. Az elkészült rokonsági fát a 8A ábra szemlélteti.



B

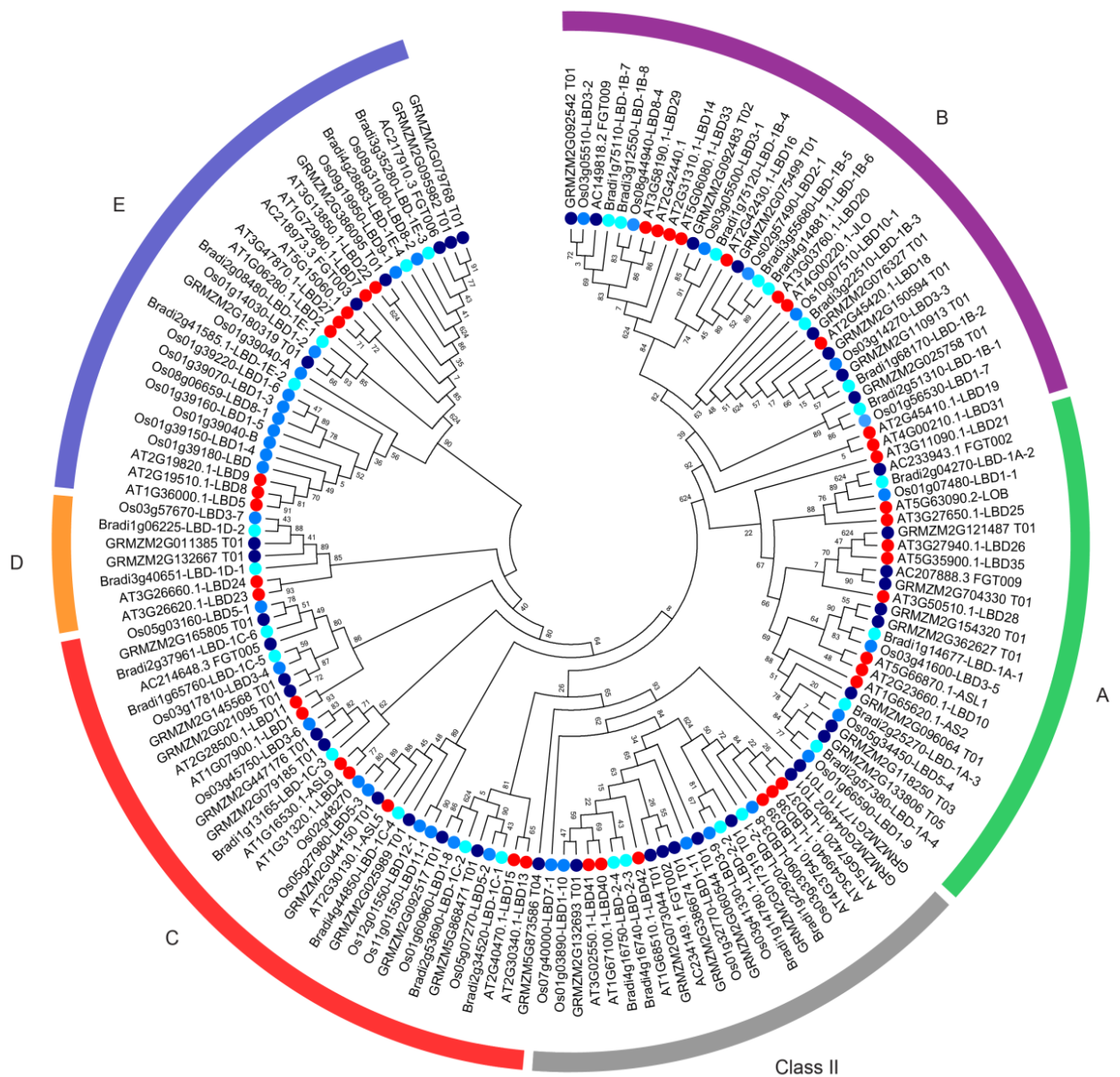
		_____CX ₂ C ₆ CX ₃ C-motif_____		_____GAS-block_____		_____coiled-coil motif_____	
BdLBD1D-2	13	RCAACKVLRRCARDCVFAPYFF-----ASDPQRYACVQVFGAGNVAMTQQ-----FAEEFRRAADAVVEASRFQADDPVYGCAGVHRLQEEIRAVTECHARTAQI	113				
BdLBD1D-1	40	RCAACKVLRRCARDCVFAPYFF-----ASLPQRYAAVHVFGASNVSLTQS-----DEKEEGRAETMAEAEBCRLRDPVYGCCLSLRQEEIRDTCCRLATTAA--	138				
BdLBD1B-2	26	PCACKFLRRRCVSGCTFAPYFD-----SEQGAHFPAVHKVFGASNVSKLLQ-----EBAHRKDDAVVTTCYEAQARLRDPVYGCVHFFALQCCVNVNLCASLTYLQTH-	126				
BdLBD1B-3	33	PCACKFLRRRCVSGCTFAPYFN-----TENGAAHFPAVHKVFGASNVSKLLQ-----EAPKRADAFTTCYEAQARLRDPVYGCVSHVFNLCQCCVANLCASLTCLQAH-	133				
BdLBD1B-7	9	PCACKFLRRRCARGCVFAPYFC-----HEQGAAHFPAVHKVFGASNVSKLLAH-----ELADRAEAVTVSYEAQARLRDPVYGCVHFFALQCCVMTLCAQLASFQOH-	109				
BdLBD1B-8	7	PCACKFLRRRCVNGCVFAPYFS-----HEQGAAHFPAVHKVFGASNVSKLLTH-----EASDRCEAVTMSYEAQARLRDPVYGCVHFFALQCCVNVNLCASLESFTQ-	107				
BdLBD1B-5	16	PCACKFLRRRCVABCVFAPYFS-----SEHGASHFPAVHKVFGASNVSKLLAH-----EAAERCEAVVTITEAOSRLRDPVYGCVQHFALQCCVAILCAQLMQAAQL	117				
BdLBD1B-6	9	-----CKFLRRRCVA-----VAPYFS-----SEHGASHFPAVHKVFGASNVSKLLAH-----EAAERCEAVVTITEAOSRLRDPVYGCVQHFALQCCVQHCHSKV-----	104				
BdLBD1B-4	11	PCACKFLRRRCABCVFAPYFC-----AEDGASQFAVHKVFGASNVSKLLSG-----EPADSEAAATVTYEAQARLRDPVYGCVHFFALQCCVAAALQVQVHAHTQ-	111				
BdLBD1B-1	44	PCACKFLRRRCAPGCVFAPYFFSGGGGREGGAQFAVHVFGASNVKLLSR-----VEVALRDTARTVCEAQAARLDVYGCVCVTHLALQHVALLGGOLSILOSQL	150				
BdLBD1C-5	51	PCAACKLRRRCADGCMFAPYFF-----PTDPAFTTAHVFASNTIKLQOE-----EESARADAVSSMVYEAEARLRDPVYGCACACRLOEEANDIKVRARAAQADL	152				
BdLBD1C-6	33	PCAACKLRRRCVDRCTFAPYFF-----PTDPHFPAVHVFGASNVKLLQD-----DEEERADAVSSMVYEAEARLRDPVYGCACACRLOEEANDIKVRARAAQADL	133				
BdLBD1C-4	20	PCAACKLRRRCARDCVFAPYFF-----PEDPAFATVHVFGASNVKLLQOE-----EPAARADAVSSLVYEATARLRDPVYGCACATSYLQHVQALQVCLAVAQAQI	121				
BdLBD1C-3	21	PCAACKLRRRCACAGCVFAPYFF-----SSEPHFASVHKVFGASNVKLLQOE-----VEAERCDAVSSLVYEANARLRDPVYGCACATSYLQHVQALQVCLAVAQAQI	121				
BdLBD1C-1	60	PCAACKLRRRCQAQCPSPFAPYFF-----PLEPHFASVHKVFGASNVKLLQOE-----VESORCDANSLVYEANRLRDPVYGCACATSYLQHVQALQVCLAVAQAQI	161				
BdLBD1C-2	57	PCAACKLRRRCQAQCPSPFAPYFF-----PHEPNFPAVHVFGASNVKLLQOE-----VEAERCDANSLVYEANRLRDPVYGCACATSYLQHVQALQVCLAVAQAQI	157				
BdLBD1A-3	40	PCAACKLRRRCQPDVCFAPYFF-----PDNPFQVHVHVFGASNVKLLQOE-----ESPFQEDANSLAYEADRLRDPVYGCACATSYLQHVQALQVCLAVAQAQI	139				
BdLBD1A-4	37	PCAACKLRRRCQPDVCFAPYFF-----PDNPFQVHVHVFGASNVKLLQOE-----ESPFQEDANSLAYEADRLRDPVYGCACATSYLQHVQALQVCLAVAQAQI	136				
BdLBD1A-2	30	PCAACKLRRRCQPGCVFAPYFF-----PEEPQFANVHKVFGASNVKLLQOE-----ELPHQEDANSLAYEAEARLRDPVYGCACATSYLQHVQALQVCLAVAQAQI	131				
BdLBD1A-1	7	PCAACKLRRRCQPGCVFAPYFF-----PDQPAFANVHKVFGASNVKLLQD-----EQAQEDANSLAYEAEARLRDPVYGCACATSYLQHVQALQVCLAVAQAQI	107				
BdLBD1E-3	72	ACAACKVLRRCNPDCTFAPYFF-----ADQQRFLNAHRLFGVSNILKTRR-----HKPELCDAAANALVYQAEARLRDPVYGCACATSYLQHVQALQVCLAVAQAQI	171				
BdLBD1E-4	68	ACAACKVLRRCNPDCTFAPYFF-----ADQQLFLNAHRLFGVSNILKTRR-----TEPELRDANRALVYQAEARLRDPVYGCACATSYLQHVQALQVCLAVAQAQI	165				
BdLBD1E-2	88	ACSACKHORRCAPGCTFAPYFF-----AENPGSPNSHRLFGVSNILKTRR-----APEKRRDCAVRSVYEAQARLRDPVYGCACATSYLQHVQALQVCLAVAQAQI	187				
BdLBD1E-1	20	ACVCKHORRCAPGCTFAPYFF-----ANRMNDRALHLVFGVANLKLKANATEEARRDAEILTEARLRDPVYGCACATSYLQHVQALQVCLAVAQAQI	119				
BdLBD 2-2	2	SCNCCVLRRCGSDAGVLRSEWIDGAQPOANATVFVAKYGRAGLNLITAA-----VLHHPALFRSLVYACGRTINPVSGCLN-----	105				
BdLBD 2-1	12	SCNCCVLRRCGONACVLRPCLHWIEAASQGHATVFVAKYGRAGLNLITAA-----VPEQRPVAVFSLVYACGRTINPVSGCLN-----WSGSMQCEAAVTVLR-----	114				
BdLBD 2-3	4	SCNCCVLRRCGSEGGTTRCLEWIKSPDAQANATVFVAKYGRAGLNLITAA-----GDDLRPALFRSLVYACGRTINPVSGCLN-----WSGRWEACQAAVAVLKGE-----	106				
BdLBD 2-4	4	SCNCCVLRRCGSEGGTTRCLEWIKSPDAQANATVFVAKYGRAGLNLITAA-----GDDLRPALFRSLVYACGRTINPVSGCLN-----WSGRWEACQAAVAVLKGE-----	107				
consensus	1*.....	*.....	*.....	

8. ábra. A) A szálkaperje LOB-domain fehérjeinek rokonsági fája. A fa a fehérjék konzervált domain-motívumának aminosav-illesztése alapján, NJ (neighbour-joining) módszerrel készült, és a MEGA6 programmal lett vizualizálva. A törzsfán az általunk adott elnevezések és a genomi azonosítók szerepelnek. A színes kiemelések a családon belüli egyes alcsoportokat jelölik. Az egyes ágak hosszúsága a divergencia mértékét tükrözi; az egységnyi szakasz 0,1 aminosav pozíciókénti cseréjét jelöli. Az elágazásoknál feltüntetett számok az 1000 ismétlésből származtatott bootstrap értékeket jelölik. **B)** Az LBD transzkripciós faktorok rokonsági kapcsolatainak megállapításához alapul szolgáló, konzervált domain-struktúrát kódoló aminosav-szekvenciák illesztése. * jellel a legkonzerváltabb, minden szekvenciában ugyanott elhelyezkedő aminosavak kerültek kiemelésre. Azok a konszenzus aminosavak, melyek a szekvenciák több mint 50%-ában ugyanabban a pozícióban fordulnak elő, szürke háttérrel, a szekvenciák több mint 75%-ában előfordulók fekete háttérrel kerültek megkülönböztetésre. A számok a motívumok fehérjén belüli pozícióját jelölik.

A rokonsági fa alapján két nagy csoportra oszthatók a szálkaperje LOB-domain fehérjei: I és II osztályra. A II osztály mindössze négy tagot számlál, míg a fehérjék több mint 80%-a összesen 24 fehérje) az I-es osztályba tartozik. Az I osztály tagjai további öt alosztályra oszthatók (A-E jelöléssel). A szálkaperje LOB-domain fehérjeinek rokonsági viszonyai és az egyes csoportokban található fehérjék száma konszenzusban áll az eddigi irodalmi tapasztalatokkal: más fajokban végzett filogenetikai vizsgálatok alapján is két nagyobb osztály és öt alosztály különböztethető meg az LBD fehérjék között, és az egyes csoportok mérete arányaiban hasonló a szálkaperjében általunk tapasztaltakhoz (Coudert és mtsai, 2012; Chanderbali és mtsai, 2015). A csoportok elnevezésénél követtük az irodalmi hagyományokat.

A szálkaperje LOB domain fehérjeinek az előzőekhez hasonló összehasonlító filogenetikai analízise rizsben, kukoricában és lúdfűben található LBD transzkripciós faktorokkal

megegyeztetve, hogy szálkaperjén belül nincs csak rá jellemző, egyedi LBD leszármazási ág; minthogy a szálkaperjében azonosított csoportok jól illeszkednek a rizs, kukorica és lúdfű LBD transzkripciós faktorainak alcsoportjaihoz, velük együtt térképeződnek a törzsfán (9 ábra). A teljes aminosav-szekvenciák közötti hasonlóság, valamint a rokonsági fán tapasztalt szomszédos elhelyezkedésük alapján összesen 14 feltételezhetően orthológ pár azonosítható a szálkaperje és a rizs LBD transzkripciós faktorai között. Közülük 10 fehérjének valószínűsíthetően kukoricában is megtalálható az orthológja, míg kettőnek lúdfűben is lehet orthológ párja. A feltételezhetően orthológ párokat a 6. táblázat tartalmazza, „*” jellel megkülönböztetve.



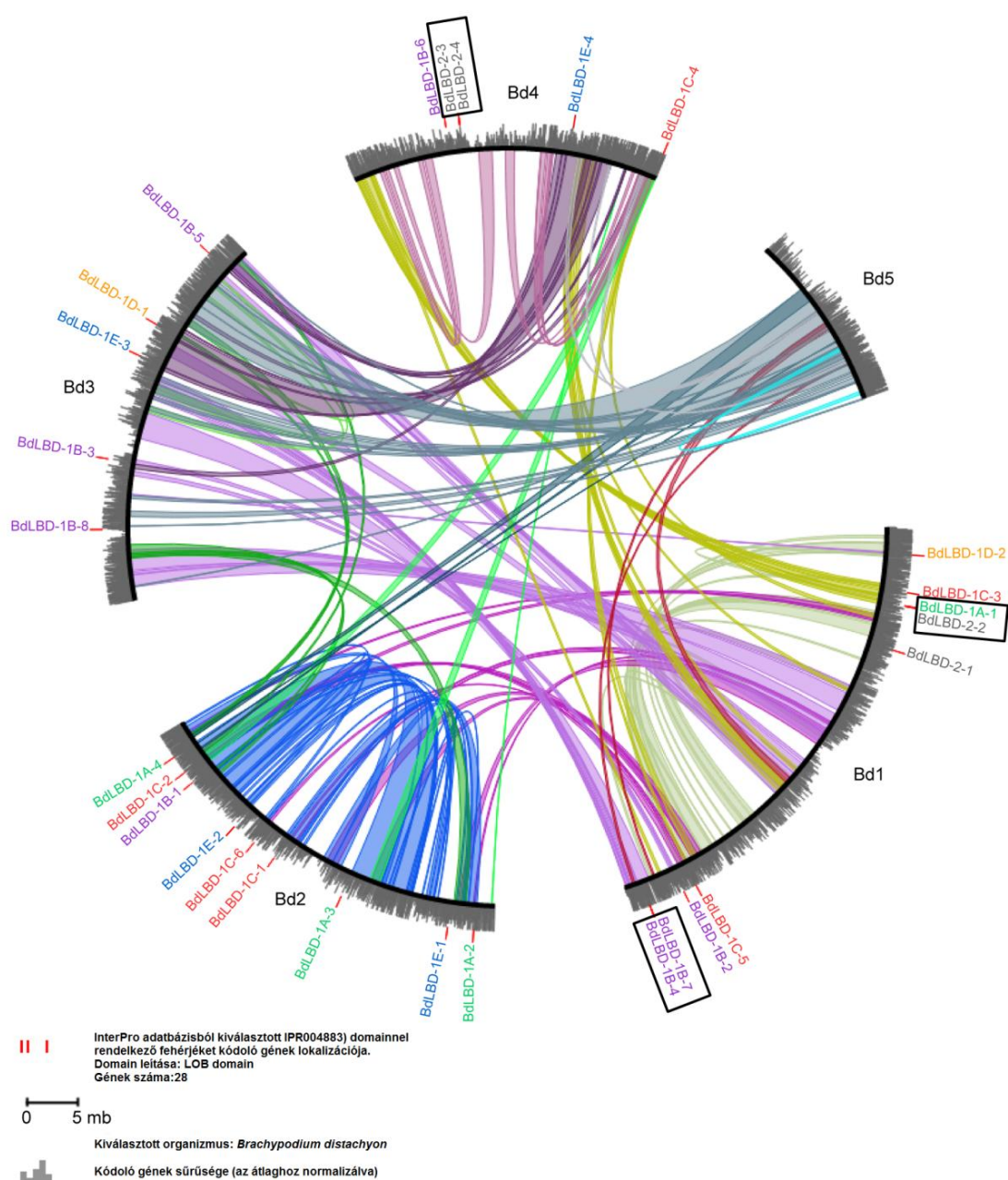
9. ábra. A szálkaperje (*B. distachyon*), rizs (*O. sativa*), kukorica (*Z. mays*) és lúdfű (*A. thaliana*) LBD transzkripciós faktorainak rokonsági fája. A fa a konzervált domain-motívum aminosav-sorrendjének hasonlósága alapján készült. A szekvenciák illesztése a dolgozat mellékleteként csatolt lemezen, digitális formában tekinthető meg (elektronikus_melléklet2). A fa NJ (neighbour-joining) módszerrel készült, és a MEGA6 programmal lett vizualizálva. A színes kiemelések a családon belüli egyes alcsoportokat jelölik. Az elágazásoknál feltüntetett számok az 1000 ismétlésből származtatott bootstrap értékeket jelölik.

A szálkaperje, rizs, kukorica és lúdfű LOB-domain motívumainak filogenetikai összehasonlítása alapján ugyan nem különböztethetők meg csak egyszikűekre vagy csak kétszikűekre jellemző leszármazási vonalak, az egyes csoportok divergációja viszont jól látható eltéréseket mutat. A B alcsalád egyszikűekben sokkal divergáltabbnak tűnik a kétszikű fajokhoz képest, míg az A alcsalád expansziója inkább a kétszikűekre jellemző (Coudert és mtsai, 2012). Ezt tükrözi az általunk végzett, négy különböző fajra kiterjedő filogenetika analízis eredménye is.

A filogenetikai fa alapjául szolgáló szekvenciaillesztésből (8B. ábra) megállapítható, hogy az összes szálkaperjében azonosított LBD transzkripciós faktor domain-struktúrája hordozza a család karakterszitikus motívumait: mindegyik szálkaperje LBD fehérjében megtalálható a cisztein-gazdag régió (CX₂CX₆CX₃C), a konzervált GAS-blokk és a leucinban gazdag „coiled-coiled” motívum is felismerhető. A leucinban gazdag régióval kapcsolatban azonban látható, hogy a D és E alosztály esetében a jellegzetes „LX₆LX₃LX₆L” motívum csak részleges, mindössze két konzervált leucint tartalmaz, míg a II osztályba tartozóknál még töredékesebben van jelen. A jellegzetes struktúrákon túl további konzerváltnak mondható motívumok is felfedezhetők: a GAS-blokk preferenciálisan FX₂VH motívummal kezdődik, és minden esetben DP(V/I)YG motívummal zárul. Bár a GAS-blokk funkciója tisztázatlan, „DP(V/I)YG” motívumának prolin reziduense igen konzervált más fajok LBD transzkripciós faktoraiban is, irodalmi adatok alapján fontos szerepet játszik a DNS-kötő aktivitásban (Lee és mtsai, 2013). A ciszteinben gazdag régióon belül néhány motívum alcsládra jellemző előfordulást mutat: a „GCACK” és „CKFLRRKC” motívumok a B alcsládra nézve karakterszitikusak, míg ugyanitt a „RCAACKYL” motívum csak a D alcsládban, a „CAACKYQ” specifikusan az E alcsládban van jelen, míg a „CNGCRVLKG” motívum a II osztály fehérjéire jellemző. Összehasonlítva a rizsből, kukoricából és lúdfűből származó szekvenciákkal, konzerváltnak tekinthetők (Yang és mtsai, 2006). Előfordulásuk konszenzusban áll az eddigi irodalmi tapasztalatokkal (A szálkaperje, rizs, kukorica és lúdfű LBD fehérjéinek domain-szekvenciáját összehasonlító illesztés a dolgozat mellékleteként csatolt lemezen, digitális formában tekinthető meg- elektronikus_melléklet2-, a dokumentum terjedelmére való tekintettel.)

4.2 A szálkaperje LBD génjeinek kromoszomális elhelyezkedése és lehetséges duplikációs kapcsolatai

A szálkaperje 28 LBD génjének genomi elhelyezkedése meglehetősen egyenlőtlen: az 1. és 2. kromoszóma 9-9 gént hordoz, 5-5 LBD gén található a 3-as és 4-es kromoszómákon, míg az 5. kromoszómán egy sem. A gének között három olyan csoport is felfedezhető, ahol a gének között kevesebb, mint 200 kb a távolság; ebből kettő az 1. kromoszómán, egy a 4. kromoszómán található. Az egyenlőtlen diszpergáltság és az egymáshoz közel elhelyezkedő gének nagy száma előrevetíti a duplikációs események nagyarányú előfordulását.



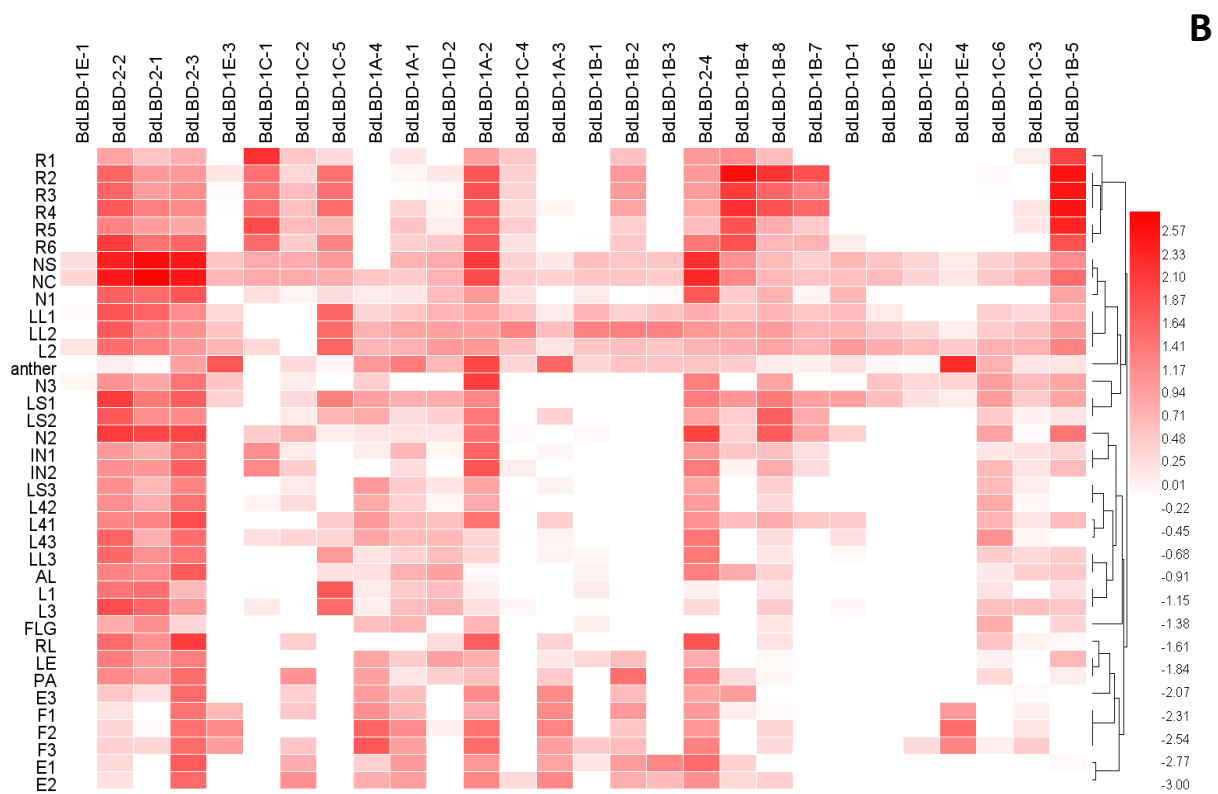
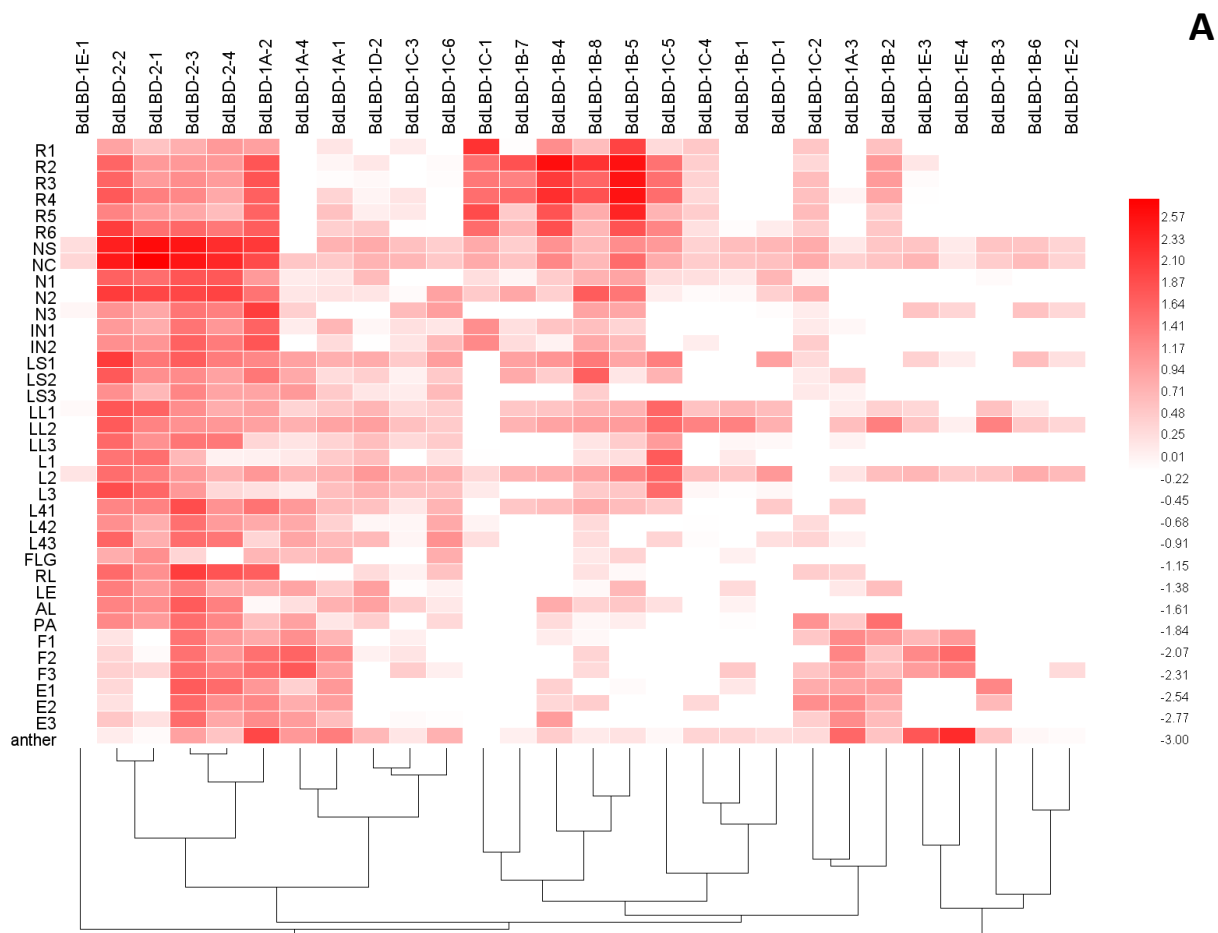
10. ábra. A szálkaperje LBD génjeinek elhelyezkedését és genom duplikációs eseményeit teljes genom szintű synten alapján szemléltető reprezentatív ábra. A színes sávok az összetartozó kollineáris blokkokat kötik össze. A bekeretezett génpárok az egymástól legfeljebb 200 kb távolságban elhelyezkedő géneket jelölik. Az ábra a Plant Genome Dupplication Database adatai alapján készült.

