

Izabela Sierocka

Różnicowa analiza sekwencji genomowych
gametofitu męskiego i żeńskiego oraz genów
ulegających specyficznnej ekspresji w
gametoficie męskim wątrobowca
Pellia endiviifolia subspecies B



Praca przedstawiona Radzie Wydziału Biologii
Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
w celu uzyskania stopnia doktora nauk przyrodniczych

Promotor: Prof. dr hab. Zofia Szweykowska-Kulińska

*Praca doktorska wykonana w ramach grantu
KBN N303 341 635*

Poznań, 2010

Serdeczne podziękowania składam:

Pani Prof. dr hab. Zofii Szweykowskiej-Kulińskiej

*Za możliwość rozwoju naukowego w Zakładzie Ekspresji Genów,
Przekazaną wiedzę oraz cierpliwość wykazaną w trakcie przygotowania pracy*

Panu Prof. dr hab. Arturowi Jarmołowskiemu

Za kreatywne dyskusje naukowe i nie tylko

Pani Prof. dr hab. Jolancie Małuszyńskiej z Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach

oraz

Panu Prof. dr hab. Januszowi Maszewskiemu z Uniwersytetu Łódzkiego

Za wysiłek włożony w zrecenzowanie mojej pracy

Dr Aleksandrze Rojek

*Za wprowadzenie w tematykę badań nad wątrobowcami,
Przekazaną wiedzę oraz ogromne wsparcie w trakcie prac laboratoryjnych i nie tylko*

Wszystkim osobom tworzącym podstawowy i ruchomy skład

Zakładu Ekspresji Genów

*Za wszelką pomoc, wskazówki i dyskusje laboratoryjno-bioinformatyczne,
a przede wszystkim za niesamowitą atmosferę*

***Wszystkim Pracownikom oraz Koleżankom i Kolegom
z Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM***

Moim Najbliższym

Za cierpliwość, motywację i wsparcie w trakcie przygotowania rozprawy doktorskiej

Rodzicom, Łukaszowi i „Groszkowi” ...

SPIS TREŚCI:

STRESZCZENIE	6
SUMMARY	8
1. WSTĘP	10
1.1. Wegetatywne i reprodukcyjne innowacje pierwszych roślin lądowych	10
1.1.1. Innowacje w budowie wegetatywnego gametofitu mszaków	10
1.1.2. Innowacje w budowie gametofitu wytwarzającego organy płciowe.....	13
1.1.3. Innowacje w procesie spermatogenezy mszaków.....	15
1.1.4. Innowacje w budowie sporofitu mszaków	17
1.2. Mszaki w ujęciu filogenetycznym ze szczególnym uwzględnieniem gromady <i>Marchantiophyta</i>	18
1.3. Rozwój badań molekularnych i genetycznych nad wybranymi przedstawicielami mszaków	20
1.3.1. <i>Physcomitrella patens</i>	21
1.3.2. <i>Marchantia polymorpha</i>	26
1.3.3. Wątrobowiec <i>Pellia endiviifolia</i> sp B jako obiekt badań cytologicznych i molekularnych.....	29
2. CEL PRACY	32
3. MATERIAŁY	33
3.1. Materiał roślinny	33
3.2. Wykorzystane szczepy bakterii <i>E.coli</i>	33
3.3. Wektory stosowane w pracy	33
3.3.1. Plazmid pGEM®-T Easy	33
3.4. Enzymy	33
3.4.1. Enzymy wykorzystane w eksperymentach RDA i RDA-cDNA.....	33
3.4.2. Enzymy wykorzystane do oczyszczenia preparatu RNA z zanieczyszczeń genomowym DNA oraz w reakcji odwrotnej transkrypcji.....	33
3.4.3. Enzymy wykorzystane w reakcjach 5' i 3' RACE oraz „spacer po genomie”	33
3.4.4. Enzym wykorzystany w reakcji ligacji produktów reakcji PCR do wektora.....	33
3.5. Markery molekularne DNA	34
3.6. Oligonukleotydy użyte w reakcjach PCR	34
3.6. Roztwory, bufory, odczynniki	38
3.6.1. Odczynniki wykorzystane w hodowli wątrobowców <i>in vitro</i>	38
3.6.2. Odczynniki stosowane w transformacji bakterii.....	38
3.6.3. Roztwory do izolacji RNA z tkanek roślinnych	39
3.6.3.1. Roztwory do izolacji RNA metodą ekstrakcji fenolowej na gorąco (Boutla i inn., 2002).....	39
3.6.3.2. Roztwory do izolacji RNA metodą Chomczyńskiego zmod. przez dr P. Nuca z wykorzystaniem odczynnika „Trizol” (Pant i in. 2009)	39
3.6.4. Odczynniki stosowane do oczyszczania DNA, cDNA.....	39
3.6.5. Odczynniki stosowane w reakcji DNazowania i odwrotnej transkrypcji	40
3.6.6. Odczynniki stosowane w eksperymentach RDA i RDA-cDNA	40
3.6.7. Odczynniki stosowane w analizach PCR i RT-PCR	40
3.6.8. Odczynniki wykorzystane w reakcjach 5' i 3' RACE oraz „spacer po genomie”	40
3.6.9. Bufory i żele do elektroforezy RNA.....	40

3.6.10.	Bufory i żele do elektroforezy DNA	41
3.7.	Zestawy użyte w doświadczeniach	41
3.7.1.	PolyATtract® mRNA Isolation System III/IV firmy Promega	41
3.7.2.	cDNA Synthesis System firmy Roche	41
3.7.3.	Zestawy wykorzystane do izolacji DNA z tkanek roślinnych	41
3.7.4.	Zestawy wykorzystane do oczyszczania produktów reakcji PCR	42
3.7.5.	Zestaw wykorzystany do izolacji plazmidowego DNA	42
3.7.6.	Zestaw wykorzystany do amplifikacji końców 5' i 3' cDNA	42
3.7.7.	Zestaw wykorzystany do uzyskania sekwencji genomowej wyselekcjonowanych genów	42
4.	METODY	43
4.1.	Hodowla in vitro wątrobowców <i>Pellia endiviifolia</i> species B	43
4.2.	Metody pracy z bakteriami	43
4.2.1.	Hodowla bakterii <i>E.coli</i> szczep DH5α	43
4.3.	Podstawowe metody pracy z kwasami nukleinowymi	44
4.3.1.	Izolacja RNA całkowitego metodą ekstrakcji fenolowej na gorąco (Boutla i inn., 2002)	44
4.3.2.	Izolacja RNA całkowitego metodą Chomczyńskiego zmod. przez dr P. Nuca z wykorzystaniem odczynnika „Trizol” (Pant i in. 2009)	44
4.3.3.	Reakcja DNazowania z wykorzystaniem DNazy RQ1	45
4.3.4.	Izolacja mRNA przy użyciu zestawu PolyATtract® mRNA Isolation System III firmy Promega	45
4.3.5.	Synteza dwuniciowego cDNA (ds-cDNA) z użyciem zestawu cDNA Synthesis System firmy Roche	47
4.3.6.	Oczyszczanie dwuniciowego cDNA	47
4.3.7.	Synteza jednoniciowego cDNA – reakcja odwrotnej transkrypcji	47
4.3.8.	Amplifikacja fragmentu cDNA aktywny	48
4.3.9.	Izolacja DNA genomowego z materiału roślinnego	48
4.4.	RDA – różnicowa analiza sekwencji genomowych	49
4.4.1.	Przygotowanie amplikonów DNA testowanego (ang. <i>Tester</i>) i eliminującego (ang. <i>Driver</i>)	50
4.4.1.1.	Trawienie restrykcyjne DNA testowanego i eliminującego	50
4.4.1.2.	Ligacja R-adaptorów do fragmentów restrykcyjnych DNA	50
4.4.1.3.	„Namnożenie” amplikonów DNA testowanego i eliminującego w reakcji PCR	51
4.4.1.4.	Oczyszczanie amplikonów DNA testowanego i eliminującego	51
4.4.2.	Różnicowa hybrydyzacja	51
4.4.2.1.	Pierwsza runda hybrydyzacji	52
4.4.2.1.1.	Usuwanie R-adaptorów z amplikonów DNA testowanego i eliminującego	52
4.4.2.1.2.	Ligacja J-adaptorów do amplikonów DNA testowanego	52
4.4.2.1.3.	Hybrydyzacja 1 – stosunek ilościowy amplikonów DNA testowanego do amplikonów DNA eliminującego – 1:100	53
4.4.2.1.4.	Wstępna amplifikacja produktów różnicowych J-DP ^I metodą PCR	53
4.4.2.1.5.	Trawienie jednoniciowego DNA nukleazą Mung Bean	54
4.4.2.1.6.	Amplifikacja produktów różnicowych J-DP ^I metodą PCR	54
4.4.2.2.	Druga runda hybrydyzacji	54
4.4.2.2.1.	Usuwanie J-adaptorów z produktów różnicowych J-DP ^I	55
4.4.2.2.2.	Ligacja N-adaptorów do produktów różnicowych DP ^I	55
4.4.2.2.3.	Hybrydyzacja 2 – stosunek ilościowy amplikonów DNA testowanego do amplikonów DNA eliminującego – 1:400 dla DP ^I -HindIII, 1:800 dla DP ^I -BamHI	55
4.4.2.2.4.	Wstępna amplifikacja produktów różnicowych N-DP ^{II} metodą PCR, trawienie jednoniciowych DNA nukleazą Mung Bean, amplifikacja produktów różnicowych N-DP ^{II} metodą PCR	55
4.4.2.3.	Trzecia runda hybrydyzacji	56
4.4.2.3.1.	Usuwanie N-adaptorów z produktów różnicowych DP ^{II}	56
4.4.2.3.2.	Ligacja J-adaptorów do produktów różnicowych DP ^{II}	56
4.4.2.3.3.	Hybrydyzacja 3 – stosunek ilościowy amplikonów DNA testowanego do amplikonów DNA eliminującego – 1:100 000 dla DP ^{II} -HindIII, 1:400 000 dla DP ^{II} -BamHI	57

4.4.2.4.	Czwarta runda hybrydyzacji	57
4.4.2.4.1.	Usuwanie J-adaptorów z produktów różnicowych J-DP ^{III}	57
4.4.2.4.2.	Ligacja N-adaptorów do produktów różnicowych DP ^{III}	57
4.4.2.4.3.	Hybrydyzacja 4 – stosunek ilościowy amplikonów DNA testowanego do amplikonów DNA eliminującego – 1:8 000 000 dla DP ^{III} -HindIII, 1:400 000 dla DP ^{III} -BamHI	58
4.5.	RDA-cDNA – różnicowa analiza cDNA.....	58
4.5.1.	Przygotowanie amplikonów cDNA testowanego (ang. <i>Tester</i>) i eliminującego (ang. <i>Driver</i>)	58
4.5.1.1.	Trawienie restrykcyjne ds-cDNA testowanego i eliminującego	58
4.5.2.	Pierwsza runda hybrydyzacji	59
4.5.2.1.	Usuwanie R-adaptorów z amplikonów cDNA testowanego i eliminującego	59
4.5.3.	Druga, trzecia, czwarta runda hybrydyzacji.....	59
4.6.	Klonowanie produktów PCR do wektora pGEM®T-Easy (Promega)	59
4.7.	Transformacja wektorem pGEM®T-Easy komórek bakteryjnych <i>E.coli</i> DH5α	60
4.8.	Izolacja DNA plazmidowego na małą skalę.....	60
4.9.	Reakcje sekwencjonowania DNA.....	60
4.10.	Identyfikacja fragmentów DNA specyficznych dla DNA testowanego metodą PCR.....	60
4.11.	Analiza poziomu ekspresji genów za pomocą metody RT-PCR.....	61
4.12.	Charakterystyka końców 5' i 3' cDNA wyselekcjonowanych mRNA w eksperymencie RDA-cDNA metodą RACE za pomocą zestawu SMART™ RACE Amplification Kit (Clontech).....	62
4.12.1.	Synteza 5'-RACE-Ready cDNA i 3'-RACE-Ready cDNA.....	64
4.12.2.	Amplifikacja końców 5' i 3' cDNA w reakcji RACE-PCR	65
4.13.	Charakterystyka pełnej sekwencji genomowej wyselekcjonowanych genów w eksperymencie RDA-cDNA metodą „spacer po genomie” za pomocą zestawu GenomeWalker™ Universal Kit firmy Clontech	66
4.13.1.	Przygotowanie „bibliotek DNA”	67
4.13.2.	Amplifikacja pełnej sekwencji genomowej badanych genów w reakcji GenomeWalking-PCR	68
4.14.	Amplifikacja pełnej długości cDNA i genu.....	69
4.15.	Metody bioinformatyczne – analiza produktów sekwencjonowania	69
5.	WYNIKI	71
5.1.	Identyfikacja fragmentów DNA specyficznych dla DNA genomowego męskiego i żeńskiego <i>Pellia endiviifolia</i> sp B	71
5.1.1.	RDA – różnicowa analiza genomowa	71
5.1.2.	Identyfikacja fragmentów DNA specyficznych dla DNA testowanego metodą PCR.....	75
5.1.3.	Analiza bioinformatyczna sekwencji fragmentów DNA specyficznych dla DNA genomowego żeńskiego i męskiego <i>P.endiviifolia</i> sp B hodowanej <i>in vitro</i>	77
5.2.	RDA-cDNA – różnicowa analiza cDNA.....	82
5.2.1.	Porównanie wydajności metod izolacji RNA całkowitego z plech <i>P.endiviifolia</i> sp B	82
5.2.2.	Identyfikacja transkryptów genów ulegających specyficznej ekspresji w gametoficie męskim <i>P.endiviifolia</i> sp B metodą RDA-cDNA	84
5.2.3.	Analiza poziomu ekspresji wyselekcjonowanych fragmentów DP ^{IV} w gametoficie żeńskim i męskim <i>P.endiviifolia</i> sp B za pomocą metody RT-PCR.....	86
5.2.4.	Analiza bioinformatyczna sekwencji fragmentów cDNA ulegających specyficznej amplifikacji na matrycach cDNA z plech męskich <i>P.endiviifolia</i> sp B	89

5.3.	Charakterystyka końców 5' i 3' cDNA wyselekcjonowanych transkryptów w eksperymencie RDA-cDNA metodą RACE	90
5.3.1.	Charakterystyka końców 5' i 3' cDNA fragmentu RDA-cDNA długości 273nt.....	91
5.3.2.	Charakterystyka końców 5' i 3' cDNA fragmentu RDA-cDNA długości 229nt wykazującego podobieństwo do roślinnych genów kodujących białka Rab.....	91
5.3.3.	Charakterystyka końców 5' i 3' cDNA fragmentu RDA-cDNA długości 243nt.....	92
5.3.4.	Charakterystyka końców 5' i 3' cDNA fragmentu RDA-cDNA długości 196nt.....	93
5.4.	Charakterystyka pełnej sekwencji genomowej wyselekcjonowanych genów w eksperymencie RDA-cDNA metodą „spacer po genomie”	94
5.4.1.	Charakterystyka sekwencji genomowej powyżej końca 5' i poniżej końca 3' fragmentu RDA-cDNA długości 273nt.....	95
5.4.2.	Charakterystyka sekwencji genomowej powyżej końca 5' i poniżej końca 3' fragmentu RDA-cDNA długości 229nt wykazującego podobieństwo do roślinnych genów kodującego białka Rab.....	96
5.4.3.	Charakterystyka sekwencji genomowej powyżej końca 5' i poniżej końca 3' fragmentu RDA-cDNA długości 243nt.....	96
5.4.4.	Charakterystyka sekwencji genomowej powyżej końca 5' i poniżej końca 3' cDNA fragmentu długości 193nt.....	97
5.5.	Analiza bioinformatyczna pełnej długości sekwencji cDNA oraz odpowiednich genów wyselekcjonowanych metodą RDA-cDNA	97
5.5.1.	Analiza sekwencji cDNA oraz sekwencji genomowej uzyskanych z wyjściowego fragmentu cDNA długości 273nt.....	97
5.5.2.	Analiza sekwencji cDNA oraz sekwencji genomowej uzyskanych z wyjściowego fragmentu RDA-cDNA długości 229nt wykazującego podobieństwo do roślinnych genów kodujących białka Rab102.....	105
5.5.3.	Analiza sekwencji cDNA oraz sekwencji genomowej uzyskanych z wyjściowego fragmentu cDNA długości 243nt.....	105
5.5.4.	Analiza sekwencji cDNA oraz sekwencji genomowej uzyskanych z wyjściowego fragmentu cDNA długości 193nt.....	108
5.6.	Amplifikacja pełnej długości cDNA oraz genów	113
6.	DYSKUSJA	115
6.1.	Identyfikacja fragmentów DNA specyficznych dla DNA genomowego męskiego i żeńskiego <i>Pellia endiviifolia</i> sp B przy zastosowaniu techniki RDA	115
6.2.	Identyfikacja genów, których ekspresja związana jest z pojawianiem się organów rozmnażania generatywnego wytwarzanych przez gametofity męskie <i>P.endiviifolia</i> sp B przy zastosowaniu techniki RDA-cDNA	120
6.2.1.	Analiza bioinformatyczna genu i białka α -tubuliny oraz jego potencjalna funkcja w plechach męskich <i>P.endiviifolia</i> sp B.....	125
6.2.2.	Analiza bioinformatyczna genu i białka z rodziny Rab oraz jego potencjalna funkcja w plechach męskich <i>P.endiviifolia</i> sp B.....	128
6.2.3.	Analiza bioinformatyczna genu i białka TS oraz jego potencjalna funkcja w plechach męskich <i>P.endiviifolia</i> sp B.....	131
6.2.4.	Analiza bioinformatyczna genu i białka HMGbox oraz jego potencjalna funkcja w plechach męskich <i>P.endiviifolia</i> sp B.....	133
7.	WNIOSKI I PERSPEKTYWY BADAWCZE	137
8.	LITERATURA	141
	WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	149
	ANEKS	152

STRESZCZENIE

W przedstawionej pracy doktorskiej za obiekt badań molekularnych obrano wątrobowca *Pellia endiviifolia* sp B, jednego z dwóch rozdzielnopłciowych przedstawicieli flory Polski z rodzaju *Pellia*, należącego do klasy jungermanii (*Jungermanniopsida*), gromady wątrobowców (*Marchantiophyta*).

W pierwszym etapie badań podjęto próbę identyfikacji fragmentów DNA specyficznych dla genomu gametofitu męskiego oraz genomu gametofitu żeńskiego u *P.endiviifolia* sp B przy zastosowaniu techniki RDA. W eksperymencie tym jako punkt wyjścia do izolacji DNA genomowego wykorzystano plechy wątrobowca hodowane w warunkach *in vitro*. Jako wynik uzyskano 3 fragmenty ulegające specyficznej amplifikacji na DNA genomowym żeńskim oraz 7 fragmentów ulegających specyficznej amplifikacji na DNA genomowym męskim, izolowanych z plech hodowli aksenicznej. Uzyskane fragmenty DNA reprezentują odcinki DNA różnicujące genomy plech żeńskich i męskich *P.endiviifolia* sp B hodowanych *in vitro*, gdyż stwierdzono ich obecność w przypadku DNA genomowego męskiego i żeńskiego izolowanego z plech z terenu. Zidentyfikowane fragmenty różnicują więc genomy jedynie bardzo wąskiej grupy osobników hodowanych w warunkach aksenicznych i nie odzwierciedlają rzeczywistego stanu różnic w DNA genomowym męskim i żeńskim gatunku *P.endiviifolia* sp B.

W drugim etapie badań przeprowadzono analizy mające na celu identyfikację genów, których ekspresja związana jest z pojawianiem się organów rozmnażania generatywnego wytwarzanych przez gametofity męskie *P.endiviifolia* sp B przy zastosowaniu techniki RDA-cDNA. W eksperymencie tym jako punkt wyjścia do wydajnej syntezy dwuniciowego cDNA wykorzystano całkowity RNA izolowany z plech zebranych z terenu, wytwarzających organy rozmnażania generatywnego. Jako wynik otrzymano zbiór fragmentów różnicowych (DP^{IV}) długości w zakresie ~200 – 300pz. Analizy RT-PCR z wykorzystaniem specyficznych starterów zaprojektowanych na podstawie uzyskanych sekwencji pozwoliły na identyfikację czterech fragmentów cDNA ulegających amplifikacji wyłącznie na matrycach cDNA z plech męskich. Dwa fragmenty cDNA długości 273nt oraz 229nt (fragmenty transkryptów genów kodujących odpowiednio α -tubulinę oraz białko Rab) wykazały amplifikację zarówno na cDNA uzyskanym z plech męskich *P.endiviifolia* sp B z hodowli *in vitro*, jak i cDNA uzyskanym z plech męskich pochodzących z terenu. Dwa kolejne długości 243nt oraz 193nt (fragmenty transkryptów genów kodujących białko z domeną HMGbox oraz białko bogate w reszty leucyny i proliny Ts) wykazały amplifikację wyłącznie na cDNA uzyskanym z plech męskich *P.endiviifolia* sp B wytwarzających plemniki, pochodzących z terenu. Dodatkowo

wykazano, że geny kodujące białko z domeną HMGbox oraz białko bogate w reszty leucyny i proliny Ts są obecne zarówno w DNA genomowym plech męskich jak i żeńskich. Natomiast zidentyfikowane geny kodujące α -tubulinę oraz białko Rab występują wyłącznie w DNA genomowym plech męskich. Geny te są więc specyficzne dla genomu osobników męskich *P.endiviifolia* sp B.

Eksperymenty typu 5' i 3'RACE oraz „spacer po genomie” pozwoliły na poznanie dokładnej struktury wyselekcjonowanych genów z określeniem liczby i długości egzonów, intronów, a także regionów nie ulegających translacji. Zaobserwowano duże podobieństwo budowy genów kodujących α -tubulinę oraz białko Rab wątrobowca *P.endiviifolia* sp B do odpowiednich genów mchu *P.patens* i roślin okrytozalążkowych, co może świadczyć, że homologi zidentyfikowanych genów występują również u roślinnych przedstawicieli innych mszaków, a także roślin wyższych. W przypadku genu kodującego białko z HMGbox gen wątrobowca różni się zdecydowanie od znanych genów roślinnych i grzybowych. Z kolei gen *TS*, kodujący potencjalne białko bogate w reszty leucyny i proliny może należeć do grupy genów specyficznych tylko dla wątrobowców, gdyż nie wykazuje on żadnego podobieństwa do znanych obecnie genów.

Ponieważ część genów *P.endiviifolia* sp B zidentyfikowanych w niniejszej pracy wykazała podobieństwo do genów kodujących białka roślin wyższych zaangażowanych w procesy rozmnażania płciowego, można sądzić, że produkty tych genów biorą udział w procesach związanych z wytwarzaniem plemni przez plechy męskie wątrobowca *P.endiviifolia* sp B.

SUMMARY

In the presented PhD thesis for the object of molecular studies a liverwort *Pellia endiviifolia* sp B was chosen, one of two dioecious representatives of the Polish flora from the genus *Pellia*, belonging to the class *Jungermanniopsida*, phylum *Marchantiophyta*.

In the first part of the research an attempt was made to identify specific DNA fragments for the genome of male and female gametophytes of *P.endiviifolia* sp B. For this purpose the RDA technique was used and genomic DNA from male and female thalli cultured *in vitro* was isolated. As the result three fragments showing the specific amplification on female genomic DNA and seven fragments showing the specific amplification on male genomic DNA were obtained (as a template DNA isolated from axenic culture of liverwort was used). Further studies showed that these DNA fragments represent sections of DNA differentiating female and male genomic DNA of *P.endiviifolia* sp B cultivated *in vitro*. They are not present in the genomic DNA isolated from liverwort thalli growing in the country. The obtained DNA fragments differentiate narrow class of male/female individuals raised *in vitro*, and does not reflect the real state of differences in the male and female genomic DNA of *P.endiviifolia* sp B.

In the second part of the present work analyses of the gene identification, which expression is connected with the production of the generative organs by male thalli of *P.endiviifolia* sp B were conducted. For this purpose the RDA-cDNA technique was implemented. In these experiments total RNA isolated from thalli collected in the country and producing the generative organs was used. As the result a set of differential products (DP^{IV}) within the range ~200 – 300bp was obtained. RT-PCR analyses showed that the obtained cDNA fragments exclusively amplify on cDNA from male thalli. Two cDNA fragments of the length 273nt and 229nt (transcripts fragments of genes coding for α -tubulin and Rab protein, respectively) showed sex-specific amplification on cDNA from male thalli cultured *in vitro* and collected from the country. Two fragments of 243nt and 193nt in lengths (transcript fragments of genes coding the protein with the HMGbox domain and the leucin-proline rich protein - Ts) were exclusively amplified only on cDNA from male thalli of *P.endiviifolia* sp B producing antheridia and collected in the country. No products on DNA from female thalli were detected. Additionally we showed that the genes coding the protein with the HMGbox domain and the leucin-proline rich protein Ts are encoded in both, male and female genome while genes coding α -tubulin and the Rab protein are present exclusively in the male genome.

These two genes are unique for the genome of male individuals of the liverwort *P.endiviifolia* sp B.

The 5' and 3' RACE and the „genome walking” experiments allowed for the recognition of the detailed structure of selected genes. The high similarity of the structure and sequence of genes coding α -tubulin and the Rab protein of the liverwort *P.endiviifolia* sp B to the respective genes found in the moss *P.patens* and several representatives of angiosperm suggests that identified liverwort genes may have homologes in other bryophytes and higher plants. In the case of the gene coding the protein with HMGbox domain, *P.endiviifolia* sp B gene structure differs significantly from the known genes of plants and fungi. In the case of Ts gene, coding the potential leucin-proline rich protein Ts, no similarity to known sequences deposited in public databases was found suggesting that this gene may belong to the class of genes specific only for liverworts.

Because several *P.endiviifolia* sp B genes identified in the present work showed similarity to genes encoding higher plant proteins, which are involved in the process of gametogenesis, it can be assumed that the identified genes are involved in the antheridia production by male individuals of the liverwort *P.endiviifolia* sp.

1. WSTĘP

1.1. Wegetatywne i reprodukcyjne innowacje pierwszych roślin lądowych

Wczesne etapy ewolucji roślin lądowych charakteryzowały się wysokim stopniem morfologicznych i reprodukcyjnych innowacji, które były napędzane przez losowe zmiany genetyczne, preferowane przez dobór naturalny (Niklas 1997, Bateman i in. 1998). Żyjąc w niezamieszkałym środowisku lądowym, pierwsze rośliny zielone miały miejsce i czas, by nastąpił wybuch różnorodności ich form, którego rezultatem była radiacja w kierunku zasiedlania różnorodnych stanowisk. Wielokrotne eksperymenty ewolucyjne, prowadzące do rozległej morfologicznej dywersyfikacji roślin, po których następowała surowa selekcja, charakteryzowały prawdopodobnie wczesne etapy kolonizacji lądu (Kenrick i Crane 1997). Z ogromu przystosowawczych rozwiązań jedynie ograniczona ich ilość przetrwała miliony lat, w tym reprezentanci trzech linii mszaków: glewiki, wątrobowce oraz mchy (Stewart i Rothwell 1993).

Uwzględniając ogrom czasu jaki upłynął od momentu kiedy nastąpiło rozejście się dróg ewolucyjnych prowadzących do różnych gromad mszaków (ponad 400 mln lat temu), zubożony zapis w postaci skamieniałości oraz ogrom nowo zasiedlonego krajobrazu, nie jest dziwnym, że wczesne etapy filogenezy roślin lądowych pozostają nadal jedną z największych zagadek w biologii ewolucyjnej. Obecnie powszechnie przyjęta jest koncepcja głosząca, że rośliny lądowe są monofiletyczne, mszaki reprezentują ich podstawową gałąź, a glony z klasy ramienic *Charophyceae* (zwłaszcza rzędy *Coleochaetales* i *Charales*) są najbliższymi krewnymi pierwszych roślin lądowych (McCourt 1995). Z uwagi na swoje antyczne pochodzenie wątrobowce, glewiki oraz mchy reprezentują relikty różnorodnej flory, a jako najstarsze pozostałości etapów wczesnej kolonizacji ziemi, reprezentują żywe laboratorium do badań wczesnych, morfologicznych adaptacji potrzebnych do życia na lądzie. Rośliny te pozwalają na obserwacje innowacyjnych rozwiązań morfologicznych i rozwojowych na poziomie komórek, tkanek, organów i całych organizmów, których optymalizacja umożliwiła im skuteczną aktywność wegetatywną i reprodukcyjną w warunkach lądowych.

1.1.1. Innowacje w budowie wegetatywnego gametofitu mszaków

Dominujące stadium gametofitu wyróżnia mszaki spośród pozostałych roślin lądowych. Modyfikacje adaptacyjne dotyczyły więc przede wszystkim gametofitu, w obrębie którego nastąpiła optymalizacja rozwoju wegetatywnego, z jednoczesnym utrzymaniem rozmnażania płciowego, wciąż zależnego od wody. Z tego względu mszaki i paprotniki nazywamy roślinami ziemnowodnymi, tzn. takimi, które wymagają nieprzerwanego dostępu

do wody w celu reprodukcji. W momencie niedoboru wody rośliny te trwają w fazie wegetatywnej cyklu. Mszaki różnią się tym od paprotników, że przede wszystkim gametofit odpowiedzialny jest za rozwój, rozmieszczenie i trwanie formy wegetatywnej oraz rozmnażanie płciowe. U paprotników, to sporofit jest formą odpowiedzialną za produkcję biomasy i kolonizację nowych stanowisk. Z tego względu gametofity mszaków są najbardziej złożonymi w budowie i funkcji gametofitami wśród wszystkich roślin lądowych. To właśnie u mszaków doszło do wypróbowania różnych strategii strukturalnych, które umożliwiły ogromnej liczbie gametofitów przetrwanie w warunkach środowiska charakteryzującego się wysoką presją selekcyjną na system zapłodnienia z wykorzystaniem ruchomych gamet (Renzaglia i in. 2000).

Gametofit mszaków występuje w dwóch zasadniczych formach: pierwsza to spłaszczone, płózące się plechy (glewiki oraz wybrane gatunki złożonych i prostych plechowatych wątrobowców), druga to wzniesione lub pełzające, cylindryczne „pędy liściaste” (liściaste wątrobowce, wybrane gatunki prostych plechowatych wątrobowców oraz mchy). Spłaszczenie grzbietobrzusne plech spowodowało ograniczenie całkowitej powierzchni ciała wystarczającej jednak dla wymaganej pojemności wymiany gazowej i dostępu do światła (Niklas 1997). Formy plechowate rzadko wykazują wzrost pionowy (Renzaglia i in. 2000). U form liściastych pojawiły się wyspecjalizowane organy, związane z częściowym podziałem funkcji wegetatywnych: spłaszczone liście maksymalizują wychwytywanie światła i zwiększają pojemność fotosyntetyczną, podczas gdy centralna „łodyżka” wzmaga gospodarkę zasobami wodnymi i umożliwia pionowy wzrost u niektórych gatunków. Wzniesiona budowa ciała ułatwia eksploatację powietrza dla wymiany gazowej i wychwytywania fotonów światła. Zapewnia również możliwość pionowego wzrostu sporofitu, promując w ten sposób rozsiewanie zarodników. Za wzrost gametofitu mszaków odpowiedzialna jest pojedyncza komórka apikalna. Może ona przyjmować jeden z czterech podstawowych, geometrycznych kształtów: klinowaty, soczewkowaty, czworościenny (piramidalny) lub półdyskowaty (Crandall-Stotler 1986). Kształt piramidalny komórki apikalnej charakteryzuje najczęściej liściaste gatunki wątrobowców, soczewkowaty – gatunki o spłaszczonych plechach (z często zgrubiałym żeberkiem i wywiniętymi na zewnątrz skrzydełkami, np. *Metzgeria* i *Pallavicinia*). Klinowate i półdyskowate komórki apikalne spotyka się u wielu gatunków plechowatych wątrobowców oraz u glewików. U mchów z kolei dominuje kształt piramidalny (Crandall-Stotler 1984). Podsumowując, u wątrobowców, jako jedynej gromadzie mszaków, występuje każdy z czterech rodzajów komórek apikalnych. Istnieją przykłady na transformację kształtu komórki w trakcie ontogenezy osobników z

kształtu piramidalnego do soczewkowatego, z soczewkowatego do piramidalnego lub klinowatego oraz z klinowatego do półdyskowego (Fulford 1956, Renzaglia i Bartholomew 1985). Najczęściej te geometryczne przekształcenia występują w gromadzie *Marchantiophyta* i związane są ze zmianą morfologii i/lub orientacji wzrostu. Przykładem może być przejście z młodocianej w dojrzałą formę gametofitu u niektórych liściastych wątrobowców, któremu towarzyszy transformacja geometrii soczewkowatej do czworościennej komórki apikalnej (Fulford 1956). U *Fossombronia* czworościenna komórka wierzchołkowa formuje się bezpośrednio po wykiełkowaniu spory, a ograniczona segmentacja prowadzi do utworzenia trzech rzędów liści. Kolejne ukośne podziały zamieniają czworościenną komórkę w soczewkowatą, czemu towarzyszy wytworzenie dojrzałej plechy z dwoma bocznymi rzędami liści (Renzaglia i Bartholomew 1985). Należy zwrócić uwagę, że konwersja geometrii komórki wierzchołkowej jest krytyczna dla normalnego przebiegu procesów rozwojowych u mszaków, a szczególnie rozpowszechniona jest u wątrobowców. Ponadto zmiana kształtu komórki apikalnej pociąga za sobą zmianę zarówno w formie jak i orientacji wzrostu plech/ulistnionych łodyżek. Zmiany jednego kształtu w drugi wywołują zatem bardzo istotne zmiany morfologiczne, tym samym umożliwiając powstawanie dużych zmian ewolucyjnych (Renzaglia i in. 2000).