A „Genome Dupplication Database” adatbázisából nyert információk *in silico* vizsgálata alapján összesen 10 LBD gén származhat génduplikációs eseményekből. Ebből két csoport, a BdLBD1B-4 és BdLBD1B-7, valamint a BdLBD2-3- és BdLBD2-4 gének tandem duplikációra vezethetők vissza, míg hat további gén (BdLBD1C-2, BdLBD1B-2, BdLBD1A-3, BdLBD1A-4, BdLBD1B-3, BdLBD1B-5) részleges génduplikációk eredményei lehetnek. A legtöbb duplikálódott génpár más-más kromoszómán helyezkedik el. Az LBD gének kromoszomális elhelyezkedését és a duplikációs események sematikus ábráját a 10. ábra szemlélteti.

A szálkaperje teljes genomjának összehasonlító elemzése arra enged következtetni, hogy a teljes genom mintegy 92%-át érintették duplikációs események, és a gének 30%-a duplikációs eseményekből eredeztethető (Vogel és mtsai, 2010). Ezzel összhangban áll, hogy az általunk végzett analízis szerint az LBD kódoló gének 36%-a származhat duplikációs eseményből, ezen belül is leginkább a B alcsalád fehérjéit kódoló gének a leginkább érintettek. A 10. ábra alapján genomátrendeződési események is nagy szerepet tölthettek be a szálkaperje LBD génjeinek evolúciójában. A duplikációk és az ezt követő áthelyeződések nagy arányának jelenléte az LBD géncsaládon belül konszenzusban áll azzal az általános megfigyeléssel, miszerint a transzkripciós faktorok evolúciójában különösen gyakori jelenség a teljes genomduplikálódást követően meg többszöröződött gének megőrzése (Blanc és Wolfie, 2004; You és mtsai, 2015).

4.3 A szálkaperje LBD génjeinek kifejeződési mintázata

A szálkaperje LBD transzkripciós faktorait kódoló gének szövet/ növényi szervre specifikus aktivitását reverz transzkripció kapcsolt valós idejű polimeráz láncreakcióval (qRT-PCR) követtük nyomon, összesen 37 különböző növényi mintában. Az összes LBD gén két referenciagénhez (EF1-alpha és UBC18) képest mutatott átlagos kifejeződéséhez viszonyított relatív transzkript mennyiségeket az egyes génekre, log10 formában a 11. ábra foglalja össze. Az egyes gének kifejeződési mintázata oszlopgrafikonban a relatív transzkript szintek pontos értékeivel együtt a disszertáció digitális mellékleteként megtekinthető (elektronikus_melléklet3).



11. ábra. A szálkaperje (*Brachypodium distachyon*) LBD génjeinek 37 különböző növényi részben qRT-PCR technikával meghatározott relatív transzkript mennyisége, log10 formában megadva. A relatív transzkript mennyiségek két referenciagén (UBC18- ubiquitin konjugáló enzim valamint az EIF1 α -elongációs faktor 1 alpha) átlagos kifejeződéséhez és az összes LBD gén átlagos expressziós szintjéhez normalizálva lettek megadva. **A)** A gének csoportosítása expressziós mintázat alapján. **B)** A vizsgált növényi részek csoportosítása a bennük expresszálandó LBD gének alapján. A minták rövidítései: R1-gyökércsúcs, R2- megnyúlási zóna, R3-differenciálódási zóna, R4- érési/felszívási zóna, R5- fiatal oldalgyökér-kezdemény, R6-érett oldalgyökér-iniciális, SN-szkutelláris gyökerek nódusza, CN- koleoptil-nodális gyökerek nódusza, N1-első levél nódusza, N2- második levél nódusza, N3- harmadik levél nódusza, IN1- első levél internódiuma, IN2- második levél internódiuma, LH1- első levél hüvelye, LH2- második levél hüvelye, LH3- harmadik levél hüvelye, LL1- első levél ligulája (levélcsukló), LL2- második levél ligulája, LL3- harmadik levél ligulája, L1- első levél lemeze, L2- második levél lemeze, L3- harmadik levél lemeze, L41- negyedik levél lemezének bazális szegmense, L42- negyedik levél lemezének középső szegmense, L43- negyedik levél lemezének apikális szegmense, ZL- zászlóslevél lemeze, KT- kalásztengely, LE- lemma (toklász), LSZ- a lemma szakáll, PA- palea (pelyvavevél), V1- kifejlett virág 1-2 nappal a pollináció előtt, V2- fejlődő virág 3-4 nappal a pollináció előtt, V3- fejletlen virág 5-6 nappal a pollináció előtt, E1- kifejlett termés 9-10 nappal a pollináció után, E2- fejlődő termés 6-7 napal a pollináció után, E3- fejletlen termés 3-4 nappal a pollináció után, portok- portok. A minták részletes leírását lásd az "anyag módszer" "mintavétel" fejezetében.

A vizsgált növényi részek közül 24 minta két hetes/ négy leveles állapotú kontroll körülmények között nevelt növényekből származott (ide tartoznak a gyökér különböző szegmensei- a gyökércsúcs, a megnyúlási zóna, differenciálódási zóna, felszívási zóna valamint a fiatal és érett oldalgyökerek eredési pontjai; a járulékos gyökerek kialakításában érintett növényi részek- a koleoptil nódusz, szkutelláris nódusz valamint a hajtás különböző nóduszai; a zöld növényi részek közül az internódiumok, a különböző korú levelek levéllemeze, levélhüvelye és ligulája), a zászlóslevél lemeze és a virágzat különböző részeit reprezentáló 8 minta (a kalásztengely, a toklász és a toklászhoz tartozó "szakáll" vagy "szálka", a pelyvavevél, három különböző fejlettségi stádiumú termős virág valamint a portokok) 28 napos növényekből kerültek begyűjtésre, míg a három különböző fejlettségi stádiumot reprezentáló termések 40-45 napos növényekből származtak. (Részletes leírást ld. az "Anyag és módszer" fejezet mintavételre vonatkozó részében).

Az igen részletes, a gyökércsúcstól a hajtáscsúcsig szinte minden növényi részre kiterjedő, vegetatív és generatív szerveket egyaránt érintő génexpressziós analízis alapján megállapítható, hogy a szálkaperje LBD génjeinek relatív transzkript mennyisége nagyon tág határok között mozog. Az expresszió relatív mértékét tekintve három nagy csoportba sorolhatjuk a szálkaperje LBD génjeit. Általánosan magas transzkript szinttel jellemezhetők a II csoport génjei (BdLBD2-1, 2-2, 2-3 és 2-4), a BdLBD1A-2, 1A-3, 1B-4, 1B-5, 1B-7, 1B-8, 1C-1, 1E-3 és 1E-4. A következő csoport kifejeződésének mértéke a többi LBD génhez viszonyítva közepes:

BdLBD1A-1, 1A-4, 1B-2, 1B-3, 1C-2, 1C-3, 1C-4, 1C-5, 1C-6. A harmadik csoport génjeinek aktivitása a többi LBD génhez képest alacsony (ide tartozik a BdLBD1B-1, 1B-6, 1D-1, D-2, 1E-1, 1E-2). Az expressziós szintek közötti jelentős eltérések ellenére mindegyik gén mutat detektálható mértékű aktivitás legalább egy, általunk vizsgált növényi részben. Látható az is, hogy az egyes LBD gének egyedi és jellegzetes kifejeződési mintázatot mutatnak. Példaként lehet említeni a BdLBD1C-1 gyökércsúcsra jellemző aktivitását, vagy az LBD1B-7 kifejeződését, amely a gyökér különböző zónáiban a legkifejezettebb, viszont a gyökércsúcsban hiányzik. Hasonlóan szélsőségesen szövetspecifikus az LBD1E-3 és 1E-4 kifejeződése: aktivitásuk szinte kizárólag a portokra korlátozódik. Az egyedi jellegzetességek mellett észrevehető, hogy (néhány kivételtől eltekintve) az egy filogenetikai csoportba tartozó LBD gének kifejeződési mintázata hasonló, és gyakran gyakran átfed egymással.

Az "A" alcsaládba tartozó LBD gének kifejeződési mintázatuk alapján két nagy csoportra oszthatók. Az 1A-1 és 1A-2 gének transzkriptumai minden növényi részben detektálhatók, jóllehet az 1A-1 kifejeződése a generatív szervekben a legmagasabb, míg az 1A-2 transzkriptuma relatíve legnagyobb mértékben a gyökér különböző szegmenseiben akkumulálódik. Velük ellentétben a BdLBD1A-4 aktivitása teljes egészében hiányzik a gyökér különböző zónáiból, az 1A-3 transzkriptje pedig csak a fejlődő virágokban, termésekben és a portokban van jelen.

Az "A" alcsaláddhoz hasonlóan a "B" alcsalád tagjai is két külön csoportba sorolhatók kifejeződési mintázatuk alapján. A B alcsalád filogenetikailag korábban divergált tagjainak (BdLBD1B-1, 1B-2 és 1B-3) kifejeződése heterogén képet mutat: az 1B-1 alacsony, csak néhány növényi szervben detektálható aktivitással rendelkezik, mint pl. a különböző korú levelek ligulája, az első és második levél lemeze, a zászlóslevél, pelyvalevél és toklász. Az 1B-2 gén transzkriptuma az összes gyökérszegmensben és a generatív növényi részekben is detektálható, míg az 1B-3 csak a fejlődő termésekben és a második levél ligulájában mutatott számottevő aktivitást. Ezzel szemben a B alcsalád többi, később divergálódott tagjai (1B-4, 1B-5, 1B-7 és 1B-8) magas transzkript-mennyiséggel és erőteljesen gyökérspecifikus kifejeződéssel jellemezhetők. Megfigyelhető, hogy ezen gének relatív transzkript mennyisége a gyökércsúcsban jelentősen alacsonyabb a gyökér többi szegmenséhez viszonyítva. A legnagyobb transzkript mennyiségek a megnyúlási zónában tapasztalhatók, és ez a mennyiség fokozatosan csökken az érettebb gyökérszónák felé haladva. A sorba egyedül a BdLBD1-B6 nem illeszkedik részint kimondottan alacsony, részint szórványos, csak néhány növényi részben (pl. a járulékos gyökerek eredési helyének számító szkutelláris és koleoptiláris nóduszokban) detektálható aktivitása miatt, amely sokkal inkább a B alcsalád korábban divergált tagjainak

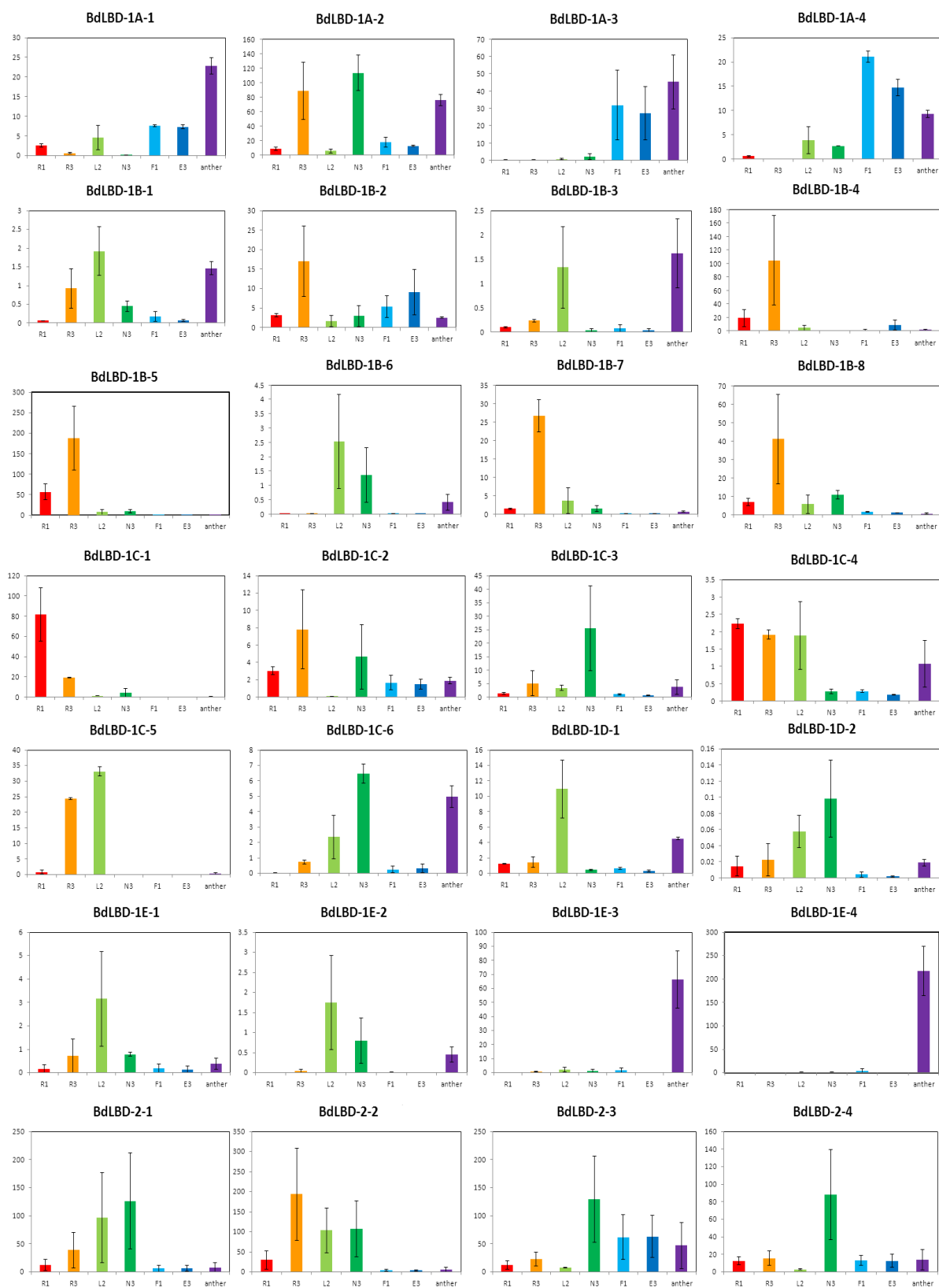
(elsősorban a BdLBD1B-3) kifejeződési mintázatára emlékeztet. Kifejeződési mintázatukat tekintve a C alcsalád génjei tekinthetők a legheterogénebb csoportnak. A BdLBD1C-1 aktivitása kimondottan a gyökérre (azon belül legszámottevőbben a gyökércsúcsra) és a járulékos gyökök eredési helyére jellemző. A BdLBD1C-2 transzkriptuma szinte minden növényi részben detektálható, a levéllemezeket kivéve, de legnagyobb mennyiségben a különböző fejlettségi stádiumú termésekben és a kalászkák különböző részeiben akkumulálódik. A BdLBD1C-3 és 1C-6 gének expressziója ugyan alacsony, de majdnem minden vegetatív zöld növényi részben aktívak. Hozzájuk hasonlóan a BdLBD1C-4 relatív transzkript mennyisége szintén alacsony, de számottevő aktivitása a gyökérből származó mintákban detektálható. A BdLBD1C-5 is mutat aktivitást a különböző gyökérszegmensekben, de jelentős mértékű expresszióval rendelkezik a különböző korú levelek lemezében, levélhüvelyében és ligulájában is. Az 1C-5 esetében - ellentétben az LBD génekről általánosan feltételezhető képpel, miszerint inkább fiatal, osztódóképes sejteket nagy mennyiségben tartalmazó növényi szövetekben működnek leginkább - a legtöbb transzkriptum az érett, idősebb növényi részekben pl. az első levél lemezében vagy a gyökér érési/felszívási zónájában detektálható.

A D alcsaládba tartozó gének alacsony relatív transzkript mennyiséggel jellemezhetők, közülük az 1D-1 a különböző nóduszokban (a szkutelláris és koleoptil nodális gyökök eredési helyén, valamint a hajtás első és második nóduszában), a levelek lemezében és ligulájában mutat aktivitást, míg az 1D-2 a generatív növényi részek kivételével szinte a növényben expresszálódik. Az E alcsalád tagjai között a BdLBD1E-1 és 1E-2 kifejeződési mintázatának közös vonása, hogy aktivitásuk a detektálhatóság alsó határát alig haladja meg. Aktivitásuk csak a szkutelláris és koleoptiláris nóduszban valamint a második levél szegmenseiben mérhető, de nagyon alacsony, szinte elhanyagolható mértékben. (Természetesen lehetnek olyan általunk nem tesztelt körülmények vagy növényi részek, melyben ez a két gén az általunk tapasztaltaknál jóval magasabb expressziós szintet érhet el.) Velük ellentétben a BdLBD1E-3 és 1E-4 igen magas szinten expresszálódik, de csak a portokban és a különböző fejlettségi stádiumú virágokban. Az I család génjeivel ellentétben a II család tagjai semmilyen szövetspecifitással nem rendelkeznek. Kifejezetten magas szinten expresszálódnak minden általunk vizsgált növényi mintában, egy-két kivételtől eltekintve, mint pl. az LBD2-1, amely a termésekben és virágokban alig mutat aktivitást, vagy az LBD2-3, amelynek relatív transzkript mennyisége a zászlós levélben igen alacsony.

Az LBD gének kifejeződésének átfogó vizsgálata során kapott változatos mintázatok tükrében a géncsaládon belül nagyfokú funkcionális heterogenitás tételezhető fel; egybehangzóan a korábbi irodalmi tapasztalatokkal, melyek arra engednek következtetni, hogy

az LBD gének a növényi egyedfejlődés legkülönbözőbb aspektusában érintettek (Majer és Hochholding, 2011; Xu és mtsai, 2016). Az egyes génekre jellemző egyedi kifejeződési mintázatok alapján egy-egy LBD egyedi funkciókkal rendelkezhet. Gyakran még az egy rokonsági körbe tartozó gének kifejeződése is markáns eltéréseket mutat, ami miatt korlátozottan lehet jól definiálható funkciót társítani egy-egy alcsaláddhoz. Az egyedi mintázatok ellenére azonban számos gén esetében tapasztaltunk jelentős mértékben átfedő kifejeződési profilt.

A hasonló mintázattal rendelkező gének között nemcsak redundáns funkciók feltételezhetők, de az átfedő mintázat egyben azt is jelenti, hogy egy adott növényi részen belül az egyszerre kifejeződő LBD gének egyedi kombinációja van jelen, amely kombináció jellemző az adott növényi részre vagy szervtípusra. Ez jól látható, ha a növényi mintákat az általuk expresszált LBD gének alapján csoportosítjuk (11. B ábra). Eszerint az általunk vizsgált növényi részek négy nagyobb csoportba sorolhatók. Az első csoportot a gyökér különböző zónái valamint a fiatal oldalgöyökér-kezdemenyek és az érett oldalgöyökér-iniciálisok alkotják (R1-R6 minták). Ezekben a mintákban jellemzően a II család génjei valamint az LBD1A-2, az LBD1B-2, 1B-4, 1B-5, 1B-7, 1B-8 és az LBD1C-1, 1C-2, 1C-4, 1C-5 működnek. A második csoportba tartozó mintákban szinte az összes LBD gén aktivitása detektálható. Ilyen növényi részek a szcutelláris és koleoptil nóduszok, a hajtás első, második és harmadik nódusza, az első és második levél különböző szegmensei (levélhüvely, ligula) és a portok. Ezekben a mintákban különösen magas a II családba tartozó gének relatív transzkript mennyisége, mellettük az I család tagjainak relatív expressziós szintje igen alacsony, legtöbbször alig mérhető. Ez alól kivételt képez az LBD1C-5, amely az első és második levél ligulájában erőteljes aktivitást mutat, valamint az LBD1E-3 és 1E-4, melyek kifejeződésének relatív mértéke a portokban igen magas. A harmadik csoportba azok a növényi részek tartoznak, melyekben a II család génjei mellett az LBD1A-1, 1A-2, 1A-4, 1C-6 valamint az 1D-2 gének kifejeződése számottevő. Ide sorolhatók a szár internódiumai, a levéllemezek és a legfiatalabb, még fejletlen negyedik levél szegmensei és a zászlóslevél. A negyedik csoportot a virágzat különböző részei valamint a különböző fejlettségi stádiumú virágok és termések alkotják. Ezekben a mintákban az LBD gének közül a II csoport tagjai mellett az LBD1A-1, 1A-2, 1A-3, 1A-4, 1B-2, 1C-2 gének mutatnak aktivitást. Az LBD gének heterogén kifejeződését részleges biológiai ismételés is alátámasztotta (12. ábra).



12. ábra. A szálkaperje LBD génjeinek relatív expressziós szintjei 7 különböző növényi részben. Az R1, R3, L2, N3 minták 14 napos, négyleveles növényekből származtak, a V1 minta 28 napos növényekből, az E3 minta 40-45 napos kontroll körülmények között nevelt növényekből származott. A feltüntetett szórás (SD-standard deviation) két biológiai ismétlésből származó értékekre vonatkozik. A relatív transzkript mennyiségek két referenciagén (UBC18-ubiquitin konjugáló enzim valamint az ELF1 α -elongációs faktor 1 alpha) átlagos kifejeződéséhez és az összes LBD gén átlagos expressziós szintjéhez normalizálva lettek megadva.

Mivel ahhoz, hogy az egyes növényi részekből az expressziós vizsgálathoz megfelelő mennyiség álljon rendelkezésre, nagy mennyiségű növényi anyag került feldolgozásra (mintegy 200 növény), ezért erre való tekintettel a biológiai ismétlésnél a 37 mintából 7 reprezentatív növényi részen (R1- gyökércsúcs, R3- differenciálódási zóna, L2- második levél lemeze, N3- harmadik levél nódusza, V1- kifejlett virág 1-2 nappal a pollináció előtt, E3- fejlődő termések 3-4 nappal a pollinációt követően, portok) végeztük el újra a teljes expressziós vizsgálatot. Ennek eredményét a 12. ábra szemlélteti.

Ugyan LBD génekkel kapcsolatban ennyire részletes, a géncsalád minden tagjára és szinte minden növényi részre kiterjedő vizsgálat más növényekben még nem született, számos, a géncsalád átfogó és általános jellemzésére törekvő munka ismert nemcsak modellnövényekből, mint a lúdfű (Shuahi és mtsai, 2002; Matsumura és mtsai, 2009) vagy a *Lotus japonicus* (Yang és mtsai, 2016), hanem olyan gazdaságilag fontos fajokból is, mint pl. a rizs (Yang és mtsai, 2009), a kukorica (Zhang és mtsai, 2014), az árpa (Gou és mtsai, 2016), az alma (*Malus domestica*) (Wang és mtsai, 2013), a borszőlő (*Vitis vinifera*) (Cao és mtsai, 2016) vagy az eperfafélék közé tartozó *Morus notabilis* (Lou és mtsai, 2016). Annak ellenére, hogy ezek az irodalmi adatok nehezen mérhetőek össze egymással és az általunk kapott eredményekkel - részint a vizsgált növényi részek közötti különbségek, részint az eltérő technikák miatt - a kifejeződési mintázatok mégis jelentős hasonlóságot mutatnak.