Liście nie tylko funkcjonują jako organy fotosyntetyzujące, ale również zapewniają ochronę delikatnym wierzchołkom wzrostu. Zaczątki liści okrywają komórkę apikalną i pierwsze komórki pochodzące z jej podziałów. Dodatkowo tuż za strefą podziałów komórki apikalnej wytwarzane są włoski produkujące śluz, zwane papillami, które dostarczają warstwę ochronną przeciwko mechanicznym uszkodzeniom i wysychaniu. Proces ten zachodzi równocześnie z procesem rozwoju liści zarówno u mchów jak i wątrobowców. W przypadku, prostych, plechowatych wątrobowców, liczne, ułożone w jednym rzędzie lub rozgałęzione papille otaczają i ochraniają obszar merystematyczny (Duckett i in. 1990). U złożonych, plechowatych wątrobowców, oprócz produkujących śluz papilli występują spłaszczone, wielokomórkowe łuski z krańcowymi papillami jako forma dodatkowej ochrony (Renzaglia i in. 2000). Wśród ewolucyjnych adaptacji, które umożliwiły mchom pionowy wzrost oraz przetrwanie w stosunkowo suchym środowisku, ważnymi osiągnięciami okazały się również wyspecjalizowane komórki przewodzące (Ligrone i in. 1993), zgrubiałe ściany komórkowe oraz gromadzone w nich związki polifenolowe. Rozwój nowych ścieżek metabolicznych zabezpieczył pierwsze rośliny lądowe przed wysychaniem i stresem cieplnym. Ponadto wzrost wielu osobników w gęstych skupiskach u wielu mszaków efektywnie ułatwia absorpcję i zatrzymanie wody (Renzaglia i in. 2000).

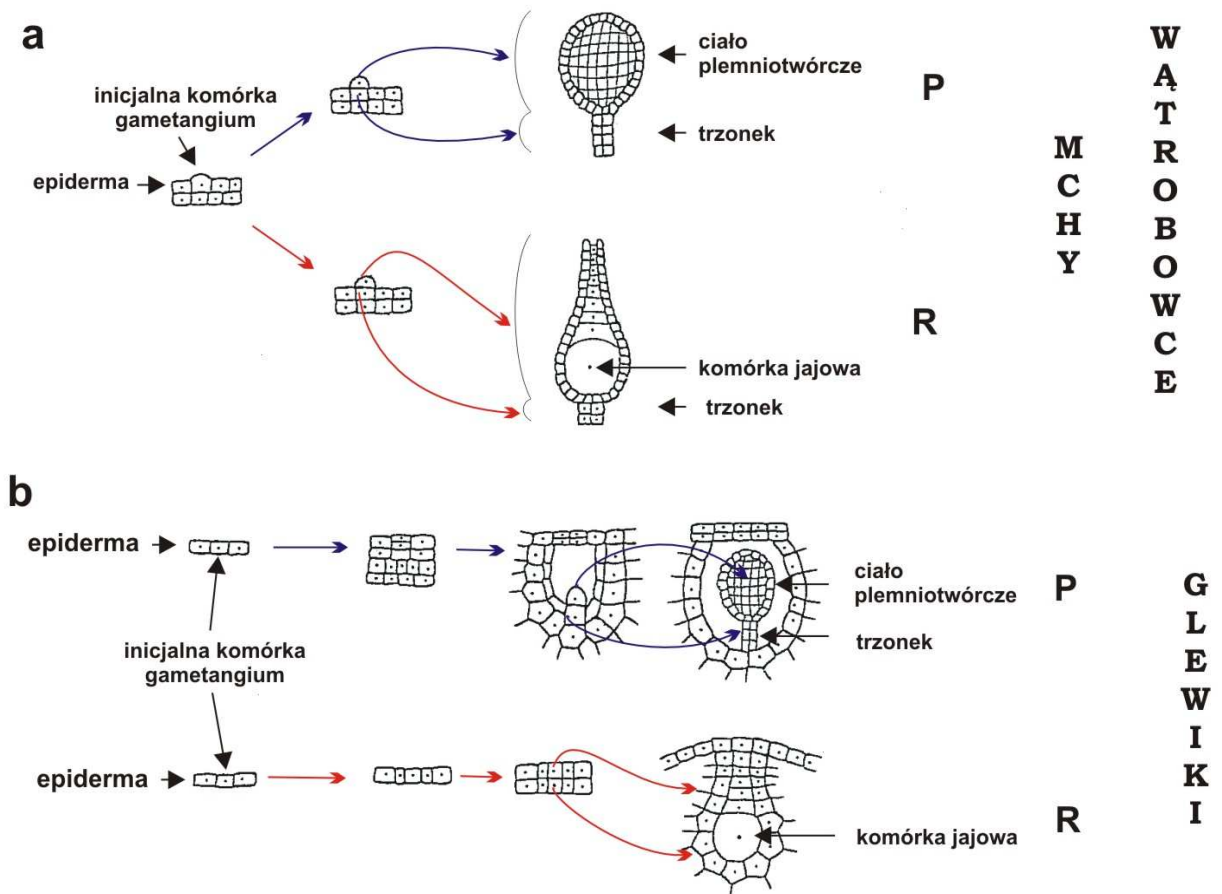
Wątrobowce, jako jedyna gromada mszaków, posiadają unikalne, otoczone pojedynczą błoną organelle tzw. ciała oleiste, w których akumulowane są m.in. związki terpenoidowe. Pozostałe rośliny lądowe, w tym mchy i glewiki produkują cytoplazmatyczne kropelki oleju (zazwyczaj trójglicerydy), lecz nie są one zgrupowane w żadnych wyspecjalizowanych organellach. Ciała oleiste występują u ok. 90% wszystkich gatunków wątrobowców, szczególnie rozpowszechnione są w najstarszych taksonach, sugerując ich utratę w młodszych. Ciała oleiste powstają w komórkach merystematycznych z retikulum endoplazmatycznego (Duckett i Ligrone 1995). Funkcja tych organelli jest dość problematyczna, gdyż najwyraźniej nie stanowią one rezerwuaru składników pokarmowych. Są jednak bardzo cenne dla taksonoma, gdyż ich rozmiar, kształt, liczba w komórce oraz kolor są gatunkowo specyficzne (Crandall-Stotler i Stotler 2000).

1.1.2. Innowacje w budowie gametofitu wytwarzającego organy płciowe

Proces emigracji glonów ze środowiska wodnego na ląd oraz późniejsza ewolucja roślin lądowych wymagały wykształcenia wielokomórkowych organów rozmnażania płciowego (Niklas 1997). Organy te służą przede wszystkim ochronie rozwijających się w nich gamet. Ewolucja gametangiów u mszaków i paprotników była sekwencją złożonych zmian zachodzących po sobie, które wymagały koordynacji procesów morfogenetycznych, fizjologicznych i sygnałów płynących ze środowiska. Produkcja organów płciowych musi być odpowiednio zsynchronizowana i zachodzić szybko w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska. Gametangia muszą być strategicznie umieszczone na roślinie oraz zaopatrzone w struktury ochronne (Renzaglia i in. 2000). W odróżnieniu od paprotników, gametangia mchów i wątrobowców są umieszczone na gametoficie i powstają egzogenicznie przez odkształcenie komórki epidermy (rys. 1-1a) (Szweykowscy 2003). W taksonach liściastych gametangia są połączone z płatkami liści lub dodatkowe odgałęzienia liści otaczają zgrupowanie organów płciowych. Liczne papille lub włoski są przemieszane między gametangiami zapewniając dodatkową ochronę. Plechowate wątrobowce rozwinęły wiele struktur i mechanizmów dla ochrony gametangiów, jak np. wtórnie zapadnięte komory (*Pellia*, *Noteroclada* i złożone, plechowate wątrobowce), czy blaszkowate narośla plechy. Natomiast gametangia glewików są wytwarzane i utrzymywane w obrębie tkanki plechy (endogenicznie), morfologicznie przypominając gametangia paprotników (Renzaglia i in. 2000).

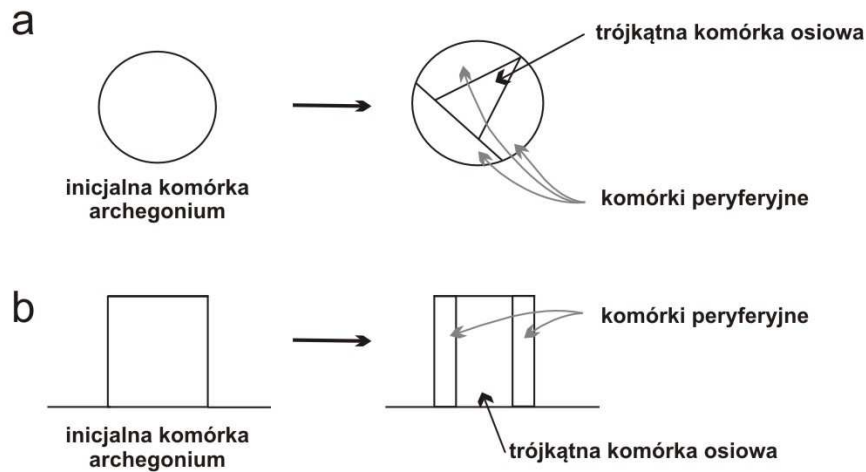
Aby oszacować stopień homologii między gametangiami poszczególnych grup mszaków, należy zwrócić uwagę na wzory podziałów komórek, a zwłaszcza na początkową sekwencję podziałów komórek twórczych, podczas których zapada decyzja o losie późniejszych linii komórkowych (Niklas 1997). Na pierwszy rzut oka wydaje się, że nie ma

żadnego podobieństwa w ontogenezie organów rozmnażania płciowego między wątrobowcami, mchami i glewikami. U mchów i wątrobowców inicjalna komórka archegoniów (rys. 1-1a) wydłuża się powyżej powierzchni epidermy i dzieli na dwie potomne. W wyniku podziałów komórki dolnej powstaje trzonek, a z górnej pozostała część rodni. Rodnie glewików rozwijają się endogenicznie: komórka epidermy dzieli się dwukrotnie, równoległe do warstwy epidermalnej, odkładając w głąb plechy cztery komórki. Trzy mniejsze otaczają większą komórkę. Ta ostatnia dzieli się na dwie potomne komórki: z górnej pochodzić będzie górna część rodni zamykająca szyjkę, a z dolnej powstaną kanalik i część brzuszna rodni (rys. 1-1b) (Szweykowscy 2003). Te cechy związane z ontogenezą rodni dostarczają dowodów na rozbieżność ścieżek rozwojowych w poszczególnych gromadach mszaków.



Rysunek 1-1. Schemat ilustrujący ontogenezę plemni (P) oraz rodni (R) u mchów i wątrobowców (a) oraz u glewików (b). (Wg Szweykowskich 2003, zmienione).

Jednak jeśli spojrzeć na sekwencję podziałów formujących dojrzałą rodnię, to pojawia się zasadniczy wzór, który jest diagnostyczny dla całej grupy mszaków: proces tworzenia rodni dotyczy podłużnych podziałów, które formują centralną trójkątną komórkę osiową otoczoną przez trzy peryferyjne komórki (rys. 1-2).



Rysunek 1-2. Schemat przedstawiający początkowe etapy tworzenia archegoniów u mszaków; (a) przekrój poprzeczny (b) przekrój podłużny (wg Renzaglia i in. 2000, zmodyfikowany).

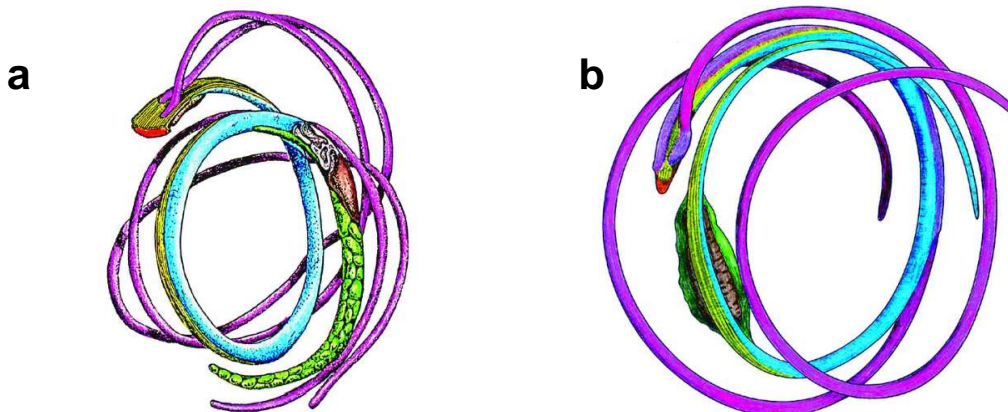
Komórki peryferyjne dalej dzieląc się tworzą szyjkę oraz brzuszną część rodni, osiowa komórka z kolei daje początek komórkom kanału szyjki, wewnętrznej części rodni oraz komórce jajowej (Renzaglia i in. 2000).

Plemnice (anteridia) mszaków posiadają dobrze rozwinięte trzonki oraz umieszczone na nich kuliste lub wydłużone ciała plemniotwórcze. Podobnie jak w przypadku rozwoju rodni mchów i wątrobowców, ontogeneza plemni jest szczególna ze względu na fakt, że komórka inicjalna plemni przed pierwszym podziałem musi ulec wydłużeniu (rys. 1-1a) (Szweykowscy 2003). Powstawanie plemni glewików w wewnętrznej komorze plechy (rys. 1-1b) było uważane za podstawową różnicę morfogenetyczną odróżniającą tę gromadę od mchów i wątrobowców. Jednak po bliższym zbadaniu u podstawy rozwoju plemni wszystkich trzech gromad mszaków leży również wspólny plan rozwoju: komórka inicjalna przechodzi podobne cykle podziałowe formując dwa pierwotne spermatogonia z czterema otaczającymi je komórkami osłonki (mchy i liściaste/proste plechowate wątrobowce) lub formując cztery pierwotne spermatogonia z ośmioma zewnętrznymi komórkami osłonki (glewiki i złożone plechowate wątrobowce) (Renzaglia i in. 2000). Wszystkie innowacje w obrębie organów rozmnażania płciowego mają za zadanie ochronę gametangiów wrażliwych na uszkodzenia mechaniczne w środowisku lądowym, mimo iż do zapłodnienia komórki jajowej dochodzi w obecności wody.

1.1.3. Innowacje w procesie spermatogenezy mszaków

Komórki plemnikowe mszaków i paprotników są przystosowane do zapłodnienia komórki jajowej w środowisku wodnym. Budowa tych komórek jest najbardziej skomplikowana w tej grupie roślin. W trakcie procesu spermatogenezy nieodróżniane komórki parenchymy są stopniowo przekształcane w spiralnie zwinięte komórki o

opływowych kształtach, zawierające minimalną ilość organelli. Proces ten dotyczy również powstania i rozwoju złożonego aparatu lokomotorycznego. Wspólną cechą ruchliwych gamet mszaków i paprotników jest powstawanie *de novo* centrioli w późnej tkance spermatogennej (Vaughn i Harper 1998, Vaughn i Renzaglia 1998). U mszaków wytwarzających dwuwiciowe plemniki powstają bicentriole, zbudowane z dwóch centrioli połączonych ze sobą końcami (Renzaglia i Duckett 1987; Bernhard i Renzaglia 1995; Renzaglia i in. 1994). Dojrzały dwuwiciowy plemnik mszaków jest komórką kształtu helikalnego, z ulokowanym z przodu aparatem lokomotorycznym oraz czterema organellami: przednim mitochondrium, skondensowanym, centralnym jądrem, oraz tylnym plastydem z dołączonym do niego mitochondrium (rys. 1-3). W skład aparatu lokomotorycznego wchodzi wici, dwa ciała podstawowe, blaszkowate pasmo oraz wąska obręcz mikrotubul (tzw. wrzeciono). Te dwie ostatnie struktury ciągną się wzdłuż komórki tworząc szkielet dla prawidłowego rozmieszczenia organelli. Blaszkowate pasmo zbudowane jest z centryn, kurczliwych białek wiążących jony wapnia. Jest ono centrum zarządzającym organizacją mikrotubul wrzeciona i ustaleniem pozycji wici. Po uzyskaniu przez komórkę dojrzałości blaszkowaty pas ulega zanikowi do zwartej obręczy wzdłuż głównego grzbietu komórki (Vaughn i in. 1993).



Rysunek 1-3. Rekonstrukcja dojrzałego, dwuwiciowego plemnika wątrobowca *Blasia pusilla* (a) oraz mchu *Aulacomnium palustre*. Kolory: czerwony/fioletowy – ciała podstawowe/wici; niebieski – jądro komórkowe; brązowy – mitochondria; żółty – mikrotubule; zielony – plastyd (Renzaglia i in. 2000).

Wśród glonów jedynie rząd *Charales* posiada zwinięte plemniki. Wykazują one taką samą podstawową budowę co gamety męskie mszaków, a główną różnicą jest liczba zawartych w nich organelli. W odróżnieniu do mszaków, u których płytki blaszkowatego pasa są ułożone pod kątem 45° względem podłużnej osi mikrotubul wrzeciona, u glonów kąt ten wynosi 90° (Renzaglia i in. 2000).

Dojrzałe plemniki glików, mchów i wątrobowców są rozróżnialne dzięki różnicom architektonicznym. Plemniki glików są niezwykle małe (ok. 3.0µm średnicy), obustronnie symetryczne oraz (w odróżnieniu od innych roślin wytwarzających ruchliwe plemniki, których gamety męskie są lewoskrętnie zwinięte) wykazują prawoskrętne zwinięcie. Z kolei

plemniki wątrobowców i mchów są asymetryczne. U przedstawicieli obu tych gromad dwa ciałka podstawowe wici są różnej długości, innej budowy i różnie rozmieszczone w komórce. W efekcie wici wyłaniające się z plemników rozmieszczone są asymetrycznie. Jeśli spojrzeć z przodu na komórki plemników, to ciałko podstawowe zlokalizowane bliżej nas jest usytuowane po prawej stronie, a to umieszczone bardziej z tyłu leży po lewej stronie komórki. Przednie ciałko podstawowe mchów i wątrobowców zawiera trójkę grzbietowych mikrotubul, tylne natomiast wykazuje wyjątkową, zachowawczą budowę z tripletem brzusznych mikrotubul. Uderzające cechy wspólne w budowie aparatu lokomotorycznego wątrobowców i mchów silnie wspierają teorię o monofiletycznym pochodzeniu tych gromad (Renzaglia i Duckett 1991, Garbary i in. 1993). Podstawową różnicą w budowie gamet męskich mchów i wątrobowców jest obecność u tych pierwszych dodatkowej mikrotubuli oraz obecność plastydu wraz z mitochondrium po brzusznej stronie powierzchni jądra, a nie jak u wątrobowców, na końcu komórki (Renzaglia i in. 2000).

1.1.4. Innowacje w budowie sporofitu mszaków

Mszaki są łatwo odróżnialne od pozostałych roślin lądowych z uwagi na obecność nierozgałęzionych monosporangialnych sporofitów, które całkowicie są zależne od trwałego, fotosyntetyzującego gametofitu. Jediną funkcją sporofitu mszaków jest wytworzenie i „rozsianie” zarodników. Mimo ich niesamodzielnego charakteru, sporofity mszaków wytwarzają najbardziej skomplikowane zarodnie wśród roślin lądowych. U roślin tych doszło do utworzenia wyspecjalizowanych mechanizmów powstawania i rozsiewania zarodników takich jak: perystomy mchów właściwych, komórkowe elatery wątrobowców, wysoce skomplikowane zarodnie glewików czy też wynoszenie zarodni wysoko ponad tkankę gametofitu. To ostatnie przystosowanie mszaki osiągnęły dzięki wydłużeniowemu wzrostowi komórek tkanki gametofitu w postaci archeonioforów, jak u *Marchantiales* lub pseudopodium u *Sphagnum*. Jednak u zdecydowanej większości mszaków związane jest ono ze wzrostem i podziałami komórek tkanki sporofitu. Wyniesienie tkanki sporofitu ponad powierzchnię gametofitu pociąga za sobą albo wytworzenie sety (mchy właściwe, *Takakia*, liściaste i proste plechowate wątrobowce) albo merystemu podstawowego (glewiki). U wątrobowców wydłużanie sety jest procesem szybkim i dotyczy wydłużania komórek turgorowych sporofitu. Siła mechaniczna zapewniana jest przez ciśnienie hydrostatyczne wywierane na ścianę komórkową przez dużą centralną wakuolę. Zarówno wydłużanie archeonioforu u przedstawicieli *Marchantiales* jak i rozwój ochronnych struktur wokół rozwijającego się sporofitu u pozostałych wątrobowców jest również następstwem szybkiej zdolności rozciągania ścian komórkowych i tworzenia tymczasowych organów (takich jak

perychechia, przylistki) (Renzaglia i in. 2000). W odróżnieniu od mchów i glewików sporofity wątrobowców osiągają dojrzałość w obrębie tkanek ochronnych gametofitów, które rozwijają się z „ulistnionych łodyżek”/plech (np. perygynium) oraz/lub rodni (np. kalyptra). Skoro przez długą część swojego rozwoju sporofity znajdują się w tkankach ochronnych gametofitu, to fotosynteza w komórkach sporofitu, z uwagi na utrudniony dostęp światła, jest ograniczona. Z tego względu sporofity wątrobowców przez cały okres swego życia odżywiane są i zaopatrywane w wodę przez tkanki gametofitu. Większość sporofitów wątrobowców zróżnicowana jest na stopę, setę i zarodnię; sporadycznie u przedstawicieli złożonych, plechowatych wątrobowców, seta i/lub stopa są śladowe lub nieobecne (Shaw i Renzaglia 2004). Charakterystyczną cechą wątrobowców, która umożliwia efektywne i natychmiastowe rozsianie zarodników, jest wytwarzanie elater, wyspecjalizowanych wydłużonych sterylnych komórek ze spiralnie skręconymi zgrubieniami ścian (Szweykowscy 2003). Tworzenie krótkotrwałego, wydłużonego sporofitu wykluczyło najprawdopodobniej u wątrobowców obecność komórek przewodzących, fotosyntetyzujących czy aparatów szparkowych na drodze selekcji. Innowacje te pojawiły się natomiast u mchów i glewików. Wzmocniona wytrzymałość mechaniczna tkanek oraz możliwość transportu materiałów pokarmowych do wzrastającego sporofitu okazały się u mchów i glewików kluczowe dla wydłużenia jego czasu życia oraz czasu rozsiewania zarodników (Renzaglia i in 2000).

1.2. Mszaki w ujęciu filogenetycznym ze szczególnym uwzględnieniem gromady *Marchantiophyta*

W przybliżeniu ok. 18 000 gatunków mszaków sklasyfikowanych jest w trzech równorzędnych gromadach: *Marchantiophyta* – wątrobowce, *Bryophyta* – mchy, *Anthocerotophyta* – glewiki. Relacje pokrewieństwa między tymi trzema gromadami mszaków nadal pozostają jedną z największych nierozwiązanych zagadek w biologii ewolucyjnej roślin. Analizy filogenetyczne przeprowadzone przez grupę Mishlera (1994) w połączeniu z badaniami grupy Qiu (2006) sugerują, że gromady te nie tworzą monofiletycznej grupy, lecz raczej reprezentują pewien etap w procesie ewolucji pierwszych roślin lądowych, a każda z nich stanowi odrębną linię monofiletyczną, z niewyjaśnioną kolejnością ich rozgałęziania na drzewie filogenetycznym (Mishler i in. 1994, Qiu i in. 1998). Kontrowersje najczęściej skupiają się wokół kwestii, która z grup mszaków jest grupą siostrzaną do pozostałych roślin lądowych, z dwiema hipotezami wspieranymi najczęściej. Pod koniec XX wieku systematyka oparta na wybranych sekwencjach DNA znalazła swe zastosowanie w badaniach nad problematyką wczesnej ewolucji roślin lądowych. Zebrane dane molekularne

są zgodne z dwiema rywalizującymi hipotezami. Według pierwszego poglądu to glewiki stanowią najstarszą grupę roślin lądowych, a mchy wraz z wątrobowcami stanowią grupę siostrzaną w stosunku do pozostałych roślin lądowych (Nishiyama i Kato 1999, Renzaglia i in. 2000, Nickrent i in. 2000). Druga hipoteza sugeruje, że podstawową linią roślin lądowych są wątrobowce, podczas gdy glewiki stanowią najmłodszą ewolucyjnie gromadę mszaków i dzielą wspólnego przodka z roślinami naczyniowymi (Qiu i in. 1998). Ostatnio wysunięto postulat, który głosi że to właśnie glewiki, a nie wątrobowce i mchy stanowią najbliższej spokrewnioną gromadę mszaków względem roślin naczyniowych. Tezę tę popierają dane uzyskane z analiz chloroplastowych sekwencji ITS (ang. Internal Transcribed Spacers), jak również genów 4.5S oraz 5S rRNA znajdujących się w tym samym operonie (Samigullin i in. 2002).

Liczbę obecnie żyjących wątrobowców szacuje się na ok. 6 000 – 8 000 gatunków (Crandall-Stotler i Stotler 2000). Charakteryzują się one olbrzymią, morfologiczną różnorodnością, która stanowi nie lada wyzwanie dla badania i zrozumienia ich filogenezy i ewolucji. Przez wiele lat w taksonomii obowiązywała klasyfikacja wątrobowców zaproponowana w 1953r. przez Schustera. Zwrócił on uwagę na początkową dichotomię w ewolucji wątrobowców i sklasyfikował je na dwie podklasy. Proste plechowate wątrobowce zostały zgrupowane w rzędzie *Metzgeriales*, liściaste wątrobowce w rzędzie *Jungermanniales*, razem tworząc podklasę jungermanii, *Jungermanniiidae*. Pozostałe wątrobowce utworzyły drugą podklasę, podklasę porostnic *Marchantiidae*. Klasyfikację tę akceptowano do momentu zastosowania analiz molekularnych, opartych o specyficzne sekwencje DNA kodujących lub niekodujących regionów każdego z trzech roślinnych genomów: mitochondrialnego, plastydowego i jądrowego. Uzyskanie z tych badań szeregu danych doprowadziło w 2002r. do wyróżnienia dwóch dodatkowych podklas, *Treubiopsida* i *Blasiopsida*, a w 2004r. kolejnej *Haplomitriopsida* (Stech i in. 2000, Stech i Frey 2001, Stech i Frey 2004). Najnowsze badania przeprowadzone przez He-Nygrena i współpracowników (2006) dokonały fundamentalnej rewizji klasyfikacji systematycznej *Marchantiophyta*. Analizy z wykorzystaniem zestawu danych zawierających sekwencje regionów genów chloroplastowych *rbcL* (ang. ribulose biphosphate carboxylase), *trnL-trnF* (ang. the leucine tRNA_(UAA) - phenylalanine tRNA_(GAA)), *rps4* (ang. ribosomal protein S4), częściową sekwencję genu jądrowego 26S rRNA oraz 90-ciu cech morfologicznych i rozwojowych zarówno gametofitów, jak i sporofitów dla 159 gatunków wątrobowców, wyodrębniły trzy niezależne klasy w gromadzie *Marchantiophyta*, wśród których zaproponowano szereg nowych podklas i rzędów (He-Nygren i in. 2006):

- klasa: *TREUBIOPSIDA*
 podklasa: *Treubiidae*
 rząd: *Treubiales*
 podklasa: *Haplomitriidae*
 rząd: *Haplomitriales*
- klasa: *MARCHANTIOPSIDA*
 podklasa: *Blasiidae*
 rząd: *Blasiales*
 podklasa: *Marchantiidae*
 rząd: *Sphaerocarpales*
 rząd: *Marchantiales*
- klasa: *JUNGERMANNIOPSIDA*
 podklasa: *Pelliidae*
 rząd: *Pelliales*
 rząd: *Fossombroniales*
 podklasa: *Metzgeriidae*
 rząd: *Metzgeriales*
 podklasa: *Jungermanniidae*
 rząd: *Pleuroziales*
 rząd: *Porellales*
 rząd: *Jungermanniales*

Według tej klasyfikacji wątrobowce z klasy *Treubiopsida* tworzą grupę siostrzaną w stosunku do pozostałych wątrobowców, wśród których pierwszy rozłam we wspólnej ewolucji rozdzielił linie złożonych plechowatych wątrobowców (klasa *Marchantiopsida*) od prostych plechowatych i liściastych wątrobowców (klasa *Jungermanniopsida*). Podklasy *Pelliidae* i *Metzgeriidae* uważane są obecnie za grupy parafiletyczne. *Pellidae* to formy plechowate, czasem liściaste z przebiegającym centralnie żeberkiem zawierającym martwe komórki przewodzące wodę. Z kolei podklasa *Metzgeriidae* nie wykazuje zróżnicowania wewnętrznych komórek plechy. W jej skład wchodzi proste plechowate gatunki tworzące siostrzaną grupę do liściastych wątrobowców z rodzaju *Pleurozia*, należących do podklasy *Jungermanniidae*. Pozostałe wątrobowce podklasy *Jungermanniidae* dzielą się na dwa rzędy: *Porellales* (liściaste I) oraz *Jungermanniales* (liściaste II) (Vanderpoorten i Goffinet 2009).

1.3. Rozwój badań molekularnych i genetycznych nad wybranymi przedstawicielami mszaków

W pierwszych kilku dekadach XX w, naukowcy zajmujący się badaniami genetycznymi nad przedstawicielami mszaków – mchach i wątrobowcach – byli na pierwszym planie ówczesnej genetyki roślin. Po raz pierwszy u roślin chromosomy płci opisano u przedstawiciela wątrobowców, *Sphaerocarpus texanus*. Zidentyfikowano chromosomy typu X u żeńskich osobników oraz Y u męskich. Te dwa chromosomy znacznie

różnią się od siebie wielkością – z zarodników posiadających duży chromosom X rozwijały się gametofity żeńskie, natomiast z zarodników z małym chromosomem Y gametofity męskie (Allen 1917). Heitz (1928) przeprowadził pierwsze badania chromosomów podczas mitotycznego podziału komórkowego u wątrobowców, a Knapp (1936) zaadaptował mutagenезę z zastosowaniem promieni Roentgena w badaniach genetycznych. Jednak pod względem badań molekularnych, mszaki przez długi czas stanowiły marginalny obiekt badań. Szczególnym wyjątkiem był wątrobowiec *Marchantia polymorpha*, który już w 1943r. został poddany analizom genetycznym z zastosowaniem licznych mutacji i krzyżówek w eksperymentach Burgeff'a (1943). Niejednokrotnie zwracano uwagę na ogromny potencjał mszaków w dziedzinie badań genetycznych i molekularnych ze względu na ich haploidalną dominującą formę życiową. Szczególnie podkreślano potencjalną wagę splątka mchów w badaniach nad genetyką procesów różnicowania gametofitu. Tego rodzaju doświadczenia rozpoczęto tworząc kolekcję mutantów mchów *Physcomitrium piriforme*, *Funaria hygrometrica* i *Physcomitrella patens* (Barthelmes 1940, Oehlkers i Bopp 1957, Engel 1968), a ich zwieńczeniem było opracowanie przebiegu różnicowania komórkowego u *Funaria* i *Physcomitrella* na poziomie fizjologicznym i genetycznym (Bopp 1990, Cove 1992, Cove i Knight 1993). Te klasyczne genetyczne badania doprowadziły do wniosku, że dogłębna analiza genomu mchu *Physcomitrella* może wnieść ogromny wkład do zrozumienia ewolucji roślinnych procesów rozwojowych.

1.3.1. *Physcomitrella patens*

Physcomitrella patens łączy w sobie kilka charakterystycznych cech, które sprawiają, iż organizm ten jest konkurencyjnym modelem badawczym w stosunku do innych modeli roślinnych. Prosta budowa morfologiczna, dominująca haploidalna forma cyklu życiowego oraz fotoautotroficzny charakter tego mchu umożliwiły opracowanie stabilnych warunków hodowli *in vitro* na nieorganicznych pożywkach, bez dodatku jakichkolwiek fitohormonów, witamin, czy innych suplementów. Hodowla *in vitro* *Physcomitrella* obejmuje przede wszystkim rośliny w młodocianym stadium rozwojowym gametofitu – stadium splątka oraz stadium dojrzałym, produkującym organy rozmnażania płciowego – stadium gametoforów. Hodowle te można prowadzić zarówno na pożywkach stałych jak i w płynnych. Należy zwrócić uwagę, że płynne kultury mchu różnią się zasadniczo od kultur zawieszinowych roślin nasiennych, które głównie złożone są z komórek kallusa lub nieodróżnicowanych morfologicznie agregatów komórkowych. W przypadku kultur zawieszinowych mchu, hodowla taka składa się z komórek charakterystycznych dla określonego etapu rozwoju i najczęściej utrzymywana jest w stadium filamentów splątka (Frank i in. 2005).

Rozwój wegetatywny mchu po wykiełkowaniu zarodnika charakteryzuje się w pierwszym etapie wytworzeniem splątka w postaci chloronemy (komórki z dużą liczbą chloroplastów o ścianach poprzecznych prostopadłych do osi filamentów). Następnie różnicuje się on w komórki kaulonemy (komórki o mniejszej liczbie i słabiej rozwiniętych chloroplastach, o ścianach poprzeczno-skośnych w stosunku do osi filamentów) pod wpływem auksyn i zwiększonej intensywności światła (Cove i Knight 1993). Kolejnym etapem jest formowanie pączków (na drugich, co do kolejności za komórką apikalną, komórkach kaulonemy), które stanowią początek rozwoju gametoforów. Etap ten wymaga działania cytokinin przez co najmniej 48 godzin dla prawidłowego różnicowania pączków. Działanie cytokinin, jako szczególnego rodzaju przełącznika, jest kluczowe, gdyż prowadzi do przekształcenia wzrastającego wierzchołkowo filamentu splątka w bardziej złożoną, trójwymiarową strukturę gametoforu. W celu poznania molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za ten proces przeprowadzono eksperyment subtraktywnej hybrydyzacji, w wyniku którego wyselekcjonowano sześć różnych transkryptów genów tzw. *BIP* (ang. Bud Induced in *Physcomitrella*) ulegających specyficznej ekspresji w kulturach splątka pod wpływem działania cytokinin. Geny *BIP4* i *BIP6* kodują białka bogate w reszty proliny, treoniny i tyrozyny, których sekwencje aminokwasowe najbardziej podobne są do sekwencji białek strukturalnych ściany komórkowej roślin wyższych (Brun i in. 2003). Białka bogate w hydroksyprolinę i prolinę (np. ekstensyny, białka Prp) oraz arabinogalaktany reprezentują najbardziej liczne białka ściany komórkowej. Uważa się, że formują one niezależną sieć wewnątrz macierzy ściany, która wzmacnia mechaniczną wytrzymałość i wspomaga właściwą organizację ściany (Casab 1998). Rozwój pączków gametoforów u *P.patens* związany z pojawianiem się trójwymiarowej architektury może wymagać wzmocnienia ściany komórkowej i zwiększonej ekspresji genów kodujących białka strukturalne ściany komórkowej. Z kolei gen *BIP3* koduje białko o największym podobieństwie do białka *Arabidopsis thaliana* Pdf1 (ang. protodermal factor 1), które jest specyficzne dla merystemu wierzchołkowego pędu. Kolejne dwa geny, *BIP1* i *BIP2*, wykazały podobieństwo do genów roślin naczyniowych zaangażowanych w rozmnażanie płciowe lub różne etapy różnicowania (odpowiednio *STIG1* oraz *PgEMB7*, *ZmRCP1* i 2) (Brun i in. 2003). *STIG1* ulega specyficznej ekspresji w strefie sekrecyjnej znamienia słupka u *Nicotiana tabacum* (Goldman i in. 1994). Ponieważ *P.patens* nie posiada komórek tego typu, można wysunąć wniosek, że geny *BIP1* i *STIG1* posiadają wspólnego przodka, charakterystycznego dla wyspecjalizowanych tkanek. Gen *BIP2* należy do rodziny białek konserwatywnych wśród roślin okrytonasiennych, nagonasiennych i mszaków, gdyż koduje on białko najbardziej podobne sekwencyjnie do

białka związanego z somatyczną embriogenezą u *Picea glauca* (PcEmb7), dwóch białek czapeczki korzenia *Zea mays* (ZmRcp) oraz ośmiu przewidywanych białek *A.thaliana* (Brun i in. 2003). Obserwacje te są zgodne ze spekulacjami grupy Nishiyamy, że geny, które funkcjonują w sporofitach roślin wyższych, zostały przejęte z genów, które funkcjonowały w gametofitach wspólnego przodka mchów i roślin kwiatowych (Nishiyama i in. 2003).