A tapasztalatok alapján a nagyon diverz, változatos kifejeződési mintázat általános jellemzője az LBD géneknek, fajtól függetlenül, és az is általánosnak tekinthető, hogy egy-egy növényi részben több LBD gén is működik egyszerre. Figyelembe véve az irodalmi adatokat, nemcsak a szálkaperje LBD génjeire, hanem az egész családra jellemző gyakori tulajdonság, hogy a szövet/szervspecifikus kifejeződés mellett számos LBD gén egyszerre több különböző növényi részben is expresszálódik. Ezek a megfigyelések arra engednek következtetni, hogy egy-egy LBD transzkripciós faktor akár több növényi szerv fejlődését irányíthatja szimultán, más LBD fehérjékkel kombinációban. Kísérletek igazolják, hogy lúdfűben az AtLBD6/AS2 és az AtLBD30/JLO együttesen felelősek a megfelelő levélmorfológia kialakításáért (Borghi és mtsai, 2007; Rast és Rüdiger, 2012). Az AtLBD30/JLO ugyanakkor fontos szerepet tölt be az

embriogenezis folyamatában, később pedig a szállítószövetek differenciálódásában is, de egy másik LBD transzkripció faktorral, az AtLBD18-cal közösen (Soyanto és mtsai, 2008; Bureau és mtsai, 2010).

Összesítve a szálkaperje LBD génjeinek kifejeződési mintázatait és a más fajokban megtalálható legközelebbi rokon LBD génekről rendelkezésre álló ismereteket (7. táblázat), a gén család még egy igen lényeges jellegzetessége látszik kirajzolódni: a nagyfokú konzerváltság. Erre enged következtetni a különböző fajok LBD génjeinek kifejeződési mintázata közötti hasonlóságok, és amint az irodalmi bevezetőben említésre került, néhány esetben funkcionális egyezést is kimutattak a lúdfű, a rizs vagy a kukorica néhány LBD génje között pl. az LBD6/AS2 génre vonatkozóan (Semiarti és mtsai, 2002; Evans és mtsai, 2007; Ma és mtsai, 2009).

Név	Jellemző expresszió	Orthológ gén ismert funkcióval/ kifejeződési mintázattal*			
A család	BdLBD-1A-1	minden növényi részben, főként a generatív szervekben	Os03g41600.1 (OsLBD3-5) GRMZM2G1543020_T01	virágzatban portokban	
	BdLBD-1A-2	minden növényi részben	AC233943.1_FGT002 (Ra2)	bugavirágzat fejlődése	a szár különböző szegmenseiben, virágzatban Bortiti és mtsai, 2006
	BdLBD-1A-3	a virágzat különböző részeiben			
	BdLBD-1A-4	minden zöld növényi részben és a virágzat különböző részeiben	Os01g66590 (OsLBD1-9) GRMZM2G11825_T05/Ig1 AT1G65620 (LBD6/AS2)	levélfejlődés, embriófejlődés	levelekben, virágzatban termések perikarpiumában Ma és mtsai, 2009 Iwakawa és mtsai, 2002 Evans, 2007
B család	BdLBD-1B-1	levelek lemeze és ligulája, virágzat részei	GRMZM2G025758 AT3G03760/LBD17	virágzatban	
	BdLBD-1B-2	a gyökérzónák és a virágzat részei	AT2G45420 (LBD18/ASL20)	oldalgyökerek fejlődése	gyökérben, hajtásban Soyano és mtsai, 2008
	BdLBD-1B-3	szkutelláris és koleoptil nódusz, fejlődő termések	AT4G00220(LBD30/ASL22/JLO)	gyökérfejlődés embriófejlődés	hajtásban, gyökérben, virágokban Bureau és mtsai, 2010
	BdLBD-1B-4	gyökérzónák és levélnóduszok	GRMZM2G092483_T02 (RTCN)	koronagyökerek fejlődése	gyökérben, radikulában Xu és mtsai, 2016
	BdLBD-1B-5	számos növényi részben, főként a gyökérzónákban	Os02g57490 (OsLBD2-1/DH1) AT2G42430 (LBD16/ASL18)	gyökérfejlődés	gyökérben Li és mtsai, 2008 Goh és mtsai, 2012
	BdLBD-1B-6	Szkutelláris és koleoptil nódusz, levélnóduszok			
	BdLBD-1B-7	gyökérzónák és levélnóduszok	GRMZM2G092542_T01 (RTCS) Os03g05510.1 (OsLBD3-2/CRL1) AT3G58190 (LBD29/ASL16)	gyökérfejlődés	gyökérben Taramino és mtsai, 2007 Liu és mtsai, 2005 Feng és mtsai, 2012
	BdLBD-1B-8	gyökérzónák, elsősorban a megnyúlási zóna	Os08g44940.1 (OsLBD8-4)		gyökérben

C család	BdLBD-1C-1	gyökérszónák, elsősorban gyökércsúcs	Os05g07270.1 (OsLBD5-2) AT2G30340.1 (LBD13)	gyökérben	
	BdLBD-1C-2	a levéllemezek kivételével minden növényi részben, főként a virágzatban, termésben	AT2G40470 (LBD15/ASL11) Os01g60960.1 (OsLBD1-8)	hajtás apikális merisztéma és oldalszervek fejlődése	gyökérben, virágzatban Sun és mtsai, 2013 Zhu és mtsai, 2014
	BdLBD-1C-3	a levelek különböző részei, levélnódusok, pelyva és toklás	AT1G16530 (LBD3/ASL9)	citokinin indukálta fejlődési folyamatok	gyökérben, virágban Naito és mtsai, 2007
	BdLBD-1C-4	gyökérszegmensek, második level lemeze és ligulája			
	BdLBD-1C-5	vegetatív növényi részek, elsősorban a level különböző részeiben	Os03g17810.1 (OsLBD3-4) AT1G07900.1 (LBD1)	hajtásban, gyökérben és levélben	
	BdLBD-1C-6	a level különböző részei, levélnódusok, kalásztengely, pelyvalevél, portok			
D család	BdLBD-1D-1	szkutelláris és koleoptil nódusz, a level különböző részei			
	BdLBD-1D-2	a levelek különböző részeiben, levélnódusokban, pelyvalevélben, toklásban	Os03g57670 (OsLBD3-7)	levélméret és levélmorfológia meghatározása	a szár különböző szegmenseiben, levélben Li és mtsai, 2016
E család	BdLBD-1E-1	szkutelláris és koleoptil nódusz, második level lemeze			
	BdLBD-1E-2	szkutelláris és koleoptil nódusz, második level lemeze			
	BdLBD-1E-3	portok			
	BdLBD-1E-4	portok			
II család	BdLBD-2-1	minden növényi részben	AT4G37540 (LBD39/ASL41)	antocián szintézis, virágzási idő	minden növényi részben Rubin és mtsai, 2009 Li és mtsai, 2017
	BdLBD-2-2	minden növényi részben	AT5G67420 (LBD37/ASL39) Os03g41330.1 (OsLBD3-9) GRMZM2G017319_T01	antocián szintézis, virágzási idő	minden növényi részben Rubin és mtsai, 2009 Li és mtsai, 2017
	BdLBD-2-3	minden növényi részben	Os01g32770.1 (OsLBD1-11) GRMZM2G073044_T01 AT3G02550.1 (LBD41)		minden növényi részben
	BdLBD-2-4	minden növényi részben	Os01g32770.1 (OsLBD1-11) GRMZM2G073044_T01 AT3G02550.1 (LBD41)		minden növényi részben

7. táblázat. Összefoglaló táblázat a szálkaperje LBD génjeinek jellemző kifejeződési mintázatáról és más fajokban megtalálható orthológ párjaik funkciójáról. *Az orthológ gének expressziójára vonatkozó adatok lúdfüvel (*A. taliana*) (Shuai és mtsai, 2002), rizsszel (*O. sativa*) (Yang és mtsai, 2006) valamint kukoricával (*Zea mays*) (Zhang és mtsai, 2014) végzett átfogó vizsgálatokból származnak. A táblázatban feltüntetett referenciák a funkcionális vizsgálatokra vonatkoznak.

A lúdfű (*A. thaliana*), a kukorica (*Zea mays*), a rizs (*O. sativa*) és a szálkaperje (*B. distachyon*) LBD génjeinek egybevágó kifejeződési mintázata megerősíteni látszik az LBD génekről általánosan elfogadott nézetet, miszerint az egyes LBD gének funkciója alig változott az egyszikűek és a kétszikűek több mint 130 millió évvel ezelőtti bekövetkezett evolúciós szétválása óta. Bár kizárólag a kifejeződési mintázatokban fellelhető azonosságokra alapozva – egyéb összehasonlító vizsgálatok hiányában – hiba volna egyértelmű funkcionális azonosságot feltételezni a különböző fajok és a szálkaperje rokon LBD génjei között, de a hasonlóságok jó kiindulási pontként szolgálnak az egyes LBD gének szerepének prediktálásához és feltáráshoz.

4.4 A szálkaperje LBD1C-1 és 1C-2 fehérjéinek kapcsolata a sejtciklus szabályozásával

Az eddigi tapasztalatok arra engednek következtetni, hogy az LBD transzkripciós faktorok a sejtosztódás és a differenciálódás folyamatainak koordinálásában töltenek be lényeges szerepet az osztódóképes szövetek és a fejlődő szervprimordiumok határán (Rast és Simon, 2008; Xu és mtsai, 2016). Belátható, hogy az új sejtek megjelenésének, az utódsejtek sorsának térben és időben jól összehangolt irányítása döntő fontosságú a növény egész architektúrájának kialakulása és fenntartása szempontjából. Ugyan az már számos esetben ismert, hogy az LBD transzkripciós faktorok mely regulációs hálózatok részeként vesznek részt a növényi egyedfejlődés irányításában (Majer és Hochholdinger, 2011; Xu és mtsai, 2016), közvetlen összeköttetésük a sejtciklus irányításával mindmáig hipotézis tárgyát képezi. Bár az LBD transzkripciós faktorok és a sejtosztódás szabályozói között fennálló direkt kapcsolatok létezése kétséget kizáróan feltételezhető, a közvetlen összeköttetést biztosító mechanizmusok még feltáratlanok.

Kutatócsoportunk korábbi, még publikálatlan eredményei alapján az egyik ilyen lehetséges direkt kapcsolat a LOB domain fehérjék és a sejtciklus szabályozása között az LBD transzkripciós faktorok és a ciklin-CDK komplexek közötti kölcsönhatás. Nevezetesen, élesztő-két hibrid rendszerben a lucerna (*Medicago sativa*) A2;2 típusú mitotikus ciklinjének (szekvencia-azonosító: CAB46083.1) egyik kölcsönható fehérje partnere egy közel rokon faj, a *Medicago truncatula* egyik LBD transzkripciós faktora, az MtCPP1 (cyclin partner ptotein) (Medtr5g083960). Irodalmi adatok alapján a lucerna A2;2 ciklinje elsősorban az olyan merisztémák (a hajtás és a gyökér apikális merisztémája, az oldalgyökerek és a pillangósvirágúakra jellemző gyökérgümők fejlődése során megjelenő másodlagos merisztémák) mitotikus aktivitásával hozható összefüggésbe (Roudier és mtsai, 2003), melyek működésének irányításában potenciálisan az LBD gének is érintettek.

Az MtCPP1 és az A2;2 ciklin közötti kölcsönhatás felveti a lehetőségét az LBD transzkripciós faktorok sejtciklus függő szabályozottságának, és bár akkori kutatásaink nem az LBD génekre fókuszáltak, figyelmünket az LBD géncsalád felé fordították. A disszertáció további részében azok az élesztő-két hibrid rendszerben (Y2H- yeast two hybrid) végzett kísérletek kerülnek bemutatásra, melyeket a lucerna A2;2 ciklinjének és a *Medicago truncatula* MtCPP1 fehérjéjének szálkaperjében megtalálható legközelebbi rokon fehérjével végeztünk.

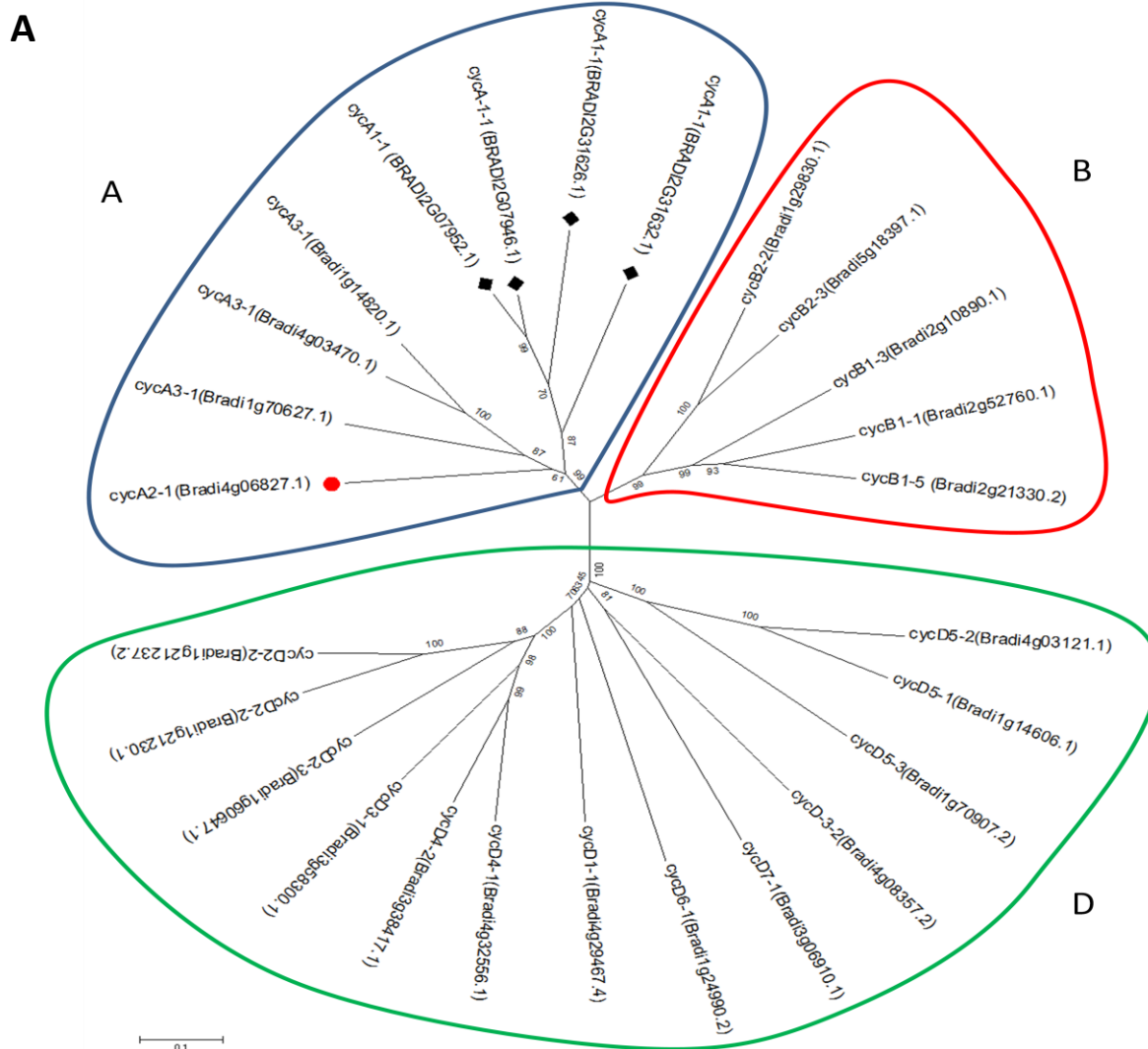
4.4.1 A lehetséges kölcsönható partnerek kiválasztása

A szálkaperje teljes fehérjeszekvencia adatbázisában végzett részletes, szekvencia-hasonlóságon alapuló BLAST keresés eredményeként az MtCPP1 legközelebbi rokonai a szálkaperje LBD transzkripciós faktorai között a BdLBD1C-1 valamint a BdLBD1C-2. A három fehérje hasonlóságát reprezentáló szekvencia-illesztést a 13. ábra szemlélteti. Mivel mind a BdLBD1C-1, mind a BdLBD1C-2 azonos, megközelítőleg 50%-os hasonlóságot mutat az MtCPP1 szekvenciájával, az Y2H vizsgálatokhoz mindkét fehérje génjének kódoló szekvenciája klónozásra került.

BdLBD1C-1 (Bradi	1	MPIAS	WQEH	ELGKKIKRES	AAAAEADRMMAARRS	SSSOI	PAAAF	AGAGPGS	SEPFNTMTF									
Medtr5g083960.1	1	MSRER	GRFF	DEIGKKREGD	-----E-----	-----	SFOK	GRMLGPS	GTINTTTF									
BdLBD1C-2 (Bradi	1	MSTER	ERL	DEIGKKIKRE	PDGAAAAAGGFVVAS	SSSPV	DHHVSR	RMVLIG	GAPNTATF									
consensus	1	*									
LOB-domain																		
BdLBD1C-1 (Bradi	61	CAACKLLRRRC	AOEC	PFSP	FSELE	PHK	FASVHKVFGASNV	SKMLLEVHES	ORGDAANSI									
Medtr5g083960.1	40	CAACKLLRRRC	AOEC	PFSPYFSPHE	POK	FASVHKVFGASNV	SKLLEV	PENQR	DAANSI									
BdLBD1C-2 (Bradi	58	CAACKLLRRRC	AHECP	FAFYFSPHE	PNKFA	AVHKVFGASNV	SKMLLEV	VEAER	GDAANSI									
consensus	61	*****									
BdLBD1C-1 (Bradi	121	VYEANLRLR	DPVYG	CMGAIL	L	LQOOV	H	LEADIAALRA	QIOLH	HKQOHT	CSSLRPPPP							
Medtr5g083960.1	100	VYEAN	VRLR	DPVYG	CMGAI	SL	LQOOV	QSL	L	IGELN	AIREE	IHKYKLM	EANM	ESSE	-----			
BdLBD1C-2 (Bradi	118	VYEANLRLR	DPVYG	CMGAI	SL	LQOOV	S	LAELAE	LEAVRAE	IFKHRY	Q	ASSI	M	AGGD	----			
consensus	121	*****	*****	*****			
BdLBD1C-1 (Bradi	181	ATAGN	VPSNV	L	PS	SHASQLL	AAAAA	ASTAG	P	RAA	QAAAA	MGPA	ASAS	S	STTVYAAA	---		
Medtr5g083960.1	155	DVSI	ATL	PPS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
BdLBD1C-2 (Bradi	174	DAGFM	CA	PAM	AMP	PVHA	ADDD	VVS	VAAA	---	AGQ	Q	DVIV	-----	AGIP	GT	PTVYAA	TG
consensus	181*	
BdLBD1C-1 (Bradi	239	-----	S	SST	DYSSI	-----	TH	EN	V	PYFG								
Medtr5g083960.1	180	NPT	-----	S	YSSI	-----	SNDH	S	YFD									
BdLBD1C-2 (Bradi	226	Q	PSS	S	AAD	DY	G	S	ENT	SEH	GAYFG							
consensus	241

13. ábra. A *Medicago truncatula* MtCPP1 (Medtr5g083960.1) és a szálkaperjében megtalálható legközelebbi homológjainak, a BdLBD1C-1 (Bd2g34520) és 1C-2 (Bd2g53690) szekvencia-illesztése. Az egyenes vonal a LOB-domain struktúra kiterjedését jelöli. A szekvenciák több mint 50%-ában ugyanabban a pozícióban előforduló konszenzus aminosavak szürke, a szekvenciák több mint 75%-ában előfordulók fekete háttérrel kerültek megkülönböztetve. A számok a motívumok fehérjén belüli pozícióját jelölik.

Hasonló megközelítéssel azonosítottuk be a lucerna A2;2 típusú ciklinjének szálkaperjében megtalálható legközelebbi megfelelőjét is. A keresés eredményeként sikerült beazonosítanunk a szálkaperje ciklinjei között az egyetlen A2 típusú ciklint (Bd4g06827), mint a lucerna A2;2 ciklinjének legközelebbi rokonát (14. ábra).



destrukciós box

14. ábra. (A) A szálkaperje A, B és D ciklinjeinek teljes aminosav-szekvencián alapuló rokonsági kapcsolatai. Fekete rombuszsal jelöltek a Phytozome v12 adatbázisban nem szereplő, de az NCBI adatbankjában megtalálható cikinek. Piros körrel az A2 cikin került kiemelésre. A törzsfá alapjául szolgáló szekvencia-illesztés a disszertáció digitális mellékletében szerepel (elektronikus_melléklet4). **(B)** A *Medicago sativa* A2;2 ciklinjének (CAB46083.1) és szálkaperjében megtalálható legközelebbi homológjának, az A2 ciklin (Bradi4g06827.1) szekvencia-illesztése és fontosabb szerkezeti motívumai. A szekvenciák több mint 50%-ában ugyanabban a pozícióban előforduló konszenzus aminosavak szürke, a szekvenciák több mint 75%-ában előfordulók fekete háttérrel kerültek megkülönböztetve.

74

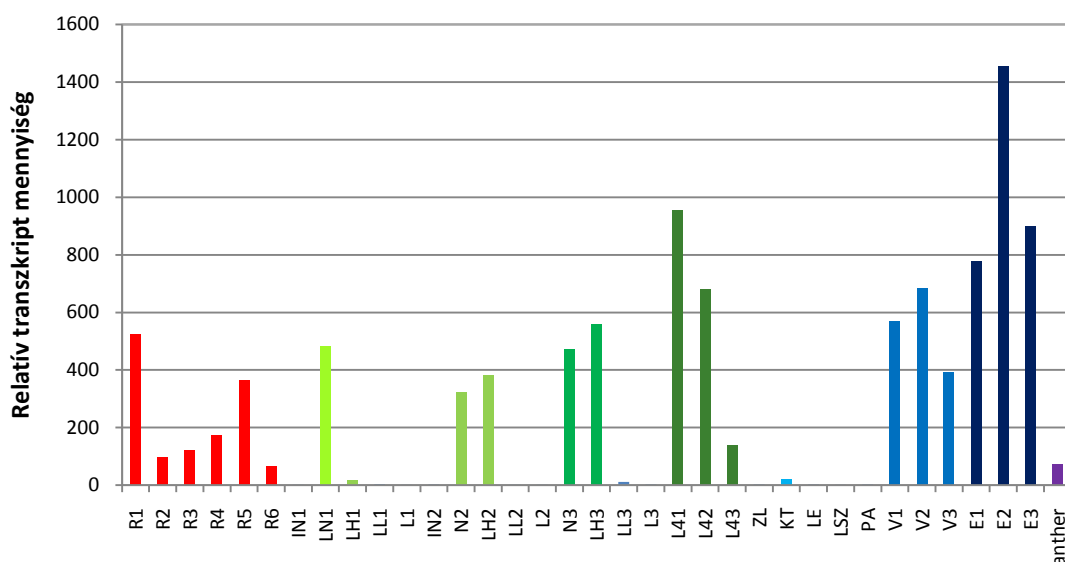
alosztály (A1-3) is elkülöníthető az A típusú cikinek között. Az A alcsalád növényekre jellemző komplexitása felveti a lehetőségét annak, hogy a csak növényekben előforduló A típusú ciklinek növényekre jellemző egyedi funkciókkal bírhatnak, bár e tekintetben kevés ismeret áll rendelkezésünkre. A lucerna A2;2 ciklinjének merisztémák kialakulásában és osztódóképességének fenntartásában betöltött szerepe egy ilyen, csak növényekre jellemző specifikus funkció, jöllehet a sejtciklus irányításában konzervált, növényekben és állatokban egyaránt megtalálható mechanizmusok révén vesz részt (Roudier és mtsai, 2000; 2003).

A legtöbb magasabb rendű növényfaj esetében 4 különböző A2 típusú cikin ismeretes, pl. lúdfűben (Wang és mtsai, 2004), rizsben (La és mtsai, 2006), de még lucernában is két A2 ciklin allélt azonosítottak (Roudier és mtsai, 2000). A szálkaperjében megtalálható egyetlen A2 ciklin funkcióját eddig még nem vizsgálták, ennél fogva nem tudjuk, szerepe mennyiben egyezik meg a lucerna A2;2 ciklinjének szerepével. Erre csak a szekvenciák hasonlóságára támaszkodva lehetnek sejtéseink. Ugyan a szálkaperje A2 ciklinjének szekvenciája mindössze 48%-os hasonlóságot mutat a lucerna A2 ciklinjével, mégis több szempontból alkalmas jelöltnek tűnt arra vonatkozólag, hogy megvizsgáljuk kölcsönhatását az MtCPP1 szálkaperjében megtalálható két legközelebbi homológjával. Egyrészt előzetes vizsgálataink alapján ugyanis a szálkaperje A2 ciklinjének szövetspecifikus kifejeződése jó egyezést mutat a lucerna A2;2 ciklinjének nem szimbiotikus szervekben mutatott expressziós mintázatával.

A lucerna A2;2 ciklin 7-10 napos, kontroll körülmények között nevelt növényekben csak a gyökércsúcsban és a hajtás apikális merisztémában mutat aktivitást (Roudier és mtsai, 2003). Hozzá hasonlóan a szálkaperje A2 ciklinje a két hetes szálkaperje növényekben a gyökércsúcsban, a fejlődő oldalgyökerek iniciálisaiban valamint a negyedik levél bazális, hajtása apikális merisztémát is tartalmazó szegmensében mutatja a legmagasabb transzkript szinteket. Másrészt a szálkaperje A2 ciklinjének kifejeződése mind a BdLBD1C-1, mind a BdLBD1C-2 kifejeződési mintázatával átfed. A szálkaperje A2 ciklinje ugyanis számottevő aktivitást mutatott a gyökér osztódóképes szöveti régióit tartalmazó szegmensei mellett (ahol a BdLBD1C-1 is expresszálódik) ugyanis a legszámottevőbb aktivitást a fejlődő generatív szervekben (virágokban és termésekben) mutatott (ott, ahol a BdLBD1C-2 is kifejeződik) (15. ábra).

A szálkaperje A2 ciklinjének expressziós vizsgálatát tájékozási jelleggel végeztük el, és csak előkísérletnek tekinthető. Célja csupán annyi volt, hogy kiderítsük, kifejeződési mintázata alapján lehet-e alkalmas jelölt a BdLBD1C-1 valamint a BdLBD1C-2-vel való kölcsönhatásra,

akár *in vivo* körülmények között is. Erre a három különböző gén kifejeződési mintázatainak közös pontjai mindenképp utalnak. Minhogyan azonban a ciklinek kifejeződésének részletes vizsgálata nem képezte kutatásaink célját, biológiai ismétles nem született a szálkaperje A2 ciklinjének expressziójára vonatkozóan.