Jednak jedną z najciekawszych cech *P.patens* jest wysoki stopień rekombinacji homologicznej w jądrowym DNA, kilka rzędów wielkości wyższy, niż u jakiegokolwiek scharakteryzowanego do tej pory gatunku roślin. Cecha ta umożliwia manipulowanie genomem jądrowym poprzez nokaut pojedynczych genów lub ich wymianę na zmutowane kopie. W połączeniu z haploidalnym gametofitem pozwala to na łatwe i szybkie ustalenie funkcji wyłączonych/uszkodzonych genów w uzyskanych mutantach mchu, bez konieczności skomplikowanych krzyżowań wstecznych (Reski 1999). Eksperymenty przeprowadzone przez kilka grup badawczych zademonstrowały, że wyłączenie/uszkodzenie konkretnego genu drogą rekombinacji homologicznej u *Physcomitrella* koreluje z fenotypem mutantu, co w jasny sposób pozwala poznać biologiczną funkcję wyłączonego genu. Strepp i in. (1998) wyłączyli gen *FTZI*, który koduje pierwotną tubulinę zaangażowaną w podział chloroplastu. Fenotyp mutantu tego genu charakteryzuje się obecnością pojedynczego, dużego chloroplastu w komórce, zamiast ok. 50 chloroplastów obserwowanych w komórkach mchu typu dzikiego (Strepp i in. 1998). Z kolei Girod i in. (1998) wykazali, że nokaut genu *MCBI* (ang. multi-ubiquitin chain binding 1) kodującego białko 26S proteasomu prowadzi do zahamowania rozwoju *P.patens*. W mutancie *mcb1* dochodzi do wytworzenia anormalnych filamentów kaulonemy, a komórki nie są w stanie przejść z apikalnego wzoru wzrostu spletki do trójwymiarowego wzrostu dającego początek gametoforom.

Nokaut genów u *P.patens* przeprowadza się poprzez transformację protoplastów mchu konstruktem DNA niosącym sekwencję docelowego genu, którego struktura została zaburzona poprzez insercję kasety z markerem selekcyjnym. Najczęstszą metodą wykorzystywaną do transformacji protoplastów jest metoda chemiczna z zastosowaniem glikolu polietylenowego (Schaefer i in. 1991), jakkolwiek odpowiednią metodą jest również metoda biolistyczna (Sawahel i in. 1992). Największą wydajność izolacji protoplastów *P.patens* zaobserwowano z płynnych hodowli chloronemy, której komórki są najbardziej podatne na działanie enzymów trawiących ścianę komórkową (Hohe i Reski 2002). Szeroka gama markerów selekcyjnych może zostać wykorzystana do przygotowania konstruktyw dla nokautu genów u mchu. Należą do nich m. in. najczęściej wykorzystywany gen *NPTII* kodujący fosfotransferazę neomycyny, zapewniającą odporność na genetycynę, gen *APH*

kodujący fosfotransferazę amino glikozydów zapewniającą oporność na kanamycynę czy też gen *HPH* kodujący fosfotransferazę hygromycyny zapewniającą odporność na hygromycynę (Schaefer i in. 1991, Imaizumi i in. 2002, Kasahara i in. 2004). Aby doprowadzić do ekspresji kasety niosącej zaburzony gen *P.patens*, konstrukt ten oskrzydłony jest przez sekwencje promotora i terminatora genu 35S RNA wirusa mozaiki kalafiora (CaMV) lub syntazy nopaliny z *Agrobacterium tumefaciens*. Wykazano również przydatność kilku roślinnych promotorów dla ekspresji transgenów u *Physcomitrella*, w tym promotora aktyny1 z ryżu, genu ubikwityny z kukurydzy, czy też promotorów genów samego mchu, kodujących alfa-1,3-fukozyltransferazę, beta-1,3-ksylozyltransferazę czy genów beta-tubulin (Bezanilla i in. 2003, Horstmann i in. 2004, Jost i in. 2005). Dla utworzenia konstruktów wyłączających funkcję określonego genu, może zostać wykorzystany zarówno fragment cDNA lub sekwencji genomowej. Wydajność homologicznej rekombinacji może być w niektórych przypadkach wyższa z zastosowaniem konstruktów opartego na sekwencji genomowej, gdyż niekorzystne dla integracji konstruktów na bazie fragmentu cDNA mogą okazać się połączenia egzon-egzon (Frank i in. 2005). Tuż przed transformacją protoplastów mchu zaleca się linearyzację konstruktów DNA, gdyż transformacja kolistymi cząsteczkami plazmidów może doprowadzić do ich pozachromosomalnej replikacji i utworzenia niestabilnych transformantów (Ashton i in. 2000).

Niejednokrotnie proces integracji fragmentu DNA do genomu mchu za pomocą homologicznej rekombinacji wykorzystywany jest nie tylko dla uzyskania mutantów typu nokaut, ale również dla uzyskania mutantów zawierających badany gen w połączeniu z genem reporterowym. Quodt i in. (2007) wykorzystali oba rodzaje mutantów w badaniach ekspresji i funkcji jednego z sześciu genów *MADSbox*, *PPM2*. Gen *PPM2*, wspólnie z genami *PPM1* i *PpMADS1* *P.patens*, należy do rodziny MIKC^C genów MADS-box kodujących grupę czynników transkrypcyjnych, które u roślin okrytozalążkowych są odpowiedzialne za definiowanie tożsamości poszczególnych części kwiatów (Kaufmann i in. 2005). W przypadku *P.patens* transkrypty genu *PPM2* zaobserwowano w wielu tkankach gametoforu, jak i sporofitu. Również analizy mutantów posiadających gen fuzyjny *PPM2:GUS*, wykazały obecność białka Ppm2 we wszystkich badanych tkankach, jednak o wiele większa jego ilość kumulowała się w brzusznej części zarodni (zwłaszcza komórce jajowej i zygocie), w rozwijających się i dojrzałych plemnikach oraz stopie sporofitu. Niestety mutanty nokaut genu *PPM2* nie wykazały żadnego, oczywistego dla interpretacji jego funkcji, fenotypu. Niewykluczone, że pozostałe geny z rodziny *MADSbox* *P.patens* są w stanie uzupełnić braki funkcjonalne, wynikające z braku ekspresji genu *PPM2* (Quodt i in. 2007). Podobny schemat

ekspresji w tkankach gametoforu i sporofitu zaobserwowano również w przypadku genów *PPM1* i *PpMADS1*. Z wykorzystaniem mutantów RNAi dla genu *PPM1* podjęto próbę określenia pełnionej przez niego funkcji. Różne linie mutantów charakteryzowały się opóźnionym rozwojem gametangiów oraz zmniejszoną wydajnością tworzenia sporofitów. Dodatkowo niektóre z nich cechowały się opóźnioną inicjacją tworzenia sporofitów. Opóźniona inicjacja sporofitów może być następstwem wolniejszego rozwoju zygoty lub opóźnionego rozwoju gametangiów oraz gamet jednego, bądź obu rodzajów. Zaskakująco mutanty typu nokaut zarówno genu *PPM1* jak i *PpMADS1* nie zdołały wyjaśnić funkcji któregośkolwiek z tych genów, ze względu na brak efektów fenotypowych w otrzymanych liniach mutantów (Singer i in. 2007). Sytuację tę może tłumaczyć zdolność organizmu do adaptacji fizjologicznej w odpowiedzi na szeroki zakres stresów i ograniczeń poprzez kompensację utraty funkcji jednego genu przez inny. Częściowa lub całkowita funkcjonalna redundancja genów znana jest dla kilku grup blisko spokrewnionych genów *MADSbox* u *Arabidopsis* (Ferrandiz i in. 2000), dlatego niewykluczone iż zjawisko to ma również miejsce u *P.patens* (Singer i in. 2007).

Istotnym etapem prowadzenia badań w zakresie genomiki funkcjonalnej mchu było opracowanie bazy sekwencji EST z wykorzystaniem różnych bibliotek cDNA: splećki, gametoforu i sporofitu, które dodatkowo traktowano różnymi hormonami roślinnymi. Jako rezultat sekwencjonowania bibliotek ekspresyjnych uzyskano ponad 110 000 sekwencji cDNA, które prawie całkowicie reprezentują transkryptom *P.patens* (Rensing i in. 2002a+b). Dane te, w połączeniu z sekwencją genomową, pozwoliły na określenie liczby genów mchu na 35 938, z czego 98% ma swe pokrycie w bazie EST (Rensing i in. 2008). Zarówno dane na temat sekwencji genomowej, jak i transkryptomu *P.patens* dostępne są w publicznej bazie danych www.cosmoss.org (<http://www.cosmoss.org/>) (Rensing S.A. i in. 2005).

Ponad 11 000 genów z bazy EST *Physcomitrella* nie wykazało podobieństwa do znanych obecnie sekwencji białkowych. Dlatego organizm ten jest uważany za bogate źródło nieznanych dotąd genów roślinnych, z których wysoki procent może reprezentować geny o nowych, nieznanych dotąd funkcjach (Rensing i in. 2002a). Około 8% genów nie wykazuje homologii do odnotowanych genów roślinnych, lecz do genów bakteryjnych, grzybowych i zwierzęcych (Rensing i in. 2005). U roślin okrytozalążkowych zidentyfikowano cztery klasy wewnątrzkomórkowych białek, które wyewoluowały z typu I bakteryjnego transportera glicerolu. *P.patens* posiada dodatkową, piątą klasę białek GIpF-like, których sekwencja jest najbardziej podobna do sekwencji kodujących bakteryjne transportery glicerolu typu II (Gustavsson i in. 2005).

Uzyskanie reprezentatywnej bazy EST, wspólnie z poznaną sekwencją genomową *P.patens* umożliwia przeprowadzenie szeregu analiz z zakresu genomiki porównawczej pomiędzy różnymi grupami roślin lądowych. Lądowe warunki życiowe pociągają za sobą zmiany w gospodarce wodnej, temperatury oraz zwiększoną ekspozycję na promieniowanie UV. Adaptacje pierwszych roślin lądowych do nowego środowiska spowodowały drastyczne zmiany planu ciała oraz modyfikacje procesów komórkowych, fizjologicznych i ścieżek regulatorowych. Najważniejsze zmiany dotyczyły: ulepszenia procesów osmoregulacji i osmoochrony, tolerancji na wysuszenie, niską i wysoką temperaturę, syntezę i akumulację ochronnych substancji przed promieniowaniem UV oraz ulepszenia mechanizmów naprawy uszkodzeń DNA. Szereg genów odpowiedzialnych za powyższe innowacje znajduje się w genomie *P.patens* (Rensing i in. 2008). *P.patens* zajmuje więc istotną pozycję w ewolucyjnym drzewie organizmów roślinnych. Porównanie genomów zielenic, mchu i roślin naczyniowych pozwala na rekonstrukcję ewolucyjnych zmian w obrębie genomów, które towarzyszyły podbojowi środowiska lądowego.

1.3.2. *Marchantia polymorpha*

Marchantia polymorpha – porostnica wielokształtna jest przedstawicielem najliczniejszego rzędu złożonych plechowych wątrobowców, *Marchantiales*, w którego skład wchodzi 28 rodzajów (He-Nygren i in. 2006). Uważa się, że rodzaj *Marchantia* osiągnął w trakcie ewolucji najwyższe zorganizowanie budowy plechy i organów rozrodczych wśród wątrobowców. Plecha *M.polymorpha* posiada wyróżnioną tkankę okrywającą, asymilacyjną, spichrzową i przewietrzającą. Na górnej powierzchni plechy występują aparaty szparkowe, zbudowane z 16 komórek, lecz w przeciwieństwie do aparatów szparkowych roślin wyższych są one niezdolne do otwierania i zamykania się w odpowiedzi na warunki wilgotności. *M.polymorpha* jest rośliną rozdzielnopłciową. Osobniki męskie wytwarzają plemniki, które są umiejscowione na górnej stronie tarczowatych płatów anteridioforów, na szczycie trzonków. Gametofity żeńskie z kolei posiadają parasolowate archegoniofory z rodniami po spodniej stronie (Szweykowscy 2003, Vanderpoorten i Goffinet 2009). Płeć porostnicy determinowana jest przez cytologicznie i genetycznie różne chromosomy: X w przypadku osobników żeńskich, Y w przypadku osobników męskich. Chromosomy te są znacznie mniejsze od ośmiu autosomów, dodatkowo chromosom Y jest mniejszy od chromosomu X (Nakayama i in. 2001). W odróżnieniu od roślin kwiatowych, chromosomy X i Y *M.polymorpha* są oddzielone od siebie przez większość cyklu życiowego, dlatego też system ten okazał się niezwykle interesujący w badaniach dotyczących determinacji płci roślin lądowych. W 2000r. grupa Okady opublikowała badania, które dotyczyły utworzenia bibliotek genomowych PAC (ang.

P1-derived artificial chromosome vectors) z osobników żeńskich i męskich *M.polymorpha*. Oba rodzaje bibliotek zawierały ok. 22 000 klonów z insertami fragmentów DNA genomowego >50kbp, co wystarcza na siedmiokrotne pokrycie genomu porostnicy (Okada i in. 2000) oszacowanego na 280Mbp (Akiyama i in. dane niepublikowane). W wyniku różnicowej hybrydyzacji klonów „biblioteki męskiej i żeńskiej” uzyskano 70 klonów specyficznych dla DNA genomowego plech męskich, z których pMM4G7 został poddany bardziej szczegółowym analizom metodami Southern i PCR. Badania te jednoznacznie potwierdziły jego obecność wyłącznie w genomie osobników męskich. Ponadto eksperyment FISH wykazał obecność sygnału sekwencji badanego klonu wyłącznie w obrębie chromosomu Y *M.polymorpha* (Okada i in. 2000). Kolejnym podejściem wykorzystanym do izolacji fragmentów DNA żeńsko- i męsko specyficznych były badania przeprowadzone przez Fujisawę i in. (2001) z zastosowaniem techniki RDA (ang. Representational Difference Analysis). W wyniku analiz RDA wykryto 7 fragmentów specyficznych dla DNA genomowego plech męskich oraz 6 specyficznych dla DNA genomowego plech żeńskich *M.polymorpha* (Fujisawa i in. 2001). Co więcej w obrębie chromosomu X zidentyfikowano grupę genów 17S rDNA, które zawierają wariant genu 17S rRNA niespotykany w męskim DNA oraz różniący się od sekwencji tych genów w autosomach (Nakayama i in. 2001). Sone i in. (1999) w hybrydyzacji typu Southern pokazali, że sekwencja genu 5S rDNA kolokalizuje w obrębie powtarzalnej jednostki 45S rDNA. Kolejne analizy przeprowadzone z użyciem enzymów restrykcyjnych wykazały również obecność genu 5S rDNA w obrębie jednostki 45S rDNA występującej w chromosomie X. W wyniku sekwencjonowania badanych fragmentów stwierdzono, że sekwencje IGS1 (ang. Intergenic Spacers), między genami 26S i 5S rDNA i IGS2, między genami 5S i 17S rDNA, różnią się znacznie między autosomami a chromosomem X (Fujisawa i in. 2003). Co ciekawe kopia genu 5S rDNA została zidentyfikowana w obrębie fragmentu rbf62 – fragmentu DNA uzyskanego w doświadczeniu RDA przez Fujisawę i in. i pochodzącego z chromosomu X (2001). Z kolei sekwencjonowanie klonów biblioteki genomowej PAC plech męskich umożliwiło poznanie pełnej sekwencji chromosomu Y *M.polymorpha*. Zawiera on na jednym ze swych dwóch segmentów YR1 (ang. Y chromosome region 1) rodzinę specyficznych powtórzeń, które są reprezentowane przez tzw. powtórzenie BamHI długości 2.4-kbp. Zidentyfikowano również obecność 64 genów, z czego 14 (1 w obrębie rejonu YR1 oraz 13 w obrębie rejonu YR2) wydaje się być specyficznych dla męskiego genomu i w dodatku wykazuje ekspresję tylko w męskich organach rozmnażania płciowego. Co ciekawe, większość tych genów nie wykazała znacznego podobieństwa do znanych już genów innych organizmów roślinnych. Za to 6 z

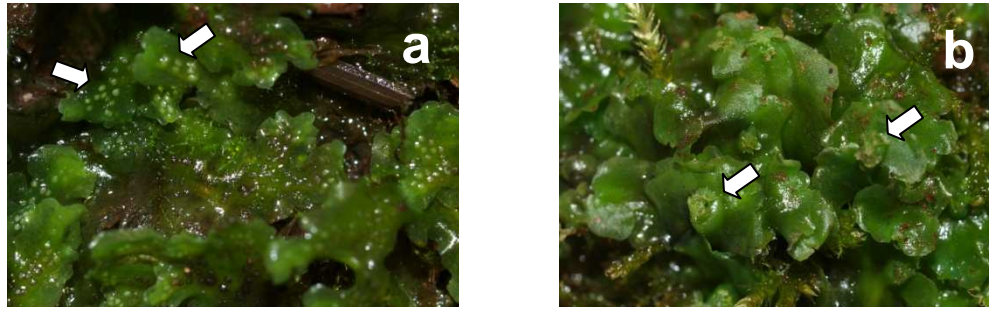
nich koduje białka, których homologi występują u zwierząt, lecz nie u roślin kwiatowych. Ponieważ gamety męskie u mszaków posiadają wici, niewykluczone jest, iż w proces spermatogenezy zarówno u *M.polymorpha* jak i u zwierząt zaangażowane są białka o wspólnym dla nich pochodzeniu ewolucyjnym (Katsuyuki i in.2006).

Ponieważ dominującym stadium cyklu życiowego *M.polymorpha* jest haploidalny gametofit, to podobnie jak u *P.patens*, o wiele łatwiej można selekcjonować mutanty o zaburzonej budowie konkretnego genu niż w przypadku roślin wyższych. Dlatego *Marchantia* posiada ogromny potencjał jako ewolucyjnie atrakcyjna roślina modelowa do szczegółowych badań procesów rozwojowych na poziomie komórkowym, jak i molekularnym. Techniki transformacji roślin stanowią jeden z ważnych nurtów badań *M.polymorpha* jako zasadnicze narzędzie genomiki funkcjonalnej. Obecnie młode fragmenty plech z hodowli gemmów (rozmnożek) mogą być bezpośrednio transformowane za pomocą bombardowania plech mikrokuleczkami opłaszczonymi DNA (Tekanaka i in. 2000). Wykorzystanie młodych, kiełkujących z zarodników gametofitów zdecydowanie polepsza wydajność tego rodzaju transformacji, a także przyspiesza z 8 do 4 tygodni proces regeneracji transformantów (Chiyoda i in. 2008). Jednak wprowadzanie transgenów metodami fizycznymi często generuje dużą liczbę insercji i wysoce złożone rearanżacje w obrębie transgenów (Kohli i in. 2003), stanowiąc przeszkodę do dalszych badań genetycznych. Dlatego Ishizaki i współpracownicy podjęli próbę transformacji plech *Marchantia* z wykorzystaniem *Agrobacterium*. Mimo nieudanych prób transformacji tą metodą przeprowadzonych uprzednio na niektórych gatunkach paproci, mchów i glonów, w przypadku *M.polymorpha* metoda ta okazała się skuteczna przy wykorzystaniu młodych, kiełkujących z zarodników gametofitów. System ten, oparty na powszechnie stosowanym szczepie *Agrobacterium* oraz wektorze binarnym, zapewnia stabilną integrację oraz ekspresję transgenów w mutantach porostnicy (Ishizaki i in. 2008).

Łatwość hodowli *M.polymorpha*, przynależność do jednej z pierwszych grup roślin zasiedlających środowisko lądowe oraz szeroki zakres technik pomyślnie zaadoptowanych do badań fizjologicznych, genetycznych i molekularnych, zadecydowały o podjęciu projektu sekwencjonowania genomu *Marchantia* (The Joint Genome Institute DOE-JGI: <http://www.jgi.doe.gov/sequencing/why/CSP2008/mpolymorpha.html>). Możliwość porównania genomów wątrobowca, mchu, widliczki (*Selaginella moellendorffii*) oraz kilku roślin kwiatowych może dostarczyć wielu przełomowych informacji na temat podobieństw i różnic dotyczących genów zaangażowanych w procesy rozwojowe, strukturę i fizjologię w poszczególnych grupach ewolucyjnych roślin.

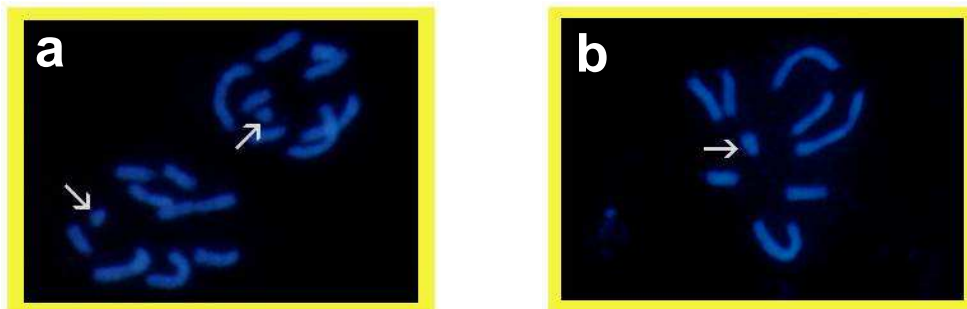
1.3.3. Wątrobowiec *Pellia endiviifolia* sp B jako obiekt badań cytologicznych i molekularnych

Pellia endiviifolia sp B – pleszanka kędzierzawa, jest rozdzielнопłciowym przedstawicielem najbardziej podstawowej linii prostych, plechowych wątrobowców podklasy *Pelliidae*, klasy *Jungermanniopsida* stanowiącej ponad 80% obecnie żyjących wątrobowców (He-Nygren i in. 2006, Szweykowscy 2003). Morfologicznie rodzaj *Pellia* wykazuje szereg cech plezjomorficznych, takich jak klinowata komórka apikalna, niezróżnicowane komórki wewnętrznej części plechy, brak komórek przewodzących, gametangia umieszczone na grzbietowej stronie plechy, kulista zarodnia i masywna seta (He-Nygren i in. 2006). Gametofit *P. endiviifolia* sp B to wydłużone i płózące się plechy, stosunkowo cienkie, szarozielone do brązowawych. Osobniki żeńskie są nieco większe od męskich (Schuster 1992, Paton 1999). W naturze *P. endiviifolia* sp B żyje w symbiozie z grzybami mikoryzowymi, które znajdują się w starszych częściach plechy (Ligrone i in. 2007). Charakterystyczną cechą przedstawicieli rodzaju *Pellia* jest zdolność *P. endiviifolia* sp B do wegetatywnego rozmnażania się poprzez małe, dychotomiczne i pozbawione chwytników odgałęzienia (zwane rozmnożkami czy też gemmami), powstającymi jesienią i wczesną wiosną na szczycie macierzystych plech, zarówno żeńskich jak i męskich (Schuster 1992, Paton 1999). Rozgałęzienia te nie powstają w czasie wytwarzania sporofitów. Organy rozmnażania generatywnego umieszczone są na oddzielnych roślinach, które bardzo często rosną w oddzielnych darniach. Gametangia zlokalizowane są na grzbietowej stronie plechy, podobnie też jak u wszystkich wątrobowców, powstają egzogenicznie z zewnętrznej części komórki początkowej. Plemniki rozmieszczone są w 1 – 2 nieregularnych rzędach wzdłuż żeberka i są widoczne gołym okiem jako wyraźne guzki na powierzchni rośliny (Schuster 1992). Cechą charakterystyczną rodzaju *Pellia* jest wtórne zapadnięcie plemni do małych komór pod warstwą powierzchniowych komórek plechy (He-Nygren i in. 2006). Rodnie rozwijają się nieco poniżej szczytu plechy, osłonięte są rurkowatą, wzniesioną do góry osłonką (perychecium), powstającą w tym samym czasie co rodnie. W jednym perychecium znajduje się około 10 – 12 rodni, z których po zapłodnieniu jedna daje początek sporofitowi, a pozostałe degenerują (Schuster 1992). Gametofity *P. endiviifolia* sp B przedstawione zostały na zdjęciach 1-1a i b.



Zdjęcie 1-1. Gametofity męskie (a) i żeńskie (b) wątrobowca *Pellia endiviifolia* sp B. Strzałki wskazują plemniki (a) oraz perychecia (b) z ukrytymi wewnątrz rodniami. Zdjęcia makroskopowe, Konica Minolta Dynax5D.

Badania cytologiczne wykazały, że liczba chromosomów w plechach męskich wynosi $n=8+m$, a w plechach żeńskich $n=9$. Z danych literaturowych wiadomo, że 9-ty chromosom gametofitu męskiego zidentyfikowano i opisano jako mniejszy od żeńskiego chromosomu 9-go, zarówno na podstawie idiogramów chromosomów uzyskanych z materiału europejskiego, jak i japońskiego (Newton 1981). Doniesienia te wspierają również obserwacje zdjęć chromosomów *P.endiviifolia* sp B wybarwionych barwnikiem DAPI (zdj. 1-2) uchwycionych w stadium metafazy. Strzałkami zaznaczono 9-te chromosomy z gametofitów męskich (zdj. 1-2a) i żeńskich (zdj. 1-2b), między którymi widać wyraźne różnice w długości.



Zdjęcie 1-2. Chromosomy *Pellia endiviifolia* sp B z gametofitu męskiego (a) oraz żeńskiego (b) wybarwione DAPI. Preparaty wykonano z wyizolowanych plemni osobnika męskiego i szczytowych części plechy osobnika żeńskiego. Zdjęcia spod mikroskopu epifluorescencyjno-świetlnego Provis AX 70 OLYMPUS – aut. dr Aleksandra Rojek we współpracy z dr Mają Orzechowską i prof. dr hab. Jolantą Małuszyńską z Katedry Anatomii i Cytologii Roślin UŚ w Katowicach, powiększenie 100x).

Znane są gatunki wątrobowców, u których obserwuje się chromosomy różniące się między sobą w znacznym stopniu długością. Małe chromosomy, odbiegające długością od pozostałych, zostały zidentyfikowane po raz pierwszy u wątrobowców przez Heitza w 1927 roku (Newton 1979) i nazwane mini- lub m-chromosomami. Mimo wielu kontrowersji wokół definicji m-chromosomów (będących podobnymi do dodatkowych chromosomów B) w 1978 roku Smith zaproponował aby określać je jako m-chromosomy, czyli najmniejsze elementy kariotypu. M-chromosomy w większości przypadków zawierają w znacznej ilości heterochromatynę, a ich liczba jest zazwyczaj stała dla gatunku (Kuta i Przywara 1985). Natomiast podobne chromosomy dodatkowe B, nie zawsze zawierają heterochromatynę, a ich

liczba może być zmienna w obrębie gatunku, populacji, czy nawet w różnych komórkach danego osobnika (Małuszyńska 1994).

Badania filogenetyczne przeprowadzone przez He-Nygrena i współpracowników (2006) nie tylko dokonały zasadniczej reorganizacji w klasyfikacji systematycznej gromady *Marchantiophyta*, ale sugerują również, że „prototypem” dla rozwoju obecnie żyjących wątrobowców były osobniki o prostej, plechowatej budowie gametofitu. Najstarsze skamieniałości przedstawiające fragmenty roślin posiadających zarodniki pochodzą z ordowiku, ok. 450 milionów lat temu i wykazują podobieństwo do prostych plechowatych form wątrobowców (Wellman i in. 2003). Mimo iż znane paleozoiczne i mezozoiczne szczątki wątrobowców są skąpe i fragmentaryczne, dostarczają znaczących wskazówek co do wzoru ewolucji gromady *Marchantiophyta* i wspierają hipotezę o grzbietobrzusnie płożącym, prostym plechowatym przodku wszystkich wątrobowców (He-Nygren i in. 2006). W świetle tej teorii można przypuszczać, że *P.endiviifolia* sp B może reprezentować jeden z najstarszych, obecnie żyjących modeli roślinnych. W porównaniu do roślin nasiennych, rozdzielnościowość u wątrobowców jest zjawiskiem o wiele bardziej powszechnym: ok. 2/3 gatunków wątrobowców to rośliny rozdzielnościowe (Bell i Hemsley 2000). Schuster zasugerował, że obupłciowość jest cechą nabytą w tej grupie roślin (1966). Z tego też względu rozdzielnościowe gatunki (w tym *P.endiviifolia* sp B) można postrzegać jako ewolucyjnie starsze w porównaniu do gatunków wytwarzających na jednym osobniku organy rozmnażania generatywnego. *P.endiviifolia* sp B należy do klasy, w której znajduje się aż 80% wszystkich gatunków wątrobowców, a także ma potencjalnie bardzo stare, jeśli nie najstarsze pochodzenie ewolucyjne wśród roślin lądowych. Z tego względu jest ten gatunek, według mojego rozeznania, bardzo dobrym obiektem do badań molekularnych nad rozwojem i różnicowaniem wątrobowców. Mimo dość dobrze poznanego schematu podziałów i różnicowania wysoce wyspecjalizowanych komórek plemnikowych wątrobowców, proces ten nie jest w ogóle poznany pod kątem ekspresji genów. Dlatego postanowiłam, stosując odpowiednie techniki biologii molekularnej poznać geny ulegające specyficznej ekspresji w gametoficie męskim wytwarzającym plemnie wątrobowca *P.endiviifolia* sp B. Ponadto zdecydowałam się podjąć działania eksperymentalne mające na celu sprawdzenie, czy obrazy chromosomów uchwyconych w stadium metafazy z gametofitów *P.endiviifolia* sp B (zdj. 1-2) świadczą o rzeczywistych różnicach w składzie sekwencji genomowych, czy też są jedynie wynikiem odmiennej kondensacji 9-tych chromosomów.

2. CEL PRACY

Wiedza na temat molekularnych mechanizmów związanych z determinacją płci wątrobowców jest bardzo skromna, zwłaszcza wśród przedstawicieli klasy *Jungermanniopsida*, do której należy większość obecnie żyjących, w tym najprawdopodobniej najstarszych ewolucyjnie, wątrobowców. Dostępne są pewne informacje na temat determinacji płci u rozdzielnopłciowego wątrobowca *Marchantia polymorpha*, należącego do klasy *Marchantiopsida*. Jednak wybór *M.polymorpha* na modelową roślinę gromady wątrobowców jest dyskusyjny, gdyż *M.polymorpha* charakteryzuje się nietypową w stosunku do większości wątrobowców, wysoce skomplikowaną strukturalnie budową plechy, a ponadto należy do klasy reprezentującej jedynie ok. 15% gatunków wątrobowców. W niniejszej pracy doktorskiej za obiekt badań molekularnych obrano wątrobowca *Pellia endiviifolia* sp B, jednego z dwóch rozdzielnopłciowych przedstawicieli flory Polski z rodzaju *Pellia*, należącego do klasy *Jungermanniopsida*. Za główne cele wykonywanej pracy doktorskiej postawiono:

- I. identyfikację fragmentów DNA specyficznych dla genomu gametofitu męskiego oraz specyficznych dla genomu gametofitu żeńskiego u *P.endiviifolia* sp B przy zastosowaniu techniki RDA (ang. Representational Difference Analysis – różnicowa analiza genomowa),
- II. identyfikację genów, których ekspresja związana jest z pojawianiem się organów rozmnażania generatywnego wytwarzanych przez gametofity męskie *P.endiviifolia* sp B przy zastosowaniu techniki RDA-cDNA (ang. Representational Difference Analysis of cDNA – różnicowa analiza cDNA).

3. MATERIAŁY

3.1. *Materiał roślinny*

Pellia endiviifolia (sub)species B – numer zielnikowy 40228

3.2. *Wykorzystane szczepy bakterii E.coli*

DH5 α supE44 Δ lac169 (Φ 80lacZ Δ M15)hsdR17 recA endA1 gyrA96 thi-1 recA1

stosowany do selekcji transformantów i namnażania wektorów plazmidowych.

3.3. *Wektory stosowane w pracy*

3.3.1. **Plazmid pGEM $\text{\textcircled{R}}$ -T Easy**

W celu klonowania produktów reakcji PCR wykorzystano plazmid pGEM $\text{\textcircled{R}}$ -T Easy firmy Promega. Plazmid ten ma długość 3018 pz; występuje w formie liniowej, na swoich końcach posiada wystające, jednonukleotydowe (nukleotyd T) końce 3'. Zapobiegają one samoistnemu zamknięciu się wektora oraz ułatwiają ligację produktów reakcji PCR. Większość polimeraz DNA daje produkty z wystającymi jednonukleotydowymi końcami (nukleotyd A na końcach 3').

3.4. *Enzymy*

3.4.1. **Enzymy wykorzystane w eksperymentach RDA i RDA-cDNA**

BamHI	[10U/ μ l]	Fermentas	nukleaza Mung Bean	[5U/ μ l]	New England Biolabs
DpnII	[10U/ μ l]	New England Biolabs	T4 DNA ligaza	[400U/ μ l]	New England Biolabs
HindIII	[10U/ μ l]	Fermentas	polimeraza DNA <i>Taq</i>	[10U/ μ l]	Fermentas

3.4.2. **Enzymy wykorzystane do oczyszczenia preparatu RNA z zanieczyszczeń genomowym DNA oraz w reakcji odwrotnej transkrypcji**

RQ1 DNaza	[1U/ μ l]	Promega	odwrotna transkryptaza SuperScript TM III	[200U/ μ l]	Invitrogen
-----------	---------------	---------	-------------------------------------------------------------------------	-----------------	------------

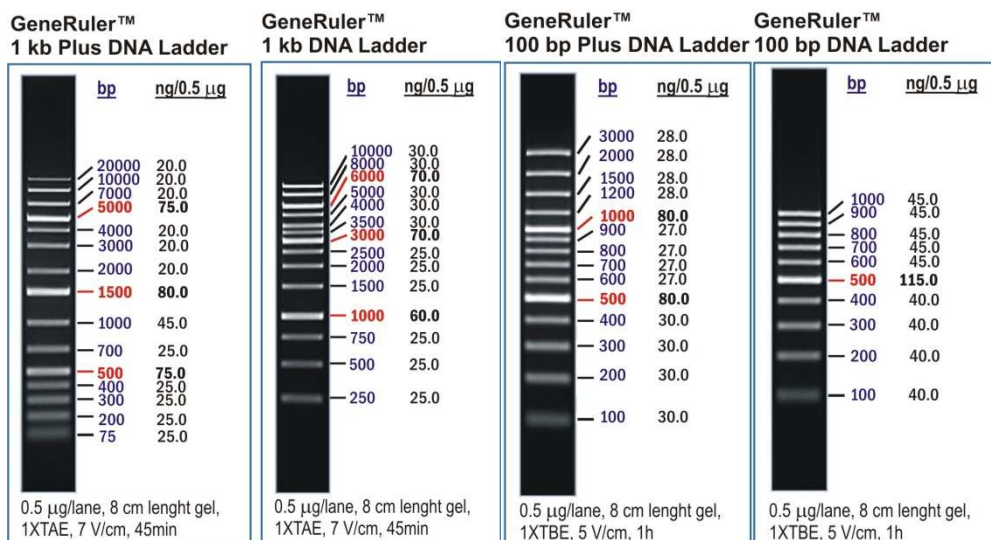
3.4.3. **Enzymy wykorzystane w reakcjach 5' i 3' RACE oraz „spacer po genomie”**

50x mix polimeraz Advantage $\text{\textsuperscript{\textcircled{R}}}$ 2		Clontech	polimeraza DyNAzyme TM EXT DNA	[1 U/ μ l]	Finnzymes
--------------------------------------------------------------------------	--	----------	--------------------------------------------------------------	----------------	-----------

3.4.4. **Enzym wykorzystany w reakcji ligacji produktów reakcji PCR do wektora**

T4 DNA ligaza	[5U/ μ l]	Fermentas			
---------------	---------------	-----------	--	--	--

3.5. Markery molekularne DNA



Schemat 3-1. „Drabinki” markerów molekularnych DNA wykorzystanych w trakcie elektroforezy kwasów nukleinowych w żelach agarozowych (źródło: <http://www.fermentas.com/en/products/all/dna-electrophoresis>)

Markery molekularne DNA firmy Fermentas zaprojektowano dla określenia długości oraz ilości szerokiego zakresu fragmentów dwuniciowych DNA poddawanych elektroforezie w żelach agarozowych.

3.6. Oligonukleotydy użyte w reakcjach PCR

Nazwa	Sekwencja	* T _m [°C]
Sekwencje oligonukleotydów wykorzystanych w różnicowej hybrydyzacji genomowej		
R-Bam-24	5'- AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGAG -3'	73.2
R-Bam-12	5'- GATCCTCGGTGA -3'	43.67
J-Bam-24	5'- ACCGACGTCGACTATCCATGAACG -3'	71.97
J-Bam-12	5'- GATCCGTTTCATG -3	40.35
N-Bam-24	5'- AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAG -3'	72.26
N-Bam-12	5'- GATCCTCCCTCG -3	46.11
R-Hind-24	5'- AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCA -3'	76.27
R-Hind-12	5'- AGCTTGCGGTGA -3'	49.7
J-Hind-24	5'- ACCGACGTCGACTATCCATGAACA -3'	70.68
J-Hind-12	5'- AGCTTGTTTCATG -3'	36.27
N-Hind-24	5'- AGGCAGCTGTGGTATCGAGGGAGA -3'	72.95
N-Hind-12	5'- AGCTTCTCCCTC -3'	40.86
Sekwencje oligonukleotydów wykorzystanych w różnicowej hybrydyzacji cDNA		
R-Dpn-24	5'- AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCA -3'	76.27
R-Dpn-12	5'- GATCTGCGGTGA -3'	45.47
J-Dpn-24	5'- ACCGACGTCGACTATCCATGAACA -3'	70.68
J-Dpn-12	5'- GATCTGTTTCATG -3'	30.52
N-Dpn-24	5'- AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAA -3'	72.5
N-Dpn-12	5'- GATCTTCCCTCG -3'	42.43
Sekwencje oligonukleotydów wykorzystanych w reakcji PCR na aktyne		
JNAKT1	5'- AT(TCA)TA(TC)GA(AG)GG(TCAG)TA(TC)GC -3' stopień zdegenerowania 96	43
JNAKT2	5'- TC(AGTC)AC(AG)TC(AG)CA(TC)TTCAT-3' stopień zdegenerowania 32	43

MATERIAŁY

RTAKTF	5'-CCGATGCCTTAATGAAGATCC-3'	64.74
RTAKTR	5'-CCCCAATGGTAATGACTTGAC-3'	63.33
Sekwencje oligonukleotydów wykorzystanych do badania specyficzności produktów różnicowej hybrydyzacji genomowej		
gFmB1	5'- ACATTTACGACTTGTGGTCAG -3'	59.66
gRmB1	5'- CCAGATCCGCCTGTATAAAG -3'	61.5
gFmB2	5'- CAAGACAAACCGTCAAGTCC -3'	62.64
gRmB2	5'- CTTGCCGTTCCAGCCGCCCTT -3'	76.86
gFmB3	5'- ACAGGCAGTCAAGGTTAGCAC -3'	63.63
gRmB3	5'- GTCCAGGCGAGAACGGTATC -3'	67.11
gFmB4	5'- TCCACTACATTACGACGAACC -3'	61.86
gRmB4	5'- GTACGGCGGCATTGCTGAAG -3'	70.13
gFmB5	5'- TACGGACATTATTCAAGCGAG -3'	62.02
gRmB5	5'- CTAGGAGTAGTCAACCTCAC -3'	53.43
gFzB6	5'- CAAGTATAGATGTCTCAATC -3'	48.96
gRzB6	5'- TCCCATAGTGACCAACAGTG -3'	61.59
gFzB7	5'- GAGGTAAGAGTCCAGAGTG -3'	58.44
gRzB7	5'- TCTCCTTTGTGCTGTTTTGTC -3'	62.32
gFzB8	5'- CAAGATTCCACAACAACATCC -3'	62.28
gRzB8	5'- GCCGTAATGGTTAGTTCGGAC -3'	64.65
Z 363 pz F	5'- GGCTTGATAACGTAATGAATG -3'	59.09
Z 363 pz	5'- TCCAAAGGAAGGTATTGCCAG -3'	65.25
Z_474 F	5'- TGCCAAGTGGTGGTTTGCCAA -3'	72.90
Z_474	5'- GATCCAAATGAGTGTCTTAC -3'	55.76
Z_333 F	5'- GATTTTGACAAGTGTGCCAA -3'	62.92
Z_333	5'- GATCCACTCTTCCCTCTCTTAT -3'	59.71
Fm_I	5'- TTGTCATGGCGTGGCTGAATG -3'	71.66
Rm_I	5'- CTGAGCATCGGCAGGTATTAC -3'	63.83
Fm_II	5'- AAGCCGATGGGAGCAGCAGAA -3'	72.45
Rm_II	5'- CAGATTCTCATCCAGCCAATG -3'	64.90
Fm_V	5'- GAAGTAGACAAGCCTCCGAAC -3'	62.21
Fm_V	5'- AGCACTCTCCAGCCTCTCACC -3'	67.50
Fm_XI	5'- TGGTTGGATAAATTGGGACTG -3'	63.77
Rm_XI	5'- GTGCTGAACACTGCCATATAC -3'	60.18
Fm_XVII	5'- GATGAACGTGACCTTGCTTC -3'	66.15
Rm_XVII	5'- CGATGAACCCGTCTGCGGAAT -3'	72.46
gFmH1	5'- TATGGTGGCGTAAGGGTGGTG -3'	69.01
gRmH1	5'- CCAATGAAGTGAAGTGAAGAC -3'	59.32
gFmH2	5'- GGATGTGCTGCCAGAGTATG -3'	63.79
gRmH2	5'- TTCTGCTTCTCTTTGACGCC -3'	64.91
gFmH3	5'- GATTCCAGCAGATTCGTCTTG -3'	64.06
gRmH3	5'- ATGTGGCGGATAAGGTTGATG -3'	66.05
gFmH4	5'- ATCTCAAAGCGAAGGCGGGAC -3'	70.76
gRmH4	5'- TAGTGGCAATAGAGAGAGCGG -3'	63.7
gFmH5	5'- GGAGATGTAGTGTATTACCTG -3'	53.34
gRmH5	5'- TCTGCGTTGTGAGTTTAGGAC -3'	62.33
gFmH6	5'- CAGACCCTCATCAGATTATAG -3'	55.89
gRmH6	5'- GAGAGTGTTCGCTGCTTCAGA -3'	65.22
gFmH7	5'- AAGGCGTGTACCGTTCATTG -3'	65.13
gRmH7	5'- GCTTCCACATCCGAAAGGTTG -3'	68.01
gFzH8	5'- GGATAGAACCTCTCGGCAAAC -3'	64.1
gRzH8	5'- CGTGACTGGCGTAGAAGGAGT -3'	65.9

MATERIAŁY

gFzH9	5'- TGTCTTGGCGAGTTGATGTTG -3'	66.53
gRzH9	5'- CGAAACGGTATATGGTAAAGG -3'	60.23
gFzH10	5'- GCGTCCCATCTGTCTGTTCAAC -3'	69.31
gRzH10	5'- CTTAGGATAACTCCGAGAATG -3'	57.55
gFzH11	5'- GGAACTTCTATGCCGCCGTC -3'	68.16
gRzH11	5'- GATGCTCGTTCAAGAGGATGG -3'	66.26
gFzH12	5'- CAAGTGGTATGCGGTGGTGA -3'	67.33
gRzH12	5'- CCTCTTCCATTCATCATCTG -3'	60.18
gFzH13	5'- CCGATGCGTTCTTCCGACTTG -3'	71.16
gRzH13	5'- GACATTGATGAGGCAGAAATC -3'	61.56
gFzH14	5'- GCTTCGTTCAATCTATTCGGC -3'	64.98
gRzH14	5'- TCTTCGGCTTCCCATCTTGC -3'	68.92
gFzH15	5'- GCAGAAGTTATACCACGAGTA -3'	56.63
gRzH15	5'- GCTCCAGATGCGACCAATGAT -3'	68.77
gFzH16	5'- TTGAGGACTAATTGGGCAAC -3'	61.94
gRzH16	5'- GGTCACCATGTTGACACTTG -3'	62.1
gFzH17	5'- TGACTTCAGTTGGCAAGCGTG -3'	68.94
gRzH17	5'- TGGTTGGCACCTACAAGCGAC -3'	69.62
Sekwencja oligonukleotydu oligo(dT)₁₅ wykorzystanego w reakcji odwrotnej transkrypcji		
Oligo (dT) ₁₅	5'- TTTTTTTTTTTTTTTT -3'	42.96
Sekwencje oligonukleotydów wykorzystanych do badania specyficzności produktów różnicowej hybrydyzacji cDNA		
Frd1	5'- GTATGTAAGCACCCACCCTAACCTG -3'	69.79
Rrd1	5'- TGAGTGATTTGTGTTCTGGTTCTGCC -3'	71.12
Frd2	5'- TTGTGGAGGTCTGTGGAGTAGTGGT -3'	69.08
Rrd2	5'- TGATTGGGTCTAAGATGGGTGGCAG -3'	72.56
Frd3	5'- ACACCGCCTCGCCGAATTTCACTCC -3'	78.31
Rrd3	5'- GTCCTTGTCTGGCAGACTCCTTC -3'	73.78
Frd4	5'- GATCATACTGACTCCAACATTGTG -3'	62.59
Rrd4	5'- CACATTCGTAGATTCAAGAGCAGAC -3'	65.22
Frd5	5'- CGAGCCGTGTTTCTGGTAAGAGTAG -3'	67.96
Rrd5	5'- CTCTCCAAGTCCACCTTCCCCGC -3'	76.89
Frd6	5'- GCAAATCGGGGAGTGGACGAG -3'	72.2
Rrd6	5'- GCTCTCTTGGGACGCCTTTTG -3'	69.37
Frd7	5'- GGAGCAGATTGCTTGTCCAAG -3'	66.35
Rrd7	5'- TCATAGAACCAACCAACAGACC -3'	63.12
Frd8	5'- TCAACCCCTTCGTACTTGTCTGG -3'	68.39
Rrd8	5'- AGCCTTGAACCAAACTGACTCTC -3'	65.05
Frd10	5'- GACAAGTTCGGTGTGGTCTCGC -3'	72.55
Rrd10	5'- GAGCACTCGTCCAGGGTCTTG -3'	72.58
Frd11	5'- GAGCCCGTCAGTTCCGCAGAG -3'	72.79
Rrd11	5'- GCTGAAGCTGTACGAGGAGGA -3'	66.14
Frd12	5'- ATCATTGGAGGCAGTGGACG -3'	68.59
Rrd12	5'- CCTTCCCTTACACTTAGAAC -3'	60.02
Frd13	5'- GCAGTTTCCAAGCCAATGTATCC -3'	67.64
Rrd13	5'- ATCAGGGGCACAGGAGTCACG -3'	71.11
Frd14	5'- CGTATAGTCAGTAACAGCACTGCC -3'	64.02
Rrd14	5'- TTCCTGATAAAGTTGGACCCGAG -3'	67.29
Frd15	5'- GGCTGTACGAGTAACAGTTGTCC -3'	64.03
Rrd15	5'- TGAACACTTTGGTTTGGCACCGC -3'	73.82
Frd16	5'- TCACAACTGGCAGTATGGCG -3'	68.47

MATERIAŁY

Rrd16	5'- CGAATGGAAATGGCTGGCTA -3'	67.28
Sekwencje oligonukleotydów wykorzystanych w eksperymentach 5'RACE		
5N_1SP1	5'- CAGGTTAGGGTGGGGTGCTTACATAC -3'	69.79
5TUA2	5'- CATCGTCTCCAACACCACACTCGTG -3'	71.6
5N_TUA2	5'- CTTACAAGTCACAGGCGGCTTCTCT -3'	73.2
5N_2SP2	5'- CTGCCACCCATCTTAGACCCAATCA -3'	72.56
St1	5'- AATATCTTCATGGCTTCCGATTGGT -3'	68.2
Nst1	5'- GCCCACTCAATGACAAATCGTTACC -3'	70.0
5RAB1	5'- CCACATTCGTAGATTCAAGAGCAGACG -3'	71.2
5N_RAB1	5'- AGACTTGTCCCAACCAGCATCACCAC -3'	74.2
5RAB2	5'- GCCTGCTGTATCCCATATCTGAGCC -3'	71.3
5N_RAB2	5'- AGTCCCGTGTTCGCCTGTATGAATCG -3'	75.2
5HMG2	5'- GGGACGCCTTTTGTCTTCACTTTTCG -3'	75.0
5N_HMG	5'- CACTCCCCGATTTGCCTTTGGTTTC -3'	74.6
5HMG2g1	5'-TCTTTGCAAAAATACATGTAAGGCCCC-3'	70.52
5N_HMG2g1	5'-CCTTTCCTTTCCTTTTCGAAGAAGAGCG-3'	73.0
Sekwencje oligonukleotydów wykorzystanych w eksperymentach 3'RACE		
3N_1SP2	5'- GGCAGAACCAGAACACAAATCACT -3'	67.55
3N_2SP1	5'- ACCACTACTCCACAGACCTCCACAA -3'	69.08
3RAB2	5'- CATTGTGGTGATGCTGGTTGGGAACA -3'	75.95
3N_RAB2	5'- CGTCTGCTCTTGAATCTACGAATGTGG -3'	71.24
3HMG2	5'- CAAAGGCAAATCGGGGAGTGGACGAGG -3'	79.33
3N_HMG2	5'- CGAAAAGGAAAGGAAAGGAGGAGAAAC -3'	70.1
Sekwencje oligonukleotydów wykorzystanych w eksperymentach „spacer po genomie”		
GWg1_1Tua	5'- GTCTGTCATGTCCTTTAACCTATTGAG -3'	63.4
GWg1N_1Tua	5'- CAGGTTAGGGTGGGGTGCTTACATACAT -3'	71.43
g2_1Tua	5'- GGACTGGAAAATAGGCTACAGAGGGTAT -3'	69.66
g2N_1Tua	5'- TCAAGCAAACCTCAAACCTTACCAGCCCG -3'	74.4
3g1Tua	5' ACGGATAACTGCTCGTGATAGGCTTTCTC -3'	71.9
3Ng1Tua	5' GAAAGCATGAAATGAATCCGAGGATAGGG -3'	73.3
4g1Tua	5'- GCACCAACAAGAACCTAACACCTTAGGC -3'	69.84
4Ng1Tua	5'- CTTCAGGTTACGCAAATGCTAACTACGC -3'	70.45
5g1Tua	5'- TGCAGGACATTGCCAGTACTTATTTGC -3'	71.12
5Ng1Tua	5'- GGATTAGAAGGTGCGTAAACACACTCCAC -3'	71.37
GWd1_1Tua	5'- ACCCCACCCTAACCTGACTTCCTCAACT -3'	73.3
GWd1N_1Tua	5'- GGCAGAACCAGAACACAAATCACTCAT -3'	70.85
GWg2_4	5'- CACGGCTAATCCTCCAAATCCAATCAAGG -3'	75.4
GWg2N_4	5'- AAAACGTGGAGTGACTTAAATGTGCGCAGT -3'	71.4
g3_4Rab	5'- GTCAAATGTGTGCTCTGCGATGGTTAGA -3'	73.0
g3N_4Rab	5'- TAACCTAAACACTTGCCCTCATCCGAAGC -3'	71.7
Sekwencje oligonukleotydów wykorzystanych w reakcji sekwencjonowania produktów eksperymentów RACE i spacer po genomie		
sR3g1	5'- ATCCACGAACCTTCAGGTTACG -3'	63.24
sR_GW1_7CHL	5'- TCCTCTTGGTTCAGAACCAACGCTC -3'	72.54
2sF_GW1_7CHL	5'- TTAGTATAACTCGGACACTTC -3'	53.28
Sekwencje oligonukleotydów wykorzystanych w reakcji sekwencjonowania wektora pGEM®-T Easy		
M13F(-47)	5'- CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC -3'	76.79
M13R	5'- TCACACAGGAAACAGCTATGAC -3'	62.22

MATERIAŁY

M13pUCf	5'- CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG -3'	57.10
M13pUCr	5'- AGCGGATAACAATTTACACAGG -3'	53,0
Sekwencje oligonukleotydów wykorzystanych do amplifikacji pełnej długości cDNA i genów		
F_TUA	5'- ACTCGTGAGCGTCCTCGACA -3'	69.10
R_TUA	5'- GAGTATCTGACTCGTCACAGTGA -3'	64.86
F_RAB	5'- GTCGAATAGGCACGACAAAAC -3'	63.75
R_RAB	5'- ACTGCTTGAAGGAATGTAGATGG -3'	63.35
SPRupp61	5'- GATTGGATTTTCGATTGGGTCTACAT -3'	66.90
SPRlow2634L26	5'- ACAAAATTATTCATATCGCCAAGAAGC -3'	65.90
3HMG2_AMP	5'- GCCTCTTTCAATCTCTATGTGCCTC -3'	67.24
5HMG2_AMP	5'- GTTTTTCGACATTTTGGATTGATCTG -3'	66.46
5HMG2_AMPkr	5'- TTTCTACTACAAGTGAGCCTGCC -3'	67.44

* T_m – temperatura topnienia obliczona kalkulatorem, który wykorzystuje zmodyfikowaną analizę nearest-neighbor na podstawie metody opisaną przez Breslauer'a (Breslauer i in.1986).

3.6. Roztwory, bufony, odczynniki

3.6.1. Odczynniki wykorzystane w hodowli wątrobowców *in vitro*

Pożywka mineralna do wprowadzania wątrobowców do hodowli <i>in vitro</i>	Pożywka do pasażu wątrobowców 1/2 Gamborg
NH ₄ NO ₃ (Sigma) 0.12g	Gamborg (Sigma) 1.585g
KH ₂ PO ₄ (Sigma) 0.7g	sacharoza (Chempur) 20g
MgSO ₄ x7H ₂ O (Sigma) 0.25g	agar (Sigma) 8g
CaCl ₂ (Sigma) 0.02g	H ₂ O do 1000ml
FeCl ₃ (Sigma) 0.03g	
agar (Sigma) 10g	
sacharoza (Chempur) 10g	
H ₂ O do 1000ml	
pH pożywki doprowadzono do wartości 5.64; następnie dodano agar.	pH pożywki doprowadzono do wartości 5.64 – 6.0; następnie dodano agar.
Sterylizacja: 121°C, 20', 0.1MPa	Sterylizacja: 121°C, 20', 0.1MPa

3.6.2. Odczynniki stosowane w transformacji bakterii

Pożywka LB płynna	Pożywka LB stała z ampicyliną
Bacto Tryptone (Difco Laboratories) 10g	pożywka LB płynna 1000ml
Yeast extract (Difco Laboratories) 5g	agar (Difco Laboratories) 15g
NaCl (Chempur) 10g	
H ₂ O do 1000ml	
Składniki rozpuszczono w wodzie destylowanej.	Do płynnej pożywki LB dodano agar.
Sterylizacja: 121°C, 20', 0.1MPa	Sterylizacja: 121°C, 20', 0.1MPa
	Po ochłodzeniu dodano 1000µl wodnego roztworu ampicyliny [25mg/ml] (Polfa), po czym wylano pożywkę na sterylne szalki Petriego.
Ampicylina [25mg/ml]	Polfa
IPTG [24mg/ml]	ICN MP Biomedicals
X-Gal [20mg/ml]	Sigma

3.6.3. Roztwory do izolacji RNA z tkanek roślinnych

3.6.3.1. Roztwory do izolacji RNA metodą ekstrakcji fenolowej na gorąco (Boutla i in. 2002)

Bufor ekstrakcyjny	0.1M LiCl	(Merck)	25 ml
	100mM Tris pH 8,0	(Sigma)	50 ml
	10mM EDTA pH 8.0	(Sigma)	200 ml
	1% SDS	(ICN MP Biomedicals)	100 ml
	H ₂ O _{DEPC}		do 1 000 ml
Kwaśny fenol	80 ml fenolu podgrzano do temperatury 67°C, po czym dodano H ₂ O _{DEPC} do 100ml.		

Mieszaninę reakcyjną przygotowano przez połączenie buforu ekstrakcyjnego i kwaśnego fenolu w stosunku 1:1 oraz przez podgrzanie do 80°C.

Odczynniki dodatkowe:			
Alkohol izoamylowy	(Chempur)	Chloroform	(Chempur)
96% etanol	(Chempur)	75% etanol	(Chempur)

3.6.3.2. Roztwory do izolacji RNA metodą Chomczyńskiego zmod. przez dr P. Nuca z wykorzystaniem odczynnika „Trizol” (Pant i in. 2009)

Fenol do RNA wysycony octanem sodu

Uwodniony fenol (Roti Aqua Phenol) wysycono jednakową objętością 100mM octanu sodu pH=5.0 (Sigma) w 4°C w ciemności przez 4h z mieszaniem. Następnie mieszaninę doprowadzono do temperatury pokojowej, po czym usunięto fazę wodną i dodano 50µl β-merkaptioetanolu (Fluka). Tak przygotowany fenol przechowywano w ciemności w 4°C, pod warstwą 1.0cm fazy wodnej.

Przygotowanie odczynnika Trizol

Do wysyconego octanem sodu fenolu (38ml) dodano 3.34ml 3M octanu sodu pH=5.0. Następnie rozpuszczono 11.816g tiocyjanianu guanidyny (Fluka) i 7.612g tiocyjanianu amonu (Sigma) w H₂O_{DEPC} (V_k=50ml), dodano do fenolu. Do tak przygotowanej mieszaniny dodano 5ml glicerolu (Sigma) i dopełniono do 100ml H₂O_{DEPC}.

Trizol:		
Fenol wysycony 100mM octanem sodu	38ml	38% v/v
Tiocyjanian guanidyny	11.816g	0.8M
Tiocyjanian amonu	7.612g	0.4M
Octan sodu 3M pH=5.0	3.34ml	0.1M
Glicerol 99%	5ml	5% v/v
H ₂ O _{DEPC}	Do 100ml	

Przygotowany Trizol przechowywano w ciemności w 4°C.

*EDTA _{DEPC} 0.5M	(Sigma)	100µl/10ml odczynnika Trizol
*Sarkozyl _{DEPC} 10%	(Fluka)	500µl/10ml odczynnika Trizol

*Przed izolacją RNA połączyć: 10ml odczynnika Trizol, dodać sarkozyl_{DEPC} i EDTA_{DEPC}, wymieszać przez „worteksowanie”.

Odczynniki dodatkowe:		
0.8M cytrynian sodu (Sigma)/1.2M NaCl (Sigma)	Izopropanol	(Chempur)

3.6.4. Odczynniki stosowane do oczyszczania DNA, cDNA

Fenol pH 8.0	Sigma	7.5M octan amonu	POCH
0.2M EDTA pH 8.0	Sigma	Glikogen molecular biology grade #R0561	Fermentas
75% etanol	Chempur	96% etanol	Chempur

3.6.5. Odczynniki stosowane w reakcji DNazowania i odwrotnej transkrypcji

RNasin®Plus RNase Inhibitor 40U/μl	Promega	4x bufor dla RQ1 DNazy	Promega
5x bufor dla SuperScript™III	Invitrogen	dNTP (10mM każdy)	Roche
Fenol wysycony 100mM octanem sodu pH 5.0	Roti Aqua	DTT [0.1M]	Invitrogen
	Phenol	Chloroform	Chempur
96% etanol	Chempur	75% etanol	Chempur

3.6.6. Odczynniki stosowane w eksperymentach RDA i RDA-cDNA

10x bufor dla BamHI	Fermentas	10x bufor dla nukleazy Mung Bean	New England Biolabs
10x bufor R+	Fermentas	10x bufor dla T4 DNA ligaza	New England Biolabs
MgCl ₂ [25mM]	Fermentas	10x bufor dla DpnII	New England Biolabs
10x bufor dla polimerazy DNA Taq +KCl	Fermentas	10x bufor dla polimerazy DNA Taq +NH ₄	Fermentas
dNTP [4mM/2.5mM każdy]	Roche	Glikogen molecular biology grade #R0561	Fermentas
5M NaCl	Chempur	tRNA drożdżowy	Boehringer Mannheim
Fenol pH 8.0	Sigma	Olejek parafinowy	Aflfarm
Chloroform	Chempur	75% etanol	Chempur
Alkohol izoamylowy	Chempur	96% etanol	Chempur
Bufor TE: 10mM TrisHCl pH 7.5 1mM EDTA pH 7.5	Sigma Sigma	3M octanu sodu pH 5.3/5.2/5.0	Sigma
		50mM TrisHCl pH 8.9	Sigma
Bufor 'low' TE: 2mM TrisHCl pH 7.5 0.2mM EDTA pH 7.5	Sigma Sigma	Bufor 3x EE: 30mM EPPS pH 8.0 3mM EDTA pH 8.0	Sigma Sigma

3.6.7. Odczynniki stosowane w analizach PCR i RT-PCR

MgCl ₂ [25mM]	Fermentas	dNTP [2.5mM każdy]	Roche
10x bufor dla polimerazy DNA Taq +KCl	Fermentas	10x bufor dla polimerazy DNA Taq +NH ₄	Fermentas

3.6.8. Odczynniki wykorzystane w reakcjach 5' i 3' RACE oraz „spacer po genomie”

10x bufor Advenatge 2 PCR	Clontech	10x bufor dla polimerazy DyNAzyme™ EXT	Finnzymes
dNTP [10mM każdy]	Roche	Fenol pH 8.0	Sigma
Chloroform	Chempur	80%, 96% etanol	Chempur
3M octanu sodu pH 5.0	Sigma	Glikogen molecular biology grade #R0561	Fermentas
Bufor TE	Punkt 3.7.6		

3.6.9. Bufory i żele do elektroforezy RNA

Bufor 10xTBE		Bufor 1xTBE	
Tris/HCl (Sigma)	108g	Bufor 10xTBE	100ml
EDTA/Na (Sigma)	7.3g	H ₂ O _Q	do 1 000ml
kw. borowy (Sigma)	55g		
H ₂ O	do 1 000 ml		
Sterylizacja: 121°C, 20', 0.1MPa			
1/1.2% żel agarozowy		Obciążacz do prób z RNA nakładanych na żel agarozowy	

MATERIAŁY

Bufor 1xTBE	100ml	Tris/Cl _{DEPC} pH 7.4	10mM
Agarozą	1/1.2g	EDTA (Sigma)	5mM
Delikatnie podgrzano aż do rozpuszczenia agarozy. Po ostygnięciu dodano 5µl bromku etydyny [10 mg/ml] – Bio-Rad).		formamid (Sigma)	95%
		ksylencjanol (Sigma)	1%
		błękit bromofenolowy (Sigma)	1%

3.6.10. Bufory i żele do elektroforezy DNA

0.8 – 1.5% żel agarozowy		Obciążacz do prób z DNA nakładanych na żel agarozowy	
Bufor 1xTBE	100ml	mocznik (Chempur)	4M
Agarozą	0.8 – 1.5g	sacharoza (Chempur)	50%
Delikatnie podgrzano aż do rozpuszczenia agarozy. Po ostygnięciu dodano 5µl bromku etydyny [10 mg/ml] – Bio-Rad).		Tris/Cl _{DEPC} pH 7.4	10mM
		EDTA (Sigma)	50mM
		ksylencjanol (Sigma)	0.1%
		błękit bromofenolowy (Sigma)	0.1%

3.7. Zestawy użyte w doświadczeniach

3.7.1. PolyAtract® mRNA Isolation System III/IV firmy Promega

Zestaw zawiera odczynniki wystarczające na przeprowadzenie 15 izolacji mRNA z maksymalnej ilości 1mg całkowitego RNA	
Biotynylowane oligo(dT) (50pmol/µl)	50µl
20x roztwór SSC (2 x 1.4ml)	2.8ml
Magnetyczne kuleczki ze streptawidyną MagneSphere® (15 x 0.6ml)	9ml
Woda wolna od nukleaz (2 x 25 ml)	50ml
Statyw magnetyczny na próbówki 1.5ml MagneSphere®	1

3.7.2. cDNA Synthesis System firmy Roche

Zestaw zawiera odczynniki wystarczające na przeprowadzenie 10 reakcji syntezy dwuniciowego cDNA z całkowitego RNA lub mRNA	
5x RT-bufor AMV	500µl
Odwrotna transkryptaza AMV [25U/µl]	20µl
DTT [0.1M]	1ml
RNase-inhibitor [25U/µl]	10µl
Oligo(dT)15 starter [200µM]	20µl
Oligo[(dT)24 t7prom]65 starter [100µM]	20µl
Mix dNTP [10mM każdy]	110µl
Kontrolny mRNA [0.2µg/µl]	25µl
5x bufor do syntezy drugiej nici DNA	500µl
Mix enzymów do syntezy drugiej nici cDNA (polimeraza DNA I, ligaza DNA <i>E.coli</i> , RNazaH)	65µl
T4 DNA polimeraza [1U/µl]	200µl
Woda sterylna	1ml
RNaza I [10U/µl]	15µl
Proteinaza K [0.6U/µl]	50µl

3.7.3. Zestawy wykorzystane do izolacji DNA z tkanek roślinnych

DNeasy Plant Mini Kit firmy QIAGEN®		DNeasy Plant Maxi Kit firmy QIAGEN®	
Kolumnienki DNeasy Mini Spin	50	Kolumnienki DNeasy Maxi Spin	24
Kolumnienki QIAshredder Mini Spin	50	Kolumnienki QIAshredder Maxi Spin	24
Bufor AP1	40ml	Bufor AP1	140ml
Bufor AP2	18ml	Bufor AP2	50ml
Bufor AP3/E	30ml	Bufor AP3/E	50ml
Bufor AW	17ml	Bufor AW	54ml
Bufor AE	12ml	Bufor AE	60ml
RNaza A [100 mg/ml]	220µl	RNaza A [100 mg/ml]	440µl

3.7.4. Zestawy wykorzystane do oczyszczania produktów reakcji PCR

QIAquick PCR Purification Kit firmy QIAGEN®		QIAquick Gel Extraction kit firmy QIAGEN®	
Kolumnienki QIAquick Spin	50	Kolumnienki QIAquick Spin	50
Bufor PB	30ml	Bufor QG	50ml
Bufor PE	2 x 6ml	Bufor PE	2 x 10ml
Bufor EB	15ml	Bufor EB	15ml
Loading Dye	110µl	Loading Dye	110µl

3.7.5. Zestaw wykorzystany do izolacji plazmidowego DNA

QIAprep Spin Miniprep Kit firmy QIAGEN®			
Kolumnienki QIAprep Spin	50	Bufor PB	30ml
Bufor P1	20ml	Bufor PE	2 x 6ml
Bufor P2	20ml	Bufor EB	15ml
Bufor N3	30ml	RNase A	200µl

3.7.6. Zestaw wykorzystany do amplifikacji końców 5' i 3' cDNA

SMART™ RACE cDNA Amplification Kit firmy Clontech	
Odczynniki do syntezy cDNA	
Oligonukleotyd SMART II™ A [12µM]	7µl
3'-RACE CDS starter A [12µM]	7µl
5'-RACE CDS starter A [12µM]	7µl
5x bufor do syntezy cDNA	200µl
DTT [20mM]	200µl
Woda dejonizowana	1ml
Odczynniki do 5'- & -3' RACE PCR	
10x Universal Primer Mix (UPM)	400µl
Nested Universal Primer A (NUP) [10µM]	50µl
Mix dNTP [10mM każdy]	70µl
Bufor Tricine-EDTA (10mM Tricine-KOH pH 8.5, 1.0mM EDTA)	2 x 1ml
Odczynniki kontrolne	
RNA całkowity z ludzkiego łożyska [1µg/µl]	5µl
5'-RACE starter TFR [10µM]	25µl
3'-RACE starter TFR [10µM]	25µl

3.7.7. Zestaw wykorzystany do uzyskania sekwencji genomowej wyselekcjonowanych genów

GenomeWalker™ Universal Kit firmy Clontech			
Enzymy restrykcyjne:			
DraI [10U/µl]	30µl	10x bufor dla DraI	100µl
EcoRV [10U/µl]	25µl	10x bufor dla EcoRV	50µl
PvuII [10U/µl]	50µl	10x bufor dla PvuII	100µl
StuI [10U/µl]	25µl	10x bufor dla StuI	50µl
Kontrolny ludzki DNA genomowy [0.1µg/µl]		75µl	
T4 DNA ligaza [6U/µl]		10µl	
10x bufor do ligacji		40µl	
Adaptor GenomeWalker [25µM]		36µl	
Adaptor Primer 1 [AP1; 10µM]		250µl	
Nested Adaptor Primer 2 [AP2; 10µM]		250µl	
GenomeWalker kontrolna ludzka biblioteka		10µl	
Kontrolny tPA Primer [PCP1; 10µM]		50µl	
Kontrolny tPA Nested Primer [PCP2; 10µM]		50µl	

4. METODY

4.1. Hodowla in vitro wątrobowców *Pellia endiviifolia* species B

W celu założenia hodowli *in vitro* wątrobowców *P.endiviifolia* sp B wykorzystano materiał zielony przywieziony z terenu (Kopanina/koło Poznania). Sterylnymi pęsetami i skalpelem oczyszczono pojedyncze, wierzchołkowe fragmenty plechy (oddzielnie męskie i żeńskie), zawierające apikalną komórkę wzrostu, z gleby i chwytników. Tak oczyszczone fragmenty plech płukano 3 razy w wodzie destylowanej. Następnie do zlewki z fragmentami tkanki dodano kroplę detergentu Tween20, chwilę mieszano, płukano 3 razy w wodzie destylowanej i przeniesiono do wody miliQ na 20 min. W tym czasie do komory laminarnej przeniesiono: narzędzia do przeszczepiania roślin, naczynia używane do zaszczepiania (autoklawowane uprzednio 60 min, 121°C, 0.1MPa), po czym przeprowadzono ich sterylizację 20 min. w świetle UV. Po upływie 20 min. fragmenty plech przeniesiono do komory laminarnej, gdzie zanurzono je na moment w 70% etanolu, po czym umieszczono je w 5% ACE (zawiera podchloryn sodu – roztwór aktywnego chloru) na ok. 5 min. w celu sterylizacji. Następnie tkankę płukano w wodzie miliQ i umieszczono na krążkach bibułowych. Na szalkę z pożywką mineralną przenoszono po ok. 8 zielonych fragmentów roślin zawierających komórkę apikalną odpowiedzialną za wzrost plechy, lekko zanurzając je w pożywce. Szalki uszczelniono parafilmem i umieszczono w pokoju hodowlanym, w warunkach ciągłego światła w temperaturze 21-24°C. Zastosowano światło białe, neutralne, jarzeniowe o natężeniu 1000 luks. Procedurę wprowadzania wątrobowców *P.endiviifolia* sp B do hodowli *in vitro* przeprowadzano oddzielnie dla osobników męskich i oddzielnie dla osobników żeńskich. Po zregenerowaniu plech pasażowano je na szalki z pożywką 1/2 Gamborg, uszczelniono parafilmem i prowadzono hodowlę w pokoju hodowlanym w warunkach ciągłego światła w temperaturze 21-24°C.