15. ábra. A szálkaperje A2 ciklinjének (Bd4g06827.1) relatív transzkript mennyiségének alakulása 37 különböző növényi részben. A relatív transzkript mennyiségek két referenciagén (UBC18 ubiquitin konjugáló enzim18 és Elf1 α - elongációs faktor1 alpha) átlagos expressziójához, valamint a vizsgált minták közül a szálkaperje A2 ciklinjét legalacsonyabb mértékben expresszáló mintához (harmadik levél lemeze) viszonyítva értendők. A minták rövidítései: R1-gyökércsúcs, R2- megnyúlási zóna, R3-differenciálódási zóna, R4-érési/felszívási zóna, R5- fiatal oldalgyökér-kezdemény, R6-érett oldalgyökér-iniciális, N1-első levél nódusza, N2- második levél nódusza, N3- harmadik levél nódusza, IN1- első levél internódiuma, IN2- második levél internódiuma, LH1- első levél hüvelye, LH2- második levél hüvelye, LH3- harmadik levél hüvelye, LL1- első levél ligulája (levélcsukló), LL2- második levél ligulája, LL3- harmadik levél ligulája, L1- első levél lemeze, L2- második levél lemeze, L3- harmadik levél lemeze, L41- negyedik levél lemezének bazális szegmense, L42- negyedik levél lemezének középső szegmense, L43- negyedik levél lemezének apikális szegmense, ZL- zászlóslevél lemeze, KT- kalásztengely, LE- lemma (toklás), LSZ- a lemma szakáll, PA- palea (pelyvalevél), V1- kifejlett virág 1-2 nappal a pollináció előtt, V2- fejlődő virág 3-4 nappal a pollináció előtt, V3- fejletlen virág 5-6 nappal a pollináció előtt, E1- kifejlett termés 9-10 nappal a pollináció után, E2- fejlődő termés 6-7 napal a pollináció után, E3- fejletlen termés 3-4 nappal a pollináció után, portok- portok. A minták részletes leírását lásd az "anyag módszer" "mintavétel" fejezetében.

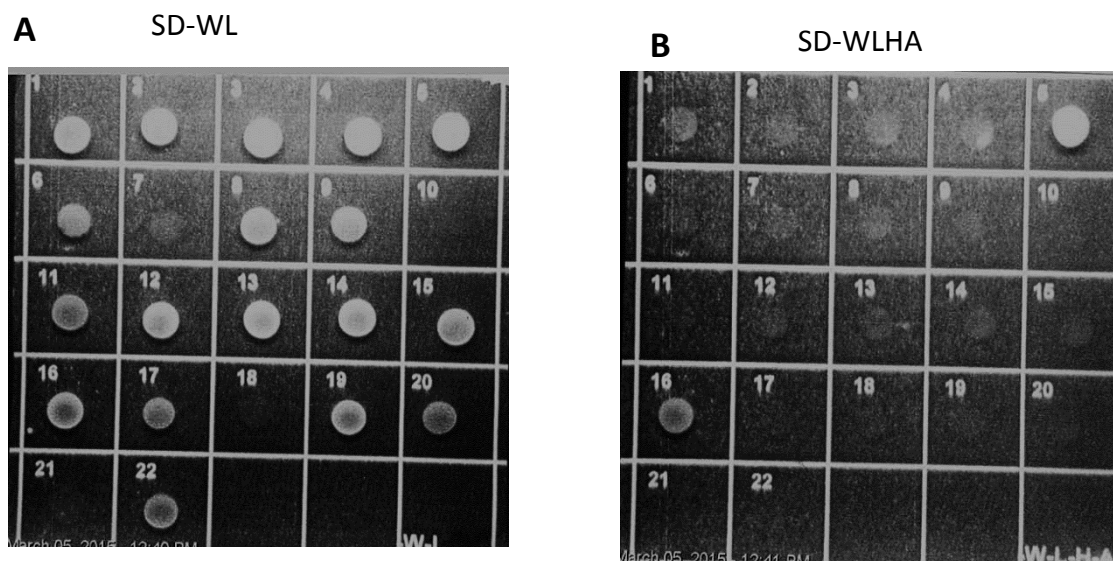
4.4.2 A BdLBD1-C1 és BdLBD1C-2 A2 típusú cikleinekkel való lehetséges

kölcsönhatásának vizsgálata

Az élesztő-kéthibrid rendszerben végzett kísérleteink elsődleges célja a *Medicago truncatula* MtCPP1 és a lucerna A2;2 ciklin közötti kölcsönhatás reprodukálása volt szálkaperjében megtalálható homológ fehérjékkel. Ehhez, amint az a fentiekből kitűnik, igyekeztünk körültekintően megválasztani a jelölteket. A kölcsönhatás teszteléséhez a BdLBD1C-1 valamint BdLBD1C-2 gének kódoló szekvenciája teljes hosszúságban került beklónozásra a „pray” vektorba, míg a szálkaperje A2 ciklinjének teljes kódoló szekvenciáját ill. trunkált, destrukciós motívumot nem tartalmazó változatát a „bait” vektorkonstrukciókba klónoztuk be. A kölcsönhatásokat két különböző vektorpáron is leteszteltük, továbbá a konstrukciók bejuttatásához kellően nagy transzformációs hatékonyságot biztosító ko-transzformációs protokollt használtunk az Y2H rendszer egyik leggyakoribb technikai problémájának, a fals pozitív kölcsönhatások detektálásának kiküszöbölése érdekében. Az eredmények szemléltetése céljából az élesztő-két hibrid kísérletekre vonatkozó ábrákon a szelektív táptalajra kihelyezett 25 µl transzformált élesztő-kultúrák szerepelnek. A bejuttatott konstrukciók az ábrák feletti táblázatban találhatók. A kölcsönhatási tesztben szereplő fehérjék esetleges autoaktiváló hatásának tesztelése céljából a fehérjék kódoló szekvenciáját hordozó vektorokat inszertet nem tartalmazó üres vektorokkal párban is betranszformáltuk. Ezzel kapcsolatban megállapítható, hogy autoaktivitást a kölcsönhatás teszteléséhez használt konstrukciók esetében nem tapasztaltunk.

A 16. ábrán látható a pGBK-T7 bait és pGAD-T7 pray vektorpárokkal történő Y2H kölcsönhatási teszt eredménye az AH-109 és PJ69-4A élesztő törzsekben.

AH-109		bait	pray	PJ69-4A		bait	pray
	1	pGBK-T7 -üres	pGAD-T7 - üres		12	pGBK-T7 -üres	pGAD-T7 - üres
	2	pGBK-Bd-cycA2	pGAD-T7 - üres		13	pGBK-Bd-cycA2	pGAD-T7 - üres
	3	pGBK-Bd-cycA2-Δ	pGAD-T7 - üres		14	pGBK-Bd-cycA2-Δ	pGAD-T7 - üres
	4	pBD-Ms-cycA2-Δ	pGAD-T7 - üres		15	pBD-Ms-cycA2-Δ	pGAD-T7 - üres
	5	pBD-Ms-cycA2-Δ	pAD-GAL4- Mt-CPP1		16	pBD-Ms-cycA2-Δ	pAD-GAL4- Mt-CPP1
	6	pGBK-Bd-cycA2	pGAD-T7- BdLBD1C-1		17	pGBK-Bd-cycA2	pGAD-T7- BdLBD1C-1
	7	pGBK-Bd-cycA2	pGAD-T7- BdLBD1C-2		18	pGBK-Bd-cycA2	pGAD-T7- BdLBD1C-2
	8	pGBK-Bd-cycA2	pGAD-GAL4-Mt-CPP1		19	pGBK-Bd-cycA2	pGAD-GAL4-Mt-CPP1
	9	pGBK-Bd-cycA2-Δ	pGAD-T7- BdLBD1C-1		20	pGBK-Bd-cycA2-Δ	pGAD-T7- BdLBD1C-1
	10	pGBK-Bd-cycA2-Δ	pGAD-T7- BdLBD1C-2		21	pGBK-Bd-cycA2-Δ	pGAD-T7- BdLBD1C-2
	11	pGBK-Bd-cycA2-Δ	pAD-GAL4-Mt-CPP1		22	pGBK-Bd-cycA2-Δ	pAD-GAL4-Mt-CPP1



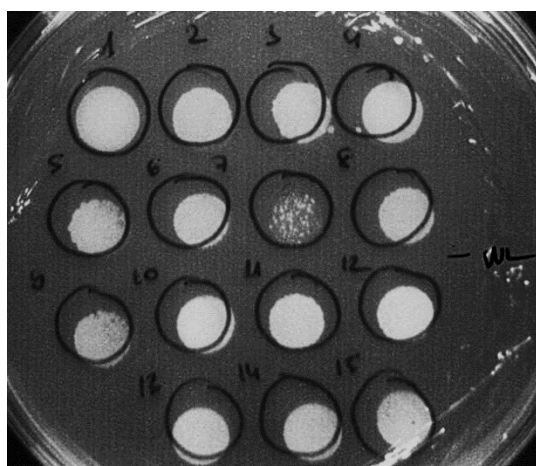
16. ábra. A szálkaperje A2 ciklinje és két kiválasztott LOB-domain transzkripciós faktora (BdLBD1C-1 és BdLBD1C-2) valamint az MtCPP1 közötti interakció vizsgálata Y2H kölcsönhatási teszttel, két különböző élesztő törzsben (AH-109 valamint PJ69-4A), epitóp tag szekvenciát tartalmazó vektorkonstrukciókkal (pGBK-T7, pGAD-T7 vektorok). **A)** SD-WL kettős szelekciós táptalajon. **B)** SD-WLHA négyszeres szelekciós táptalajon. Az ábrákhoz tartozó táblázatban szereplő Δ jelzés az adott ciklin destruktív motívum nélküli változatát jelöli.

Megbízhatóan reprodukálható kölcsönhatást csak az MtCPP1 és az Ms-cyc-A2 Δ esetében kaptunk, szálkaperjében megtalálható legközelebbi rokonaik között viszont nem. Érdeemes megjegyezni, hogy mind a teljes hosszúságú, mind a destruktív box nélküli szálkaperje A2 ciklin konstrukciók kotranszformációja jelentősen lecsökkentette a transzformáns élesztők növekedési képességét. (A transzformáns élesztők növekedésére gyakorolt negatív hatás három független kísérlet egybahangzó eredménye; a 16. ábra csak a legreprezentatívab kísérleti eredményt szemlélteti.) Tapasztalataink alapján a PJ69-4A törzs használatával magasabb transzformációs hatékonyságot sikerült elérnünk, ezért további kísérleteinket ennek a törzsnek a használatával végeztük. Mivel az első vektorpárral a (pGAD-T7 és pGBK-T7) a kölcsönhatás tesztelése nem járt sikerrel, ezért a kísérletet egy másik vektorpárral (pGBT9 és pGAD-424) is megismételtük. A pGAD-T7 és pGBK-T7 konstrukciók használata során a vektorról expresszálandó fehérje epitóp taggal ellátott formában képződik, és ez a jelölés a GAL4 megfelelő domainje (aktivátor- ill. DNS-kötő domain) és a fúziós partnerként vele együtt termelődő, vizsgálni kívánt fehérje között helyezkedik el. Az epitóp tag lehetővé teszi az expresszálandó fehérjék western blottal történő kimutatását. Az epitóp tagekre specifikus ellenanyagokkal mi is elvégeztük a western-blott analízist, amelynek eredménye alapján a

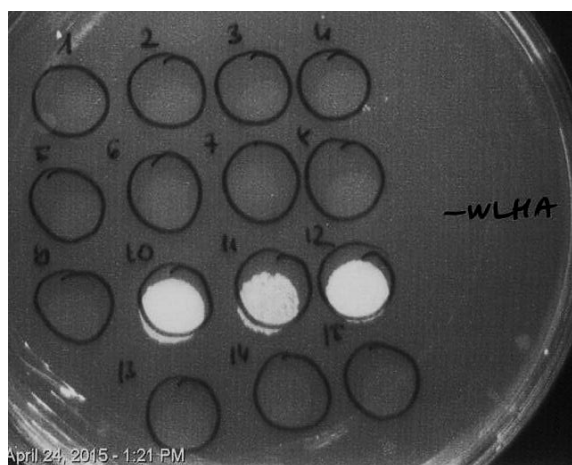
lehetséges kölcsönható partnerek megfelelően detektálhatók a transzformáns élesztő sejtekből nyert fehérjeextraktumból. A kölcsönhatás hiányát tehát nem a fehérjék expressziójának hiánya okozza. (Minvel ez az analízis csak a konstrukciók ellenőrzésére szolgált, eredményei ennél részletesebben nem kerülnek tárgyalásra a disszertációban.) A kölcsönhatások teszteléséhez választott második vektorpár (pGBT9 és pGAD-424) nem tartalmaz építő tag szekvenciát. Bár a tag jelenlététől elvileg nem várható, hogy zavarja a lehetséges kölcsönhatások kialakulását, a tag nélküli vektorkonstrukciók nemcsak szerkezetileg állnak közel a *Medicago* fehérjék kölcsönhatásának vizsgálatához használt pAD-GAL4, pBD-GAL4 vektorokhoz, hanem a jelölés nélkül képződő fúziós fehérjék térszerkezete is közelebb áll a kölcsönható partnerként vizsgált fehérjék eredeti struktúrájához. A második vektorpárral végzett kísérletek eredményeit a 17. és 18. ábra szemlélteti.

	bait	pray
PJ69-4A	1 pGBT9-üres	pGAD-T7 - üres
	2 pGBT9-üres	pGAD-T7 – BdLBD1C-1
	3 pGBT9-üres	pGAD-T7 – BdLBD1C-2
	4 pGBT9-Bd-cycA2	pGAD-T7 - üres
	5 pGBT9-Bd-cycA2Δ	pGAD-T7 - üres
	6 pGBT9-Bd-cycA2	pGAD-T7- BdLBD1C-1
	7 pGBT9-Bd-cycA2Δ	pGAD-T7- BdLBD1C-1
	8 pGBT9-Bd-cycA2	pGAD-T7- BdLBD1C-2
	9 pGBT9-Bd-cycA2Δ	pGAD-T7- BdLBD1C-2
	10 pBD-GAL4-Ms-cycA2Δ	pAD-GAL4-MtCPP1
	11 pBD-GAL4-Ms-cycA2Δ	pGAD-T7-BdLBD1C-1
	12 pBD-GAL4-Ms-cycA2Δ	pGAD-T7-BdLBD1C-2
	13 pBD-GAL4-Ms-cycA2Δ	pGAD-T7- üres
	14 pGBT9-Bd-cycA2	pAD-GAL4-MtCPP1
	15 pGBT9-Bd-cycA2Δ	pAD-GAL4-MtCPP1

A SD-WL



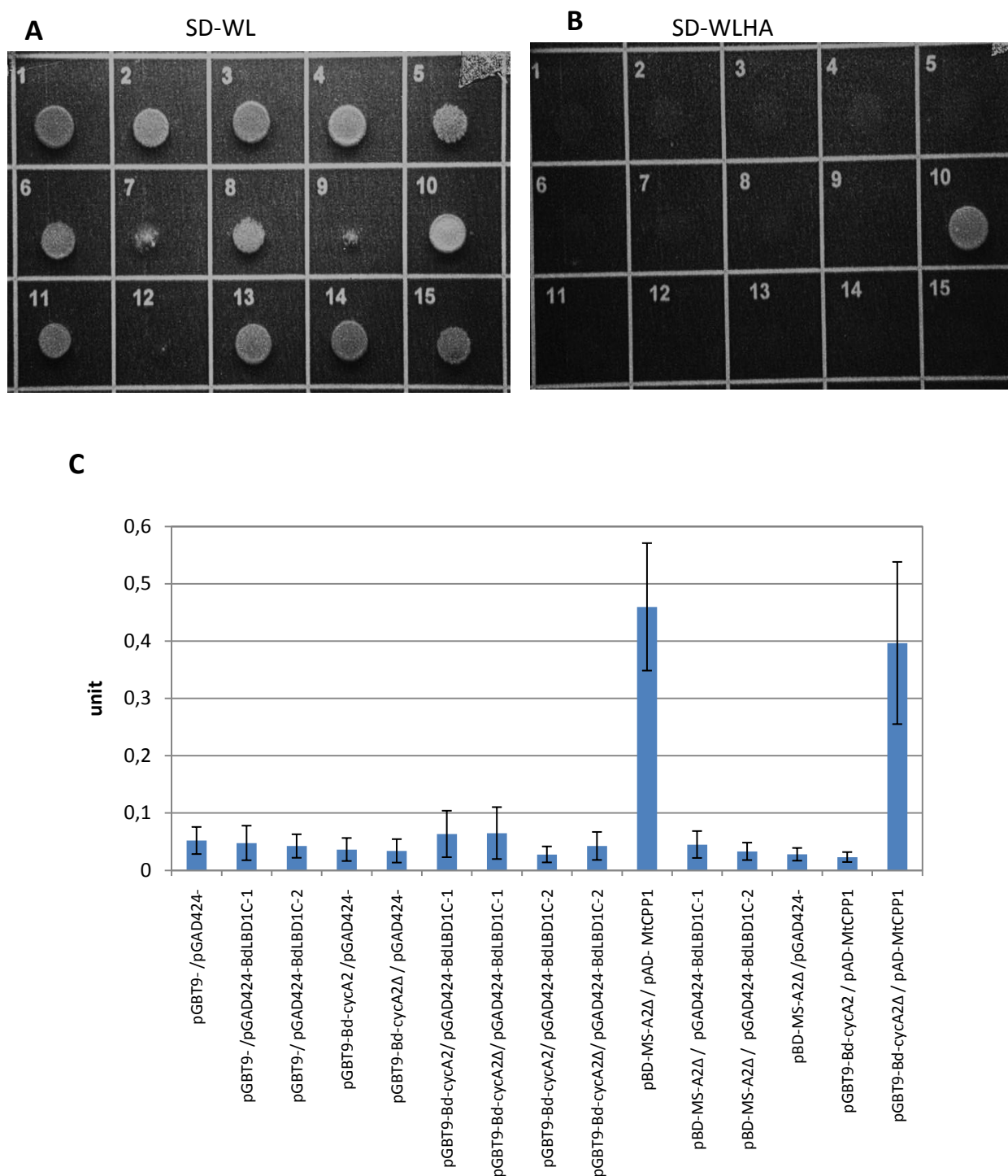
B SD-WLHA



17. ábra. A szálkaperje és a lucerna A2 ciklinje és a szálkaperje két kiválasztott LOB-domain transzkripciós faktora (BdLBD1C-1 és BdLBD1C-2) valamint az MtCPP1 közötti interakció vizsgálata Y2H kölcsönhatási tesztrel, PJ69-4A törzsben, pGBT9 és pGAD-T7 vektorkonstrukciókkal. **A)** SD-WL táptalajon. **B)** SD-WLHA táptalajon. Az ábrákhoz tartozó táblázatban szereplő Δ jelzés az adott ciklin destruktív motívum nélküli változatát jelöli.

Kölcsönhatást a szálkaperje A2 ciklinje és a szálkaperje két kiválasztott LBD transzkripciós faktora között nem tapasztaltunk sem abban az esetben, amikor a ciklint tag nélkül kifejeztető „bait” konstrukciót kombináltuk az LBD fehérjét tag jelöléssel expresszáló „prey” konstrukcióval (17. ábra), sem pedig akkor, amikor az LBD transzkripciós faktorok kifejeződését tag nélkül biztosító pGAD-424 vektorkonstrukcióval próbálkoztunk kombinációban a pGBT9 vektorba klónozott szálkaperje A2 ciklinnel (18. ábra). A pGBT9 vektorkonstrukciók alkalmazásakor is tapasztaltuk a szálkaperje A2 ciklinjének (különösen a stabilabb, destruktív motívum nélküli Δ változat esetében) negatív hatását az élesztő növekedésére - hasonlóan a kölcsönhatás teszteléséhez először használt pGBK-T7 vektorkonstrukcióhoz. Pozitívum ugyanakkor, hogy mind a BdLBD1C-1, mind a BdLBD1C-2 kölcsönhatást mutatott a lucerna A2 ciklinjével - de csak akkor, amikor a szálkaperje LBD fehérjei az epitóp tag jelölést biztosító pGBK-T7 vektorról expresszálódtak (17. ábra). Ugyan két teljesen különböző növényfaj fehérjei közötti kölcsönhatást sikerült kimutatni, de mindenképpen utal arra, hogy a BdLBD1C-1 és a BdLBD1C-2 is képes lehet kölcsönhatásba lépni ciklinnel/ciklinekkel. Amikor ugyanezt a kísérletet a pGAD-424 vektorba klónozott BdLBD1C-1 valamint BdLBD1C-2 génekkel ismételtük meg, nem kaptunk kölcsönhatást a lucerna A2 ciklinje és a szálkaperje kiválasztott LBD transzkripciós faktorai között (18. ábra).

PJ69-4A		bait	prey
	1	pGBT9-üres	pGAD-424 - üres
	2	pGBT9-üres	pGAD-424- BdLBD1C-1
	3	pGBT9-üres	pGAD-424 - BdLBD1C-2
	4	pGBT9-Bd-cycA2	pGAD-424 - üres
	5	pGBT9-Bd-cycA2 Δ	pGAD-424 - üres
	6	pGBT9-Bd-cycA2	pGAD-424- BdLBD1C-1
	7	pGBT9-Bd-cycA2 Δ	pGAD-424- BdLBD1C-1
	8	pGBT9-Bd-cycA2	pGAD-424- BdLBD1C-2
	9	pGBT9-Bd-cycA2 Δ	pGAD-424- BdLBD1C-2
	10	pBD-GAL4-Ms-cycA2 Δ	pAD-GAL4-MtCPP1
	11	pBD-GAL4-Ms-cycA2 Δ	pGAD-424-BdLBD1C-1
	12	pBD-GAL4-Ms-cycA2 Δ	pGAD-424-BdLBD1C-2
	13	pBD-GAL4-Ms-cycA2 Δ	pGAD-424- üres
	14	pGBT9-Bd-cycA2	pAD-GAL4-MtCPP1
	15	pGBT9-Bd-cycA2 Δ	pAD-GAL4-MtCPP1



18. ábra. A szálkaperje és a lucerna A2 ciklinje és a szálkaperje két kiválasztott LOB-domain transzkripciós faktora (BdLBD1C-1 és BdLBD1C-2) valamint az MtCPP1 közötti interakció vizsgálata Y2H kölcsönhatási teszttel, PJ69-4A törzsben, pGBT9 és pGAD-424 vektorkonstrukciókkal. **A)** SD-WL szelekciós táptalajon. **B)** SD-WLHA szelekciós táptalajon. **C)** A transzformáns élesztő kultúrákból izolált β -galaktozidáz enzim aktivitása 1 μ g enzim által egységnyi mennyiségű szubsztrát elbontásához szükséges időre vonatkoztatva (unit). A szórás három független biológiai ismétlés eredményét tükrözi. A Δ jelzés az adott ciklin destrukciós motívum nélküli változatát jelöli.

A tény, hogy a pGAD-424 vektorkonstrukció használatakor nem volt kimutatható kölcsönhatás a lucerna A2;2 ciklinje és a szálkaperje kiválasztott LBD fehérjéi között, pGAD-T7 vektor használatával viszont igen, arra enged következtetni, hogy a vektorválasztás nagymértékben képes befolyásolni az Y2H tesztelés eredményeit. Minthogy sem a BdLBD1C-1, sem a BdLBD1C-2 fehérjére specifikus ellenanyag nem állt rendelkezésre, tag jelölés hiányában nem volt lehetséges annak ellenőrzése, hogy a tag jelölés hiánya negatívan befolyásolja-e a szálkaperje kiválasztott LBD fehérjéinek stabilitását, és ez okozhatja-e ebben az esetben a kölcsönhatás hiányát.

Az Y2H rendszer korlátjai közé tartozik- a fals pozitív interakciók detektálásának lehetősége mellett -, hogy nem minden fehérje-fehérje kölcsönhatás mutatható ki vele. Előfordul, hogy egy interakció nem elég erős vagy stabil ahhoz, hogy aminosav-komplementációra történő szelekcióval kimutatható legyen (un. „fals negatív” interakciók) (Brückner és mtsai, 2009). Ez potenciális magyarázatul szolgálhat arra vonatkozóan, miért nem vezetett eredményre a szálkaperje A2 ciklinje és két kiválasztott LBD transzkripciós faktora közötti kölcsönhatás kimutatására irányuló egyik próbálkozásunk sem. Ennek igazolására ugyan részletes vizsgálatokat nem végeztünk, de β -galaktozidáz enzimaktivitás mérésével ellenőriztük azt, hogy az epitóp tag nélküli vektorkonstrukciók esetében a lucerna A2;2 ciklin és a szálkaperje két kiválasztott LOB-domain transzkripciós faktora közötti kölcsönhatást nem a gyenge interakció miatt nem sikerült detektálni. Számottevő β -galaktozidáz aktivitást ugyanis csak a pBD-GAL4Ms-cycA2 Δ /pAD-GAL4-MtCPP1 valamint a pGBT9-Bd-cycA2 Δ /pAD-GAL4-MtCPP1 kombinációk esetében kaptunk. A β -galaktozidáz aktivitás fotometrálassal történő mérése alapján nem csak a lucerna A2;2 ciklinje és az MtCPP1 között van kölcsönhatás, hanem a szálkaperje A2 ciklinje is képes az MtCPP1-LBD fehérjével kölcsönhatásba lépni – annak ellenére, hogy a négyszeres auxotrófia komplementáción alapuló növekedési teszteléssel nem mutatható ki ez az interakció (18.C ábra). Ebből arra következtethetünk, hogy bár a kölcsönhatás gyenge lehet a szálkaperje A2 ciklinje és az MtCPP1 között, de a szálkaperje A2 ciklinje is képes lehet kölcsönhatásba lépni LOB-domain transzkripciós faktor/faktorokkal.