4.2. Metody pracy z bakteriami

4.2.1. Hodowla bakterii *E.coli* szczep DH5a

Hodowle bakterii prowadzono na pożywce stałej LB z ampicyliną oraz w pożywce płynnej z ampicyliną. Hodowle na pożywce stałej, po całonocnej inkubacji w 37°C, przechowywano w temperaturze 4°C do kilku dni. Hodowle płynne prowadzone były w 37°C przez noc przy wytrząsaniu 300rpm.

4.3. Podstawowe metody pracy z kwasami nukleinowymi

4.3.1. Izolacja RNA całkowitego metodą ekstrakcji fenolowej na gorąco (Boutla i in. 2002)

Do próbki typu eppendorf 2.2ml zawierającej 100 – 150mg materiału roślinnego, rozartego uprzednio w ciekłym azocie, dodano 1ml podgrzanej do 80°C mieszaniny ekstrakcyjnej. Całość „worteksowano” przez 30 sekund, po czym dodano 500µl mieszaniny chloroform:alkohol izoamylowy (24:1) i znów wytrząsano przez 30 sekund. Próbę zwirowano 20 min. przy 4 000g w 4°C. Supernatant przeniesiono do nowej próbki, przeprowadzono 4 ekstrakcje po 600µl mieszaniną fenol:chloroform:alkohol izoamylowy (25:24:1), wirowano 10 min. przy 12 000g w 4°C, za każdym razem zbierając supernatant, bez fazy środkowej, do nowej próbki. Po czwartej fenolizie przeprowadzono 2 ekstrakcje po 600µl mieszaniną chloroform:alkohol izoamylowy (24:1), wirowano jw. Supernatant zebrano do nowej próbki. W celu wytrącenia RNA dodano 2.5 objętości zimnego, 96% etanolu, całość strącano przez noc w -80°C. Następnego dnia próby zwirowano 30 min. przy 12 000g w 4°C. Osad przemyto dwukrotnie 1ml 75% etanolu. Osad wysuszono i rozpuszczono w wodzie wolnej od RNaz. W celu określenia jakości i ilości RNA przeprowadzono elektroforezę w 1-1.2% żelu agarozowym oraz dokonano pomiaru absorbancji wyizolowanego RNA na spektrofotometrze NanoDrop® ND (TK Biotech) przy długościach fal $\lambda=260\text{nm}$, $\lambda=280\text{nm}$, $\lambda=230\text{nm}$.

4.3.2. Izolacja RNA całkowitego metodą Chomczyńskiego zmod. przez dr P. Nuca z wykorzystaniem odczynnika „Trizol” (Pant i in. 2009)

Do próbki typu eppendorf 2.2ml zawierającej 100 – 150mg materiału roślinnego, rozartego uprzednio w ciekłym azocie, dodano 2x po 750µl odczynnika „Trizol”, za każdym razem zawieszając tkankę roślinną przez pipetowanie, po czym inkubowano próbę przez 5 min. w temperaturze pokojowej, od czasu do czasu „worteksując”. Następnie dodano 300µl chloroformu, próbę wymieszano przez „worteksowanie” 15 s, pozostawiono na 3 min. w temperaturze pokojowej, po czym zwirowano 10 min. przy 12 000g w 4°C. W kolejnym kroku zebrano supernatant i ekstrahowano go 3x po 400µl świeżo przygotowaną mieszaniną chloroform:fenol wysycony 100mM octanem sodu pH 5.0 (3:1), za każdym razem wirując próbę 3 min. przy 12 000g w 4°C po pierwszej ekstrakcji, a po kolejnych dwóch w temperaturze pokojowej. Następnie supernatant ekstrahowano 2x 400µl chloroformu, „worteksowano” i wirowano próbę 3 min. przy 12 000g w temperaturze pokojowej. 1ml fazy wodnej przeniesiono do próbki typu eppendorf 2.2ml zawierającej 500µl izopropanolu, dokładnie wymieszano i dodano 500µl mieszaniny soli 0.8M cytrynian sodu/1.2M chlorek sodu, po czym zawartość próbki dokładnie wymieszano i pozostawiono na 7 min. w

temperaturze pokojowej w celu wytrącenia RNA. W dalszym etapie próbę wirowano 15 min. przy 12 000g w 4°C, supernatant usunięto nie naruszając osadu. Osad przemyto 3x 70% etanolem, za pierwszym razem 500μl, a następnie 2x po 150μl, za każdym razem wirując próbę 2min. przy 12 000g w 4°C. Osad RNA suszono przez 3-5 min. w temperaturze pokojowej, po czym rozpuszczono przez dodanie 20-40μl wody wolnej od RNaz. W celu określenia jakości i ilości RNA przeprowadzono elektroforezę w 1-1.2% żelu agarozowym oraz dokonano pomiaru absorbancji wyizolowanego RNA na spektrofotometrze NanoDrop® ND (TK Biotech) przy długościach fal $\lambda=260\text{nm}$, $\lambda=280\text{nm}$, $\lambda=230\text{nm}$.

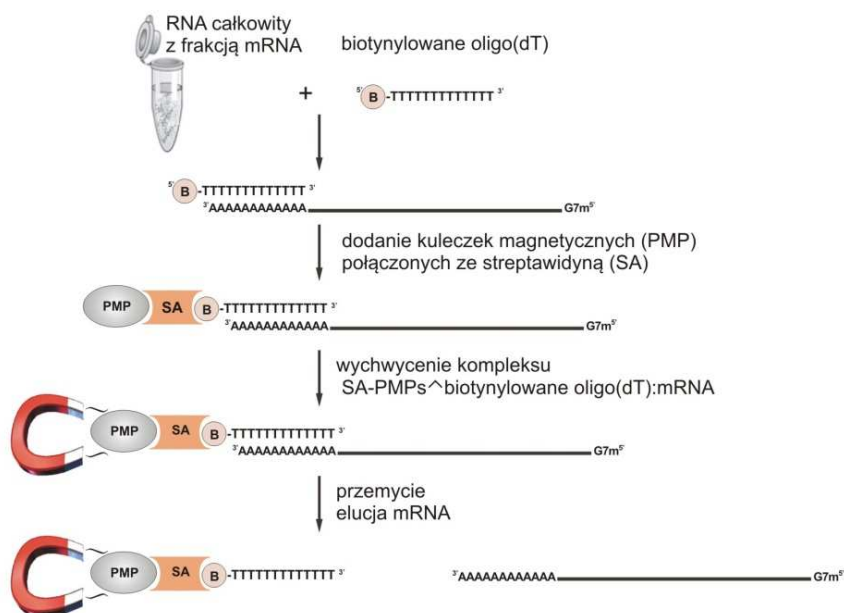
4.3.3. Reakcja DNazowania z wykorzystaniem DNazy RQ1

W celu usunięcia ewentualnych zanieczyszczeń DNA genomowym, wyizolowany RNA całkowity poddano trawieniu DNazą RQ1. W probówce typu eppendorf połączono: 6μg RNA całkowitego, 80U inhibitora RNaz RNasin® Plus, 4μl 10x buforu dla DNazy RQ1 oraz 80U DNazy RQ1, wody wolnej od RNaz do objętości 40μl. Mieszaninę inkubowano przez 40 min. w 37°C. Po zakończeniu trawienia dodano 80μl wody wolnej od RNaz, próbę dwukrotnie ekstrahowano: pierwszy raz dodając jedną objętość mieszaniny fenol:chloroform, drugi raz dodając 1 objętość chloroformu. Za każdym razem próbę wirowano 5 min. 12 000g w 4°C. Oczyszczony RNA wytrącono przez dodanie 2,5 objętości 96% etanolu oraz inkubację przez noc w temperaturze -80°C. Następnego dnia próbę zwirowano 30 min, 12 000g w 4°C. Osad RNA przemyto dwukrotnie 200μl 75% etanolu, wirując próbę za każdym razem 5 min, w warunkach jw. Osad suszono w temperaturze pokojowej ok. 5 min. i rozpuszczono w 10μl wody wolnej od RNaz. W celu określenia jakości i ilości RNA po trawieniu DNazą dokonano pomiaru absorbancji na spektrofotometrze NanoDrop® ND (TK Biotech) przy długościach fal $\lambda=260\text{nm}$, $\lambda=280\text{nm}$, $\lambda=230\text{nm}$ oraz przeprowadzono elektroforezę w 1.2% żelu agarozowym. Tak przygotowany RNA całkowity posłużył jako matryca do syntezy cDNA

4.3.4. Izolacja mRNA przy użyciu zestawu PolyATtract® mRNA Isolation System III firmy Promega

Probówkę z 1mg RNA całkowitego doprowadzano do końcowej objętości 500μl za pomocą wody wolnej od RNaz i umieszczono na 10 min. w 65°C. Po upływie tego czasu do próbki dodano 3μl biotynylowanych-oligo(dT) i 13μl roztworu 20xSSC, lekko wymieszano i inkubowano 10 min. w temperaturze pokojowej w celu przyłączenia oligo(dT) do końców poliA mRNA. Następnie przeprowadzono płukanie paramagnetycznych kuleczek ze streptawidyną MagneSphere® (SA-PMP) z buforu, w którym są przechowywane. Kuleczki płukano 3x za pomocą 300μl 0.5xSSC, za każdym razem wyłapując je na statywie magnetycznym MagneSphere®, po czym zawieszono je w 100μl 0.5xSSC. Poszczególne

etapy izolacji mRNA obrazuje schemat 4-1. W kolejnym etapie do kuleczek ze streptawidyną dodano 1mg całkowitego RNA, inkubowano przez 10 min. w temperaturze pokojowej delikatnie mieszając co 2-3 min. Następnie wychwycono SA-PMP z przyłączonym kompleksem biotynylowane oligo(dT):mRNA używając statywu magnetycznego, supernatant delikatnie usunięto nie naruszając kuleczek. Kuleczki przemyto 4x 300μl 0.1xSSC, za każdym razem wyłapując je na statywie magnetycznym. Po ostatnim płukaniu usunięto jak najwięcej supernatantu, starając się nie naruszyć osadu SA-PMPs[^]biotynylowane oligo(dT):mRNA. W celu elucji mRNA do próbki dodano 100μl wody dejonizowanej wolnej od RNaz, kuleczki zawieszono przez delikatne pukanie w próbkę, po czym kompleks kuleczek SA-PMPs[^]biotynylowane oligo(dT) wyłapano na statywie magnetycznym, a mRNA wraz z fazą wodną przeniesiono do nowej próbki. Elucję powtórzono przez zawieszenie kuleczek SA-PMPs w 150μl dejonizowanej wody.



Schemat 4-1. Zasada izolacji mRNA z użyciem zestawu PolyATtract® mRNA Isolation System firmy Promega.

Obie fazy po elucji połączone, uzyskując mRNA w 250μl wody dejonizowanej. W celu strącenia mRNA dodano 0.1 objętość 3M octanu sodu pH 5.3 i 2 objętości 96% etanolu, po czym prowadzono inkubację przez noc w -20°C. Następnego dnia próbkę zwirowano 30 min, 12 000g w 4°C. Osad przemyto 2x po 500μl 75% etanolu, wirując za każdym razem 5 min, 12 000 g w 4°C. Osad mRNA suszono w temperaturze pokojowej, rozpuszczono w 10 μl wody wolnej od RNaz. W celu określenia jakości i ilości RNA dokonano pomiaru absorbancji na spektrofotometrze NanoDrop® ND (TK Biotech) przy długościach fal λ=260nm, λ=280nm, λ=230nm.

4.3.5. Synteza dwuniciowego cDNA (ds-cDNA) z użyciem zestawu cDNA Synthesis System firmy Roche

W sterylnej probówce typu eppendorf połączono: 0.3-1µg mRNA i 400pmoli startera oligo(dT)₁₅. Całość uzupełniano wodą do 21µl, inkubowano w temperaturze 70°C przez 10 min, po czym probówkę przełożono bezpośrednio na lód. Następnie dodano kolejno: 8µl 5x buforu do odwrotnej transkrypcji, 4µl 0.1M DTT, 50U enzymu odwrotnej transkryptazy AMV, 25U inhibitora RNaz i 4µl mieszaniny dNTPs [10mM każdy]. Całość delikatnie mieszano i inkubowano 60 min. w 42°C. Po inkubacji probówkę przeniesiono bezpośrednio na lód i do mieszaniny reakcyjnej dodano kolejno: 30µl 5x buforu do syntezy drugiej nici cDNA, 1.5µl mieszaniny dNTP (10mM każdy), 6.5µl mieszaniny zawierającej polimerazę DNA I, ligazę DNA *E.coli* i RNazę H. Całość uzupełniono wodą do objętości 150µl, delikatnie mieszano i inkubowano 2 godz. w 16°C. Po upływie 2 godzin dodano 20U polimerazy DNA T4 i inkubowano kolejne 5 min. w 16°C. Reakcję zakończono dodając 17µl 0.2M EDTA o pH 8.0.

4.3.6. Oczyszczanie dwuniciowego cDNA

Po syntezie ds-cDNA do probówki dodano 200µl mieszaniny fenol:chloroform:alkohol izoamylowy (25:24:1), mieszano z użyciem worteksu 10 s, wirowano 15 s. przy 18 000g w temperaturze pokojowej. Fazę wodną przeniesiono do nowej probówki. Fazę fenolową przemyto dodając 50µl buforu TE, mieszano z użyciem worteksu 10 s, wirowano jw. Obie fazy wodne łączono, a następnie dodano 200µl mieszaniny chloroform:alkohol izoamylowy (24:1), mieszano z użyciem worteksu 10 s, wirowano jw. Fazę wodną przeniesiono do nowej probówki, DNA wytrącano przez dodanie 76µl 7.5M octanu amonu, 20µg glikogenu całość mieszano i dodano 475µl etanolu 96% schłodzonego. Dwuniciowy cDNA wytrącano przez noc w temperaturze -80°C. Następnego dnia ds-cDNA osadzano przez wirowanie 30 min. przy 18 000g w 4°C. Osad przemyto 2x po 300µl 75% etanolu, za każdym razem wirując próbę przez 5 min. w warunkach jw., po czym osad suszono w pokojowej temperaturze (ok. 10 minut), a następnie rozpuszczono w 10µl wody sterylnej. Ilość cDNA określono przez pomiar absorbancji na spektrofotometrze NanoDrop® ND (TK Biotech) przy długościach fal $\lambda=260\text{nm}$, $\lambda=280\text{nm}$, $\lambda=230\text{nm}$. Tak przygotowany dwuniciowy cDNA posłużył jako materiał wyjściowy dla przeprowadzenia eksperymentu RDA-cDNA oraz analiz RT-PCR.

4.3.7. Synteza jednociowego cDNA – reakcja odwrotnej transkrypcji

W sterylnej probówce typu eppendorf połączono: 6µg RNA całkowitego po trawieniu DNazą RQ1, 500ng oligonukleotydu oligo(dT)₁₅, 1µl mieszaniny dNTP (10mM każdy), wodę

wolną od RNaz do końcowej objętości 13 μ l. Całość wymieszano delikatnie pipetując, inkubowano 5 min. w 65°C, po czym przełożono do lodu na 2 min. Próbę delikatnie wymieszano, inkubowano dodatkowe 2 min. w lodzie, po czym dodano: 6 μ l 5x buforu dla odwrotnej transkryptazy SuperScriptIII™, 1.5 μ l 0.1M DTT, 40U inhibitora RNaz RNasin®Plus, 300U odwrotnej transkryptazy SuperScriptIII™, wodę wolną od RNaz do końcowej objętości 30 μ l. Całość wymieszano delikatnie pipetując, zwirowano i umieszczono w bloku grzejnym w temperaturze 37°C, po czym przestawiono temperaturę na 50°C. Po osiągnięciu temperatury 50°C, próbę inkubowano 1.5 godziny z lekkim mieszaniem, a następnie 10 min. w temperaturze 55°C. Reakcję zakończono przez inaktywację enzymu inkubując próbę 15 min. w 70°C. Tak przygotowany cDNA posłużył jako matryca w analizach RT-PCR.

4.3.8. Amplifikacja fragmentu cDNA aktywny

W celu sprawdzenia jakości jednoniciowego i dwuniciowego cDNA uzyskanego z plech wątrobowca *P.endiviifolia* sp B przeprowadzono reakcję PCR, w której amplifikowano fragment cDNA genu kodującego aktynę. Przygotowano 10 μ l mieszaniny reakcyjnej o składzie: 1 μ l 10x bufor dla polimerazy DNA Taq +KCl, 0.6 μ l MgCl₂ [25mM], 0.8 μ l dNTP [2.5mM każdy], po 2.5 μ l startera JNAKT1 oraz JNAKT2/po 0.5 μ l startera RTAKTF oraz RTAKTR [10 μ M każdy], 0.1U polimerazy DNA Taq, 1 μ l matrycy ds-cDNA/cDNA. Amplifikację prowadzono wg następującego profilu temperaturowego (aparatury MJ Research, PTC – 200 Peltier Thermal Cycler):

Denaturacja		95°C	5 min
30 cykli	Amplifikacja	Denaturacja	94°C
		Hybrydyzacja	43/60°C
		Elongacja	72°C
Elongacja		72°C	5 min
Schłodzenie prób		4°C	-

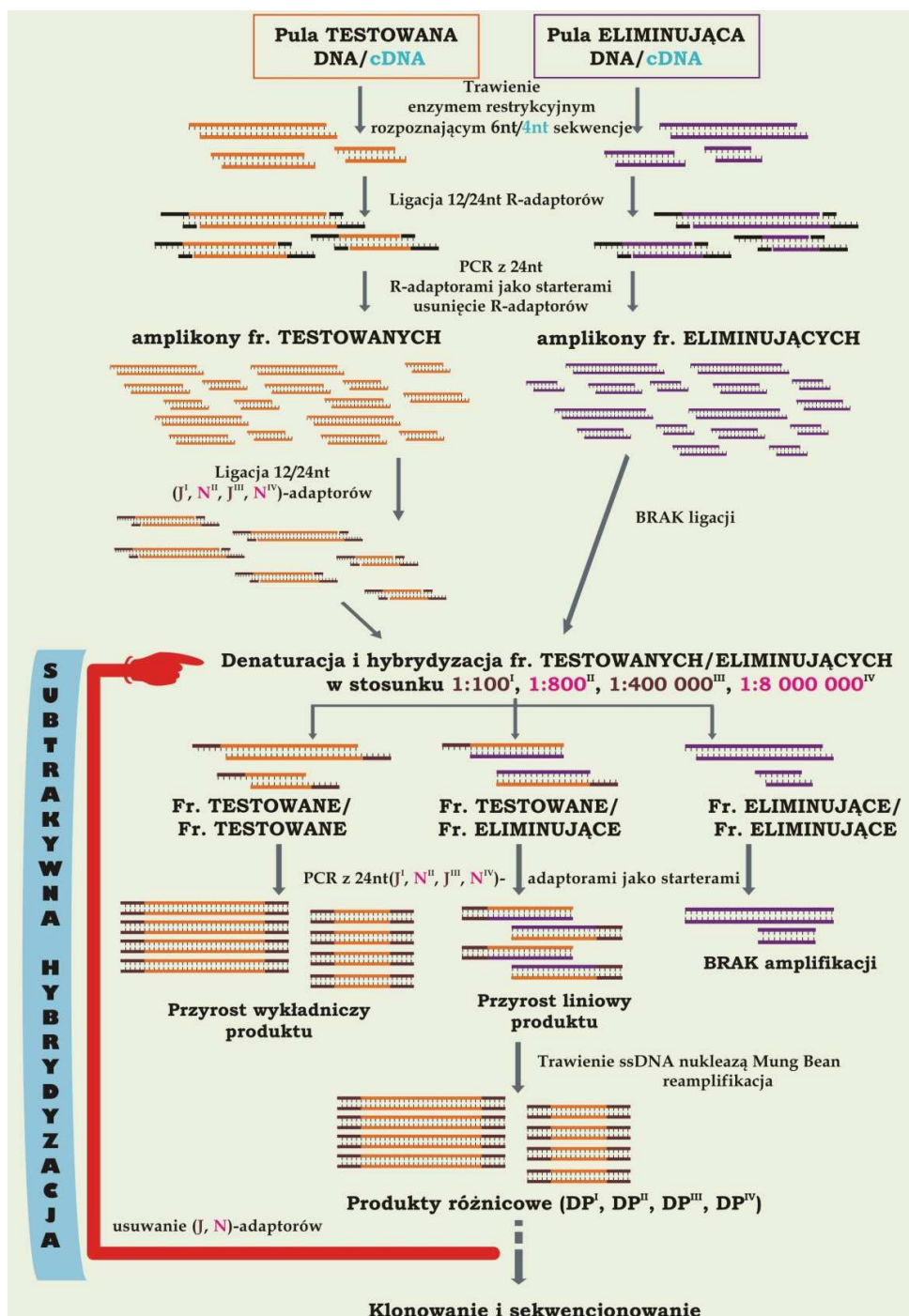
Produkty reakcji PCR sprawdzano podczas elektroforezy w 1.5% żelu agarozowym.

4.3.9. Izolacja DNA genomowego z materiału roślinnego

DNA genomowy z plech wątrobowca *P.endiviifolia* sp B hodowanych *in vitro* oraz zebranych z terenu izolowano zestawami firmy Qiagen zgodnie z protokołami producenta. Jakość i ilość DNA genomowego określono za pomocą pomiaru absorbancji na spektrofotometrze NanoDrop® ND (TK Biotech) przy długościach fal λ =260nm, λ =280nm, λ =230nm. Przygotowany w ten sposób DNA posłużył jako materiał wyjściowy dla eksperymentu RDA, przygotowania „bibliotek DNA” dla eksperymentu „spacer po genomie” oraz jako matryca w analizach PCR.

4.4. RDA – różnicowa analiza sekwencji genomowych

RDA (ang. Representational Difference Analysis) – różnicowa analiza sekwencji genomowych należy do ogólnej klasy metod badawczych, w których wykorzystuje się technikę różnicowej hybrydyzacji w połączeniu z reakcją PCR. Procedura postępowania w eksperymencie RDA/RDA-cDNA przedstawiona została na schemacie 4-2.



Schemat 4-2. Opis techniki różnicowej hybrydyzacji genomowej/cDNA.

Technika RDA umożliwia selekcję fragmentów DNA, które są obecne w jednej puli DNA zwanej pulą testowaną (ang. *tester*), a nie występują, bądź też są polimorficzne w drugiej puli DNA zwanej pulą eliminującą (ang. *driver*). Eksperyment RDA przeprowadzony został wg

protokołu Lisitsyn'a (Lisitsyn i Lisitsyn 1993) z pewnymi modyfikacjami na podstawie protokołu 25B.7 „Current Protocols in Molecular Biology”, 2003 (Ausubel i in. 2003)

4.4.1. Przygotowanie amplikonów DNA testowanego (ang. *Tester*) i eliminującego (ang. *Driver*)

4.4.1.1. Trawienie restrykcyjne DNA testowanego i eliminującego

W czterech próbkach typu eppendorf połączono:

- w pierwszej: 2µg DNA testowanego, 10µl 10x buforu R+, 80U enzymu HindIII,
- w drugiej: 2µg DNA testowanego, 10µl 10x buforu dla BamHI, 80U enzymu BamHI,
- w trzeciej: 2µg DNA eliminującego, 10µl 10x buforu R+, 80U enzymu HindIII,
- w czwartej: 2µg DNA eliminującego, 10µl 10x buforu dla BamHI, 80U enzymu BamHI.

Zawartość próbek uzupełniano wodą do 100µl i przeprowadzono inkubację przez 16 godzin w 37°C. W celu oczyszczenia DNA po trawieniu do próbek dodano jedną objętość mieszaniny fenol:chloroform:alkohol izoamylowy (25:24:1), mieszano z użyciem wortexu 5 s, wirowano przy 18 000g w temperaturze pokojowej przez 2 min. Supernatanty przeniesiono do nowych próbek i dodano do nich 1 objętość mieszaniny chloroform:alkohol izoamylowy (24:1), mieszano z użyciem wortexu 5s i wirowano jw. DNA strącano przez dodanie 2µg glikogenu, 0.1 objętości 3M octanu sodu pH 5.3, 2 objętości schłodzonego 96% etanolu oraz inkubację w -80°C przez noc. Następnego dnia DNA osadzano przez wirowanie przy 18 000g przez 30 min. w 4°C, osady przemyto 2x 75% etanolem, za każdym razem zwirowując próby 5 min. w warunkach jw. Osady DNA suszono w pokojowej temperaturze ok. 5 min. DNA rozpuszczono w 35µl wody sterylnej. Produkty trawienia restrykcyjnego sprawdzono podczas elektroforezy w 1.5% żelu agarozowym.

4.4.1.2. Ligacja R-adaptorów do fragmentów restrykcyjnych DNA

W czterech próbkach typu eppendorf połączono:

- w pierwszej: 1µg fragmentów DNA testowanego po trawieniu enzymem HindIII, 6µl 10x buforu dla ligazy DNA T4, 8µg oligonukleotydu R-HindIII24 i 4µg oligonukleotydu R-HindIII12,
- w drugiej: 1µg fragmentów DNA testowanego po trawieniu enzymem BamHI, 6µl 10x buforu dla ligazy DNA T4, 8µg oligonukleotydu R-BamHI24 i 4µg oligonukleotydu R-BamHI12,
- w trzeciej: 1µg fragmentów DNA eliminującego po trawieniu enzymem HindIII, 6µl 10x buforu dla ligazy DNA T4, 8µg oligonukleotydu R-HindIII24 i 4µg oligonukleotydu R-HindIII12,
- w czwartej: 1µg fragmentów DNA eliminującego po trawieniu enzymem BamHI, 6µl 10x buforu dla ligazy DNA T4, 8µg oligonukleotydu R-BamHI24 i 4µg oligonukleotydu R-BamHI12.

Objętość prób uzupełniano wodą sterylną do 57μl, następnie wstawiono je do bloku termicznego o temperaturze 55°C, inkubowano 5 min, po czym schładzano wolno temperaturę bloku do 10°C. Po osiągnięciu przez termoblok temperatury 10°C, do prób dodano 600U T4 DNA ligazy, mieszano, krótko zwirowano i inkubowano 16 godzin w 16°C. Po upływie czasu inkubacji do mieszanin dodano po 40μl buforu „lowTE”.

4.4.1.3. „Namnożenie” amplikonów DNA testowanego i eliminującego w reakcji PCR

Przygotowano po 100 probówek 0.25ml dla „namnożenia” amplikonów testowanych i eliminujących w reakcji PCR, w której mieszanina pojedynczej reakcji zawierała: 0.5μl produktu ligacji R-adaptorów, 5μl 10x bufor dla polimerazy DNA Taq +KCl, 5μl mieszaniny dNTP [2.5mM każdy], 4μl MgCl₂ [25mM], 0.5μg oligonukleotydów R-Bam/Hind-24, H₂O sterylnej do 50μl. Amplifikację przeprowadzono wg następującego profilu temperaturowego (aparat MJ Research, PTC – 200 Peltier Termal Cycler):

Hot start		72°C	10 min
Amplifikacja 25 cykli	Denaturacja	95°C	1 min
	Hybrydyzacja i elongacja	72°C	3 min
Końcowa elongacja		72°C	10 min
Chłodzenie		4°C	-

Produkty reakcji amplifikacji analizowano poprzez elektroforezę w 1.5% żelu agarozowym

4.4.1.4. Oczyszczanie amplikonów DNA testowanego i eliminującego

100 prób po reakcji PCR odpowiednio dla amplikonów DNA testowanych i eliminujących połączono w probówce (15ml) i wymieszano przez pipetowanie. Następnie pobrano po 500μl do nowych probówek 1.5ml i ekstrahowano jedną objętością mieszaniny fenol:chloroform:alkohol izoamyłowy (25:24:1). Próby mieszano z użyciem wortexu 5s, wirowano przy 18 000g w temperaturze pokojowej przez 5 min. Supernatanty przeniesiono do nowych probówek i dodano do nich jedną objętość mieszaniny chloroform:alkohol izoamyłowy (24:1), mieszano z użyciem wortexu 5 s i wirowano jw. Amplikony DNA strącano przez dodanie 0.1 objętości 3M octanu sodu pH 5.3 i 2 objętości 96% etanolu, i przechowaniu przez noc w -80°C. Następnego dnia pule amplikonów DNA wirowano przez 30 min, 18 000g w 4°C. Osady przemyto 2x 75% etanolem, po 300 μl, wirowano 5 min. jw, suszono ok. 5 min. i rozpuszczano w 40μl buforu ‘low’TE. Ilość amplikonów DNA określono za pomocą pomiaru na spektrofotometru NanoDrop® ND (TK Biotech) przy długościach fal λ=260nm, λ=280nm, λ=230nm.

4.4.2. Różnicowa hybrydyzacja

Kolejne rundy różnicowej hybrydyzacji przeprowadzono według następującego planu:

- usuwanie adaptorów,

- oczyszczenie prób z usuniętych adaptorów,
- ligacja nowych adaptorów,
- właściwa hybrydyzacja w zmiennych stosunkach ilościowych amplikonów DNA testowanych do eliminujących,
- wstępna amplifikacja produktów różnicowania w reakcji PCR,
- trawienie jednoniciowego DNA nukleazą Mung Bean,
- właściwa amplifikacja produktów różnicowania w reakcji PCR – uzyskanie produktów różnicowych DP (ang. Difference Products),
- oczyszczanie produktów amplifikacji przed kolejną rundą hybrydyzacji.

4.4.2.1. Pierwsza runda hybrydyzacji

4.4.2.1.1. Usuwanie R-adaptorów z amplikonów DNA testowanego i eliminującego

W celu usunięcia R-adaptorów z pul amplikonów DNA testowanego i eliminującego przeprowadzono cztery reakcje trawienia restrykcyjnego. W probówkach typu eppendorf połączono:

- w pierwszej: 65µg amplikonów DNA testowanego, 40µl 10x buforu R+, 325U enzymu HindIII,
- w drugiej: 65µg amplikonów DNA testowanego, 40µl 10x buforu dla BamHI, 325U enzymu BamHI,
- w trzeciej: 65µg amplikonów DNA eliminującego, 40µl 10x buforu R+, 325U enzymu HindIII,
- w czwartej: 65µg amplikonów DNA eliminującego, 40µl 10x buforu dla BamHI, 325U enzymu BamHI.

Próby uzupełniono wodą sterylną do objętości 400µl i inkubowano 3 godziny w 37°C. Po zakończeniu trawienia amplikony DNA testowanego i eliminującego oczyszczono z odciętych adaptorów jak w punkcie 4.4.1.4. Osady rozpuszczono w 40µl buforu TE. Ilość amplikonów DNA określono za pomocą pomiaru na spektrofotometru NanoDrop® ND (TK Biotech) przy długościach fal $\lambda=260\text{nm}$, $\lambda=280\text{nm}$, $\lambda=230\text{nm}$.

4.4.2.1.2. Ligacja J-adaptorów do amplikonów DNA testowanego

W dwóch probówkach typu eppendorf połączono:

- w pierwszej: 2µg amplikonów DNA testowanego uzyskanych z trawienia enzymem HindIII, 6µl 10x buforu dla ligazy DNA T4, 8µg oligonukleotydu J-Hind-24 i 4µg oligonukleotydu J-Hind-12,
- w drugiej: 2µg amplikonów DNA testowanego uzyskanych z trawienia enzymem BamHI, 6µl 10x buforu dla ligazy DNA T4, 8µg oligonukleotydu J-Bam-24 i 4µg oligonukleotydu J-Bam-12.

Całość uzupełniono sterylną wodą do objętości 57µl. Następnie postępowano jak w punkcie 4.4.1.2, po ligacji próby rozcieńczono dodając 140µl buforu TE uzyskując stężenie 10ng/µl.

4.4.2.1.3. Hybrydyzacja 1 – stosunek ilościowy ampliconów DNA testowanego do ampliconów DNA eliminującego – 1:100

W oddzielnych probówkach 1.5ml mieszano:

- 400ng J-ampliconów DNA testowanego uzyskanych z trawienia enzymem HindIII z 40μg ampliconów DNA eliminującego uzyskanych z trawienia enzymem HindIII w końcowej objętości 120μl,
- 400ng J-ampliconów DNA testowanego uzyskanych z trawienia enzymem BamHI z 40μg ampliconów DNA eliminującego uzyskanych z trawienia enzymem BamHI w końcowej objętości 120μl.

Następnie dodano jedną objętość mieszaniny fenol:chloroform:alkohol izoamyłowy (25:24:1), mieszano z użyciem wortexu 5 s, wirowano przy 18 000g w temperaturze pokojowej przez 2 min. Supernatanty przeniesiono do nowej probówki i dodano do nich jedną objętość mieszaniny chloroform:alkohol izoamyłowy (24:1), mieszano z użyciem wortexu 5 s i wirowano jw., supernatanty przeniesiono do nowej probówki, DNA strącano przez dodanie 0.3 objętości 7.5M octanu amonu i 3 objętości 96% etanolu, po czym próby inkubowano przez noc w -80°C. Następnego dnia próby umieszczono na 2 min. w temperaturze 37°C, po upływie tego czasu DNA osadzano przez wirowanie 30 min. przy 18 000g w 4°C. Osady DNA przemyto 2 razy 300μl 75% etanolem, suszono ok. 5 min. i rozpuszczono w 4μl buforu 3x EE. Następnie próby inkubowano 5min. w 37°C, "wortexowano" 1 min, krótko zwirowano i przeniesiono do probówek 0,2ml. Jednocześnie do nowych probówek 0,2ml dodano 1μl 5M NaCl. Próby zarówno z DNA i NaCl umieszczono na 1 min. w 95°C. Po zakończeniu inkubacji próby krótko zwirowano, po czym zdenaturowany DNA przeniesiono natychmiast do probówek zawierających NaCl, wymieszano przez pipetowanie i pokryto 35μl oleju mineralnego. Następnie próby zdenaturowano dodatkowe 5min. w temperaturze 95°C, po czym temperaturę obniżono stopniowo do 67°C w celu hybrydyzacji DNA. Hybrydyzację prowadzono przez 48 godzin, po jej zakończeniu próby rozcieńczono dodając kolejno: 8μl tRNA/TE (o stężeniu 5μg/μl), 25μl buforu 'lowTE', 62μl 'lowTE' i na koniec 300 μl wody sterylnej.

4.4.2.1.4. Wstępna amplifikacja produktów różnicowych J-DP^I metodą PCR

W celu wstępnego namnożenia produktów różnicowania po pierwszej rundzie hybrydyzacji, przygotowano po 12 prób odpowiednio dla amplifikacji produktów J-DP^I-HindIII oraz J-DP^I-BamHI. Mieszanina reakcyjna na jedną próbę zawierała: 6μl DNA po pierwszej hybrydyzacji, 5μl 10x bufor dla polimerazy DNA Taq +(NH₄)₂SO₄, 5μl dNTP [4mM każdy], 4μl MgCl₂ [25mM], H₂O sterylna do objętości końcowej 50μl. Wstępną amplifikację przeprowadzono wg profilu temperaturowego (aparatury MJ Research, PTC – 200 Peltier Thermal Cycler):

Temperatura pokrywy		104°C	
Hot start		72°C	10 min
Amplifikacja 14 cykli	Denaturacja	95°C	1 min
	Hybrydyzacja i elongacja	72°C	2 min
Końcowa elongacja		72°C	10 min
Chłodzenie		4°C	-

Po osiągnięciu przez termocykler temperatury 72°C wstawiono próby, po 3 min. dodano 2.5U polimerazy DNA Taq, po kolejnych 5 min. dodano 0.5µg odpowiednio oligonukleotydu J-Hind-24 lub J-Bam-24. Produkty wstępnej amplifikacji sprawdzono przeprowadzając elektroforezę 10µl każdej z prób w 1.5% żelu agarozowym. Następnie zawartość 12 prób łączono w probówce eppendorf, a następnie oczyszczano i strącano jak w punkcie 4.4.1.4. Osady suszono i rozpuszczono w 40µl wody sterylnej.

4.4.2.1.5. Trawienie jednoniciowego DNA nukleazą Mung Bean

34µl oczyszczonego DNA po wstępnej amplifikacji mieszano z: 4µl 10x buforu dla nukleazy Mung Bean, 20U nukleazy Mung Bean, H₂O do końcowej objętości 40µl. Całość inkubowano 30 min. w 30°C, po czym inaktywowano nukleazę przez dodanie 160µl 50mM TrisHCl pH 8.9 i inkubację przez 10 min. w 98°C.

4.4.2.1.6. Amplifikacja produktów różnicowych J-DP^I metodą PCR

W celu uzyskania produktów różnicowych po pierwszej rundzie hybrydyzacji przygotowano po 12 prób odpowiednio dla amplifikacji produktów J-DP^I-HindIII oraz J-DP^I-BamHI. Mieszanina reakcyjna na jedną próbę zawierała: 2µl DNA po trawieniu nukleazą Mung Bean, 5µl 10x bufor dla polimerazy DNA Taq +(NH₄)₂SO₄, 5µl dNTP [4mM każdy], 4µl MgCl₂ [25mM], 0.5µg odpowiednio oligonukleotydu J-Hind-24 lub J-Bam-24, H₂O sterylną do objętości końcowej 50µl. Amplifikację przeprowadzono wg profilu temperaturowego (aparatury MJ Research, PTC – 200 Peltier Thermal Cycler) jak w punkcie 4.4.2.1.4, z 25 cyklami amplifikacji. Po osiągnięciu przez termocykler temperatury 72°C wstawiono próby, po 3 minutach dodano 2.5U polimerazy DNA Taq. Produkty różnicowe sprawdzono przeprowadzając elektroforezę 10µl każdej z prób w 1.5% żelu agarozowym. Namnożony DNA opisano jako produkty różnicowe: J-DP^I-HindIII i J-DP^I-BamHI.

4.4.2.2. Druga runda hybrydyzacji

Produkty różnicowe J-DP^I-HindIII i J-DP^I-BamHI z 12 reakcji PCR połączono w probówkach typu eppendorf i oczyszczono za pomocą zestawu do oczyszczania produktów reakcji PCR firmy Qiagen, postępując zgodnie z zaleceniami producenta. Ilość produktów różnicowych J-DP^I określono za pomocą pomiaru na spektrofotometrze NanoDrop® ND (TK Biotech) przy długościach fal λ=260nm, λ=280nm, λ=230nm.

4.4.2.2.1. Usuwanie J-adaptorów z produktów różnicowych J-DP^I

W celu usunięcia J-adaptorów z produktów różnicowych J-DP^I przeprowadzono dwie reakcje trawienia restrykcyjnego. W probówkach typu eppendorf połączono:

- w pierwszej: 10μg J-DP^I-HindIII, 10μl 10x buforu R+, 50U enzymu HindIII,
- w drugiej: 10μg J-DP^I-BamHI, 10μl 10x buforu dla BamHI, 50U enzymu BamHI.

Próby uzupełniono wodą sterylną do objętości 100μl i inkubowano 3 godziny w 37°C. Po zakończeniu trawienia produkty różnicowe DP^I oczyszczono z odciętych adaptorów za pomocą zestawu do oczyszczania produktów reakcji PCR firmy Qiagen, postępując zgodnie z zaleceniami producenta. Ilość produktów różnicowych DP^I oczyszczonych z adaptorów określono za pomocą pomiaru na spektrofotometrze NanoDrop® ND (TK Biotech) przy długościach fal $\lambda=260\text{nm}$, $\lambda=280\text{nm}$, $\lambda=230\text{nm}$.

4.4.2.2.2. Ligacja N-adaptorów do produktów różnicowych DP^I

W dwóch probówkach typu eppendorf połączono:

- w pierwszej: 1μg DP^I-HindIII, 6μl 10x buforu dla ligazy DNA T4, 8μg oligonukleotydu N-Hind-24 i 4μg oligonukleotydu N-Hind-12,
- w drugiej: 1μg DP^I-BamHI, 6μl 10x buforu dla ligazy DNA T4, 8μg oligonukleotydu N-Bam-24 i 4μg oligonukleotydu N-Bam-12.

Całość uzupełniono sterylną wodą do objętości 57μl. Następnie postępowano jak w punkcie 4.4.1.2. Po ligacji próbę z produktami N-DP^I-HindIII rozcieńczono dodając 496μl buforu TE uzyskując stężenie 2.5ng/μl, próbę z produktami N-DP^I-BamHI rozcieńczono dodając 1160μl buforu TE uzyskując stężenie 1.25ng/μl.

4.4.2.2.3. Hybrydyzacja 2 – stosunek ilościowy amplikonów DNA testowanego do amplikonów DNA eliminującego –1:400 dla DP^I-HindIII, 1:800 dla DP^I-BamHI

W oddzielnych probówkach 1.5ml mieszano:

- 100ng N-DPI-HindIII z 40μg amplikonów DNA eliminującego uzyskanych z trawienia enzymem HindIII w końcowej objętości 120μl,
- 50ng N-DPI-BamHI z 40μg amplikonów DNA eliminującego uzyskanych z trawienia enzymem BamHI w końcowej objętości 120μl.

Kolejne etapy hybrydyzacji prowadzono jak w punkcie 4.4.2.1.3

4.4.2.2.4. Wstępna amplifikacja produktów różnicowych N-DP^{II} metodą PCR, trawienie jednoniciowych DNA nukleazą Mung Bean, amplifikacja produktów różnicowych N-DP^{II} metodą PCR

W celu wstępnej amplifikacji produktów różnicowania po drugiej rundzie hybrydyzacji postępowano jak w punkcie 4.4.2.1.4, kolejne etapy reakcji były identyczne jak podczas

reakcji PCR po pierwszej hybrydyzacji z tą różnicą, że reakcje przeprowadzono w obecności odpowiednio oligonukleotydu N-Hind-24 lub N-Bam-24.

Produkty wstępnej amplifikacji po drugiej rundzie hybrydyzacji trawiono nukleazą Mung Bean (4.4.2.1.5) i namnażano metodą PCR identycznie jak w czasie pierwszej rundy hybrydyzacji (4.4.2.1.6) z tą różnicą, iż reakcje przeprowadzono w obecności oligonukleotydu N-Hind-24 lub N-Bam-24. Produkty różnicowe sprawdzono przeprowadzając elektroforezę 10µl każdej z prób w 1.5% żelu agarozowym. Zamplifikowany DNA opisano jako produkty różnicowe: N-DP^{II}-HindIII i N-DP^{II}-BamHI.

4.4.2.3. Trzecia runda hybrydyzacji

Produkty różnicowe N-DP^{II}-HindIII i N-DP^{II}-BamHI z 12 reakcji PCR połączono w probówkach typu eppendorf i oczyszczono za pomocą zestawu do oczyszczania produktów reakcji PCR firmy Qiagen, postępując zgodnie z zaleceniami producenta. Ilość produktów różnicowych N-DP^{II} określono za pomocą pomiaru na spektrofotometrze NanoDrop® ND (TK Biotech) przy długościach fal $\lambda=260\text{nm}$, $\lambda=280\text{nm}$, $\lambda=230\text{nm}$.

4.4.2.3.1. Usuwanie N-adaptorów z produktów różnicowych DP^{II}

W celu usunięcia N-adaptorów z produktów różnicowych DP^{II} przeprowadzono dwie reakcje trawienia restrykcyjnego. W probówkach typu eppendorf połączono:

- w pierwszej: 10µg N-DP^{II}-HindIII, 10µl 10x buforu R+, 50U enzymu HindIII,
- w drugiej: 10µg N-DP^{II}-BamHI, 10µl 10x buforu dla BamHI, 50U enzymu BamHI.

Próby uzupełniono wodą sterylną do objętości 100µl i inkubowano 3 godziny w 37°C. Po zakończeniu trawienia produkty różnicowe DP^{II} oczyszczono z odciętych adaptorów za pomocą zestawu do oczyszczania produktów reakcji PCR firmy Qiagen, postępując zgodnie z zaleceniami producenta. Ilość produktów różnicowych DP^{II} oczyszczonych z adaptorów określono za pomocą pomiaru na spektrofotometrze NanoDrop® ND (TK Biotech) przy długościach fal $\lambda=260\text{nm}$, $\lambda=280\text{nm}$, $\lambda=230\text{nm}$.

4.4.2.3.2. Ligacja J-adaptorów do produktów różnicowych DP^{II}

W dwóch probówkach typu eppendorf połączono:

- w pierwszej: 1µg DP^{II}-HindIII, 6µl 10x buforu dla ligazy DNA T4, 8µg oligonukleotydu J-Hind-24 i 4µg oligonukleotydu J-Hind-12,
- w drugiej: 1µg DP^I-BamHI, 6µl 10x buforu dla ligazy DNA T4, 8µg oligonukleotydu J-Bam-24 i 4µg oligonukleotydu J-Bam-12.

Całość uzupełniono sterylną wodą do objętości 57µl. Następnie postępowano jak w punkcie 4.4.1.2. Po ligacji próbę z produktami J-DP^{II}-HindIII rozcieńczono dodając 496µl buforu TE uzyskując stężenie 2,5ng/µl, po czym 4µl rozcieńczono dodając 996µl tRNA'low' TE (o

stężeniu 20ng/μl) uzyskując stężenie 10pg/μl. Po ligacji próbę z produktami J-DP^{II}-BamHI rozcieńczono dodając 1160μl buforu TE uzyskując stężenie 1.25ng/μl, po czym 20μl rozcieńczono dodając 980μl tRNA/'low'TE (o stężeniu 20ng/μl) uzyskując stężenie 2.5pg/μl.

4.4.2.3.3. Hybrydyzacja 3 – stosunek ilościowy amplikonów DNA testowanego do amplikonów DNA eliminującego – 1:100 000 dla DP^{II}-HindIII, 1:400 000 dla DP^{II}-BamHI

W oddzielnych probówkach mieszano:

- 400pg J-DP^{II}-HindIII z 40μg amplikonów DNA eliminującego uzyskanych z trawienia enzymem HindIII w końcowej objętości 120μl,
- 100pg J-DP^{II}-BamHI z 40μg amplikonów DNA eliminującego uzyskanych z trawienia enzymem BamHI w końcowej objętości 120μl.

Kolejne etapy hybrydyzacji prowadzono jak w punkcie 4.4.2.1.3 Wstępną amplifikację produktów różnicowych J-DP^{III} metodą PCR, trawienie jednoniciowych DNA nukleazą Mung Bean, amplifikację produktów różnicowych J-DP^{IV} metodą PCR prowadzono odpowiednio jak w punktach 4.4.2.1.4, 4.4.2.1.5, 4.4.2.1.6. Produkty różnicowe sprawdzono przeprowadzając elektroforezę 10μl każdej z prób w 1.5% żelu agarozowym. Zamplifikowany DNA opisano jako produkty różnicowe: J-DP^{III}-HindIII i -DP^{III}-BamHI.

4.4.2.4. Czwarta runda hybrydyzacji

Produkty różnicowe J-DP^{III}-HindIII i J-DP^{III}-BamHI z 12 reakcji PCR połączono w probówkach typu eppendorf i oczyszczono za pomocą zestawu do oczyszczania produktów reakcji PCR firmy Qiagen, postępując zgodnie z zaleceniami producenta. Ilość produktów różnicowych DP^{III} określono za pomocą pomiaru na spektrofotometrze NanoDrop® ND (TK Biotech) przy długościach fal λ=260nm, λ=280nm, λ=230nm.

4.4.2.4.1. Usuwanie J-adaptorów z produktów różnicowych J-DP^{III}

W celu usunięcia J-adaptorów z produktów różnicowych J-DP^{III} postępowano jak w punkcie 4.4.2.2.1 wykorzystując po 10μg produktów różnicowych J-DP^{III}-HindIII i J-DP^{III}-BamHI.

4.4.2.4.2. Ligacja N-adaptorów do produktów różnicowych DP^{III}

W celu ligacji N-adaptorów do produktów różnicowych DP^{III} postępowano jak w punkcie 4.4.2.2.2 wykorzystując po 1μg produktów różnicowych DP^{III}-HindIII i DP^{III}-BamHI. Całość uzupełniono sterylną wodą do objętości 57μl. Następnie postępowano jak w punkcie 4.4.1.2. Po ligacji próbę z produktami N-DP^{III}-HindIII rozcieńczono dodając 496μl buforu TE uzyskując stężenie 2.5ng/μl, po czym 4μl rozcieńczono dodając 996μl tRNA/'low'TE (o stężeniu 20ng/μl) uzyskując stężenie 10pg/μl. Następnie 12.5μl produktów N-DP^{III}-HindIII rozcieńczono dodając 987.5μl tRNA/'low'TE (o stężeniu 20ng/μl) uzyskując stężenie

0.125pg/ μ l. Po ligacji próbę z produktami J-DP^{III}-BamHI rozcieńczono dodając 1160 μ l buforu TE uzyskując stężenie 1.25ng/ μ l, po czym 20 μ l rozcieńczono dodając 980 μ l tRNA/'low' TE (o stężeniu 20ng/ μ l) uzyskując stężenie 2.5pg/ μ l.

4.4.2.4.3. Hybrydyzacja 4 – stosunek ilościowy amplikonów DNA testowanego do amplikonów DNA eliminującego – 1:8 000 000 dla DP^{III}-HindIII, 1:400 000 dla DP^{III}-BamHI

W oddzielnych probówkach mieszano:

- 5pg N-DP^{III}-HindIII z 40 μ g amplikonów DNA eliminującego uzyskanych z trawienia enzymem HindIII w końcowej objętości 120 μ l,
- 100pg N-DP^{III}-BamHI z 40 μ g amplikonów DNA eliminującego uzyskanych z trawienia enzymem BamHI w końcowej objętości 120 μ l.

Kolejne etapy hybrydyzacji prowadzono jak w punkcie 4.4.2.1.3. Wstępną amplifikację produktów różnicowych N-DP^{IV} metodą PCR, trawienie jednoniciowych DNA nukleazą Mung Bean, amplifikacja produktów różnicowych N-DP^{IV} metodą PCR prowadzono odpowiednio jak w punktach 4.4.2.2.4, 4.4.2.2.5, 4.4.2.2.6. Produkty różnicowe sprawdzono przeprowadzając elektroforezę 10 μ l każdej z prób w 1,5% żelu agarozowym. Zamplifikowany DNA opisano jako produkty różnicowe: N-DP^{IV}-HindIII i N-DP^{IV}-BamHI.

4.5. RDA-cDNA – różnicowa analiza cDNA

Metoda RDA-cDNA, opisana po raz pierwszy przez Hubank i Schatza w 1994 roku (Hubank i Schatz 1994), stanowi adaptację metody RDA do analizy różnicowej dwóch transkryptomów. Technika ta pozwala na izolację i identyfikację cDNA genów ulegających różnej ekspresji w czasie, w tkance, w organie, w warunkach stresowych, chorobowych itd. Eksperyment RDA-cDNA przeprowadzono wg protokołu opisanego w punkcie 4.4 z kilkoma modyfikacjami.

4.5.1. Przygotowanie amplikonów cDNA testowanego (ang. *Tester*) i eliminującego (ang. *Driver*)

4.5.1.1. Trawienie restrykcyjne ds-cDNA testowanego i eliminującego

Materiał wyjściowy dla przygotowania amplikonów cDNA testowanego i eliminującego stanowiły dwie pule dwuniciowego cDNA (ds-cDNA). W dwóch probówkach typu eppendorf połączono:

- w pierwszej: 1.5 μ g ds-cDNA testowanego, 10 μ l 10x buforu dla DpnII, 20U enzymu DpnII,
- w drugiej: 1.5 μ g ds-cDNA eliminującego, 10 μ l 10x buforu dla DpnII, 20U enzymu DpnII.

Zawartość probówek uzupełniano wodą do 200µl i przeprowadzono inkubację przez 3 godziny w 37°C. cDNA po trawieniu oczyszczano jak w punkcie 4.4.1.1. Kolejne etapy przygotowania amplikonów przeprowadzono jak w punktach 4.4.1.2-4.4.1.5 z wykorzystaniem adaptorów R-Dpn-24 i R-Dpn-12.

4.5.2. Pierwsza runda hybrydyzacji

4.5.2.1. Usuwanie R-adaptorów z amplikonów cDNA testowanego i eliminującego

W celu usunięcia R-adaptorów z pul amplikonów cDNA testowanego i eliminującego przeprowadzono dwie reakcje trawienia restrykcyjnego. W probówkach typu eppendorf połączono:

- w pierwszej 15µg amplikonów cDNA testowanego, 20µl 10x buforu dla DpnII, 75U enzymu DpnII, woda sterylna do objętości 200µl,
- w drugiej 65µg amplikonów cDNA eliminującego, 40µl 10x buforu dla DpnII, 325U enzymu DpnII, woda sterylna do objętości 400µl.

Mieszaniny reakcyjne inkubowano 3 godziny w temperaturze 37°C. Kolejne etapy pierwszej rundy hybrydyzacji przeprowadzono jak w punktach 4.5.2.1.2-4.4.2.1.6. z wykorzystaniem adaptorów J-Dpn-24 i J-Dpn-12.

4.5.3. Druga, trzecia, czwarta runda hybrydyzacji

Kolejne rundy hybrydyzacji przeprowadzono we wzrastających stosunkach ilościowych produktów różnicowych względem amplikonów cDNA eliminującego (druga runda 1:800, trzecia i czwarta runda 1:400 000) stosując odpowiednio adaptory J-Dpn-24 i J-Dpn-12 w trzeciej rundzie hybrydyzacji, adaptory N-Dpn-24 i N-Dpn-12 w drugiej i czwartej rundzie hybrydyzacji.

4.6. Klonowanie produktów PCR do wektora pGEM®T-Easy (Promega)

Produkty różnicowej analizy genomowej oraz cDNA, bezpośrednio po reakcji lub eluowane z żelu agarozowego za pomocą zestawu firmy Qiagen, klonowano do wektora pGEM®T-Easy. W tym celu do probówki typu eppendorf 1.5ml dodano: 1µl buforu 10x dla ligazy DNA T4, 10ng wektora pGEM®T-Easy, 5U ligazy DNA T4, 1µl produktu PCR bezpośrednio po reakcji lub odpowiednią ilością DNA po elucji z żelu, obliczoną według wzoru:

$$\frac{3 \times \text{ng wektora} \times \text{kpz insert}}{1 \times \text{kpz wektora}}$$

Całość uzupełniono sterylną wodą do objętości 10µl. Mieszaninę inkubowano przez noc w 4°C lub 2 godziny w temperaturze pokojowej.

4.7. Transformacja wektorem pGEM[®]T-Easy komórek bakteryjnych *E.coli* DH5 α

100 μ l komórek kompetentnych DH5 α rozmrożono na lodzie. Następnie dodano 10 μ l mieszaniny ligacyjnej. Całość ostrożnie wymieszano i inkubowano przez 30 min. w lodzie. Po zakończeniu inkubacji komórki podano szokowi termicznemu – 2 min. w 42°C, po czym natychmiast przeniesiono je na lód i inkubowano 2 min. Następnie do probówki dodano 700 μ l płynnej pożywki LB (bez ampicyliny). Całość wymieszano i umieszczono w termomikserze na 2 godziny w 37°C z wytrząsaniem 350rpm. Po inkubacji na szalkę Petriego z pożywką LB z ampicyliną [50 mg/ml] naniesiono 30 μ l IPTG, 30 μ l X-Gal oraz 300 μ l zawiesiny bakteryjnej po transformacji, po czym wszystkie składniki dokładnie rozprowadzono za pomocą głaszczki. Szalki umieszczono do góry dnem w cieplarni (37°C), gdzie poddano je całonocnej inkubacji. Następnego dnia zaszczepiono z każdej szalki po 10 białych kolonii do falkonów z 3.5ml płynnej pożywki LB z dodatkiem 3.5 μ l ampicyliny. Bakterie hodowano w 37°C na wytrząsarce (~300rpm) przez noc.

4.8. Izolacja DNA plazmidowego na małą skalę

Izolacja DNA plazmidowego z hodowanych przez noc bakterii przeprowadzono za pomocą zestawu QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen) zgodnie z protokołem producenta. Stężenie wyizolowanego DNA plazmidowego określono za pomocą pomiaru na spektrofotometrze NanoDrop[®] ND (TK Biotech) przy długościach fal $\lambda=260\text{nm}$, $\lambda=280\text{nm}$, $\lambda=230\text{nm}$.

4.9. Reakcje sekwencjonowania DNA

Reakcje sekwencjonowania DNA zostały przeprowadzone w Pracowni Techniki Biologii Molekularnej Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, 61-614 Poznań, ul. Umultowska 89 oraz w firmie Genomed sp. z o.o., 02-971 Warszawa ul. Ponczowa 12.

4.10. Identyfikacja fragmentów DNA specyficznych dla DNA testowanego metodą PCR

Na podstawie sekwencji DNA uzyskanych po sekwencjonowaniu produktów różnicowych N-DP^{IV} po czwartej rundzie różnicowej hybrydyzacji genomowej zaprojektowano 33 pary starterów w celu identyfikacji fragmentów DNA specyficznych dla testowanych fragmentów DNA. Następnie przeprowadzono reakcję PCR na matrycach DNA testowanego i eliminującego z wykorzystaniem każdej z par starterów. Mieszanina reakcyjna na 1 próbę zawierała: 1 μ l 10x bufor dla polimerazy DNA Taq +KCl, 0.6 μ l MgCl₂ [25mM], 0.8 μ l dNTP

[2.5mM każdy], po 0.5µl startera F i R [10µM każdy], 0.1U polimerazy DNA Taq, 10ng matrycy DNA, wodę sterylną do końcowej objętości 10µl. Amplifikację prowadzono wg następującego profilu temperaturowego (aparatus MJ Research, PTC – 200 Peltier Thermal Cycler):

Denaturacja		95°C	5 min
Amplifikacja 35 cykli	Denaturacja	94°C	30 s
	Hybrydyzacja	57-65°C	30 s
	Elongacja	72°C	60 s
Elongacja		72°C	5 min
Schłodzenie prób		4°C	-

Produkty reakcji PCR sprawdzano podczas elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym.

4.11. Analiza poziomu ekspresji genów za pomocą metody RT-PCR

W celu zbadania różnic w poziomie ekspresji genów wyselekcjonowanych w wyniku eksperymentu RDA-cDNA zastosowano metodę RT-PCR w dwóch podejściach. W pierwszym matrycę do pojedynczej reakcji RT-PCR stanowił ds-cDNA testowany i eliminujący – wyjściowy dla eksperymentu RDA-cDNA. W drugim podejściu matrycę cDNA przygotowano *de novo* – czyli z nowo zebranego materiału w terenie oraz materiału hodowanego *in vitro*, zarówno dla puli cDNA testowanego, jak i eliminującego. RNA całkowity izolowano z plech wątrobowca *P. endiviifolia* sp B wg metody opisanej w punkcie 4.3.2. rozdziału METODY. Następnie poddano go reakcji trawienia DNazą RQ1 (METODY, punkt 4.3.6), po czym przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji (METODY, punkt 4.3.7), monitorując za każdym razem ilość RNA wykorzystanego do reakcji za pomocą pomiaru absorbancji na spektrofotometrze NanoDrop® ND (TK Biotech). Do każdej reakcji odwrotnej transkrypcji podano taką samą ilość oczyszczonego z DNA genomowego RNA całkowitego – 6µg. W analizie różnic w poziomie ekspresji genów między cDNA testowanym, a eliminującym metodą RT-PCR oparto się na założeniu, że reakcja odwrotnej transkrypcji w każdej próbówce zachodzi z taką samą wydajnością – tym samym ilość cDNA w każdej próbówce, przepisane z identycznej ilości RNA całkowitego, powinna teoretycznie być taka sama.

Na podstawie sekwencji cDNA uzyskanych po sekwencjonowaniu produktów różnicowych N-DP^{IV} po czwartej rundzie różnicowej hybrydyzacji cDNA zaprojektowano 16 par starterów w celu identyfikacji fragmentów cDNA specyficznych dla cDNA testowanego. Mieszanina reakcyjna na jedną próbę zawierała: 1µl 10x bufor dla polimerazy DNA Taq +KCl, 0.6µl MgCl₂ [25mM], 0.8µl dNTP [2.5mM każdy], 0.5µl startera F i R [10µM], 0.1U polimerazy DNA Taq, 7ng matrycy ds-cDNA lub 1µl cDNA, woda sterylna do końcowej objętości 10µl. Amplifikację prowadzono wg następującego profilu temperaturowego programu RT (aparatus MJ Research, PTC – 200 Peltier Thermal Cycler):

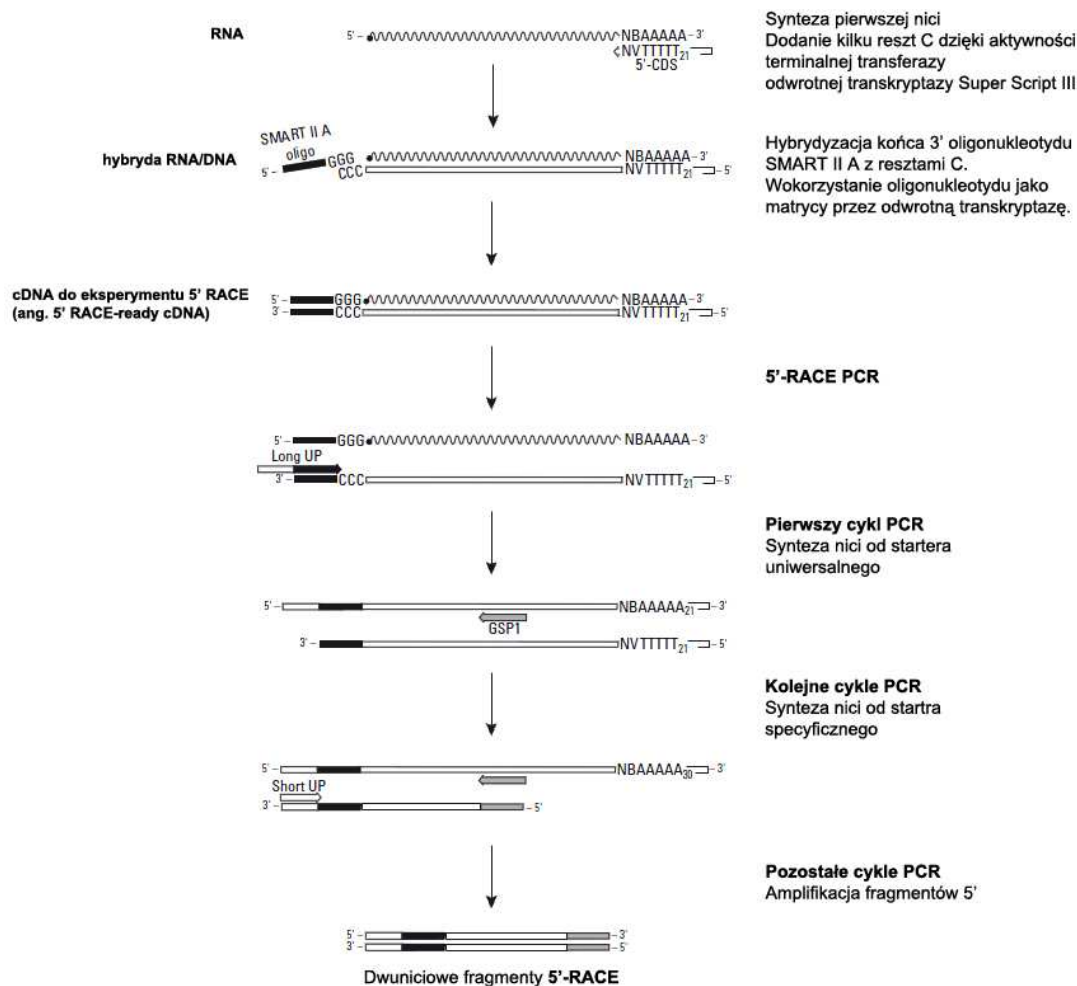
Denaturacja		95°C	5 min
Amplifikacja 35 cykli	Denaturacja	94°C	30 s
	Hybrydyzacja	58-64°C	30 s
	Elongacja	72°C	60 s
Elongacja		72°C	5 min
Schłodzenie prób		4°C	-

Produkty reakcji PCR sprawdzano podczas elektroforezy w 1.5% żelu agarozowym.