Konklúzióként megállapítható, hogy a *Medicago* A2 ciklin és LBD transzkripciós faktora közötti kölcsönhatás szálkaperjében megtalálható homológ fehérjékkel történő reprodukálása Y2H rendszerben csak töredékesen volt sikeres. Ennek számos oka lehet: adódhat a módszerül választott élesztő-kéthibrid rendszer korlátaiból; abból, hogy az esetlegesen kölcsönható

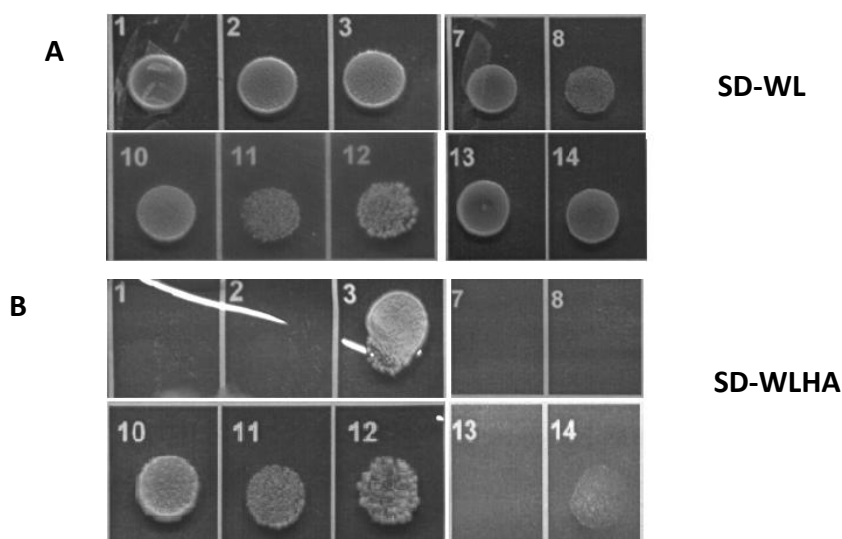
partnerek negatívan befolyásolhatják az élesztő életképességét, de eredhet abból is, ha az interakció gyenge a vizsgált fehérjék között. Előfordulhat az is, hogy a vizsgált fehérjék nem stabilan vagy nem megfelelő konformációban expresszálnak az élesztő sejten belül, esetleg hiányoznak a kölcsönhatást biztosító másodlagos módosítások (pl. foszforiláció) (Brückner és mtsai, 2009). Végezetül az sem zárható ki, hogy a szálkaperje A2 ciklinje és a kísérlethez kiválasztott két LBD transzkripciós faktora között valóban nincs kölcsönhatás. A szálkaperje A2 ciklinje és két LBD transzkripciós faktora közötti kölcsönhatás kimutatására irányuló Y2H kísérletek negatív eredményének hátterében álló okokat nem volt célunk kideríteni - a disszertációban bemutatásra került többféle kísérlettel csupán néhány olyan alapvető körülményt próbáltunk tisztázni, mely negatívan befolyásolhatja a kölcsönhatás kimutathatóságát. Annak ellenére, hogy hipotézisünket - miszerint a lucerna A2;2 ciklinje és a *Medicago truncatula* MtCPP1 LOB-domain transzkripciós faktorához hasonlóan homológiájuk alapján a szálkaperje két LBD fehérjéje, a BdLBD1C-1 és a BdLBD1C-2 képes kölcsönhatni a szálkaperje A2 ciklinjével – nem sikerült igazolni, kísérleteink alapján mégis arra következtethetünk, hogy mind a szálkaperje A2 ciklinje képes LBD transzkripciós faktoralal történő interakcióra, mind a BdLBD1C-1, 1C-2 fehérjék képesek kölcsönhatást kialakítani ciklinnel; mivel ez *Medicago* partnerekkel mindkét oldalról kimutatható volt. Az továbbra is tisztázásra vár, mely ciklinnel/ciklinekkel hathat kölcsön a BdLBD1C-1 és a BdLBD1C-2, ahogy azt sem tudjuk, mely LOB-domain transzkripciós faktoralal/faktorokkal léphet kölcsönhatásba a szálkaperje A2 ciklinje. Az Y2H kísérletek tanulsága alapján ezeknek a kérdéseknek a megválaszolásához előnyösebb lesz *in vitro* technikákat alkalmazni. Ilyen, a szálkaperje LBD fehérjék és ciklin/CDK komplexek kölcsönhatását valamint az LBD transzkripciós faktorok feltételezett foszforilációs szabályozását feltárni hivatott kísérletek már jelenleg is folynak kutatócsoportunkban.

4.4.3 A BdLBD1C-1 és BdLBD1C-2 homo- és heterodimer képzésének tesztelése Y2H rendszerben

Az Y2H kísérletek keretén belül sor került mind a BdLBD1C-1, mind a BdLBD 1C-2 önmagával valamint egymással való kölcsönhatásának tesztelésére is (19. ábra). A kapott eredmények azt mutatják, hogy a BdLBD1C-1 Y2H rendszerben képes önmagával és a BdLBD1C-2-vel is kölcsönhatni, autoaktiváló hatást pedig nem tapasztaltunk. A BdLBD1C-2 esetében ugyanakkor jól látható az autokativáló hatás abban az esetben, ha a GAL4 DNS-kötő „binding” doménjét hordozó pGBK-T7 vektorba klónoztuk be. Ezért homodimer képzésére vonatkozóan a BdLBD1C-2 esetében következtetést nem vonhatunk le.

A teljesség kedvéért mind a BdLBD1C-1, mind a BdLBD1C-2 esetében megvizsgáltuk, képesek lehetnek-e kölcsönhatásra a *Medicago* MtCPP1 proteinnel is. Erre vonatkozóan csak a BdLBD1C-2 esetében kaptunk nem túl erős, pozitív eredményt.

AH-109		bait	prey
	1	pGBKT7 - üres	pGADT7-üres
	2	pGBKT7- BdLBD1C-1	pGADT7-üres
	3	pGBKT7 - BdLBD1C-2	pGADT7-üres
	7	pGBKT7 - üres	pGADT7-BdLBD1C-1
	8	pGBKT7- üres	pGADT7-BdLBD1C-2
	10	pGBKT7- BdLBD1C-1	pGSDT7-BdLBD1C-1
	11	pGBKT7- BdLBD1C-2	pGADT7-BdLBD1C-2
	12	pGBKT7- BdLBD1C-2	pGADT7-BdLbD1C-1
	13	pGBKT7-BdLBD1C-1	pAD-GAL4-MtCPP1
	14	pGBKT7-BdLBD1C-2	pAD-GAL4-MtCPP1



19. ábra. ABdLBD1C-1 és BdLBD1C-2 homo- ill. heterooligomerizációjának tesztelése Y2H rendszerben. **A)** SD-WL szelekciós táptalajon. **B)** SD-WLHA szelekciós táptalajon.

Az Y2H rendszerben kapott pozitív eredményeket – a módszer korlátaiból adódóan- minden esetben érdemes és szükséges más biokémiai módszerekkel és *in vivo* is igazolni, önmagában az élesztő kettős hibrid módszer nem elegendő két fehérje kölcsönhatásának egyértelmű bizonyítására. A BdLBD1C-1 és a BdLBD1C-2 önmagukkal ill. egymással mutatott kölcsönhatásának alátámasztása további kísérletekkel ugyan még várat magára, a BdLBD1C-1 és BdLBD1C-2 lehetséges homodimerizációjának további vizsgálata abból a szempontból is

figyelmet érdemlő kutatási irány lehet, mivel az eddigi irodalmi tapasztalatok alapján az LBD transzkripciós faktorok zöme inkább heterodimerekként funkcionál, kevés péda van homodimerizációra vonatkozóan (Xu és mtsai, 2016). A kapott eredmények tükrében pedig a pGBKT7-GAL-4: BdLBD1C-1 konstrukció alkalmas lehet további kölcsönható partnerek azonosítását célzó átfogóbb screenelési kísérletekhez is.

4.5 Perspektívák

A fentiek tükrében a *Medicago* fehérjékkel mutatott homológiára alapozott munkahipotézisünk, miszerint a BdLBD1C-1 és 1C-2 fehérjék kölcsönható partnerei lehetnek a szálkaperje A2 ciklinjének, élesztő két-hibrid kísérleteink alapján nem nyert megerősítést. A kísérletekhez kiindulópontként szolgáló, *Medicago* fehérjékkel végzett kutatási eredményekből biztosan csak azt a következtetést vonhattuk le, hogy LOB-domain transzkripciós faktorok közvetlen kapcsolatban állhatnak a sejtosztódást irányító központi molekuláris mechanizmusokkal. Maga a közel húsz évvel ezelőtti *Medicago* kísérletből eredő alapgondolat, hogy LOB-domain fehérjék direkt összeköttetésben álljanak a sejtciklus szabályozásával, más megközelítésre épülő további kísérletekre érdemes. Munkacsoportunkban Zombori Zoltán és Horváth Gábor által végzett *in vitro* foszforilációs kísérletek előzetes eredményei éppen ezt támasztják alá: mind a rekombináns úton előállított BdLBD1C-1, mind az 1C-2 foszforilálódott szálkaperje sejtuszupenzióból izolált össz ciklin-CDK komplexek által.

Ezek a még publikálatlan eredmények egészen új távlatokat nyitottak számunkra. A ciklinekkel való kapcsolat funkciójának értelmezése három nagy, egyenként is több évre előremutató kísérletsorozatot igénylő kérdéskört vet fel. Az első csoportba a foszforiláció fehérjeműködésre gyakorolt szabályozó szerepének feltárása tartozik. Ennek részeként már elkezdtük azoknak a szerin/treonin aminosavaknak a beazonosítását mind az LBD1C-1, mind az LBD1C-2 fehérjén belül, melyek a ciklin-CDK komplexek által foszforilálódnak. Ezen aminosavakra nézve konstitutívan nem foszforilálható valamint konstitutív foszforilációt mimikáló mutáns fehérje-variánsokat már létrehoztunk részint abból a célból, hogy teszteljük az adott aminosavak foszforilációjának relevanciáját, részint pedig azért, hogy megvizsgálhassuk a foszforiláció fehérje-kölcsönhatásra és DNS-kötő aktivitásra gyakorolt hatását. A fehérje-kölcsönhatás vizsgálatához jó kiindulópontként szolgál az LBD1C-1 és 1C-2 homo- ill. heterodimerizációs képességének ismerete. A DNS-kötő aktivitás teszteléséhez pedig folyamatban van az LBD1C-1 valamint 1C-2 által preferenciálisan felismert DNS-motívumok beazonosítása. A másik nagyobb kérdéskör a ciklinek és a két szóban forgó LOB-domain transzkripciós faktor közötti kölcsönhatás magára a sejtosztódásra gyakorolt hatásának

vizsgálatára vonatkozik. Hipotézisünk szerint „feed-back” visszacsatolós szabályozás állhat fenn: egyes ciklin-CDK komplexek foszforiláció révén szabályozzák az LBD transzkripciós faktorok aktivitását, melyek sejtosztódást irányító gének működését irányítják- akár pozitívan, akár negatívan. Ennek igazolásához a foszforilációt végző ciklin-CDK komplexek beazonosítása valamint a LOB-domain transzkripciós faktorok célgénjeinek ismerete feltétlenül szükséges. Ide kapcsolódik annak megvizsgálása is, hogy a ciklinek és a két szálkaperje LOB-domain transzkripciós faktora közötti kölcsönhatás pozitív vagy negatív hatással van-e magára a sejtosztódásra. A harmadik kérdéscsoport, melyet az általunk vizsgált kölcsönhatás felvet, e kapcsolat növények egyedfejlődésében *in vivo* betöltött szerepének feltárása. Ezen túlmenően felmerülnek az általunk vizsgálni kívánt szabályozást nagyobb kontextusba helyező kérdések is; pl. ez a foszforilációs szabályozás mennyire konzervált más növényekben, és vannak-e esetleg más LOB-domain transzkripciós faktorok, melyek működése szintén ciklin-CDK komplexek által szabályozódik?

A sejtciklus szabályozása és a LOB-domain transzkripciós faktorok között valószínűsített kapcsolat tehát rengeteg kérdést vet fel. A disszertációban bemutatott kísérleti anyag ezek megalapozásának tekinthető. A fentebb felvázolt kérdések megválaszolása jóval túlmutat jelen Ph. D értekezés tárgyán (sőt, feltehetően külön-külön is elegendő ismertanyagot szolgáltathatnak majdegy-egy önálló disszertációhoz), ám ennek a kapcsolatnak a részletes feltárása a sejtosztódás és differenciálódás egészen izgalmas és újszerű összefüggései felé vezetnek.

5. Összegzés

A növények egyedülállóan rugalmas egyedfejlődési programjának hátterében álló mechanizmusok megismerése a növénybiológia jelenleg is intenzíven kutatott területe. A növények természetben megfigyelhető formai sokfélesége - nagy általánosságban - a csak növényekre jellemző nyitott egyedfejlődési programra vezethető vissza. Habár az alapstruktúrát (pl. a levél formáját, összetettségét, a virág alakját, virágzattá szerveződését stb.) fajra jellemző genetikai program szabja meg a növények esetében is, az állatoktól eltérő módon az adott fajra jellemző architektúra posztembrionálisan alakul ki. Köszönhetően annak, hogy egész életükön át képesek új szervek létrehozására, a növények esetében ez az architektúra fajon belül is végtelenül plasztikus - legyen szó akár egy mamutfenyőről, vagy az alig arasnyi lúdfüről. Ennek a plaszticitásnak köszönhető, hogy szesszilis életformájuk ellenére a növények képesek alkalmazkodni folytonosan változó környezetükhöz. Fajtól függetlenül a plaszticitás forrása a merisztematikus sejtcsoportok pluripotenciájának fenntartása valamint a már differenciálódott sejtek kompetenciája új merisztémák formálására. A pontos és arányos szervfejlődés fenntartásához az új sejtek képződésének és differenciálódásának összehangolása ugyanakkor elengedhetetlen. Ebben játszanak kulcsszerepet a merisztémák és differenciált szövetek határán elhelyezkedő sejtek (Wang és mtsai, 2016).

Bár ma még csak részleteiben ismert, hogy ezek a „határsejtek” milyen mechanizmusok révén szabályozzák a szervfejlődés folyamatát, néhány olyan gént már azonosítottak, melyek meghatározzák működésüket és identitásukat (Rast és Simon, 2008). Ilyen génekként azonosították a disszertáció tárgyát képező LBD (Lateral Organ Boundaries- domain) géneket is. Elnevezésük (LOB- Lateral Organ Boundaries domain – vagyis oldalszervek határán működő fehérjék) is erre a jellegzetes kifejeződési mintázatra utal. Maga a géncsalád egy csak növényekben előforduló, fajonként néhány tucat tagot számláló transzkripciós faktor családot, a LOB-domain transzkripciós faktorok családját takarja. Közös jellemzőjük a fehérjék amino terminálisán elhelyezkedő ~100 aminosav hosszú, erősen konzervált motívum, a LOB-domain, mely a fehérjék elsődleges funkcióiért (DNS-kötő aktivitás, fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakítása) felelős régiókat tartalmazza. A domain struktúra alapján az ide tartozó fehérjék könnyen beazonosíthatók (Majer és Hochholdinger, 2011). A felfedezésük óta eltelt bő másfél évtizedben már sokrétűen igazolták, hogy az oldalszervek határának kijelölésén túl a legkülönbözőbb szervfejlődést érintő folyamat irányításában részt vesznek, mint pl. fotomorfogenetikus folyamatok, levélmorfológia meghatározása, oldalgyökerek képződése,

virágfejlődés, pollenképződés, kalluszképződés és *in vitro* regeneráció (Xu és mtsai, 2016). Egy-egy LBD transzkripciós faktor egyszerre több különböző szerv fejlődési folyamatait is irányíthatja, és gyakori, hogy ezeket a feladatokat más-más LBD transzkripciós faktorokkal kombinációban látják el. Sokrétű funkciójuk ellenére úgy tűnik, hogy az LBD transzkripciós faktorok általánosságban a külső környezeti jelek és a növényi hormonok jelentette belső szignálok fejlődési programmá történő „lefordításában” játszanak nélkülözhetetlen szerepet.

Habár a LOB-domain transzkripciós faktorokról egyre bővülő ismeretanyag áll rendelkezésünkre, ezek zöme csak lúdfűből (*A. thaliana*), mint modellnövényből származik. Ráadásul a lúdfű esetében is az azonosított LBD géneknek alig negyedét jellemezték eddig részletesen. Az egyszikűekkel kapcsolatban (néhány kukoricával és rizzsel végzett kutatástól eltekintve) javarészt még tisztázatlan az LBD gének működése. Hatalmas gazdasági jelentőségük okán ugyanakkor az egyszikűekben is legalább olyan fontos az általuk irányított folyamatok megismerése. Az LBD gének vizsgálatához éppen ezért egy, a kalászos gabonanövényeinkkel szoros rokonságban álló fajt, a szálkaperjét (*B. distachyon*) választottuk kísérleti objektumul; egy olyan egyéves fűfélé, mely adottságai alapján egyre szélesebb körben elismert és alkalmazott egyszikű modellorganizmus (Draper és mtsai, 2001; Opanowitz és mtsai, 2008; Kellogg, 2015).

A disszertációban tárgyalt kísérletek elsődleges célkitűzése az LBD géncsalád általános, átfogó jellemzése volt a szálkaperjén belül, beleértve a géncsalád tagjainak meghatározását, filogenetikai kapcsolatainak vizsgálatát, valamint expressziójuk igen részletes, a gyökércsúcstól a hajtáscúsig, vegetatív és generatív szervekre egyaránt kiterjedő analízisét. Összesen 28 LBD gént sikerült azonosítanunk a szálkaperje genomjában. A konzervált LOB-domain aminosav-szekvenciáján alapuló filogenteikai vizsgálataink alapján a szálkaperje LBD transzkripciós faktorai két nagyobb osztályra (I és II osztály), az első osztályon belül pedig további öt alcsoportba (IA-IE) sorolhatók. A szálkaperje LBD génjeire általunk bevezetett nomenklátúra ezt az evolúciós rokonságon alapuló besorolást tükrözi, és ez a filogenetikai besorolás összhangban áll más fajokban végzett hasonló elemzések eredményeivel. A rizs, a kukorica, a lúdfű és a szálkaperje LOB-domain transzkripciós faktorainak összehasonlító filogeneikai analízise alapján nem találtunk csak a szálkaperjében előforduló, egyedi LBD géneket, sem az egyszikűekre jellemző leszármazási vonalat a géncsaládon belül. Különbség az egyes alcsoportok komplexitásában mutatkozott: egyszikűekben a B-alcsoport, míg kétszikűekben inkább az A-alcsoport kiterjedtebb. A géncsalád evolúciós eredetét vizsgáló kutatások alapján az LBD gének

diverzifikációjában nagy szerepe volt a teljes genomot érintő duplikációs eseményeknek és az ezt követő diszpergálódásnak, valamint annak, hogy a duplikációs eseményeket követően az LBD géncsalád tagjai prezerválódtak, megmaradtak az evolúció során. Becslések szerint a magvas növények ismert LBD génjeinek több mint 80%-a duplikációs események eredménye (Kong és mtsai, 2017). A kromoszomális régiók kollinearitásán alapuló *in silico* elemzésünk szerint ez alól a szálkaperje LBD géncsaládja sem kivétel. Más magasabbrendű növényekkel összehasonlítva ugyanakkor a szálkaperje genomja számottevően kevesebb LBD gént tartalmaz (a legtöbb zárva termő növény 34 vagy ennél több LBD génnel rendelkezik). Ez arra enged következtetni, hogy a géncsalád erőteljes expanzióját eredményező folyamatok kevesebbszer érintették a szálkaperje LBD géncsaládját.

Az LBD génekre jellemző nagyfokú funkcionális divergencia kétség kívül erre az evolúciós történetre vezethető vissza, és ezt tükrözi vissza az LBD génekre jellemző nagyon változatos kifejeződési mintázat is. A qRT-PCR technikával feltérképezett részletes expressziós vizsgálat alapján a szálkaperje LBD génjeinek szövet/szervspecifikus kifejeződése nemcsak alcsoportonként egyedi, de gyakran csoporton belül is nagy heterogenitást mutat, és sokszor még az egymással közel rokon LBD gének kifejeződése is jelentősen eltér egymástól. Emiatt nemcsak nehéz, de hiba is volna egy-egy alcsoporthoz általános funkciót társítani. Néhány jellegzetesség ennek ellenére megállapítható: így pl. az IA alcsoport tagjai leginkább a virágzatban és a levél szöveteiben expresszálódnak, az IB alcsoport tagjai inkább gyökérspecifikus kifejeződési mintázattal jellemző, az IE alcsoport tagjai pedig inkább a portokban expresszálódnak. Tőlük eltérően az IC, ID alcsoportok tagjai igen változatos kifejeződési mintázattal rendelkeznek. Így pl. az IC alcsoporton belül van olyan gén, amely csak a vegetatív növényi részekben aktív, van olyan, amelyik a gyökérben és a generatív szervekben működik, de olyan is akad, amelyik csak a gyökér egyes szegmenseiben mutat expressziót. Az ID alcsoport esetében az LBD1D-1 csak a levél különböző részeiben, míg az LBD1D-2 szinte minden vegetatív szervben kifejeződik. Egyedül a II osztály génjeire jellemző a nem szövetspecifikus expresszió. Hasonló változatosság csak kevés másik géncsalád esetében figyelhető meg. A sokszínű kifejeződési mintázat nemcsak a szálkaperje LBD géncsaládjára érvényes: az általunk kapott eredmények összhangban állnak más fajokból már ismert expressziós mintázatokkal. A szálkaperje egyes LBD génjeinek kifejeződési mintázata nagyfokú hasonlóságot mutat más fajokban (pl. lúdfűben, kukoricában, rizsben) azonosított legközelebbi rokonjaik kifejeződési mintázatával. Bár az expressziós mintázat ismerete az LBD gének szerepének megértéséhez messze nem elegendő, de nélkülözhetetlen kiindulópontja a funkcionális vizsgálatoknak. A különböző, akár egymástól

távoli rokon fajok LBD génjeinek kifejeződési mintázatai között tapasztalható egyezések alapján feltételezhetjük, hogy az egyes LBD gének funkciója evolúciósan nagymértékben konzervált lehet.

Munkacsoportunk erre a konzerváltságra alapozva kezdte el a géncsalád két tagjának, a BdLBD1C-1 és a BdLBD1C-2 funkcionális jellemzését. Korábbi kutatási eredményeink alapján a lucerna (*M. sativa*) A2;2 ciklinje és a *M. truncatula* egyik LOB-domain transzkripciós faktora, az MtCPP1 kölcsönható partnerek lehetnek. Részben ennek a kölcsönhatásnak köszönhetően irányult a figyelmünk az MtCPP1 szálkaperjében megtalálható két homológjának, a BdLBD1C-1 és a BdLBD1C-2 funkcionális karakterizálása felé. Ennek keretén belül az egyik célunk a BdLBD1C-1 valamint a BdLBD1C-2 sejtciklus szabályozásával való kapcsolatának alátámasztása. Ezt célozták a lucerna A2 ciklinje és az MtCPP1 közötti kölcsönhatás reprodukálására irányuló kísérleteink élesztő kéthibrid (Y2H) rendszerben, szálkaperjében megtalálható homológjaikkal. Ugyan a szálkaperje A2 ciklinje és a BdLBD1C-1 valamint BdLBD1C-2 között kölcsönhatás kimutatása Y2H vizsgálatokkal zömmel negatív eredményre vezetett, de a vizsgálatok rávilágítottak arra, hogy potenciálisan mind a BdLBD1C-1, mind a BdLBD1C-2 képes lehet ciklinel/ciklinekkel való interakcióra. Erre utalnak munkacsoportunk még publikálatlan eredményei is: *in vitro* foszforilációs kísérletek alapján a BdLBD1C-1 és a BdLBD1C-2 is képes foszforilálódni a szálkaperje sejtszuspenzióból izolált ciklin-ciklin dependens kináz komplexek által (Zombori Zoltán, Horváth Gábor- nem publikált adat).

Arra vonatkozóan, hogy a LOB-domain transzkripciós faktorok kapcsolatban állnak a sejtciklus szabályozásával, több irodalmi adat is utal. Lúdfüben pl. az LBD16 és LBD29 a gyökér periciklus sejtek osztódásának pozitív regulátora (Goh és mtsai, 2012; Feng és mtsai, 2012), az LBD27/SCP (SIDE CAR POLLEN) a sejtosztódási irányának és időzítésének meghatározásával játszik szerepet a mikrospóra sejtek fejlődésében (Oh és mtsai, 2010), az AS2/LBD6 hiánya pedig fokozott sejtprolifерációt eredményez a levelek adaxiális oldalán (Iwakawa és mtsai, 2007). Arra vonatkozóan, hogy a LOB-domain transzkripciós faktorok maguk is sejtciklus szabályozottak lehetnek, eddig még nem volt példa. Eredményeink a BdLBD1C-1 és a BdLBD1C-2 esetében egyértelműen ebbe az irányba mutatnak. Kizárólag az itt bemutatott eredményekre támaszkodva azonban még messzemenő következtetéseket nem vonhatunk le a BdLBD1C-1 és a BdLBD1C-2 direkt kapcsolatáról a sejtciklus szabályozásával. Nem tudjuk, ebben a folyamatban mely ciklin-CDK komplex vesz részt. Nem ismertek azok a szervfejlődési folyamatok sem, amelynek irányításában szerepe lehet egy ilyen folyamatnak.

Felmerül a kérdés, lehetnek-e esetleg más ciklin-CDK komplexek által szabályozott LOB-domain transzkripciós faktorok is? Az sem tisztázott, hogyan befolyásolja a ciklin-CDK komplexek által történő szabályozás a LOB-domain transzkripciós faktorok működését; és az is kérdéses, ez a feltételezhető szabályozási kapcsolat mennyire általános a növényvilágban. Ezeknek az alapvető kérdéseknek a megválaszolása további részletes kutatásokat igényel, és a növényi egyedfejlődés egy eddig teljesen ismeretlen területének - a sejtosztódás és a differenciálódás összefonódásának- megismerése felé vezet.

6. Summary

Understanding the mechanisms behind the unique and flexible ontogeny of plants is an intensively studied field of plant biology. In a nutshell, enormous variety of plant architecture in nature can be traced back to this plant specific flexible developmental program. Although basic structures characteristic of a given species (e.g. compound or simple leaf shape, structure of flowers and inflorescences) are determined by species specific genetical programmes in the case of plants as well, but contrary to the animal ones, plant architecture develops postembryonic. Moreover, this architecture is infinitely variable owing to the special capacity of plants that they are able to produce new organs during their entire lifespan. This plasticity is true for every plant species from the *Arabidopsis* with height of a span to the 100m high *Sequoiadendron* trees. Despite their sessile lifestyle plants can adopt to the continuously changing environment thanks to this plasticity. The sources of flexibility are the maintenance of meristematic cell activity and the competence of differentiated cells to form new meristems. In order to develop a proper and proportional plant architecture cell division and differentiation of daughter cells must be coordinated precisely which is carried out by specialized cells located at the meristem to organ boundaries (Wang et al., 2016).