4.12. Charakterystyka końców 5' i 3' cDNA wyselekcjonowanych mRNA w eksperymencie RDA-cDNA metodą RACE za pomocą zestawu SMARTTM RACE Amplification Kit (Clontech)

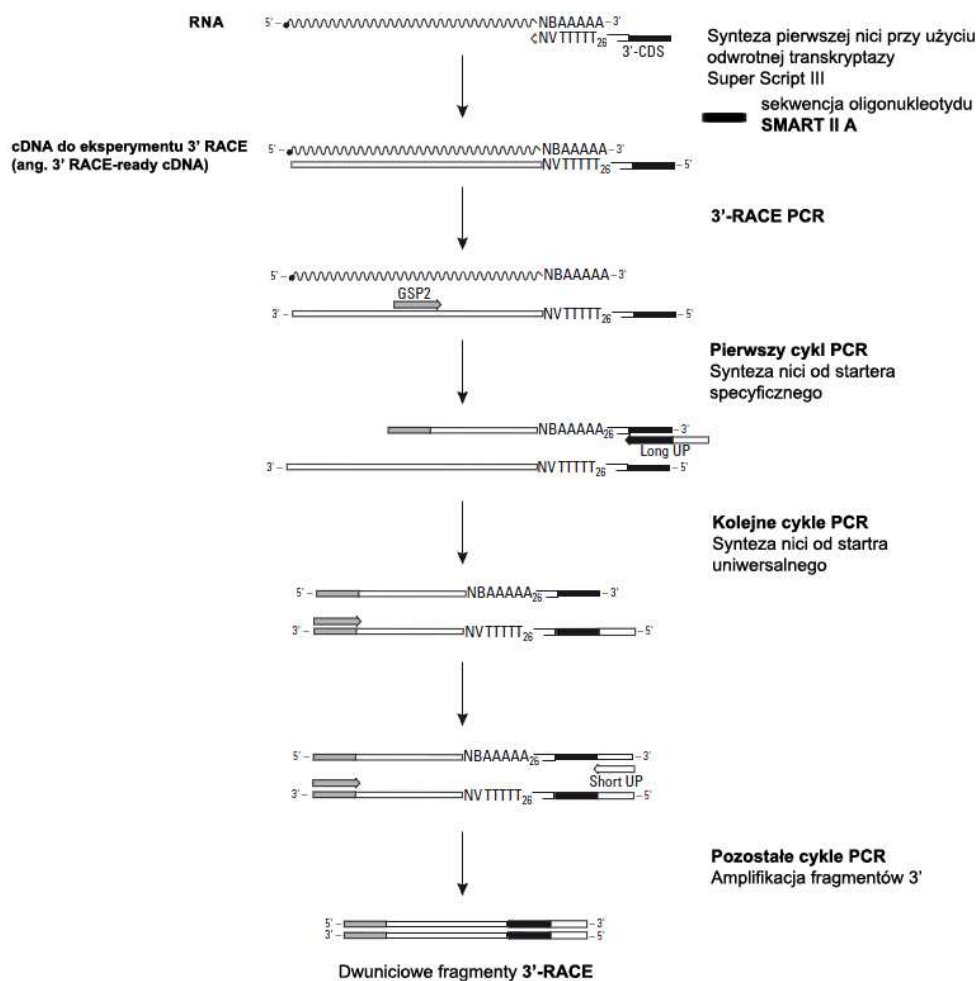
W celu charakterystyki końców 5' i 3' cDNA wyselekcjonowanych fragmentów mRNA metodą RDA-cDNA wykorzystano zestaw SMARTTM RACE Amplification Kit firmy Clontech. Amplifikacja właściwych końców cDNA przeprowadzana jest dwuetapowo. W pierwszym etapie RNA całkowity, wolny od zanieczyszczeń genomowym DNA, przepisywany jest na cDNA. W drugim, metodą PCR, amplifikuje się odpowiednio koniec 5' lub 3' cDNA. Technologia SMART (ang. Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript – mechanizm przełączenia matrycy na końcu 5' transkryptu RNA) wykorzystująca oligonukleotyd SMART IITMA pozwala na tworzenie kompletnych cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji, bez konieczności ligowania adaptorów i syntezy drugiej nici. Jest to możliwe dzięki współdziałaniu oligonukleotydu SMART oraz odwrotnej transkryptazy. Wiele enzymów typu odwrotnej transkryptazy wykazuje aktywność terminalnej transferazy po osiągnięciu końca matrycy RNA, dodając 3-5 reszt głównie dC (deoksycytydyny) do końca 3' pierwszej nici cDNA. Oligonukleotyd SMART IITMA posiada na swym 3' końcu ciąg 3 reszt dG (deoksyguanozyny), który przyłącza się do końca 3' cDNA, bogatego w reszty dC, służąc tym samym jako przedłużenie matrycy dla reakcji odwrotnej transkrypcji (mechanizm przełączenia matrycy). Odwrotna transkryptaza przełączając matrycę z mRNA na oligonukleotyd SMART, generuje kompletny cDNA, będący kopią oryginalnej cząsteczki RNA, zakończony sekwencją oligonukleotydu SMART. Co ważne, aktywność dołączenia reszt dC przez odwrotną transkryptazę jest najbardziej efektywna, gdy enzym dotrze do końca matrycy RNA, dlatego sekwencja SMART jest zazwyczaj dodawana tylko do kompletnej długości cząsteczek cDNA. Proces ten gwarantuje, że korzystanie z wysokiej jakości RNA doprowadzi do utworzenia zbioru cząsteczek cDNA o maksymalnej długości końców 5' wyjściowego mRNA. Zestaw firmy Clontech zawiera protokół do syntezy cDNA dwóch odrębnych populacji cDNA: 5'-RACE-Ready cDNA i 3'-RACE-Ready cDNA. cDNA dla eksperymentów 5'RACE syntetyzowany jest przy użyciu startera 5'RACE CDS Primer A (5'-CDS) oraz powyżej opisanego oligonukleotydu SMART. 5'RACE CDS Primer A,

zbudowany z reszt dT, jest starterem dla odwrotnej transkryptazy. Ponadto na swoim końcu 3' posiada dwie zdegenerowane reszty nukleotydowe (jedną czterokrotnie, drugą trzykrotnie), które umożliwiają jego hybrydyzację z początkiem ogona poliA, eliminując tym samym heterogenność końców 3', którą wprowadza zwyczajny starter oligo(dT). Mechanizm metody 5'RACE przedstawia schemat 4-3.



Schemat 4-3. Przebieg postępowania w eksperymencie 5'RACE. GSP1 i GSP2 (ang. Gene Specific Primer) – startery genowo specyficzne 1 i 2, LongUP i ShortUP – startery uniwersalne komplementarne do sekwencji adaptoru SMART II A (Clontech, zmodyfikowany).

cDNA dla eksperymentów 3'RACE syntetyzowany jest przy użyciu startera 3'RACE CDS Primer A (3'-CDS), charakteryzującego się takim samym zdegenerowaniem końca 3' jak starter 5'-CDS oraz dołączoną sekwencją SMART na jego 5' końcu. Mechanizm metody 3'RACE przedstawia schemat 4-4.



Schemat 4-4. Przebieg postępowania w eksperymencie 3'RACE. GSP1 i GSP2 (ang. Gene Specific Primer) – startery genowo specyficzne 1 i 2, LongUP i ShortUP – startery uniwersalne komplementarne do sekwencji adaptora SMART II A (Clontech, zmodyfikowany).

Technologia SMART pozwala na poznanie końców 5' i 3' cDNA zawierającego, odpowiednio na końcu 5' lub 3', sekwencję oligonukleotydu SMART. Dzięki temu w reakcji RACE-PCR wykorzystuje się uniwersalny zestaw starterów – Universal Primer Mix A (UPM) hybrydujący z sekwencją SMART oraz starter genowo specyficzny (ang. GSP1, Gene Specific Primer 1). Dla zwiększenia specyficzności reakcji przeprowadza się drugą rundę RACE-PCR z wewnętrznym starterem genowo specyficznym (ang. GSP2, Gene Specific Primer 2) oraz z wewnętrznym starterem uniwersalnymi – Nested Universal Primer A (NUP) hybrydującym z wewnętrzną sekwencją oligonukleotydu SMART.

4.12.1. Synteza 5'-RACE-Ready cDNA i 3'-RACE-Ready cDNA

Reakcje odwrotnej transkrypcji dla przygotowania 5'- i 3'-RACE-ready cDNA przeprowadzono na RNA całkowitym, wolnym od zanieczyszczeń genomowym DNA, izolowanym z plech męskich wytwarzających plemnie *Pellia endiviifolia* sp. B. Materiał roślinny pochodził z hodowli *in vitro* lub z terenu: Kopanina k. Poznania.

Do reakcji dodano:	5'RACE-ready cDNA	3'RACE-ready cDNA
	1µg całkowitego RNA	1µg całkowitego RNA
	1µl 5'-CDS Primer A	1µl 3'-CDS Primer A
	1µl oligont. SMART II™ A	

Zawartość próbek doprowadzono do końcowej objętości 5µl wodą wolną od RNaz, wymieszano delikatnie pipetując, zwirowano, po czym inkubowano w 65°C przez 2 min. Następnie próby schładzano na lodzie przez 2 min. zwirowano i schładzano na lodzie przez kolejne 2 min. Do każdej próbki dodano: 2µl 5x bufor dla odwrotnej transkryptazy, 1µl DTT (20mM), 1µl dNTP (10mM każdy) oraz 200U odwrotnej transkryptazy SuperScriptIII™ (Invitrogen). Zawartość próbek wymieszano delikatnie pipetując, krótko zwirowano i umieszczono w bloku grzejmym w temperaturze 37°C, po czym przestawiono temperaturę na 50°C. Po osiągnięciu temperatury 50°C, próbę inkubowano 1.5 godziny z lekkim mieszaniem, a następnie 10 min. w temperaturze 55°C. Reakcję zakończono przez inaktywację enzymu inkubując próbę 15 min. w 70°C. Po reakcji odwrotnej transkrypcji próby rozcieńczono przez dodanie do każdej z nich 100µl Tricine-EDTA.

4.12.2. Amplifikacja końców 5' i 3' cDNA w reakcji RACE-PCR

W celu amplifikacji końców 5' i 3' cDNA, przeprowadzono pierwszą rundę RACE-PCR. Przygotowano mieszaninę reakcyjną zawierającą: 2.5µl 10x bufor Advantage 2 PCR, 0.5µl dNTP [10mM każdy], 0.5µl 50x Advantage 2 DNA Polymerase Mix, 2.5µl startera uniwersalnego UPM, 0.5µl startera genowo specyficznego 1 (ang. GSP1, Gene Specific Primer 1) w kierunku 5' lub 3' [10µM], 1.25µl matrycy 5'-RACE- lub 3'-RACE-Ready cDNA, 17.25µl sterylnej wody. Pierwszą rundę reakcji przeprowadzono według programu RACE:

Denaturacja		95°C	5 min
Amplifikacja 5 cykli	Denaturacja	94°C	30 s
	Hybrydyzacja i elongacja	72°C	3 min
Amplifikacja 5 cykli	Denaturacja	94°C	30 s
	Hybrydyzacja	70°C	30 s
	Elongacja	72°C	3 min
Amplifikacja 25 cykli	Denaturacja	94°C	30 s
	Hybrydyzacja	68°C	30 s
	Elongacja	72°C	3 min
Elongacja		72°C	10 min
Schłodzenie prób		4°C	-

10µl każdej reakcji sprawdzano podczas elektroforezy w 1.5% żelu agarozowym. 1µl reakcji rozcieńczono przez dodanie 49µl buforu Tricine-EDTA, po czym przeprowadzono drugą rundę RACE-PCR. Przygotowano mieszaninę reakcyjną zawierającą: 2.5µl 10x bufor Advantage 2 PCR, 0.5µl dNTP [10mM każdy], 0.5µl 50x Advantage 2 DNA Polymerase Mix, 0.5µl wewnętrznego startera uniwersalnego NUP, 0.5µl wewnętrznego startera genowo

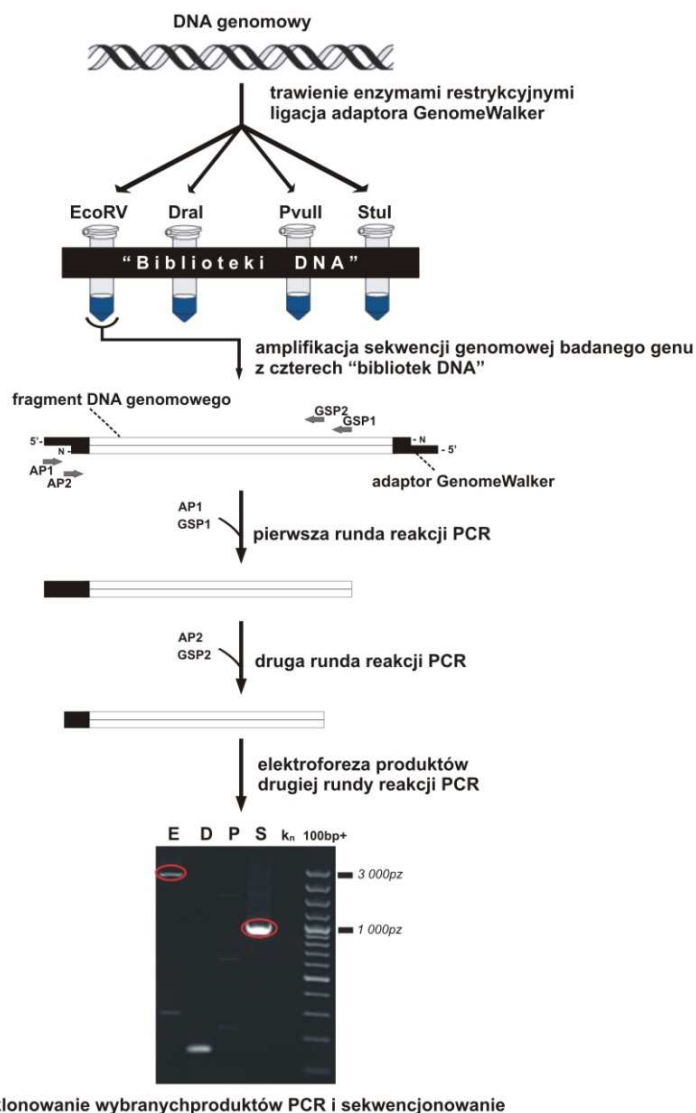
specyficznego 2 (ang. GSP2, Gene Specific Primer 2) w kierunku 5' lub 3' [10µM], 1.25µl matrycy będącej rozcieńczonym produktem pierwszej reakcji RACE-PCR, 19.25µl sterylnej wody. Drugą rundę reakcji przeprowadzano według programu NRACE:

Denaturacja		95°C	5 min
Amplifikacja 25 cykli	Denaturacja	94°C	30 s
	Hybrydyzacja	68°C	30 s
	Elongacja	72°C	3 min
Elongacja		72°C	10 min
Schłodzenie prób		4°C	-

10µl każdej reakcji sprawdzano podczas elektroforezy w 1.5% żelu agarozowym. Produkty drugiej rundy RACE-PCR klonowano bezpośrednio lub po elucji DNA z żelu agarozowego jak w punktach 4.6 – 4.8 (METODY) oraz sekwencjonowano (METODY, punkt 4.9).

4.13. Charakterystyka pełnej sekwencji genomowej wyselekcjonowanych genów w eksperymencie RDA-cDNA metodą „spacer po genomie” za pomocą zestawu GenomeWalker™ Universal Kit firmy Clontech

W celu poznania pełnej sekwencji genomowej fragmentów genów wyselekcjonowanych metodą RDA-cDNA wykorzystano zestaw GenomeWalker™ Universal Kit firmy Clontech. Metoda „spacer po genomie” umożliwia poznanie sekwencji genomowej znajdującej się powyżej oraz poniżej znanego fragmentu DNA. W pierwszym etapie DNA genomowy poddaje się trawieniu restrykcyjnemu czterema enzymami rozpoznającymi sześci nukleotydowe sekwencje w DNA, generującymi tępe końce. Takie sekwencje występują stosunkowo często w genomie, dlatego też DNA jest pocięty na fragmenty, które mogą ulegać amplifikacji w reakcji PCR. Następnie do każdego zestawu fragmentów restrykcyjnych dołącza się uniwersalny adaptor (GenomeWalker Adaptor) na obu ich końcach. Tak uzyskane fragmenty DNA tworzą tak zwane „biblioteki DNA”, stanowiące matryce w reakcjach PCR. W pierwszej reakcji PCR wykorzystuje się zewnętrzny starter uniwersalny (AP1) oraz starter genomowo specyficzny (GSP1), w drugiej reakcji PCR wykorzystuje się wewnętrzny starter uniwersalny (AP2) oraz wewnętrzny starter genomowo specyficzny (GSP2). Zarówno starter AP1, jak i AP2 są komplementarne do sekwencji adaptora dołączonego do fragmentów restrykcyjnych DNA. Mechanizm metody „spacer po genomie” przedstawia schemat 4-5.



Schemat 4-5. Przebieg postępowania w eksperymencie „spacer po chromosomie”. GSP1 i GSP2 (ang. Gene Specific Primer) – startery genowo specyficzne 1 i 2, AP1 I AP2 – startery uniwersalne komplementarne do sekwencji adaptora Genome Walker (Clontech, zmod.).

4.13.1. Przygotowanie „bibliotek DNA”

W czterech próbkach typu eppendorf połączono: 2.5µg DNA genomowego, 80U enzymu restrykcyjnego EcoRV/DraI/PvuII/StuI, 10µl 10x bufor dla EcoRV/DraI/PvuII/StuI, wodę sterylną do końcowej objętości 100µl. Całość wymieszano delikatnie pipetując, krótko zwirowano i inkubowano w 37°C przez 2 godziny. Po upływie tego czasu próby ponownie wymieszano delikatnie pipetując, zwirowano i inkubowano w 37°C przez 16 godzin. 5µl z każdej reakcji trawienia sprawdzono poprzez elektroforezę w 0,8% żelu agarozowym. Pozostałą objętość reakcji ekstrahowano 1 objętością fenolu, zwirowano 30 s przy 18 000g w temperaturze pokojowej. Fazy wodne przeniesiono do nowych próbek i ekstrahowano 1 objętością chloroformu, wirowano jw. Fazy wodne przeniesiono do nowych próbek i dodano 2 objętości zimnego 96% etanolu, 0.1 objętość 3M octanu sodu pH 5.0 oraz 20µg glikogenu. DNA wytrącano przez 5 godzin w temperaturze -20°C, po czym zwirowano 30

min. 18 000g w 4°C. Osady DNA przemyto dwukrotnie 100µl zimnego 80% etanolu, za każdym razem wirując 5 min, 18 000g w 4°C. Osady suszono ok. 5 min. w temperaturze pokojowej, rozpuszczono w 20µl buforu TE. Następnie 4µl, z każdej próbki z potrawionym DNA, przeniesiono do nowych probówek, po czym dodano: 1.9µl adaptora GenomeWalker, 1,6µl 10x bufor dla ligazy, 3U ligazy DNA T4. Całość wymieszano delikatnie pipetując, zwirowano impuls, inkubowano 16 godzin w temperaturze 16°C. W celu inaktywacji enzymu próby umieszczono na 5 min w 70°C, po czym dodano 72µl buforu TE. Każdą z „bibliotek DNA” opisano odpowiednio: E (EcoRV), D (DraI), P (PvuII), S (StuI).

4.13.2. Amplifikacja pełnej sekwencji genomowej badanych genów w reakcji

GenomeWalking-PCR

W celu amplifikacji sekwencji genomowej badanych genów, przygotowano mieszaniny reakcyjne zawierające: 1.5µl matrycy „bibliotek DNA” (E, D, P, S), 2.5µl 10x bufor dla polimerazy DyNAzyme™ EXT, 0.5µl dNTP [10mM każdy], 0.5µl startera uniwersalnego AP1 [10µM], 0.5µl startera genowo specyficznego w kierunku powyżej lub poniżej znanej sekwencji [10µM], 0.75U polimerazy DyNAzyme™ EXT, wodę sterylną do końcowej objętości 25µl. Pierwszą reakcję amplifikacji przeprowadzano według programu GW:

Denaturacja		95°C	5 min
Amplifikacja 7 cykli	Denaturacja	94°C	25 s
	Hybrydyzacja i elongacja	72°C	3 min
Amplifikacja 32 cykle	Denaturacja	94°C	25 s
	Hybrydyzacja i elongacja	67°C	3 min
Elongacja		67°C	10 min
Schłodzenie prób		4°C	-

10µl z każdej reakcji sprawdzano podczas elektroforezy w 1.5% żelu agarozowym. 1µl każdej próby rozcieńczono dodając 49µl sterylnej wody. Dla przeprowadzenia drugiej reakcji amplifikacji przygotowano mieszaninę reakcyjną: 1.5µl matrycy będącej dziesięciokrotnym rozcieńczeniem produktów pierwszej reakcji PCR, 2.5µl 10x bufor dla polimerazy DyNAzyme™ EXT, 0.5µl dNTP [10mM każdy], 0.5µl startera uniwersalnego AP2 [10µM], 0.5µl wewnętrznego startera genowo specyficznego w kierunku powyżej lub poniżej znanej sekwencji [10µM], 0.75U polimerazy DyNAzyme™ EXT, wodę sterylną do końcowej objętości 25µl. Drugą reakcję amplifikacji przeprowadzano według programu NGW:

Denaturacja		95°C	5 min
Amplifikacja 5 cykli	Denaturacja	94°C	25 s
	Hybrydyzacja i elongacja	72°C	3 min
Amplifikacja 20 cykli	Denaturacja	94°C	25 s
	Hybrydyzacja i elongacja	67°C	3 min
Elongacja		67°C	10 min
Schłodzenie prób		4°C	-

10µl z każdej reakcji sprawdzano podczas elektroforezy w 1.5% żelu agarozowym. Produkty drugiej rundy GenomeWalking-PCR klonowano bezpośrednio lub po elucji DNA z żelu agarozowego jak w punktach 4.6 – 4.8 (METODY) oraz sekwencjonowano (METODY, punkt 4.9).

4.14. Amplifikacja pełnej długości cDNA i genu

W celu sprawdzenia, czy fragmenty cDNA i DNA amplifikowane w eksperymentach RACE oraz „spacer po genomie” pochodzą z jednego transkryptu lub locus przeprowadzono reakcję PCR, w której amplifikowano pełnej długości sekwencje badanych cDNA i genów. Pojedyncza mieszanina reakcyjna zawierała: 2.5µl DyNAzyme™ EXT Buffer, 0.5µl dNTP (10mM każdy), 1.5U polimerazy DyNAzyme™ EXT DNA Polymerase, po 1.25µl startera w kierunku 5' i w kierunku 3' [10µM każdy], 20ng matrycy DNA genomowy lub 1µl matrycy cDNA, sterylną wodę do objętości końcowej 25µl. Amplifikację przeprowadzano według programu AMP:

Denaturacja		95°C	5 min.
Amplifikacja 30 cykli	Denaturacja	94°C	1 min.
	Hybrydyzacja	60/61/62/63°C	1 min.
	Elongacja	72°C	3 min.
Elongacja		72°C	10 min.
Schłodzenie prób		4°C	-

10µl każdej reakcji sprawdzano podczas elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym.

4.15. Metody bioinformatyczne – analiza produktów sekwencjonowania

Sekwencje uzyskane w wyniku reakcji sekwencjonowania poddano analizom bioinformatycznym z wykorzystaniem poniższych programów.

Sekwencje edytowano i składano w kontigi za pomocą programu ContigExpress będącego częścią pakietu Vector NTI 10.3.0 firmy Invitrogen.

Podobieństwo ze znanymi sekwencjami nukleotydowymi i białkowymi określano za pomocą zestawu programów blast dostępnych na stronie internetowej NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) oraz programu RepeatMasker dostępnego na stronie <http://repeatmasker.org>.

Doświadczenia przeprowadzone technikami RACE i „spacer po genomie” umożliwiły poznanie sekwencji cDNA i genomowych wyselekcjonowanych genów. Dzięki sekwencjom cDNA możliwe było określenie prawdopodobnych sekwencji aminokwasowych białek kodowanych przez zidentyfikowane geny za pomocą programu TranslateTool (<http://expasy.ch/tools/dna.html>) dostępnym na serwerze ExPASy (<http://expasy.ch/>).

Zastosowanie programu FGENESH (Salamov i Solovyev, 2000) (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenes&group=programs&subgroup=gfind>) dostępnego na serwerze SoftBerry (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) umożliwiło określenie struktury egzonowo – intronowej zidentyfikowanych genów oraz potencjalnych sygnałów poliadenylacji. Genomowe sekwencje genów *P.endiviifolia* sp B analizowano względem sekwencji *Arabidopsis*, roślin jednoliściennych, motylkowych, ziemniaka oraz glonu *Chlamydomonas*.

Procentową zawartość poszczególnych nukleotydów w sekwencjach genomowych i cDNA określono za pomocą programu EditSeq, będącego częścią pakietu DNASTAR Lasergene8.

W celu określenia stopnia podobieństwa sekwencji aminokwasowych potencjalnych białek kodowanych przez wyselekcjonowane geny posłużono się programem CLUSTALW2 na serwerze EBI (European Bioinformatics Institute) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>), stosując ustawienia standardowe. Dane następnie eksportowano za pomocą programu Jalview do formatu FASTA, a wizualizację różnic w poszczególnych porównaniach sekwencji przeprowadzono przy zastosowaniu programu BOXSHADE 3.21 (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

Poszukiwania specyficznych motywów białkowych prowadzono za pomocą programu MotifScan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) (Pagni i in. 2004), InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>) oraz SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) (Schultz i in. 1998).

Poszukiwania sygnałów kierowania białek do poszczególnych przedziałów komórki przeprowadzono dzięki programom PSORT (Nakai i Kanehisa 1991) (<http://psort.imsekundutokyo.ac.jp/form.html>), TargetP 1.1 (<http://www.cbsekunddtu.dk/services/TargetP/>) (Emanuelsson i in. 2000), (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Bendtsen i in. 2004) oraz ProtComp (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=protcomppl&group=programs&subgroup=proloc>).

Właściwości fizykochemiczne przewidywanych białek określono za pomocą programu ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) (Gasteiger i in. 2005).

5. WYNIKI

5.1. *Identyfikacja fragmentów DNA specyficznych dla DNA genomowego męskiego i żeńskiego *Pellia endiviifolia* sp B*

5.1.1. RDA – różnicowa analiza genomowa

Obecnie nie ma żadnych danych molekularnych na temat różnic w sekwencjach genomowych między osobnikami męskimi i żeńskimi wątrobowca *P.endiviifolia* sp B. W celu sprawdzenia, czy różnice w obrazach chromosomów metafazowych izolowanych z gametofitów męskich i żeńskich *P.endiviifolia* sp B świadczą o rzeczywistych różnicach w składzie sekwencji genomowych wykorzystano metodę RDA, która łączy w sobie technikę różnicowej hybrydyzacji z reakcją PCR. Eksperyment typu RDA umożliwia amplifikację fragmentów DNA, które są obecne w jednej puli DNA (np. DNA genomowym gametofitu męskiego *P.endiviifolia* sp B) zwanej pulą testowaną (ang. *tester*), a nie występują w drugiej puli DNA (np. DNA genomowym gametofitu żeńskiego *P.endiviifolia* sp B) zwanej pulą eliminującą (ang. *driver*). Kolejne etapy postępowania w technice różnicowej analizy genomowej przedstawiono w rozdziale METODY (pkt 4.4).

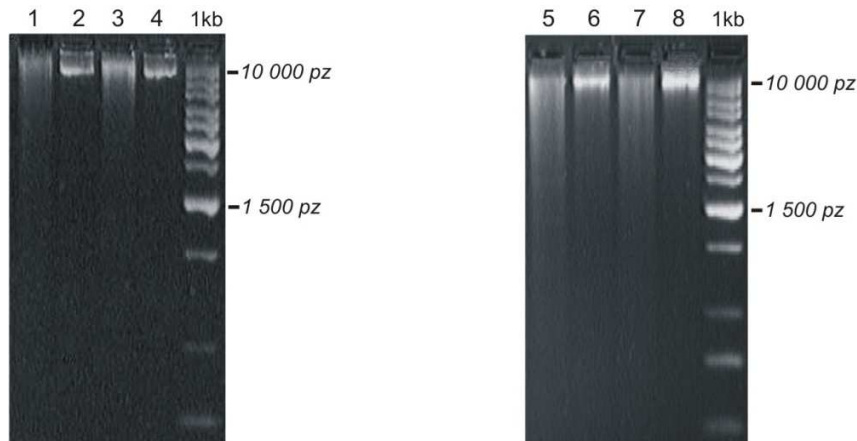
Pierwszym krokiem w celu uzyskania fragmentów specyficznych dla DNA genomowego męskiego i żeńskiego była izolacja DNA genomowego z plech męskich i żeńskich *P.endiviifolia* sp B hodowanych *in vitro*, przy wykorzystaniu zestawu DNeasy Plant Maxi Kit firmy QIAGEN®. Jakość i ilość DNA określono za pomocą pomiaru absorbancji na spektrofotometrze NanoDrop® ND.

	Stężenie [ng/μl]	260/280	260/230
DNA genomowy ♀	81.41	1.78	1.63
DNA genomowy ♂	67.88	1.76	1.55

Mimo, iż stosunek absorbancji 260/230 nie mieścił się w przedziale świadczącym o czystości preparatu DNA (1.8 – 2.2), izolaty wykorzystane zostały do następnych etapów eksperymentu. Plechy wątrobowców bogate są w różnego typu związki polifenolowe, bądź pochodne cukrowcowe, których część współizoluje się z DNA, co odzwierciedlone jest w zaniżonym stosunku absorbancji 260/230. Nie przeszkadzają one jednak w stosowanych metodach biologii molekularnej.

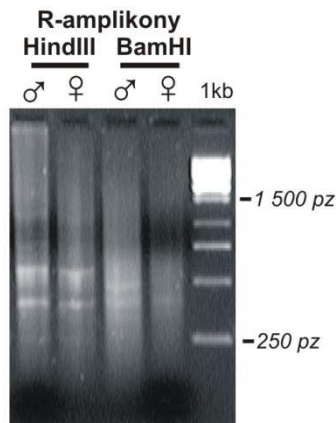
Uzyskany DNA genomowy z plech męskich i żeńskich poddano trawieniu restrykcyjnemu enzymami HindIII lub BamHI, po 2μg w każdym trawieniu. Wykorzystanie w celu trawienia DNA różnych enzymów zapewnia utworzenie kilku rodzajów tzw. „reprezentacji” badanego genomu. Jako kontrole reakcji zastosowano DNA genomowy z mieszaniną reakcyjną bez

dodania enzymów restrykcyjnych. Produkty trawienia (~300ng) sprawdzono poprzez elektroforezę w 1.5% żelu agarozowym (zdj. 5-1).



Zdjęcie 5-1. Rozdział elektroforetyczny w 1.5% agarozie produktów trawienia DNA genomowego wątrobowca *P.endiviifolia* sp B. Ścieżki 1, 3 – DNA męski trawiony odpowiednio HindIII lub BamHI. Ścieżki 2, 4 – DNA męski nietrawiony. Ścieżki 5, 7 – DNA żeński trawiony odpowiednio HindIII lub BamHI. Ścieżki 6, 8 – DNA żeński nietrawiony.

Następnie do oczyszczonych fragmentów restrykcyjnych DNA dołączono specyficzne 24-nt R-adaptory. Dla każdej puli fragmentów przeprowadzono szereg reakcji PCR z wykorzystaniem 24-nt R-adaptorów jako starterów w celu uzyskania wystarczającej ilości amplikonów do przeprowadzenia kolejnych rund różnicowej hybrydyzacji. Oczyszczone produkty amplifikacji sprawdzono przeprowadzając elektroforezę ~2µg R-amplikonów w 1.5% żelu agarozowym (zdj. 5-2).



Zdjęcie 5-2. Rozdział elektroforetyczny w 1.5% agarozie oczyszczonych R-amplikonów DNA genomowego męskiego i żeńskiego *P.endiviifolia* sp B.

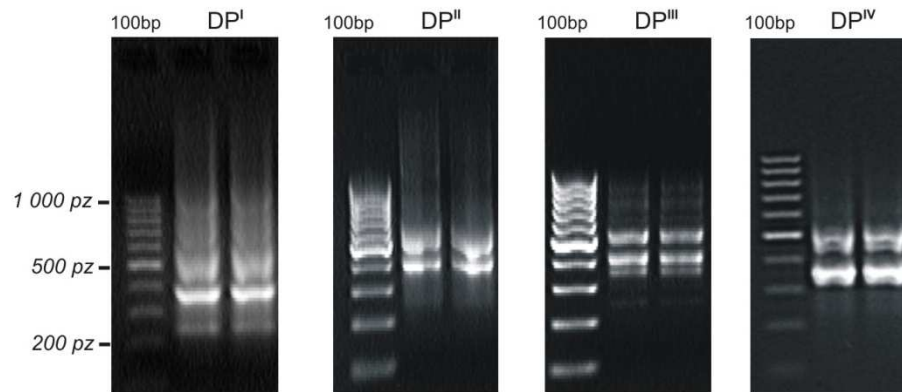
W rezultacie uzyskano ~650µg R-HindIII♀ amplikonów, ~630µg R-HindIII♂ amplikonów, ~460µg R-BamHI♀ amplikonów, ~680µg R-BamHI♂ amplikonów. Kolejne rundy różnicowej hybrydyzacji genomowej przeprowadzono w czterech badanych układach:

	Fragmenty testowane	Fragmenty eliminujące
1.	♀ amplikony BamHI	♂ amplikony BamHI
2.	♂ amplikony BamHI	♀ amplikony BamHI
3.	♀ amplikony HindIII	♂ amplikony HindIII
4.	♂ amplikony HindIII	♀ amplikony HindIII

Dla każdego układu przeprowadzono cztery rundy różnicowej hybrydyzacji DNA przy wzrastających stosunkach ilościowych biblioteki fragmentów testowanych względem biblioteki fragmentów eliminujących:

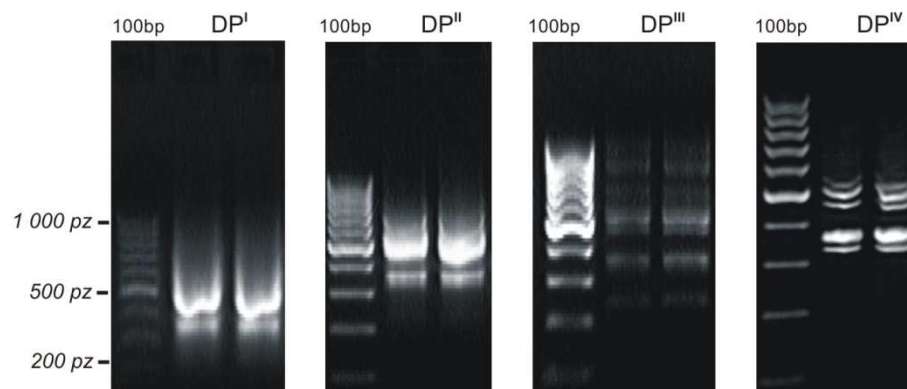
- I runda - 1:100 BamHI, HindIII,
- II runda - 1:800 BamHI, 1:400 HindIII,
- III runda - 1:400 000 BamHI, 1:100 000 HindIII,
- IV runda - 1:400 000 BamHI, 1:8 000 000 HindIII.