Although it is not known in details how they regulate plant organogenesis, some genes determining the function and identity of boundary cells have been already characterized (Rast and Simon, 2008). LBD (Lateral Organ Boundaries Domain) genes were identified as one of the genes specific for boundary cells. In addition, their name refers to this characteristic spatial expression pattern. LBD genes themselves encode a plant specific transcription factor family with a few dozens of members. Their common feature is a ~100 amino acid long, highly conserved domain motif - termed LOB-domain - that contains the regions required for basic functions of the proteins such as DNA-binding activity and formation of protein-protein interactions. LOB-domain proteins can be identified easily on the basis of this conserved motif (Mayer and Hochholdinger, 2011). LBDs were discovered about a decade ago and since then it has been proven that they define not just lateral organ boundaries but they regulate high variety of developmental processes, too - e.g. photo morphogenetic responses, leaf shape formation, lateral root emergence, flower development, pollen production, callus formation and *in vitro* plant regeneration (Xu et al., 2016). A LOB-domain transcription factor could control the development of several different organs simultaneously and it is frequently reported that multiple functions of an LBD are fulfilled by forming complexes with different other LBDs.

Despite their highly diverse functions it seems that LBDs play generally an essential role in integration of environmental stimuli and inner hormonal signals to developmental programmes.

Literature of LOB-domain transcription factors is broadening remarkably broad. However, our knowledge on them originates mostly from *Arabidopsis* experiments. Despite the intensive researches on them only one fourth of LBDs have been functionally characterized yet even in the most studied *Arabidopsis*, the dicot model plant. Apart from some few data based on maize (*Zea mays*) and rice (*Oryza sativa*) experiments function of LBDs is much more unexplained in monocotyledonous plants as well. However, on the ground of high economic importance it would be important to reveal the LBD mediated processes in monocots. For this reason we have chosen purple false brome (*Brachypodium distachyon*) as a model organism for our studies on LBD genes. This small annual grass species is closely related to cereals with high agronomical importance and owing to its advantageous features *Brachypodium* became a widely accepted and used model plant of grasses (Draper et al., 2001; Opanowitz et al., 2008; Kellogg, 2015).

Our primary aim in the project presented here was a general and comprehensive characterization of LBD gene family in *Brachypodium* - including the identification of family members, analysis of their phylogenetic relationships and analysis of their spatial expression pattern in high resolution from root tip to shoot apex. With the help of BLAST (basic local alignment search tool) based searching approach we identified 28 LBD genes in *Brachypodium* genome. LOB-domain transcription factors of *Brachypodium* can be divided into two main groups (Class I nad Class II) and five further subclasses (IA-IE) can be distinguished within Class I - according to the phylogenetic analysis based on amino acid sequence alignment of highly conserved LOB-domain motifs. This classification is consonant to the results of similar phylogenetic studies on LOB-domain transcription factors of other species and we established a nomenclature for *Brachypodium* LBDs reflecting the phylogeny. There are neither LBD gene unique to *Brachypodium* nor monocot specific lineage within the LBD family according to phylogenetic comparison of *Brachypodium*, rice, maize and *Arabidopsis* LBDs. However, there are some characteristic differences regarding the complexity of some subclasses: subclass IB seems to be enlarged in monocots while subclass IA is more expanded in dicots. Based on surveys investigating origin of LBD gene family, whole genome duplication and gene dispersion must be the main force of LBD gene diversification and members of the family must be highly preserved during the evolution. By estimation of Kong et al., more than 80% of known LBD genes of angiosperms are originated from duplication events (Kong et al, 2017). Our *in silico*

analysis of chromosomal co-linearity suggests that *Brachypodium* LBDs arise on the same way. However, *Brachypodium* genome encodes far less LBD genes compared to other higher plants: most of the angiosperms have 34 or more LBD genes while *Brachypodium* has only 28. The reduced number of LBD genes in *Brachypodium* indicates that LBD gene family in purple false brome was affected fewer times by mechanisms leading to gene family expansion.

There is no doubt that great functional diversity typical of LBD genes can be traced back to this evolutionary history and this is also reflected by the highly diverse expression pattern of LBDs reported frequently. Tissue and organ specific expression patterns of *Brachypodium* LBDs revealed by detailed qRT-PCR measurements not only differ from each other regarding to different subclasses but LBDs in a same phylogenetic subgroup often show high expressional heterogeneity, too. Moreover, we observed several times that expression of closely related LBD genes differs dramatically. Because of high variances in the expression it is incredibly difficult - and there is no sense - to assign one general function to an LBD subclass or a gene. Nevertheless, some general features can be recognised: e.g. members of subclass IA are active in parts of the leaves and in the inflorescence, while members of subclass IB can be characterized with root specific expression in general and genes in subclass IE are expressed mainly in anthers. Differing to them, members of subclass IC and ID show highly diverse expression profile. E.g. among members of subclass IC there is a gene which is active only in vegetative plant parts, another one is expressed in parts of the root and in generative organs, and another one is expressed only in root segments, mainly in root tip. Regarding to subclass ID, LBD1D-1 is active in specific parts of the leaf such as ligules and sheaths, while LBD1D-2 is active in almost all vegetative plant parts we tested. Expression of LBDs in Class II doesn't exhibit tissue specificity. The highly diverse expression patterns of LBDs is not only typical of *Brachypodium* but our results also corresponds with expression data of LBDs from other species and expression of each *BdLBD* genes show high similarity to the expression pattern of their counterparts in other species such as *Arabidopsis*, maize and rice. This suggests not just great functional diversity of LBD gene family but also suggests that diverse functions might be evolutionary conserved among different plant species. Although knowledge of transcript profile is not enough for understanding the role of LBD genes, but expression pattern analysis is an essential and integral part of functional characterization of a gene family and provides a solid base for further studies.

We started to reveal the function of BdLBD1C-1 and BdLBD1C-2 based on the hypothesized functional conservation of LBD genes. According to our previous yeast two hybrid (Y2H) studies A2;2 type cyclin of alfalfa (*Medicago sativa*) interacts with MtCPP1 (cyclin partner protein), a LOB-domain transcription factor of *Medicago truncatula*. The aim of that experiments was to identify the protein partners of alfalfa A2;2 cyclin but the results shed light on plausible connection of LBD proteins to cell cycle regulation and called our attention to the LBD protein family. Recent surveys of our laboratory focus on functional characterization of the closest counterparts of MtCPP1 in *Brachypodium*, BdLBD1C-1 and BdLBD1C-2. Based on homology of BdLBD1C-1 and LBD1C-2 to MtCPP1, we hypothesize that both of the *Brachypodium* LBDs might have direct connection to cell cycle regulation. In order to confirm this hypothesis we attempted to reproduce the original Y2H experiment with the usage of *Brachypodium* homologues of MtCPP1 and alfalfa A2 cyclin. Although our Y2H experiments to demonstrate interactions between *Brachypodium* A2 cyclin and LBD1C-1, LBD1C-2 respectively led to negative results, we observed that both BdLBDs were able to interact with alfalfa A2 cyclin. This means for us that both LBD1C-1 and LBD1C-2 have the potential to interact with cyclin(s). Outcome of *in vitro* kinase assay supports this hypothesis: both LBD1C-1 and LBD1C-2 is phosphorylated *in vitro* by total cyclin-cyclin dependent kinase (CDK) complexes purified from *Brachypodium* cell suspension culture (Zoltán Zombori, Gábor Horváth, unpublished).

It is frequently reported that LOB-domain transcription factors are linked to cell cycle regulation. For example AtLBD16 and AtLBD29 are positive regulators of asymmetric division of pericycle cells during lateral root initiation (Feng et al., 2012; Goh et al., 2012), AtLBD27/SCP (SIDE CAR POLLEN) plays an essential role in correct timing and orientation of microspore cell division (Oh et al., 2010) while loss of AtLBD6/AS2 function leads to increased cell proliferation at the adaxial site of leaf laminae (Iwakawa et al., 2007) in *Arabidopsis*. However, there have been no indications on the cell cycle dependent phosphorylation based regulation of LOB-domain transcription factors yet. Preliminary results of our Y2H experiments and *in vitro* kinase assay supports this to the first. However, we can't lay down exact conclusions yet regarding to the direct connection between BdLBD1C-1, BdLBD1C-2 and cell cycle regulation. We don't know which cyclin-CDK complex is involved in this process. We don't know which developmental processes are coordinated by cell cycle dependent phosphorylation based regulation of BdLBD1C-1 and BdLBD1C-2. It is questionable too, whether there are other LOB-domain transcription factors which are regulated by cyclin-CDK complexes. The effect of

phosphorylation on the protein function also needs to be elucidated and we don't know whether this regulation mechanism is conserved and typical of other plant species or not. Answering these basic questions requires further experiments and means opportunity to reveal a completely unknown aspect of plant ontogenesis and leads to better understanding of the relationship between cell division and differentiation.

Rövidítések

ARF: Auxin Response Factor	EST: Expressed Sequence Tag
AR11/CRL1: Adventitious Rootless/Crown Rootless1	EXP: Expansin
ARR: Arabidopsis Response Regulator	GI: Giganthea
AS2: Asymmetric Leaves2	GIP1: G-bpx Binding Factor Interacting Protein1
ASL: Asymmetric Leaves-like	HB: Homeodomain-zip1 transcription factor
BAC: Bacterial Artificial Chromosome	HIRA: Histon Regulatory Complex A
BAS1: phytochrome-B Activation Tagged Supressor	IAA: Indol-Acetic Acid Induced Protein
bHLH: basic Helix-Loop-Helix transcription factor	Ig1: Indeterminate gametophyte1
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool	ITS: Internal Transcribed Spacer
BOP: Blade On Petiole	JAG: Jagged
BRZ1: Brassinazole Resistant1	JLO: Jagged Lateral Organ
CDK: Cyclin Dependent Kinase	KNOX: Knotted-Like Homeodomain transcription factor
CUC1: Cup-Shaped Cotiledon1	LAF: Lateral Organ Fusion
DH1: Degenerated Hull1	LAS: Lateral Supressor
E2F/DP: E2F-Dimerisation Partner	LBD: Lateral Organ Boundary Domain
EG1: Extra Glume1	LOB: Lateral Organ Boundary
	MYB: Myeloblast transcription factor
	NAM: No Apical Meristem

NDHF: subunit of NADH-dehydrogenase

NPGS: National Germplasm System

PAP: Production of Anthocyanin Pigment
(MYB-transcription factor)

PB: Brevipedicellus

PIN: Pin-formed

PLT: Plethora

PTL: Petal-loss

qRT-PCR: quantitative real-time
polymerase chain reaction

Ra2: Ramosa2

RAM: Root Apical Meristem

RAPD: random amplification of
polimorphyc DNA

RAX: Regulator of Axillary Meristem

RBR: retinoblastoma related

RFLP: restriction fragment leight
polymorphism

RS2: Rought Seath2

RTCL: RTCS-like protein

RTCS: Rootless Concerning Crown and
Seminal Roots

SAM: Shoot Apical Meristem

SCP: Sidecar Pollen

SNP: Single Nucleotide Polimorphism

SSR: Single Sequence Repeat

STM: Shoot Meristemless

TILLING: Targeting Induced Local Lesions
in Genomes

WUS: Wuschel

Irodalomjegyzék

- Aida, M., & Tasaka, M. (2006). Genetic control of shoot organ boundaries. *Current opinion in plant biology*, 9(1), 72-77.
- Aida, M., & Tasaka, M. (2006). Morphogenesis and patterning at the organ boundaries in the higher plant shoot apex. *Plant molecular biology*, 60(6), 915-928.
- Aida, M., Beis, D., Heidstra, R., Willemsen, V., Blilou, I., Galinha, C., ... & Scheres, B. (2004). The PLETHORA genes mediate patterning of the Arabidopsis root stem cell niche. *Cell*, 119(1), 109-120.
- Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H., & Tasaka, M. (1997). Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *The Plant Cell*, 9(6), 841-857.
- Albinsky, D., Kusano, M., Higuchi, M., Hayashi, N., Kobayashi, M., Fukushima, A., ... & Horii, Y. (2010). Metabolomic screening applied to rice FOX Arabidopsis lines leads to the identification of a gene-changing nitrogen metabolism. *Molecular plant*, 3(1), 125-142.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389-3402.
- Alves, S. C., Worland, B., Thole, V., Snape, J. W., Bevan, M. W., & Vain, P. (2009). A protocol for Agrobacterium-mediated transformation of Brachypodium distachyon community standard line Bd21. *Nature protocols*, 4(5), 638-649.
- Ariel, F. D., Diet, A., Crespi, M., & Chan, R. L. (2010). The LOB-like transcription factor MtLBD1 controls Medicago truncatula root architecture under salt stress. *Plant signaling & behavior*, 5(12), 1666-1668.
- Ariel, F., Diet, A., Verdenaud, M., Gruber, V., Frugier, F., Chan, R., & Crespi, M. (2010). Environmental regulation of lateral root emergence in Medicago truncatula requires the HD-Zip I transcription factor HB1. *The Plant Cell*, 22(7), 2171-2183.
- Bablak, P., Draper, J., Davey, M. R., & Lynch, P. T. (1995). Plant regeneration and micropropagation of Brachypodium distachyon. *Plant cell, tissue and organ culture*, 42(1), 97-107.
- Bell, E. M., Lin, W. C., Husbands, A. Y., Yu, L., Jaganatha, V., Jablonska, B., ... & Springer, P. S. (2012). Arabidopsis lateral organ boundaries negatively regulates brassinosteroid accumulation to limit growth in organ boundaries. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(51), 21146-21151.
- Benková, E., & Bielach, A. (2010). Lateral root organogenesis—from cell to organ. *Current opinion in plant biology*, 13(6), 677-683.

- Bennetzen, J. L., & Kellogg, E. A. (1997). Do plants have a one-way ticket to genomic obesity?. *The Plant Cell*, 9(9), 1509.
- Berckmans, B., & De Veylder, L. (2009). Transcriptional control of the cell cycle. *Current opinion in plant biology*, 12(5), 599-605.
- Berckmans, B., Vassileva, V., Schmid, S. P., Maes, S., Parizot, B., Naramoto, S., ... & Persiau, G. (2011). Auxin-dependent cell cycle reactivation through transcriptional regulation of Arabidopsis E2Fa by lateral organ boundary proteins. *The Plant Cell*, 23(10), 3671-3683.
- Bertolini, E., Verelst, W., Horner, D. S., Gianfranceschi, L., Piccolo, V., Inzé, D., ... & Mica, E. (2013). Addressing the role of microRNAs in reprogramming leaf growth during drought stress in *Brachypodium distachyon*. *Molecular Plant*, 6(2), 423-443.
- Blanc, G., & Wolfe, K. H. (2004). Functional divergence of duplicated genes formed by polyploidy during Arabidopsis evolution. *The Plant Cell*, 16(7), 1679-1691.
- Borevitz, J. O., Xia, Y., Blount, J., Dixon, R. A., & Lamb, C. (2000). Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *The Plant Cell*, 12(12), 2383-2393.
- Borg, M., Brownfield, L., & Twell, D. (2009). Male gametophyte development: a molecular perspective. *Journal of experimental botany*, 60(5), 1465-1478.
- Borghi, L., Bureau, M., & Simon, R. (2007). Arabidopsis JAGGED LATERAL ORGANS is expressed in boundaries and coordinates KNOX and PIN activity. *The Plant Cell*, 19(6), 1795-1808.
- Borghi, L., Bureau, M., & Simon, R. (2007). Arabidopsis JAGGED LATERAL ORGANS is expressed in boundaries and coordinates KNOX and PIN activity. *The Plant Cell*, 19(6), 1795-1808.
- Bortiri, E., Chuck, G., Vollbrecht, E., Rocheford, T., Martienssen, R., & Hake, S. (2006). *ramosa2* encodes a LATERAL ORGAN BOUNDARY domain protein that determines the fate of stem cells in branch meristems of maize. *The Plant Cell*, 18(3), 574-585.
- Bowman, J. L., Floyd, S. K., & Sakakibara, K. (2007). Green genes—comparative genomics of the green branch of life. *Cell*, 129(2), 229-234.
- Bragg, J. N., Wu, J., Gordon, S. P., Guttman, M. E., Thilmony, R., Lazo, G. R., ... & Vogel, J. P. (2012). Generation and characterization of the Western Regional Research Center *Brachypodium* T-DNA insertional mutant collection. *PLoS One*, 7(9), e41916.
- Branca, A., Paape, T. D., Zhou, P., Briskine, R., Farmer, A. D., Mudge, J., ... & Ben, C. (2011). Whole-genome nucleotide diversity, recombination, and linkage disequilibrium in the model legume *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(42), E864-E870.

- Brandham, P. E., & Bennett, S. T. (1995). Nuclear DNA amounts in diploid and tetraploid *Oropetium* (Poaceae). *Kew Bulletin*, 601-604.
- Breuil-Broyer, S., Morel, P., Almeida-Engler, D., Coustham, V., Negrutiu, I., & Trehin, C. (2004). High-resolution boundary analysis during *Arabidopsis thaliana* flower development. *The Plant Journal*, 38(1), 182-192.
- Brkljacic, J., Grotewold, E., Scholl, R., Mockler, T., Garvin, D. F., Vain, P., ... & Caicedo, A. L. (2011). Brachypodium as a model for the grasses: today and the future. *Plant Physiology*, 157(1), 3-13.
- Brutnell, T. P., Bennetzen, J. L., & Vogel, J. P. (2015). Brachypodium distachyon and Setaria viridis: model genetic systems for the grasses. *Annual review of plant biology*, 66, 465-485.
- Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D., & Schlattner, U. (2009). Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *International journal of molecular sciences*, 10(6), 2763-2788.
- Budak, H., & Akpinar, A. (2011). Dehydration stress-responsive miRNA in Brachypodium distachyon: evident by genome-wide screening of microRNAs expression. *Omics: a journal of integrative biology*, 15(11), 791-799.
- Bureau, M., & Simon, R. (2008). JLO regulates embryo patterning and organ initiation by controlling auxin transport. *Plant signaling & behavior*, 3(2), 145-147.
- Bureau, M., Rast, M. I., Illmer, J., & Simon, R. (2010). JAGGED LATERAL ORGAN (JLO) controls auxin dependent patterning during development of the Arabidopsis embryo and root. *Plant molecular biology*, 74(4-5), 479-491.
- Bureau, M., Rast, M. I., Illmer, J., & Simon, R. (2010). JAGGED LATERAL ORGAN (JLO) controls auxin dependent patterning during development of the Arabidopsis embryo and root. *Plant molecular biology*, 74(4-5), 479-491.
- Byrne, M. E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J. M., Dunham, M., Hudson, A., & Martienssen, R. A. (2000). Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in Arabidopsis. *Nature*, 408(6815), 967-971.
- Caicedo, A. L., Williamson, S. H., Hernandez, R. D., Boyko, A., Fledel-Alon, A., York, T. L., ... & Bustamante, C. D. (2007). Genome-wide patterns of nucleotide polymorphism in domesticated rice. *PLoS Genet*, 3(9), e163.
- Cao, H., Liu, C. Y., Liu, C. X., Zhao, Y. L., & Xu, R. R. (2016). Genomewide analysis of the lateral organ boundaries domain gene family in Vitis vinifera. *Journal of genetics*, 95(3), 515-526.
- Catalán, P., Shi, Y., Armstrong, L., Draper, J., & Stace, C. A. (1995). Molecular phylogeny of the grass genus Brachypodium P. Beauv. based on RFLP and RAPD analysis. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 117(4), 263-280.

- Catalán, P., & Olmstead, R. G. (2000). Phylogenetic reconstruction of the genus *Brachypodium* P. Beauv. (Poaceae) from combined sequences of chloroplast *ndhF* gene and nuclear ITS. *Plant Systematics and Evolution*, 220(1-2), 1-19.
- Catalan, P., Chalhoub, B., Chochois, V., Garvin, D. F., Hasterok, R., Manzaneda, A. J., ... & Voxeur, A. (2014). Update on the genomics and basic biology of *Brachypodium*: International *Brachypodium* Initiative (IBI). *Trends in plant science*, 19(7), 414-418.
- Chalfun-Junior, A., Franken, J., Mes, J. J., Marsch-Martinez, N., Pereira, A., & Angenent, G. C. (2005). ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE1 gene, a member of the AS2/LOB family, controls proximal-distal patterning in *Arabidopsis* petals. *Plant molecular biology*, 57(4), 559-575.
- Chanderbali, A. S., He, F., Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2015). Out of the water: origin and diversification of the LBD gene family. *Molecular biology and evolution*, 32(8), 1996-2000.
- Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R., & Fields, S. (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(21), 9578-9582.
- Cleal, C. J., & Thomas, B. A. (2009). *An introduction to plant fossils* (p. 237). Cambridge: Cambridge University Press.
- Coudert, Y., Dievart, A., Droc, G., & Gantet, P. (2012). ASL/LBD phylogeny suggests that genetic mechanisms of root initiation downstream of auxin are distinct in lycophytes and euphyllophytes. *Molecular biology and evolution*, mss250.
- Coudert, Y., Périn, C., Courtois, B., Khong, N. G., & Gantet, P. (2010). Genetic control of root development in rice, the model cereal. *Trends in plant science*, 15(4), 219-226.
- Dalmaï, M., Antelme, S., Ho-Yue-Kuang, S., Wang, Y., Darracq, O., d'Yvoire, M. B., ... & Troadec, C. (2013). A TILLING platform for functional genomics in *Brachypodium distachyon*. *PLoS One*, 8(6), e65503.
- Davis, B. N. K., Lakhani, K. H., Brown, M. C., & Park, D. G. (1985). Early seral communities in a limestone quarry: an experimental study of treatment effects on cover and richness of vegetation. *Journal of Applied Ecology*, 473-490.
- de Reuille, P. B., Bohn-Courseau, I., Ljung, K., Morin, H., Carraro, N., Godin, C., & Traas, J. (2006). Computer simulations reveal properties of the cell-cell signaling network at the shoot apex in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(5), 1627-1632.
- De Smet, I., Tetsumura, T., De Rybel, B., dit Frey, N. F., Laplaze, L., Casimiro, I., ... & Inzé, D. (2007). Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development*, 134(4), 681-690.

- Deng, W., Wang, Y., Liu, Z., Cheng, H., & Xue, Y. (2014). HemI: a toolkit for illustrating heatmaps. *PloS one*, 9(11), e111988.
- Dewitte, W., & Murray, J. A. (2003). The plant cell cycle. *Annual review of plant biology*, 54(1), 235-264.
- Dolan, L., & Langdale, J. A. (2004). New insights into plant development in New England. *Development*, 131(21), 5215-5220.
- Döring, E., Schneider, J., Hilu, K. W., & Röser, M. (2007). Phylogenetic relationships in the Aveneae/Poeae complex (Pooideae, Poaceae). *Kew Bulletin*, 407-424.
- Draper, J., Mur, L. A., Jenkins, G., Ghosh-Biswas, G. C., Bablak, P., Hasterok, R., & Routledge, A. P. (2001). *Brachypodium distachyon*. A new model system for functional genomics in grasses. *Plant physiology*, 127(4), 1539-1555.
- ENCODE Project Consortium. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 489(7414), 57-74.
- Evans, M. M. (2007). The indeterminate gametophyte1 gene of maize encodes a LOB domain protein required for embryo sac and leaf development. *The Plant Cell*, 19(1), 46-62.
- Fan, M., Xu, C., Xu, K., & Hu, Y. (2012). LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN transcription factors direct callus formation in *Arabidopsis* regeneration. *Cell research*, 22(7), 1169-1180.
- Febrer, M., Goicoechea, J. L., Wright, J., McKenzie, N., Song, X., Lin, J., ... & Wolny, E. (2010). An integrated physical, genetic and cytogenetic map of *Brachypodium distachyon*, a model system for grass research. *PLoS One*, 5(10), e13461.
- Feng, Z., Sun, X., Wang, G., Liu, H., & Zhu, J. (2012). LBD29 regulates the cell cycle progression in response to auxin during lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of botany*, 110(1), 1-10.
- Feng, Z., Zhu, J., Du, X., & Cui, X. (2012). Effects of three auxin-inducible LBD members on lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 236(4), 1227-1237.
- Feuillet, C., & Muehlbauer, G. J. (Eds.). (2009). *Genetics and genomics of the Triticeae* (Vol. 7). Springer Science & Business Media.
- Fields, S., & Song, O. K. (1989). A novel genetic system to detect protein protein interactions. *Nature*, 340(6230), 245-246.
- Figuroa, M., Alderman, S., Garvin, D. F., & Pfender, W. F. (2013). Infection of *Brachypodium distachyon* by formae speciales of *Puccinia graminis*: early infection events and host-pathogen incompatibility. *PLoS One*, 8(2), e56857.

- Friml, J., Benková, E., Blilou, I., Wisniewska, J., Hamann, T., Ljung, K., ... & Palme, K. (2002). AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in Arabidopsis. *Cell*, 108(5), 661-673.
- Fukaki, H., Okushima, Y., & Tasaka, M. (2007). Auxin-Mediated Lateral Root Formation in Higher Plants. *International review of cytology*, 256, 111-137.
- Fukaki, H., & Tasaka, M. (2009). Hormone interactions during lateral root formation. *Plant molecular biology*, 69(4), 437-449.
- Galinha, C., Hofhuis, H., Luijten, M., Willemsen, V., Blilou, I., Heidstra, R., & Scheres, B. (2007). PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. *Nature*, 449(7165), 1053-1057.
- Garvin, D. F., Gu, Y. Q., Hasterok, R., Hazen, S. P., Jenkins, G., Mockler, T. C., ... & Vogel, J. P. (2008). Development of genetic and genomic research resources for, a new model system for grass crop research. *Crop Science*, 48(Supplement_1), S-69.
- Garvin, D. F., McKenzie, N., Vogel, J. P., Mockler, T. C., Blankenheim, Z. J., Wright, J., ... & Gu, Y. (2009). An SSR-based genetic linkage map of the model grass Brachypodium distachyon. *Genome*, 53(1), 1-13.
- Gaut, B. S. (2002). Evolutionary dynamics of grass genomes. *New phytologist*, 154(1), 15-28.
- Gendron, J. M., Liu, J. S., Fan, M., Bai, M. Y., Wenkel, S., Springer, P. S., ... & Wang, Z. Y. (2012). Brassinosteroids regulate organ boundary formation in the shoot apical meristem of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(51), 21152-21157.
- Goh, T., Joi, S., Mimura, T., & Fukaki, H. (2012). The establishment of asymmetry in Arabidopsis lateral root founder cells is regulated by LBD16/ASL18 and related LBD/ASL proteins. *Development*, 139(5), 883-893.
- Gordon, S. P., Priest, H., Des Marais, D. L., Schackwitz, W., Figueroa, M., Martin, J., ... & Wang, W. (2014). Genome diversity in Brachypodium distachyon: deep sequencing of highly diverse inbred lines. *The Plant Journal*, 79(3), 361-374.
- Gore, M. A., Chia, J. M., Elshire, R. J., Sun, Q., Ersoz, E. S., Hurwitz, B. L., ... & Ware, D. H. (2009). A first-generation haplotype map of maize. *Science*, 326(5956), 1115-1117.
- Gu, Y. Q., Ma, Y., Huo, N., Vogel, J. P., You, F. M., Lazo, G. R., ... & Luo, M. C. (2009). A BAC-based physical map of Brachypodium distachyon and its comparative analysis with rice and wheat. *BMC genomics*, 10(1), 496.
- Guo, B. J., Wang, J., Lin, S., Tian, Z., Zhou, K., Luan, H. Y., ... & Xu, R. G. (2016). A genome-wide analysis of the ASYMMETRIC LEAVES2/LATERAL ORGAN BOUNDARIES (AS2/LOB) gene family in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 17(10), 763-774.
- Hasterok, R., Draper, J., & Jenkins, G. (2004). Laying the cytotaxonomic foundations of a new model grass. *Brachypodium distachyon*, 397-403.

- Hasterok, R., Marasek, A., Donnison, I. S., Armstead, I., Thomas, A., King, I. P., ... & 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(1), 349-362.
- Hayama, R., & Coupland, G. (2004). The molecular basis of diversity in the photoperiodic flowering responses of *Arabidopsis* and rice. *Plant physiology*, 135(2), 677-684.
- Heisler, M. G., & Jönsson, H. (2006). Modeling auxin transport and plant development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 25(4), 302-312.
- Hetz, W., Hochholdinger, F., Schwall, M., & Feix, G. (1996). Isolation and characterization of *rtcs*, a maize mutant deficient in the formation of nodal roots. *The Plant Journal*, 10(5), 845-857.
- Higgins, J. A., Bailey, P. C., & Laurie, D. A. (2010). Comparative genomics of flowering time pathways using *Brachypodium distachyon* as a model for the temperate grasses. *PLoS one*, 5(4), e10065.
- Hong, S. Y., Seo, P. J., Yang, M. S., Xiang, F., & Park, C. M. (2008). Exploring valid reference genes for gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR. *BMC plant biology*, 8(1), 112.
- Hong, J. J., Park, Y. S., Bravo, A., Bhattarai, K. K., Daniels, D. A., & Harrison, M. J. (2012). Diversity of morphology and function in arbuscular mycorrhizal symbioses in *Brachypodium distachyon*. *Planta*, 236(3), 851-865.
- Huala, E., Dickerman, A. W., Garcia-Hernandez, M., Weems, D., Reiser, L., LaFond, F., ... & Mueller, L. A. (2001). The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): a comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant. *Nucleic acids research*, 29(1), 102-105.
- Huo, N., Gu, Y. Q., Lazo, G. R., Vogel, J. P., Coleman-Derr, D., Luo, M. C., ... & Anderson, O. D. (2006). Construction and characterization of two BAC libraries from *Brachypodium distachyon*, a new model for grass genomics. *Genome*, 49(9), 1099-1108.
- Huo, N., Lazo, G. R., Vogel, J. P., You, F. M., Ma, Y., Hayden, D. M., ... & Luo, M. C. (2008). The nuclear genome of *Brachypodium distachyon*: analysis of BAC end sequences. *Functional & integrative genomics*, 8(2), 135-147.
- Huo, N., Vogel, J. P., Lazo, G. R., You, F. M., Ma, Y., McMahon, S., ... & Gu, Y. Q. (2009). Structural characterization of *Brachypodium* genome and its syntenic relationship with rice and wheat. *Plant molecular biology*, 70(1-2), 47-61.
- Husbands, A., Bell, E. M., Shuai, B., Smith, H. M., & Springer, P. S. (2007). LATERAL ORGAN BOUNDARIES defines a new family of DNA-binding transcription factors and can interact with specific bHLH proteins. *Nucleic acids research*, 35(19), 6663-6671.

- Ikezaki, M., Kojima, M., Sakakibara, H., Kojima, S., Ueno, Y., Machida, C., & Machida, Y. (2010). Genetic networks regulated by ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1) and AS2 in leaf development in *Arabidopsis thaliana*: KNOX genes control five morphological events. *The Plant Journal*, 61(1), 70-82.
- International Wheat Genome Sequencing Consortium. (2014). A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science*, 345(6194), 1251788.
- Inukai, Y., Sakamoto, T., Ueguchi-Tanaka, M., Shibata, Y., Gomi, K., Umemura, I., ... & Matsuoka, M. (2005). Crown rootless1, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in auxin signaling. *The Plant Cell*, 17(5), 1387-1396.
- Inzé, D., & De Veylder, L. (2006). Cell cycle regulation in plant development 1. *Annu. Rev. Genet.*, 40, 77-105.
- Iwakawa, H., Iwasaki, M., Kojima, S., Ueno, Y., Soma, T., Tanaka, H., ... & Machida, C. (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. *The Plant Journal*, 51(2), 173-184.
- Iwakawa, H., Ueno, Y., Semiarti, E., Onouchi, H., Kojima, S., Tsukaya, H., ... & Machida, Y. (2002). The ASYMMETRIC LEAVES2 gene of *Arabidopsis thaliana*, required for formation of a symmetric flat leaf lamina, encodes a member of a novel family of proteins characterized by cysteine repeats and a leucine zipper. *Plant and Cell Physiology*, 43(5), 467-478.
- Jaakola, L., Pirttilä, A. M., Halonen, M., & Hohtola, A. (2001). Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit. *Molecular biotechnology*, 19(2), 201-203.
- Jenkins, G., Hasterok, R., & Draper, J. (2003). Building the molecular cytogenetic infrastructure of a new model grass. *Application of novel cytogenetic and molecular techniques in genetics and breeding of the grasses. Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland*, 77-84.
- Jeong, D. H., Schmidt, S. A., Rymarquis, L. A., Park, S., Ganssmann, M., German, M. A., ... & Garvin, D. F. (2013). Parallel analysis of RNA ends enhances global investigation of microRNAs and target RNAs of *Brachypodium distachyon*. *Genome biology*, 14(12), 1.
- Jiang, Y., & Deyholos, M. K. (2009). Functional characterization of *Arabidopsis* NaCl-inducible WRKY25 and WRKY33 transcription factors in abiotic stresses. *Plant molecular biology*, 69(1-2), 91-105.
- Jun, J. H., Ha, C. M., & Fletcher, J. C. (2010). BLADE-ON-PETIOLE1 coordinates organ determinacy and axial polarity in *Arabidopsis* by directly activating ASYMMETRIC LEAVES2. *The Plant Cell*, 22(1), 62-76.
- Kellogg, E. A. (2001). Evolutionary history of the grasses. *Plant physiology*, 125(3), 1198-1205.

- Kellogg, E. A. (2015). Brachypodium distachyon as a genetic model system. *Annual review of genetics*, 49, 1-20.
- Kim, J., & Lee, H. W. (2013). Direct activation of EXPANSIN14 by LBD18 in the gene regulatory network of lateral root formation in Arabidopsis. *Plant signaling & behavior*, 8(2), e22979.
- Kim, M. J., Kim, M., Lee, M. R., Park, S. K., & Kim, J. (2015). LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN (LBD) 10 interacts with SIDECAR POLLEN/LBD27 to control pollen development in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 81(5), 794-809.
- Kong, Y., Xu, P., Jing, X., Chen, L., Li, L., & Li, X. (2017). Decipher the ancestry of the plant-specific LBD gene family. *BMC genomics*, 18(1), 951.
- La, H., Li, J., Ji, Z., Cheng, Y., Li, X., Jiang, S., ... & Ramachandran, S. (2006). Genome-wide analysis of cyclin family in rice (*Oryza Sativa* L.). *Molecular Genetics and Genomics*, 275(4), 374-386.
- Lane, A. K., Niederhuth, C. E., Ji, L., & Schmitz, R. J. (2013). pENCODE: a plant encyclopedia of DNA elements. *Annual review of genetics*, 48, 49-70.
- Lee, H. W., Kim, M. J., Kim, N. Y., Lee, S. H., & Kim, J. (2013). LBD18 acts as a transcriptional activator that directly binds to the EXPANSIN14 promoter in promoting lateral root emergence of Arabidopsis. *The Plant Journal*, 73(2), 212-224.
- Lee, H. W., Kim, M. J., Park, M. Y., Han, K. H., & Kim, J. (2013). The conserved proline residue in the LOB domain of LBD18 is critical for DNA-binding and biological function. *Molecular plant*, 6(5), 1722-1725.
- Lee, H. W., Kim, M. J., Park, M. Y., Han, K. H., & Kim, J. (2013). The conserved proline residue in the LOB domain of LBD18 is critical for DNA-binding and biological function. *Molecular plant*, 6(5), 1722-1725.
- Lee, H. W., Kim, N. Y., Lee, D. J., & Kim, J. (2009). LBD18/ASL20 regulates lateral root formation in combination with LBD16/ASL18 downstream of ARF7 and ARF19 in Arabidopsis. *Plant physiology*, 151(3), 1377-1389.
- Lee, H. W., Park, J. H., Park, M. Y., & Kim, J. (2014). GIP1 may act as a coactivator that enhances transcriptional activity of LBD18 in Arabidopsis. *Journal of plant physiology*, 171(5), 14-18.
- Lee, T. H., Tang, H., Wang, X., & Paterson, A. H. (2013). PGDD: a database of gene and genome duplication in plants. *Nucleic acids research*, 41(D1), D1152-D1158.
- Li, A., Zhang, Y., Wu, X., Tang, W., Wu, R., Dai, Z., ... & Pan, X. (2008). DH1, a LOB domain-like protein required for glume formation in rice. *Plant molecular biology*, 66(5), 491-502.
- Li, C., Zhu, S., Zhang, H., Chen, L., Cai, M., Wang, J., ... & Zhang, X. (2017). OsLBD37 and OsLBD38, two class II type LBD proteins, are involved in the regulation of heading date by

- controlling the expression of Ehd1 in rice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Li, C., Zou, X., Zhang, C., Shao, Q., Liu, J., Liu, B., ... & Zhao, T. (2016). OsLBD3-7 overexpression induced adaxially rolled leaves in rice. *PloS one*, 11(6), e0156413.
- Lin, W. C., Shuai, B., & Springer, P. S. (2003). The Arabidopsis LATERAL ORGAN BOUNDARIES-domain gene ASYMMETRIC LEAVES2 functions in the repression of KNOX gene expression and in adaxial-abaxial patterning. *The Plant Cell*, 15(10), 2241-2252.
- Liu, H., Wang, S., Yu, X., Yu, J., He, X., Zhang, S., ... & Wu, P. (2005). ARL1, a LOB-domain protein required for adventitious root formation in rice. *The Plant Journal*, 43(1), 47-56.
- Liu, J., Sheng, L., Xu, Y., Li, J., Yang, Z., Huang, H., & Xu, L. (2014). WOX11 and 12 are involved in the first-step cell fate transition during de novo root organogenesis in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 26(3), 1081-1093.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Luo, N., Liu, J., Yu, X., & Jiang, Y. (2011). Natural variation of drought response in Brachypodium distachyon. *Physiologia Plantarum*, 141(1), 19-29.
- Luo, Y., Ma, B., Zeng, Q., Xiang, Z., & He, N. (2016). Identification and characterization of Lateral Organ Boundaries Domain genes in mulberry, *Morus notabilis*. *Meta gene*, 8, 44-50.
- Ma, Y., Wang, F., Guo, J., & Zhang, X. S. (2009). Rice OsAS2 gene, a member of LOB domain family, functions in the regulation of shoot differentiation and leaf development. *Journal of Plant Biology*, 52(5), 374-381.
- Majer, C., & Hochholdinger, F. (2011). Defining the boundaries: structure and function of LOB domain proteins. *Trends in plant science*, 16(1), 47-52.
- Majer, C., Xu, C., Berendzen, K. W., & Hochholdinger, F. (2012). Molecular interactions of ROOTLESS CONCERNING CROWN AND SEMINAL ROOTS, a LOB domain protein regulating shoot-borne root initiation in maize (*Zea mays* L.). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 367(1595), 1542-1551.
- Mandadi, K. K., & Scholthof, K. B. G. (2015). Genome-wide analysis of alternative splicing landscapes modulated during plant-virus interactions in Brachypodium distachyon. *The Plant Cell*, 27(1), 71-85.
- Mangeon, A., Bell, E. M., Lin, W. C., Jablonska, B., & Springer, P. S. (2011). Misregulation of the LOB domain gene DDA1 suggests possible functions in auxin signalling and photomorphogenesis. *Journal of experimental botany*, 62(1), 221-233.
- Matsumura, Y., Iwakawa, H., Machida, Y., & Machida, C. (2009). Characterization of genes in the ASYMMETRIC LEAVES2/LATERAL ORGAN BOUNDARIES (AS2/LOB) family in

- Arabidopsis thaliana*, and functional and molecular comparisons between AS2 and other family members. *The Plant Journal*, 58(3), 525-537.
- McCormick, S. (2004). Control of male gametophyte development. *The Plant Cell*, 16(suppl 1), S142-S153.
- McCourt, R. M., Delwiche, C. F., & Karol, K. G. (2004). Charophyte algae and land plant origins. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(12), 661-666.
- Michael, T. P., & VanBuren, R. (2015). Progress, challenges and the future of crop genomes. *Current opinion in plant biology*, 24, 71-81.
- Mishra, B. S., Singh, M., Aggrawal, P., & Laxmi, A. (2009). Glucose and auxin signaling interaction in controlling *Arabidopsis thaliana* seedlings root growth and development. *PLOS one*, 4(2), e4502.
- Naito, T., Yamashino, T., Kiba, T., Koizumi, N., Kojima, M., Sakakibara, H., & Mizuno, T. (2007). A link between cytokinin and ASL9 (ASYMMETRIC LEAVES 2 LIKE 9) that belongs to the AS2/LOB (LATERAL ORGAN BOUNDARIES) family genes in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 71(5), 1269-1278.
- Nakazawa, M., Ichikawa, T., Ishikawa, A., Kobayashi, H., Tsuhara, Y., Kawashima, M., ... & Matsui, M. (2003). Activation tagging, a novel tool to dissect the functions of a gene family. *The Plant Journal*, 34(5), 741-750.
- Neff, M. M., Nguyen, S. M., Malancharuvil, E. J., Fujioka, S., Noguchi, T., Seto, H., ... & Chory, J. (1999). BAS1: A gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(26), 15316-15323.
- Nordborg, M., Hu, T. T., Ishino, Y., Jhaveri, J., Toomajian, C., Zheng, H., ... & Jakobsson, M. (2005). The pattern of polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biol*, 3(7), e196.
- Oh, S. A., Park, K. S., Twell, D., & Park, S. K. (2010). The SIDECAR POLLEN gene encodes a microspore-specific LOB/AS2 domain protein required for the correct timing and orientation of asymmetric cell division. *The Plant Journal*, 64(5), 839-850.
- Oh, S. A., Twell, D., & Park, S. K. (2011). SIDECAR POLLEN suggests a plant-specific regulatory network underlying asymmetric microspore division in *Arabidopsis*. *Plant signaling & behavior*, 6(3), 416-419.
- Okushima, Y., Fukaki, H., Onoda, M., Theologis, A., & Tasaka, M. (2007). ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19(1), 118-130.
- Okushima, Y., Overvoorde, P. J., Arima, K., Alonso, J. M., Chan, A., Chang, C., ... & Onodera, C. (2005). Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. *The Plant Cell*, 17(2), 444-463.

- Opanowicz, M., Vain, P., Draper, J., Parker, D., & Doonan, J. H. (2008). Brachypodium distachyon: making hay with a wild grass. *Trends in plant science*, 13(4), 172-177.
- Ori, N., Eshed, Y., Chuck, G., Bowman, J. L., & Hake, S. (2000). Mechanisms that control knox gene expression in the Arabidopsis shoot. *Development*, 127(24), 5523-5532.
- Pacheco-Villalobos, D., Sankar, M., Ljung, K., & Hardtke, C. S. (2013). Disturbed local auxin homeostasis enhances cellular anisotropy and reveals alternative wiring of auxin-ethylene crosstalk in Brachypodium distachyon seminal roots. *PLoS Genet*, 9(6), e1003564.
- Păcurar, D. I., Thordal-Christensen, H., Nielsen, K. K., & Lenk, I. (2008). A high-throughput Agrobacterium-mediated transformation system for the grass model species Brachypodium distachyon L. *Transgenic research*, 17(5), 965-975.
- Paterson, A. H., Bowers, J. E., Bruggmann, R., Dubchak, I., Grimwood, J., Gundlach, H., ... & Schmutz, J. (2009). The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. *Nature*, 457(7229), 551-556.
- Peraldi, A., Beccari, G., Steed, A., & Nicholson, P. (2011). Brachypodium distachyon: a new pathosystem to study Fusarium head blight and other Fusarium diseases of wheat. *BMC Plant Biology*, 11(1), 1.
- Péret, B., De Rybel, B., Casimiro, I., Benková, E., Swarup, R., Laplace, L., ... & Bennett, M. J. (2009). Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends in plant science*, 14(7), 399-408.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- Phelps-Durr, T. L., Thomas, J., Vahab, P., & Timmermans, M. C. (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. *The Plant Cell*, 17(11), 2886-2898.
- Pines, J. (1995). Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations. *Advances in cancer research*, 66, 181-212.
- Priest, H. D., Fox, S. E., Rowley, E. R., Murray, J. R., Michael, T. P., & Mockler, T. C. (2014). Analysis of global gene expression in Brachypodium distachyon reveals extensive network plasticity in response to abiotic stress. *PLoS One*, 9(1), e87499.
- Proost, S., Van Bel, M., Sterck, L., Billiau, K., Van Parys, T., Van de Peer, Y., & Vandepoele, K. (2009). PLAZA: a comparative genomics resource to study gene and genome evolution in plants. *The Plant Cell*, 21(12), 3718-3731.
- Proost, S., Van Bel, M., Vanechoutte, D., Van de Peer, Y., Inzé, D., Mueller-Roeber, B., & Vandepoele, K. (2015). PLAZA 3.0: an access point for plant comparative genomics. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D974-D981.

- Qi, L., Friebe, B., Wu, J., Gu, Y., Qian, C., & Gill, B. S. (2010). The compact Brachypodium genome conserves centromeric regions of a common ancestor with wheat and rice. *Functional & integrative genomics*, 10(4), 477-492.
- Rast, M. I., & Simon, R. (2008). The meristem-to-organ boundary: more than an extremity of anything. *Current opinion in genetics & development*, 18(4), 287-294.
- Rast, M. I., & Simon, R. (2012). Arabidopsis JAGGED LATERAL ORGANS acts with ASYMMETRIC LEAVES2 to coordinate KNOX and PIN expression in shoot and root meristems. *The Plant Cell*, 24(7), 2917-2933.
- Reddy, G. V., Heisler, M. G., Ehrhardt, D. W., & Meyerowitz, E. M. (2004). Real-time lineage analysis reveals oriented cell divisions associated with morphogenesis at the shoot apex of Arabidopsis thaliana. *Development*, 131(17), 4225-4237.
- Renaudin, J. P., Doonan, J. H., Freeman, D., Hashimoto, J., Hirt, H., Inzé, D., ... & Sauré, A. (1996). Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant molecular biology*, 32(6), 1003-1018.
- Robert, H. S., & Friml, J. (2009). Auxin and other signals on the move in plants. *Nature chemical biology*, 5(5), 325-332.
- 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. *The Plant Journal*, 23(1), 73-83.
- Roudier, F., Fedorova, E., Lebris, M., Lecomte, P., Györgyey, J., Vaubert, D., ... & Kondorosi, E. (2003). The Medicago species A2-type cyclin is auxin regulated and involved in meristem formation but dispensable for endoreduplication-associated developmental programs. *Plant Physiology*, 131(3), 1091-1103.
- Rubin, G., Tohge, T., Matsuda, F., Saito, K., & Scheible, W. R. (2009). Members of the LBD family of transcription factors repress anthocyanin synthesis and affect additional nitrogen responses in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21(11), 3567-3584.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- Scheible, W. R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., ... & Stitt, M. (2004). Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of Arabidopsis in response to nitrogen. *Plant physiology*, 136(1), 2483-2499.
- Schneebeli, K., Mathesius, U., & Watt, M. (2015). Brachypodium distachyon is a pathosystem model for the study of the wheat disease rhizoctonia root rot. *Plant Pathology*, 64(1), 91-100.

- Schneider, S., Buchert, M., & Hovens, C. M. (1996). An in vitro assay of beta-galactosidase from yeast. *Biotechniques*, 20(6), 960.
- Schwartz, C. J., Doyle, M. R., Manzaneda, A. J., Rey, P. J., Mitchell-Olds, T., & Amasino, R. M. (2010). Natural variation of flowering time and vernalization responsiveness in *Brachypodium distachyon*. *Bioenergy Research*, 3(1), 38-46.
- Semiarti, E., Ueno, Y., Tsukaya, H., Iwakawa, H., Machida, C., & Machida, Y. (2001). The ASYMMETRIC LEAVES2 gene of *Arabidopsis thaliana* regulates formation of a symmetric lamina, establishment of venation and repression of meristem-related homeobox genes in leaves. *Development*, 128(10), 1771-1783.
- Shuai, B., Reynaga-Peña, C. G., & Springer, P. S. (2002). The lateral organ boundaries gene defines a novel, plant-specific gene family. *Plant physiology*, 129(2), 747-761.
- Soyano, T., Thitamadee, S., Machida, Y., & Chua, N. H. (2008). Asymmetric leaves2-like19/lateral organ boundaries domain30 and ASL20/LBD18 regulate tracheary element differentiation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 20(12), 3359-3373.
- Sugimoto, K., Jiao, Y., & Meyerowitz, E. M. (2010). *Arabidopsis* regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Developmental cell*, 18(3), 463-471.
- Sun, X., Feng, Z., Meng, L., Zhu, J., & Geitmann, A. (2013). *Arabidopsis* ASL11/LBD15 is involved in shoot apical meristem development and regulates WUS expression. *Planta*, 237(5), 1367-1378.
- Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, M. W., & Kubista, M. (2015). How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular detection and quantification*, 3, 9-16.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Tanaka, T., Antonio, B. A., Kikuchi, S., Matsumoto, T., Nagamura, Y., Numa, H., ... & Aono, R. (2008). The rice annotation project database (RAP-DB): 2008 update. *Nucleic Acids Research*, 36(Suppl 1), D1028-D1033.
- Taramino, G., Sauer, M., Stauffer, J. L., Multani, D., Niu, X., Sakai, H., & Hochholdinger, F. (2007). The maize (*Zea mays* L.) RTCS gene encodes a LOB domain protein that is a key regulator of embryonic seminal and post-embryonic shoot-borne root initiation. *The Plant Journal*, 50(4), 649-659.
- Thatcher, L. F., Kazan, K., & Manners, J. M. (2012). Lateral organ boundaries domain transcription factors: New roles in plant defense. *Plant signaling & behavior*, 7(12), 1702-1704.
- Tohge, T., Nishiyama, Y., Hirai, M. Y., Yano, M., Nakajima, J. I., Awazuhara, M., ... & Noji, M. (2005). Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of

- Arabidopsis plants over-expressing an MYB transcription factor. *The Plant Journal*, 42(2), 218-235.
- Tyler, L., Fangel, J. U., Fagerström, A. D., Steinwand, M. A., Raab, T. K., Willats, W. G., & Vogel, J. P. (2014). Selection and phenotypic characterization of a core collection of *Brachypodium distachyon* inbred lines. *BMC plant biology*, 14(1), 1.
- Vain, P., Worland, B., Thole, V., McKenzie, N., Alves, S. C., Opanowicz, M., ... & Snape, J. W. (2008). Agrobacterium-mediated transformation of the temperate grass *Brachypodium distachyon* (genotype Bd21) for T-DNA insertional mutagenesis. *Plant Biotechnology Journal*, 6(3), 236-245.
- Vigeland, M. D., Spannagl, M., Asp, T., Paina, C., Rudi, H., Rognli, O. A., ... & Sandve, S. R. (2013). Evidence for adaptive evolution of low-temperature stress response genes in a Pooideae grass ancestor. *New Phytologist*, 199(4), 1060-1068.
- Vogel, J. P. (Ed.). (2016). *Genetics and Genomics of Brachypodium* (Vol. 18). Springer.
- Vogel, J. P., Garvin, D. F., Leong, O. M., & Hayden, D. M. (2006). Agrobacterium-mediated transformation and inbred line development in the model grass *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84(2), 199-211.
- Vogel, J. P., Garvin, D. F., Mockler, T. C., Schmutz, J., Rokhsar, D., Bevan, M. W., ... & Tice, H. (2010). Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature*, 463(7282), 763-768.
- Vogel, J. P., Gu, Y. Q., Twigg, P., Lazo, G. R., Laudencia-Chingcuanco, D., Hayden, D. M., ... & Coleman-Derr, D. (2006). EST sequencing and phylogenetic analysis of the model grass. *Theor Appl Genet*, 113, 186-195.
- Vogel, J. P., Tuna, M., Budak, H., Huo, N., Gu, Y. Q., & Steinwand, M. A. (2009). Development of SSR markers and analysis of diversity in Turkish populations of *Brachypodium distachyon*. *BMC plant biology*, 9(1), 1.
- Vogel, J., & Bragg, J. (2009). *Brachypodium distachyon*, a new model for the Triticeae. In *Genetics and Genomics of the Triticeae* (pp. 427-449). Springer US.
- Vogel, J., & Hill, T. (2008). High-efficiency Agrobacterium-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* inbred line Bd21-3. *Plant cell reports*, 27(3), 471-478.
- Vollbrecht, E., Springer, P. S., Goh, L., Buckler IV, E. S., & Martienssen, R. (2005). Architecture of floral branch systems in maize and related grasses. *Nature*, 436(7054), 1119-1126.
- Walters, B., Lum, G., Sablok, G., & Min, X. J. (2013). Genome-wide landscape of alternative splicing events in *Brachypodium distachyon*. *DNA research*, 20(2), 163-171.
- Wang, G., Kong, H., Sun, Y., Zhang, X., Zhang, W., Altman, N., & Ma, H. (2004). Genome-wide analysis of the cyclin family in Arabidopsis and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant physiology*, 135(2), 1084-1099.

- Wang, Q., Hasson, A., Rossmann, S., & Theres, K. (2016). Divide et impera: boundaries shape the plant body and initiate new meristems. *New Phytologist*, 209(2), 485-498.
- Wang, X. F., Liu, X., Su, L., Sun, Y. J., Zhang, S. Z., Hao, Y. J., & YOU, C. X. (2013). Identification, evolution and expression analysis of the LBD gene family in tomato. *Scientia Agricultura Sinica*, 12, 012.
- Wang, X., Zhang, S., Su, L., Liu, X., & Hao, Y. (2013). A genome-wide analysis of the LBD (LATERAL ORGAN BOUNDARIES domain) gene family in *Malus domestica* with a functional characterization of MdLBD11. *PloS one*, 8(2), e57044.
- Wang, Y., Tang, H., DeBarry, J. D., Tan, X., Li, J., Wang, X., ... & Kissinger, J. C. (2012). MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity. *Nucleic acids research*, 40(7), e49-e49.
- Wangwattana, B., Koyama, Y., Nishiyama, Y., Kitayama, M., Yamazaki, M., & Saito, K. (2008). Characterization of PAP1-upregulated glutathione S-transferase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant biotechnology*, 25(2), 191-196.
- Watt, M., Schneebeli, K., Dong, P., & Wilson, I. W. (2009). The shoot and root growth of Brachypodium and its potential as a model for wheat and other cereal crops. *Functional Plant Biology*, 36(11), 960-969.
- Wei, B., Cai, T., Zhang, R., Li, A., Huo, N., Li, S., ... & Mao, L. (2009). Novel microRNAs uncovered by deep sequencing of small RNA transcriptomes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and Brachypodium distachyon (L.) Beauv. *Functional & integrative genomics*, 9(4), 499-511.
- Wicker, T., Krattinger, S. G., Lagudah, E. S., Komatsuda, T., Pourkheirandish, M., Matsumoto, T., ... & Perovic, D. (2009). Analysis of intraspecies diversity in wheat and barley genomes identifies breakpoints of ancient haplotypes and provides insight into the structure of diploid and hexaploid Triticeae gene pools. *Plant physiology*, 149(1), 258-270.
- Williams, L., Grigg, S. P., Xie, M., Christensen, S., & Fletcher, J. C. (2005). Regulation of Arabidopsis shoot apical meristem and lateral organ formation by microRNA miR166g and its AtHD-ZIP target genes. *Development*, 132(16), 3657-3668.
- Willis, K., & McElwain, J. (2014). *The evolution of plants*. Oxford University Press.
- Xu, B., Li, Z., Zhu, Y., Wang, H., Ma, H., Dong, A., & Huang, H. (2008). Arabidopsis genes AS1, AS2, and JAG negatively regulate boundary-specifying genes to promote sepal and petal development. *Plant physiology*, 146(2), 566-575.
- Xu, C., Luo, F., & Hochholdinger, F. (2016). LOB Domain Proteins: Beyond Lateral Organ Boundaries. *Trends in plant science*, 21(2), 159-167.
- Xu, C., Tai, H., Saleem, M., Ludwig, Y., Majer, C., Berendzen, K. W., ... & Hochholdinger, F. (2015). Cooperative action of the paralogous maize lateral organ boundaries (LOB) domain

- proteins RTCS and RTCL in shoot-borne root formation. *New Phytologist*, 207(4), 1123-1133.
- Yang, T., yue Fang, G., He, H., & Chen, J. (2016). Genome-Wide Identification, Evolutionary Analysis and Expression Profiles of LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN Gene Family in *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. *PloS one*, 11(8), e0161901.
- Yang, Y., Yu, X., & Wu, P. (2006). Comparison and evolution analysis of two rice subspecies LATERAL ORGAN BOUNDARIES domain gene family and their evolutionary characterization from *Arabidopsis*. *Molecular phylogenetics and evolution*, 39(1), 248-262.
- You, J., Zhang, L., Song, B., Qi, X., & Chan, Z. (2015). Systematic analysis and identification of stress-responsive genes of the NAC gene family in *Brachypodium distachyon*. *PloS one*, 10(3), e0122027.
- Zentella, R., Zhang, Z. L., Park, M., Thomas, S. G., Endo, A., Murase, K., ... & Sun, T. P. (2007). Global analysis of DELLA direct targets in early gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19(10), 3037-3057.
- Zgurski, J. M., Sharma, R., Bolokoski, D. A., & Schultz, E. A. (2005). Asymmetric auxin response precedes asymmetric growth and differentiation of asymmetric leaf1 and asymmetric leaf2 *Arabidopsis* leaves. *The Plant Cell*, 17(1), 77-91.
- Zhang, J., Tang, W., Huang, Y., Niu, X., Zhao, Y., Han, Y., & Liu, Y. (2015). Down-regulation of a LBD-like gene, OsIG1, leads to occurrence of unusual double ovules and developmental abnormalities of various floral organs and megagametophyte in rice. *Journal of experimental botany*, 66(1), 99-112.
- Zhang, J., Xu, Y., Huan, Q., & Chong, K. (2009). Deep sequencing of *Brachypodium* small RNAs at the global genome level identifies microRNAs involved in cold stress response. *BMC genomics*, 10(1), 1.
- Zhang, Y. M., Zhang, S. Z., & Zheng, C. C. (2014). Genomewide analysis of LATERAL ORGAN BOUNDARIES Domain gene family in *Zea mays*. *Journal of genetics*, 93(1), 79-91.
- Zhu, L., Guo, J., Zhou, C., & Zhu, J. (2014). Ectopic expression of LBD15 affects lateral branch development and secondary cell wall synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant growth regulation*, 73(2), 111-120.

Publikációs lista

MTMT azonosító:10053234

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

- Gombos, M., Zombori, Z., Szécsényi, M., Sándor, G., Kovács, H., & Györgyey, J. (2017). **Characterization of the LBD gene family in Brachypodium: a phylogenetic and transcriptional study.** Plant Cell Reports, 36(1), 61-79. IP₂₀₁₆: 3.088
- Zombori, Z., Facskó, L., Gombos, M., Szécsényi, M., Sándor, G. & Györgyey, J. (2017). **Development and optimization of an efficient Agrobacterium-mediated transformation method in Brachypodium distachyon.** Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, (submitted) IP₂₀₁₆: 0.532

Egyéb közlemények

- Csiszár, J., Gallé, Á., Horváth, E., Dancsó, P., Gombos, M., Váry, Z., ... & Tari, I. (2012). **Different peroxidase activities and expression of abiotic stress-related peroxidases in apical root segments of wheat genotypes with different drought stress tolerance under osmotic stress.** Plant Physiology and Biochemistry, 52, 119-129. IP₂₀₁₂: 2.775

Köszönetnyilvánítás

Ez úton szeretném megköszönni az MTA-SZBK Növénybiológiai Intézet- Növényi Testfelépítési és Fejlődési Csoport minden kedves munkatársának a disszertációban bemutatásra kerülő projekthez nyújtott támogatást, a közös munkát és tapasztalatokat. Külön köszönet illeti Sándor Györgyit a növények neveléséhez és a laboratóriumi munkához nyújtott segítségével, dr. Szécsényi Máriát és Zombori Zoltánt a molekuláris munkákhoz nyújtott áldozatkész szakmai és gyakorlati támogatásukért és Horváth V. Gábort az élesztő-kéthibrid kísérletekhez nyújtott elévülhetetlen segítségével. Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom dr. Györgyey Jánosnak ösztönző és türelmes témavezetői munkájáért.

Munkánkat két OTKA-program (OTKA-K76273 és OTKA-K109719) valamint egy GINOP támogatás (GINOP-2.3.2-15-2016-00001) finanszírozta. A jelölt tanulmányait a Szegedi Tudományegyetem Biológia Doktori Iskolaája állami ösztöndíjjal, a Magyar Tudományos Akadémia fiatal kutatói ösztöndíjjal támogatta.

Nyilatkozat

Mint az alábbi közlemények felelős szerzője igazolom, hogy Gombos Magdolna Ph.D jelölt jelentős mértékben hozzájárult az alábbi tudományos publikáció létrehozásához és tézisében közölt eredményeit más Ph.D értekezésben nem használjuk fel.

Gombos, M., Zombori, Z., Szécsényi, M., Sándor, G., Kovács, H., & Györgyey, J. (2017). **Characterization of the LBD gene family in Brachypodium: a phylogenetic and transcriptional study**. Plant Cell Reports, 36(1), 61-79.

Szeged, 2017. szeptember 12.

Dr. Györgyey János
Tudományos főmunkatárs
MTA-SZBK, Növénybiológiai Intézet

Zombori, Z., Facskó, L., Gombos, M., Szécsényi, M., Sándor, G. & Györgyey, J. (2017). **Development and optimization of an efficient Agrobacterium-mediated transformation method in Brachypodium distachyon**. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, (submitted)

Szeged, 2017. szeptember 12.

Zombori Zoltán
Ügyvivő szakértő
MTA-SZBK, Növénybiológiai Intézet

Függelék

1. A kísérlet során alkalmazott protokollok

1.1 RNS-izolálás LiCl-dal

- 1) Felhasználás előtt 20 µl/ml β-merkaptoetnolt 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 eppendorfbba, 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 eppendorfbba, 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 gél elektroforézissel, 1% agaróz gélen (1 µl minta + 9 µl DEPC-kezelt víz + 2 µl 6x loading buffer)
- 20) A mintát ezután –80 °C-on tároljuk felhasználásig.

DNáz kezelés

- 1) A következő reakcióelegy összeállítása, 60 µl végtérfogatra:

30 µg	RNS (~46 µl)
6 µl	DNase puffer (Mg ²⁺ tartalmú)
6 µl	DNase
0,5 µl	RNase inhibitor
1,5 µl	DEPC-kezelt víz

- 2) A mintát 30 percig 37 °C-on inkubáljuk.
- 3) A mintákat 10 percig 65 °C-on inkubáljuk az enzimek inaktiválása érdekében.
- 4) A reakcióelegyhez 150 µl DEPC H₂O-t, 150µl fenolt (NEM pH 4-es fenolt!) és 150 µl kloroformot adunk, majd alaposan vortexeljük.
- 5) Centrifugálás 10 percig 13000 rpm-en, 4 °C-on.
- 6) A felülúszóhoz 200 µl kloroformot adunk.
- 7) Alapos vortexelés után a mintákat 10 percig 13000 rpm-en, 4 °C-on centrifugáljuk.
- 8) A felülúszóhoz 20 µl Na-acetátot (1/10 térfogata a felülúszónak) és 550 µl 96%-os etanolt adunk.
- 9) -20 °C-on overnight inkubáljuk.
- 10) Centrifugálás 20 percig 13000 rpm-en, 4 °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 µl DEPC H₂O-ben visszaoldjuk a csapadékot.
- 13) Koncentrációellenőrzés Nanodroppal (2 µl minta), futtatás 1% agaróz gélben (1 µl minta + 9 µl DEPC-kezelt víz + 2 µl 6x loading buffer).

Amikor a mintánk integritása megfelelő, genomi DNS-től mentes, nem degradálódott, akkor a gélfoton látnunk kell a 18S 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.

1.2 cDNS-PCR

1) Reakcióelegy összeállítása:

2 µg	RNS-templát
1,3 µl	random hexamer

Kiegészítés 13,8 µl végtérfogatra DEPC-kezelt vízzel.

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

3) Az elegyhez hozzámérünk:

5 µl	reakció puffer (5x RT-puffer)
2,5 µl	dNTP mix (10mM)
0,5 µl	RNase inhibitor
2,7 µl	DEPC-kezelt víz

4) Az elegyet 5 percig 25 °C-on inkubáljuk, majd 0,5 µl reverz transzkriptázt adunk minden pozitív mintához. Az enzim bemérése előtt negatív kontrollként 5 µl-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.

1.3 Ellenőrző PCR

Ahhoz, hogy megbizonyosodjunk a cDNS szintézis során kapott termék minőségéről, feltétlenül szükséges egy konzervatív, konstitutívan expresszálódó gén primerpárjával végzett ellenőrző PCR reakció elkészítésére. A kísérlet során az Elingation factor 1 alpha génre tervezett primerpárt haszáltuk (Hong és mtsai, 2008).

1) Reakcióelegy összeállítása egy mintához, 20 µl végtérfogatban

0,46 µl	steril desztvíz
2 µl	Taq-puffer (Mg ²⁺ mentes)
2 µl	dNTP mix (2mM)
0,75 µl	reverz primer (10µM)
0,75 µl	forvard primer (10µM)
0,04 µl	Taq polimeráz (5U/µl)
12 µl	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: amplikonok futtatása 2% agaróz gélben

2. A kísérletekhez használt primerek

2.1 a qRT-PCR mérésekhez használt primerek

gén neve	Forward primer	Reverse primer	termék mérete (nd)	amplifikációs faktor (hatékonyság %)
BdLBD-1A-1	5'- CGAACTGGCGTCCATACATT -3'	5'- TCCGAGCACTACGAAGGATC -3'	109	1.970 (99%)
BdLBD-1A-2	5'- GTGAACGCCATTAGCACCAC-3'	5'-GTCTCCACGCACATTCAGG-3'	211	2.001 (100%)
BdLBD-1A-3	5'- AGCTCCAACAGGACCTCT -3'	5'- GTTGATGAAGTTCTGCGTGC -3'	131	1.991 (100%)
BdLBD-1A-4	5'- GGGCAAGATCAGCAGTTTTTC -3'	5'- CGAACTCGTATCCTCCGTTG -3'	100	1.984 (99%)
BdLBD-1B-1	5'- CCGTAGATTTTCATGGATGTGG -3'	5'-TCTCGTTTTCTCCAGATGC-3'	87	2.018 (100%)
BdLBD-1B-2	5'- GACCTCTCCGCACTCTTC -3'	5'- TGACATGCTGGAGGAAGC -3'	138	1.983 (99%)
BdLBD-1B-3	5'- TCCTCCGTTGACCTCTCTTC -3'	5'- AGATTGCCGCCTCCACTAC -3'	149	2.001 (100%)
BdLBD-1B-4	5'- GCAAGTTGGGTCTCGTTTGT -3'	5'-AAGGGAAATCGGAACAGAGG-3'	85	1.996 (100%)
BdLBD-1B-5	5'- GTCACACCCATGTCGTCCAT -3'	5'- CCAGTTTGATCCGTCCTTCT -3'	126	1.994 (99%)
BdLBD-1B-6	5'- CGTTCAGTTTTGTGGCTTTG -3'	5'- CGAACACCTTGTGGATCG -3'	112	2.004 (100%)
BdLBD-1B-7	5'- GTGAGCGAGATGCTGCTG -3'	5'-GGACGAAGACGACCTCCAC-3'	138	1.993 (99%)
BdLBD-1B-8	5'- GGCGATACAAGGGTATGGAG -3'	5'- TGTTGGATGGAAAAGGAGTTG -3'	115	1.997 (100%)
BdLBD-1C-1	5'- CCCTTCAACACGATGACG -3'	5'- CACCTCCAGGAGCATCTTG -3'	165	1.983 (99%)
BdLBD-1C-2	5'- GACAACAGCCATCAAGCAGT -3'	5'- ACCACCAAAACGTCAAACAA -3'	117	1.975 (99%)
BdLBD-1C-3	5'- AGCAGCCTGGTGTACGAG -3'	5'- TTGCCCATCTTGAGCCTGAT -3'	149	1.979 (99%)
BdLBD-1C-4	5'- CTGCTTTGGTTGCTTCTTTGA -3'	5'- CCTTGAACAGAAACGGAGAGA -3'	138	1.993 (100%)
BdLBD-1C-5	5'- CTTGCCCCTATCAGCAG -3'	5'- AGGTCGAGGTCCGAATCATA -3'	104	1.997 (100%)
BdLBD-1C-6	5'- CACAGCCCACCAATATTCAC -3'	5'- GACTCCATGCAGCAGAAGCT -3'	100	1.989 (99%)
BdLBD-1D-1	5'- CACTGAGAGACACAAGCAGG -3'	5'- TGAAAGCCCGTCGAGGT -3'	103	1.991 (100%)
BdLBD-1D-2	5'- CCAGATCGCCATGAACCAG -3'	5'- AGGAACCCCTGTAGTAGCTCT -3'	90	2.024 (100%)
BdLBD-1E-1	5'- AACCTCACCAAGCTCATCA -3'	5'- GTAGCAACCCCTCGGAAGG -3'	114	1.975 (99%)
BdLBD-1E-2	5'- GTAGGAGGAGTTGCGTCGTC -3'	5'- TGCGGGGTTGAACCTTACTC -3'	105	1.992 (100%)
BdLBD-1E-3	5'- GCCAGATTGACCACAAGGAG -3'	5'- TTGCGATTCTTCAGCCAGT -3'	149	1.996 (100%)
BdLBD-1E-4	5'- CAGCAGCAATACGGAACAA -3'	5'- TTGTCAGCGTTGATGTGTGA -3'	161	1.994 (100%)
BdLBD-2-1	5'- GGTGAACACGACGACGACT-3'	5'- GAGCCACAGCCCGAGAT -3'	100	1.997 (100%)
BdLBD-2-2	5'- CTCCACCACGCTTCATCC -3'	5'- GGCTTCATCTGCTGTGCT -3'	98	2.005 (100%)
BdLBD-2-3	5'- CCTCCACCTCCAAAACAAAG -3'	5'- GTGTCCTGATCCGACTGTTC -3'	190	2.004 (100%)
BdLBD-2-4	5'- GAAGAGTCGGGTCAGGACA -3'	5'- GCTCAATCCGCTCACATCA -3'	198	2.002 (100%)
Bd4g06827.1 (cycA2)	5'- GGCAAGAAAAGTTTGAGTGTGT-3'	5'-CTAAGAGTTGTTGATCAACAGGG-3'	110	2.001 (100%)
BdUBC18*	5'-GGAGGCACCTCAGGTCATTT-3'	5'-ATAGCGGTCATTGTCTTGCG -3'	193	
BdEIFα*	5'-CCATCGATATTGCCTTGTGG -3'	5'-GTCTGGCCATCCTTGGAGAT -3'	183	

A *-gal megjelölt génekre tervezett primerpárok Hong és mtsai (Hong és mtsai., 2008) publikációjából származnak.

2.2 Y2H konstrukciók létrehozásához, klónozáshoz használt primerek

Gén neve	Primer szekvenciája	Termélméret (Nd)
Bd4g06827.1(cycA2)-FWD-NdeI	5'- CGCATATGGCTGCTAGAAAGGATAATCCTGTCC-3'	1506
Bd4g06827.1(cycA2)-REV-XhoI*	5'- CCCTCGAGCTAAGAGTTGTTGATCAACAGGGGA-3'	
Bd4g06827.1(cycA2)Δ-FWD-NdeI	5'-CGCCATATGTCGTCCAAAAATTGCATTGCTG -3'	1239
Bd4g06827.1(cycA2)-REV-XhoI*	5'- CCCTCGAGCTAAGAGTTGTTGATCAACAGGGGA-3'	
Bd4g06827.1(cycA2)-FWD-BamHI	5'- GCGGATCCATGGCTGCTAGAAAGGATAATCC -3'	1506
Bd4g06827.1(cycA2)-REV-NsiI*	5'- TGCATGCATCTAAGAGTTGTTGATCAACAGGG -3'	
Bd4g06827.1(cycA2)Δ-FWD-BamHI	5'- GCGGATCCTCGTCCAAAAATTGCATTGCTG -3'	1239
Bd4g06827.1(cycA2)-REV-NsiI*	5'- TGCATGCATCTAAGAGTTGTTGATCAACAGGG -3'	
BdLBD1C-1-FWD-EcoRI	5'- CCGAATTCATGCCCATTCGCAAGTGACTGGCAGGAG -3'	771
BdLBD1C-1-REV-SalI	5'- CCGTCGACTCAACCGAAATAGGGAACATTCTC -3'	
BdLBD1C-2-FWD-EcoRI	5'- CCGAATTCATGTCCACAGAGAGGGAGAGACT -3'	753
BdLBD1C-2-REV-XhoI*	5'- CCCTCGAGTCAACCAAAGTATGCACCATGC -3'	

A * jelölt primerek esetében a megfelelő vektorba történő klónozás izoschizomer restrikciós enzimekkel volt megvalósítható.

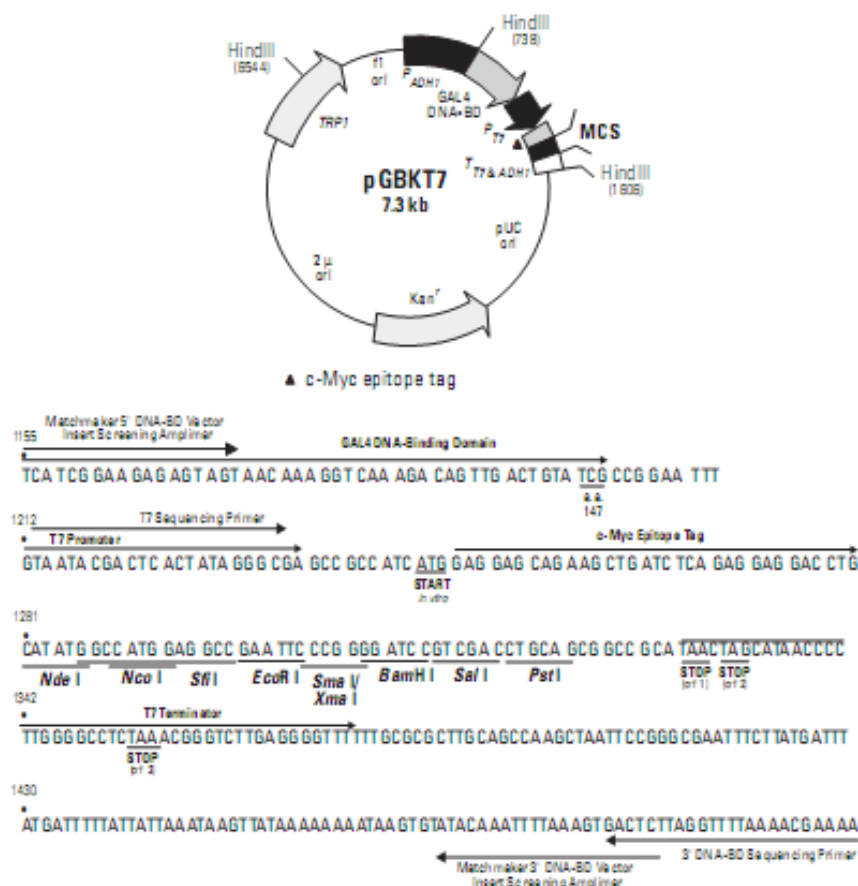
3. Az Y2H kísérletekhez használt vektorkonstrukciók

pGBKT7 Vector Information

PT3248-5

Cat. No. 630489

630443

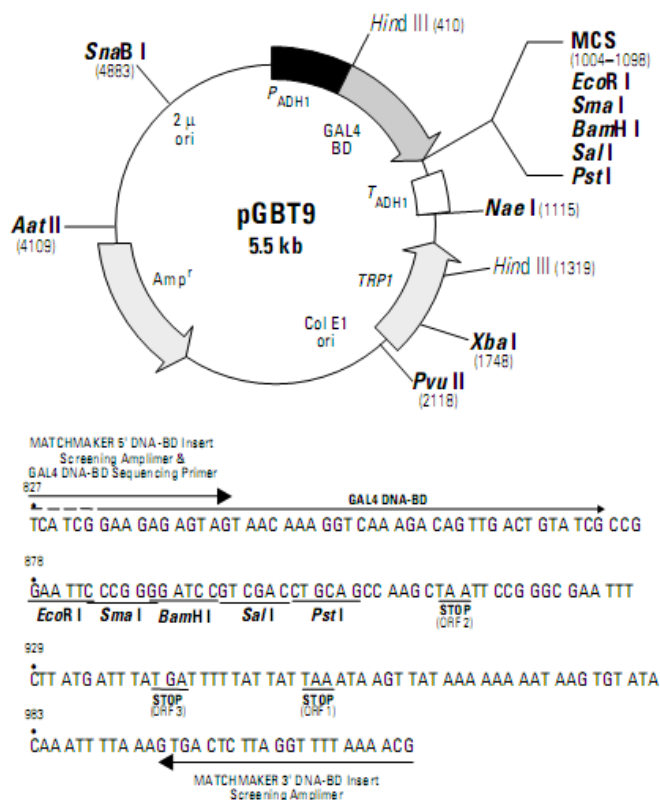


pGBT9 DNA-BD Vector Information

GenBank Accession #: U07646

PT1021-5

Catalog #K1605-A

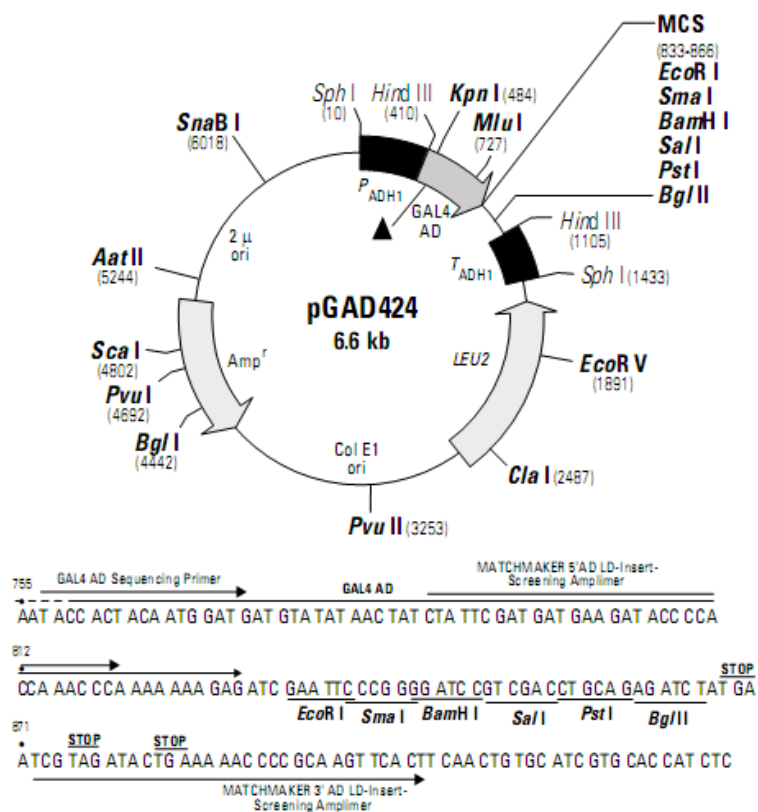


pGAD424 AD Vector Information

GenBank Accession #: U07647

PT1022-5

Catalog #K1605-1



pGADT7 AD Vector Information

PT3249-5

Cat. Nos. 630442

630489

630491