Ponadto w każdej z rund do puli fragmentów testowanych dołączano nowe adaptory, zanim pula ta została zmieszana z nadmiarem fragmentów eliminujących. Kolejne rundy hybrydyzacyjne (I - IV) wyodrębniły różne zestawy fragmentów DNA dla każdego badanego układu. W przypadku gdy fragmenty testowane stanowiły żeńskie amplicony BamHI otrzymano produkty różnicowe DP^{IV} długości w zakresie ~300 – 500pz (zdjęcie 5-3).



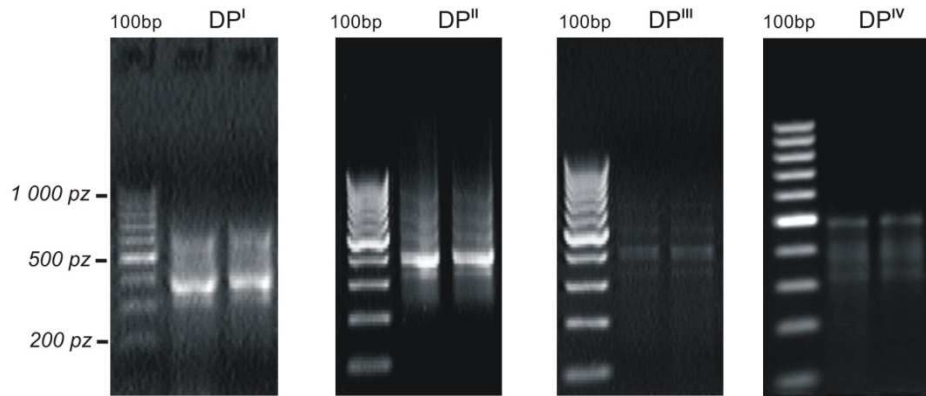
Zdjęcie 5-3. Rozdział elektroforetyczny w 1.5% agarozie produktów różnicowych PCR po każdej z czterech rund różnicowej hybrydyzacji (DP^I - DP^{IV}); fragmenty testowane stanowiły żeńskie amplicony BamHI.

W przypadku gdy fragmenty testowane stanowiły męskie amplicony BamHI otrzymano produkty różnicowe DP^{IV} długości w zakresie ~300 – 600pz (zdjęcie 5-4).



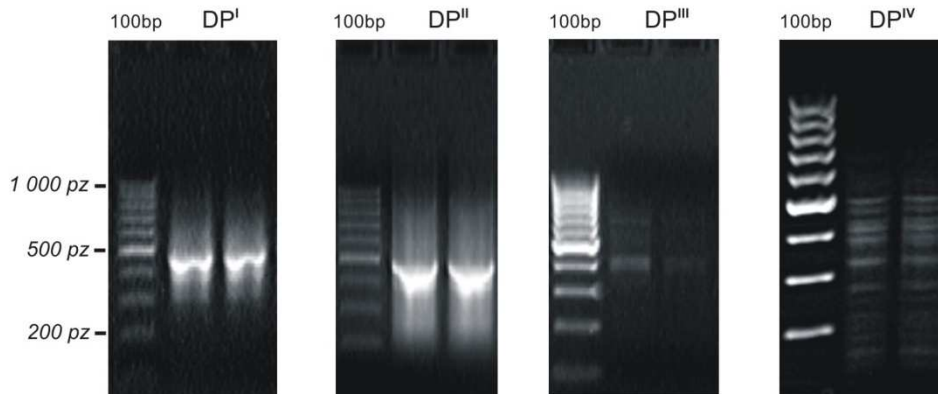
Zdjęcie 5-4. Rozdział elektroforetyczny w 1.5% agarozie produktów różnicowych PCR po każdej z czterech rund różnicowej hybrydyzacji (DP^I - DP^{IV}); fragmenty testowane stanowiły męskie amplicony BamHI.

W przypadku gdy fragmenty testowane stanowiły żeńskie amplicony HindIII otrzymano produkty różnicowe DP^{IV} długości w zakresie ~300 – 500pz (zdjęcie 5-5).



Zdjęcie 5-5. Rozdział elektroforetyczny w 1.5% agarozie produktów różnicowych PCR po każdej z czterech rund różnicowej hybrydacji (DP^I - DP^{IV}); fragmenty testowane stanowiły żeńskie amplikony HindIII.

W przypadku gdy fragmenty testowane stanowiły męskie amplikony HindIII otrzymano produkty różnicowe DP^{IV} długości w zakresie ~150 – 500pz (zdjęcie 5-6).



Zdjęcie 5-6. Rozdział elektroforetyczny w 1.5% agarozie produktów różnicowych PCR po każdej z czterech rund różnicowej hybrydacji (DP^I - DP^{IV}); fragmenty testowane stanowiły męskie amplikony HindIII.

Uzyskane fragmenty DNA stanowiące produkty różnicowe DP^{IV} dla fragmentów testowanych żeńskich i męskich amplikonów BamHI wyizolowano z żeli za pomocą zestawu firmy Qiagen, wklonowano do wektora pGEM-TEasy (Promega) i poddano reakcji sekwencjonowania. Produkty różnicowe dla fragmentów testowanych żeńskich i męskich amplikonów HindIII klonowano do wektora, a następnie poddano reakcji sekwencjonowania.

W wyniku reakcji sekwencjonowania otrzymano 33 indywidualne sekwencje DNA:

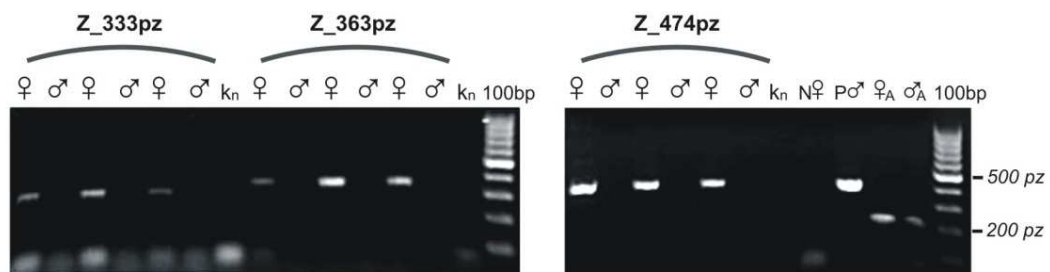
- 6 sekwencji produktów DP^{IV} dla układu, w którym fragmentami testowanymi były żeńskie amplikony BamHI;
- 10 sekwencji produktów DP^{IV} dla układu, w którym fragmentami testowanymi były męskie amplikony BamHI;
- 7 sekwencji produktów DP^{IV} dla układu, w którym fragmentami testowanymi były żeńskie amplikony BamHI;
- 10 sekwencji produktów DP^{IV} dla układu, w którym fragmentami testowanymi były męskie amplikony BamHI.

5.1.2. Identyfikacja fragmentów DNA specyficznych dla DNA testowanego metodą PCR

Na podstawie sekwencji produktów różnicowych DP^{IV} zaprojektowano 33 pary starterów, które wykorzystano w celu identyfikacji fragmentów DNA specyficznych dla DNA genomowego żeńskiego i męskiego *P.endiviifolia* sp B metodą PCR (METODY, pkt 4.10). Reakcje PCR przeprowadzono na matrycach DNA genomowych izolowanych z plech żeńskich i męskich *P.endiviifolia* sp B z hodowli *in vitro*. Jako kontrolę pozytywną reakcji PCR na DNA genomowym *P.endiviifolia* sp B wykorzystano startery RTAKTF+RTAKTR amplifikujące fragment aktyny1 długości 197pz *Pellia endiviifolia* sp B.

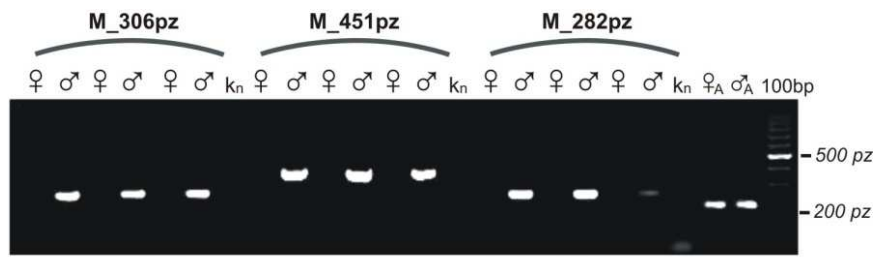
W przypadku reakcji PCR z zastosowaniem starterów zaprojektowanych na podstawie sekwencji produktów różnicowych DP^{IV} uzyskanych przy zastosowaniu żeńskich i męskich amplikonów HindIII nie zidentyfikowano fragmentów DNA specyficznych dla DNA genomowego żeńskiego i męskiego – produkty amplifikacji otrzymano dla każdej z par starterów zarówno na matrycy DNA genomowym żeńskim jak i męskim.

W wyniku reakcji PCR z wykorzystaniem starterów zaprojektowanych na podstawie sekwencji produktów różnicowych DP^{IV} uzyskanych przy zastosowaniu amplikonów BamHI otrzymano specyficzną amplifikację na matrycy DNA genomowy żeński *P.endiviifolia* sp B dla 3 par starterów (zdj. 5-7) zaprojektowanych na podstawie sekwencji: Z_333pz, Z_363pz, Z_474pz. Jako kontrolę pozytywną reakcji na DNA genomowym z plech męskich zastosowano startery amplifikujące męsko specyficzny fragment DNA M_462pz (patrz str.77).

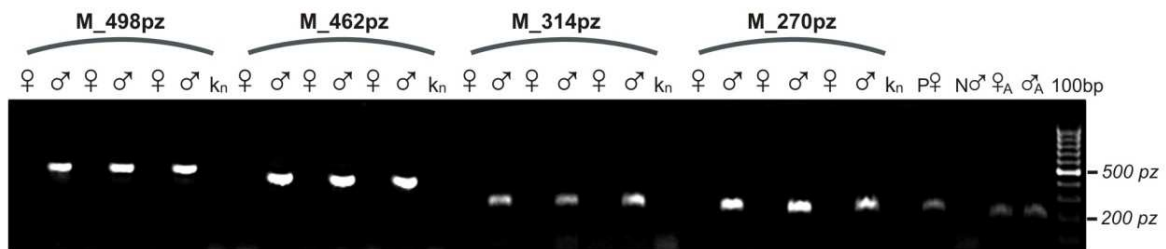


Zdjęcie 5-7. Rozdział elektroforetyczny w 1.5% agarozie produktów PCR na matrycy DNA genomowy żeński i męski *P.endiviifolia* sp B z wykorzystaniem starterów zaprojektowanych na podstawie sekwencji fragmentów: Z_333pz, Z_363pz, Z_474pz. Ścieżki ♀ - matryca DNA genomowy żeński; ścieżki ♂ - matryca DNA genomowy męski; N♀ - kontrola negatywna dla DNA genomowego żeńskiego, reakcja PCR z wykorzystaniem starterów dla fragmentu M_462pz; P♂ - kontrola pozytywna dla DNA genomowego męskiego, reakcja PCR z wykorzystaniem starterów dla fragmentu M_462pz; ♀_A, ♂_A - kontrole pozytywne dla DNA genomowego *P.endiviifolia* sp B, reakcja PCR z wykorzystaniem starterów amplifikujących fragment aktyny1; kn - kontrola negatywna dla poszczególnych par starterów (bez matrycy).

Ponadto otrzymano również specyficzną amplifikację na matrycy DNA genomowy męski *P.endiviifolia* sp B dla 7 par starterów (zdj. 5-8, 5-9) zaprojektowanych na podstawie sekwencji: M_306pz, M_451pz, M_282pz, M_498pz, M_462pz, M_314pz, M_270pz. Jako kontrolę pozytywną reakcji na DNA genomowym z plech żeńskich zastosowano startery amplifikujące żeńsko specyficzny fragment DNA Z_474pz (zdj. 5-7).

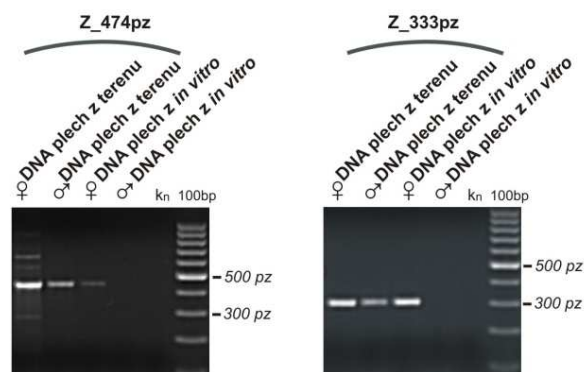


Zdjęcie 5-8. Rozdział elektroforetyczny w 1.5% agarozie produktów PCR na matrycy DNA genomowy żeński i męski *P.endiviifolia* sp B z wykorzystaniem starterów zaprojektowanych na podstawie sekwencji fragmentów: M_306pz, M_451pz, M_282pz. Ścieżki ♀- matryca DNA genomowy żeński; ścieżki ♂ - matryca DNA genomowy męski; ♀_A, ♂_A - kontrole pozytywne dla DNA genomowego *P.endiviifolia* sp B, reakcja PCR z wykorzystaniem starterów amplifikujących fragment aktyny1; kn - kontrola negatywna dla poszczególnych par starterów (bez matrycy).

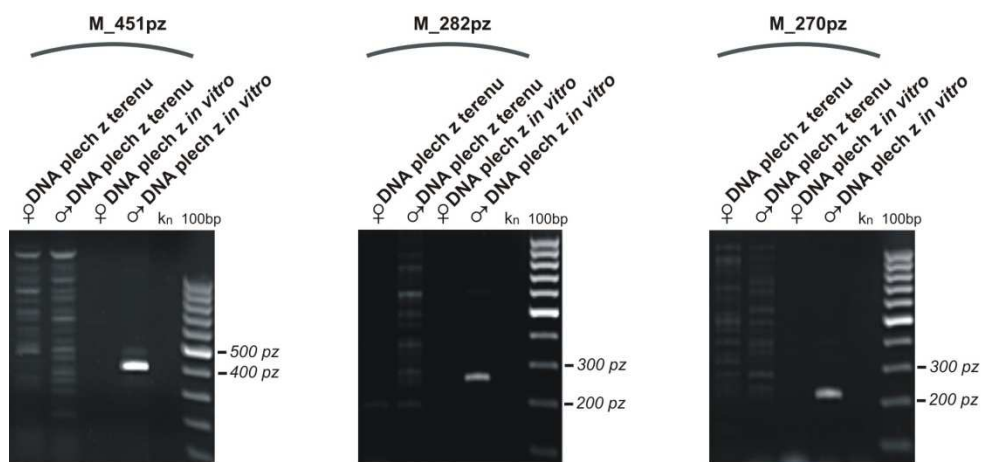


Zdjęcie 5-9. Rozdział elektroforetyczny w 1.5% agarozie produktów PCR na matrycy DNA genomowy żeński i męski *P.endiviifolia* sp B z wykorzystaniem starterów zaprojektowanych na podstawie sekwencji fragmentów: M_498pz, M_462pz, M_314pz, M_270pz. Ścieżki ♀- matryca DNA genomowy żeński; ścieżki ♂ - matryca DNA genomowy męski; P♀ - kontrola pozytywna dla DNA genomowego żeńskiego, reakcja PCR z wykorzystaniem starterów dla fragmentu Z_474pz; N♂ - kontrola negatywna dla DNA genomowego męskiego, reakcja PCR z wykorzystaniem starterów dla fragmentu Z_474pz; ♀_A, ♂_A - kontrole pozytywne dla DNA genomowego *P.endiviifolia* sp B, reakcja PCR z wykorzystaniem starterów amplifikujących fragment aktyny1; kn - kontrola negatywna dla poszczególnych par starterów (bez matrycy).

W celu sprawdzenia, czy uzyskane sekwencje będą również amplifikowane specyficznie na matrycach DNA z plech naturalnie rosnących w terenie *P.endiviifolia* sp B, przeprowadzono dodatkowo szereg reakcji PCR na DNA genomowym izolowanym z plech męskich i żeńskich zebranych z terenu (Kopanina k. Poznania). W reakcjach wykorzystano pary starterów dające odpowiednio specyficzne produkty amplifikacji na DNA genomowym męskim lub żeńskim z plech *P.endiviifolia* sp B hodowanych *in vitro*. Niestety w przypadku reakcji PCR na DNA pochodzącym z plech z terenu uzyskano produkty zarówno na matrycy DNA genomowy męski i żeński z plech z terenu (jak pokazano przykładowo w przypadku fragmentów Z_333 i Z_474, zdj. 5-10), bądź uzyskano szereg niespecyficznych produktów reakcji PCR (jak pokazano przykładowo w przypadku fragmentów M_451, M_282, M_270, zdj. 5-11).



Zdjęcie 5-10. Rozdział elektroforetyczny w 1.5% agarozie produktów PCR na matrycach DNA genomu żeńskiego i męskiego *P. endiviifolia* sp B z plech zebranych z terenu oraz DNA genomu żeńskiego i męskiego z plech hodowanych *in vitro* z wykorzystaniem starterów zaprojektowanych na podstawie sekwencji fragmentów: Z_474pz, Z_333pz. Ścieżki kn - kontrola negatywna dla poszczególnych par starterów (bez matrycy).



Zdjęcie 5-11. Rozdział elektroforetyczny w 1.5% agarozie produktów PCR na matrycach DNA genomu żeńskiego i męskiego *P. endiviifolia* sp B z plech zebranych z terenu oraz DNA genomu żeńskiego i męskiego z plech hodowanych *in vitro* z wykorzystaniem starterów zaprojektowanych na podstawie sekwencji fragmentów: M_451pz, M_282pz, M_270pz. Ścieżki kn - kontrola negatywna dla poszczególnych par starterów (bez matrycy).

5.1.3. Analiza bioinformatyczna sekwencji fragmentów DNA specyficznych dla

DNA genomowego żeńskiego i męskiego *P. endiviifolia* sp B hodowanej *in vitro*

Fragmenty DNA ulegające specyficznej amplifikacji na DNA genomowym żeńskim i męskim wątrobowca *P. endiviifolia* sp B hodowanego *in vitro* poddano analizom bioinformatycznym z wykorzystaniem zestawu programów blast dostępnych na stronie internetowej NCBI oraz programu RepeatMasker dostępnego na stronie <http://repeatmasker.org>.

- **Analiza sekwencji fragmentu DNA Z_333pz**

W wyniku eksperymentu RDA uzyskano sekwencję DNA długości 333nt:

```
GATCCTATTTGGAGGGAAAATAATGATATTGGTAGGAGGATTTTGACAAGTGTTGCCAATTTTGCAATTTGGGA
GTTGTACGGACATTATTCAAGCGAGTCTTAAGAGTTTCGATGATATGGTCACATGTCAAAGTGATGAAACTATAT
GAAAACATGCAAAATGAAGACGTTAGAAGGTAACATTATTGCAACGTAATATCAATTCTGACTTTTGCTCTTAA
GCGTGTAAGGTGGACAATTTGAGTGAGGTTGACTACTCCTAGGGTAAGCATGTATTGAACAACAAAATTTCAA
TAATTGCCCTTCTGAAAATAAGAGAGGGGAAGAGTGGATC
```

Analiza na poziomie nukleotydowym z wykorzystaniem algorytmu blastn nie wykazała znaczącego podobieństwa do znanych sekwencji nukleotydowych zdeponowanych w bazie

danych GenBank. Zastosowanie algorytmu blastx umożliwiło przetłumaczenie sekwencji nukleotydowej na sześć potencjalnych ramek odczytu oraz porównanie uzyskanych sekwencji aminokwasowych do sekwencji białkowych zdeponowanych w bazie danych GenBank. Wyniki tej analizy przedstawiono w tabeli 5-1, przy czym jako kryterium jakości dopasowania przyjęto najniższą wartość E-value.

Tabela 5-1. Wyniki analizy bioinformatycznej dla fragmentu DNA długości 333nt z wykorzystaniem algorytmu blastx. E-value = wartość E.

Fragment DNA Z_333pz			
blastx	Gene ID	%*	E-value
Hipotetyczne białko SORBIDRAFT_02g042016 <i>Sorghum bicolor</i>	gi 242051190 gb EER99860	44	2e-07
Hipotetyczne białko AP9_D05.1 <i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>petraea</i>	gi 169647206 gb ACA61624	43	3e-06
Hipotetyczna helikaza <i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 4585936 gb AAD25596	48	3e-06
Helikaza helitronu <i>Phytophthora infestans</i> T30-4	gi 9461885 gb EEY60735	42	4e-06

* procent podobieństwa analizowanej sekwencji względem sekwencji z bazy danych GenBank.

- **Analiza sekwencji fragmentów DNA Z_363pz, Z_474pz**

W wyniku eksperymentu RDA uzyskano sekwencję DNA długości 363nt:

GATCCAAATCACCTTATGGCTTGATAACGTAATGAATGAATATTTTTCTGACAAAAGTGTCTTAACTTCCATCAT
TCAGGGTTTTATGGTTAGAGTGTCTTGGAGGTGCATTTTTCCATGATAAAAATACAATGTTCAATGTGTGCAGAC
CCTTTATCCTTGAAGTTGCCACCGTGACTATCTATCTGCACGGTCAACGAAGGTCTATTTATTGGTGTGGAGAA
CAAACACACCACTAGTAGTACCTTGTGACCAATAGTAGAGAAAAATCCCTTTATCAAGATGACATAGAGAGA
AATGCCATGGAGGATTATGCAGCTAAGTCAAACCCATTGTGGACTGGCAATACCTTCCTTTGGATC

oraz sekwencję DNA o długości 474nt:

GATCCAAATGAGTGTTCTTACAAAACAACTCTCTCTCCTTGCACATGCCTCATTTGTCTCATGTAACCATCCAA
GTTGAGTTACAAAGGCTTTGGTGGATAGTGAGGTAAGAAACGCCTATGTGTGTTGCGCCCTCTCGCTTTGCTT
TCTTTTGTGATCTCCTCAACTATGGTAGTCAAGTTGTTTGTGCACCTACACGGGCTCCTCCTTTGCGCTCCCTT
CTGTGTAGTCCATCAACTCTTGGCTATTGAGGTCCTTGAACCTTCCGCTCCCGTCTCACACAACACACTCTTGG
ACTCCCAACTATCAATTTCAAAGTTTAGTGATTACAATTTGGCAATGAAGTTGTAATAATTCCTAGGGCTAT
CTAGTGTGCAGGAATTGAATGCTATTCTAAATAAGGATTGGCAAACCACCTTGGCATCCACGAGGGTATAA
ACTTTGTGCGAAACATCAAAATTGGATC

Analizy zarówno na poziomie nukleotydowym, jak i aminokwasowym z wykorzystaniem programów blast nie wykazały żadnego podobieństwa do znanych sekwencji nukleotydowych i białkowych zdeponowanych w bazie danych GenBank. Również zastosowanie programu RepeatMasker nie wskazało na obecność sekwencji repetytywnych w obrębie badanych sekwencji.

- **Analiza sekwencji fragmentu DNA M_451pz**

W wyniku eksperymentu RDA uzyskano sekwencję DNA długości 451nt:

GATCCACTGCCGCCTGCACAGGCAGTCAAGGTTAGCACTGATGAGTTGAAGCGGGCATTTCGATCTCGCTTCAG
AAGACGCGAACGGCCTGATAACGGCTGAGATCCGGCTCGATGGGAAGAATGAAGCCGGCGCATATGCCGGCCA
ATCTGCCCTCAAGCTTCTTTGCCTCTGGGGGGCAGGGTCAGAGAATTCGCCTCTCGACACCGATAGGCGAACTA
ACCGTACCTGCCGGTATGTTTCGCGAAGAGTGATCTGACTGGCGCGGAGGATGTCGAGCTGCCTGTCCGGCACCG
CCGATCTCTCGAGTCTGGACAGCAAGCTGAAGGAGAAGATTGGCAGCCATCCGGTCTGTTGAGCTGACCGCCAA
GGTCGGCGATACCGTCTCGCCTGGAACAATCCCGCGCTCCGGTACGGTGTCCGGTGAAGTACGCCCTTGCAC
AGGGTGAGGATC

Analiza na poziomie nukleotydowym z wykorzystaniem algorytmu blastn nie wykazała znaczącego podobieństwa do znanych sekwencji nukleotydowych zdeponowanych w bazie danych GenBank. Zastosowanie algorytmu blastx umożliwiło przetłumaczenie sekwencji nukleotydowej na sześć potencjalnych ramek odczytu oraz porównanie uzyskanych sekwencji aminokwasowych do sekwencji białkowych zdeponowanych w bazie danych GenBank. Wyniki tej analizy przedstawiono w tabeli 5-2, przy czym jako kryterium jakości dopasowania przyjęto najniższą wartość E-value.

Tabela 5-2. Wyniki analizy bioinformatycznej dla fragmentu DNA długości 451nt z wykorzystaniem algorytmu blastx. E-value = wartość E.

Fragment DNA M_451pz			
blastx	Gene ID	%*	E-value
Ksylanaza 5 <i>Paenibacillus</i> sp. W-61	gi 27227837 gb BAC45001	37	7e-16
Białko warstwy powierzchniowej <i>Paenibacillus</i> sp. JDR-2	gi 251798262 gb YP_003012993	36	6e-15
Endo-1,4-beta-ksylanaza <i>Paenibacillus</i> sp. JDR-2	gi 251794257 gb YP_003008988	35	4e-14

* procent podobieństwa analizowanej sekwencji względem sekwencji z bazy danych GenBank.

- **Analiza sekwencji fragmentu DNA M_282pz**

W wyniku eksperymentu RDA uzyskano sekwencję DNA długości 282nt:

GATCCATGATCATTCCGAGCGCTTCCACTACATTACGACGAACCCAATCGCTTGCATCGTTCAATGCGACA
 AATGAAGGAAGTGCAGGATGCCTTCGAGCCAATCATCCAAGCACGAACGCAGCGAGCGCTCTGCTGTTCT
 CTTCCCCTTGATCCAGTACATGAATAAGACCTGGAACAGCTTCTATGCCAGCAGCTTGAAGCCCCTAAGCCGCG
 CGCTGCGCCGTTAACTTGGAGCCTTCGCCAGCTCCTCAGCAATGCCGCCGTACCGGATC

Analiza na poziomie nukleotydowym z wykorzystaniem algorytmu blastn nie wykazała znaczącego podobieństwa do znanych sekwencji nukleotydowych zdeponowanych w bazie danych GenBank. Zastosowanie algorytmu blastx umożliwiło przetłumaczenie sekwencji nukleotydowej na sześć potencjalnych ramek odczytu oraz porównanie uzyskanych sekwencji aminokwasowych do sekwencji białkowych zdeponowanych w bazie danych GenBank. Wyniki tej analizy przedstawiono w tabeli 5-3, przy czym jako kryterium jakości dopasowania przyjęto najniższą wartość E-value.

Tabela 5-3. Wyniki analizy bioinformatycznej dla fragmentu DNA długości 282nt z wykorzystaniem algorytmu blastx. E-value = wartość E.

Fragment DNA M_282pz			
blastx	Gene ID	%*	E-value
Dioksygenaza fitynylo-CoA <i>Paenibacillus</i> sp. JDR-2	gi 251797225 gb YP_003011956	73	9e-32
Białko zawierające domenę HEAT <i>Geobacillus</i> sp. Y412MC10	gi 261406520 gb YP_003242761	50	4e-18
Białko zawierające domenę HEAT <i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843	gi 166363530 gb YP_001655803	42	7e-08

* procent podobieństwa analizowanej sekwencji względem sekwencji z bazy danych GenBank.

- **Analiza sekwencji fragmentu DNA M_462pz**

W wyniku eksperymentu RDA uzyskano sekwencję DNA długości 462nt:

GATCCATTGGACCAAGCATGCGGCTAATCCGATCTTTTCGCGCCGACCCTGCAAGCCGATGGGAGCAGCAGAAG
GTTACCGCGTGGCAGGTCGTCAAACACGACGACTGGTATGTCATGTTCTATATCGGATTCGAAGATGTGAATAC
GGCTCGTATCGGAATTGCCCGTTCACGCGACGGAACCGGCAGCTGGGAGCGGTTGCCGGTCAATCCCATTCTG
TCTCCCGGAAAGGCAAATGGGATGGGAAACATGCTATAAGCCTTTTCGCCATCTACGAAGGCGACCGCAATG
ACATTGACTGCTTTGGCAAATGTGCTTCAACAAAGTGGCAGCGAGTCACGAAATGAGTCATCTATCCGTAAG
GTGATTATTATGATTTGTTATCCCCTTACGCGAGAAGCCATTATCGGAAGCGAGTTGATGGCACGGCCTTTTCAT
TGGCTGGATGAGAATCTGGATC

Analiza na poziomie nukleotydowym z wykorzystaniem algorytmu blastn nie wykazała znaczącego podobieństwa do znanych sekwencji nukleotydowych zdeponowanych w bazie danych GenBank. Zastosowanie algorytmu blastx umożliwiło przetłumaczenie sekwencji nukleotydowej na sześć potencjalnych ramek odczytu oraz porównanie uzyskanych sekwencji aminokwasowych do sekwencji białkowych zdeponowanych w bazie danych GenBank. Wyniki tej analizy przedstawiono w tabeli 5-4, przy czym jako kryterium jakości dopasowania przyjęto najniższą wartość E-value.

Tabela 5-4. Wyniki analizy bioinformatycznej dla fragmentu DNA długości 462nt z wykorzystaniem algorytmu blastx. E-value = wartość E.

Fragment DNA M_462pz			
blastx	Gene ID	%*	E-value
Domniemana lipoproteina <i>Bacteroides fragilis</i> 638R	gi 301164242 gb CBW23800	61	1e-29
Hydrolaza glikozydowa rodzina 32 <i>Clostridium hathewayi</i> DSM 13479	gi 266624617 gb ZP_06117552	51	2e-23

* procent podobieństwa analizowanej sekwencji względem sekwencji z bazy danych GenBank.

- **Analiza sekwencji fragmentu DNA M_314pz**

W wyniku eksperymentu RDA uzyskano sekwencję DNA długości 314nt:

GATCCGTACGGATTGGTTGGATAAATTGGGACTGCAGGCGCCGAGAACGATGGACGATGTCCTGGCGATCTCG
AAGGCGTTTACAGAGCGGGACCCTGACGGCAACGGCCTAAAGGACACTTTCGGTCTCGCCATCACGAAGGACT
TGTGGGGAAGTGCAATGGGCTTAGAGGGGTTTCATGGCCGGCTACGGGGCTTATCCGAACATCTGGCTGCAGGA
CTCGTCCGGTAAGCTCGTATATGGCAGTGTTCAGCACGAAATGAAACAAGCGCTTCAGCGCTTCAAACGATG
TACAAAAACGGCGAGTTGGATC

Analiza na poziomie nukleotydowym z wykorzystaniem algorytmu blastn nie wykazała znaczącego podobieństwa do znanych sekwencji nukleotydowych zdeponowanych w bazie danych GenBank. Zastosowanie algorytmu blastx umożliwiło przetłumaczenie sekwencji nukleotydowej na sześć potencjalnych ramek odczytu oraz porównanie uzyskanych sekwencji aminokwasowych do sekwencji białkowych zdeponowanych w bazie danych GenBank. Wyniki tej analizy przedstawiono w tabeli 5-5, przy czym jako kryterium jakości dopasowania przyjęto najniższą wartość E-value.

Tabela 5-5. Wyniki analizy bioinformatycznej dla fragmentu DNA długości 314nt z wykorzystaniem algorytmu blastx. E-value = wartość E.

Fragment DNA M_314pz			
blastx	Gene ID	%*	E-value
pozakomórkowe białko wiążące substancje rozpuszczalne – rodzina1, <i>Geobacillus</i> sp.Y412MC10	gi 261407109 gb YP_003243350	72	1e-38
pozakomórkowe białko wiążące substancje rozpuszczalne – rodzina1, <i>Clostridium cellulolyticum</i> H10	gi 220928679 gb YP_002505588	65	1e-33

* procent podobieństwa analizowanej sekwencji względem sekwencji z bazy danych GenBank.

- **Analiza sekwencji fragmentu DNA M_270pz**

W wyniku eksperymentu RDA uzyskano sekwencję DNA długości 270nt:

GATCCCTACTTGCAGAAGATGAACGTGACCTTGGCTTCCGGCGACCTTCCGGACATCATTCCGGTCAATGCCAC
CCAGCTGAAGCAGCTGGCCGACTCGAACCAGATCGAGGATATGACGGATTGTACGAGAAGTACGCTTCTCCT
CTGCTCAAGGAAATCTCTCCGAGGAAGGTTCAAGGCCGTTTCGATGCCGCGACGTTTCGACGGAAGACTTATGG
CCATTCCGACAGCGGTTTCATCGATCGAACAAGCGCAGTTCATCTGGATC

Analiza na poziomie nukleotydowym z wykorzystaniem algorytmu blastn nie wykazała znaczącego podobieństwa do znanych sekwencji nukleotydowych zdeponowanych w bazie danych GenBank. Zastosowanie algorytmu blastx umożliwiło przetłumaczenie sekwencji nukleotydowej na sześć potencjalnych ramek odczytu oraz porównanie uzyskanych sekwencji aminokwasowych do sekwencji białkowych zdeponowanych w bazie danych GenBank. Wyniki tej analizy przedstawiono w tabeli 5-6, przy czym jako kryterium jakości dopasowania przyjęto najniższą wartość E-value.

Tabela 5-6. Wyniki analizy bioinformatycznej dla fragmentu DNA długości 270nt z wykorzystaniem algorytmu blastx. E-value = wartość E.

Fragment DNA M_270pz			
blastx	Gene ID	%*	E-value
pozakomórkowe białko wiążące substancje rozpuszczalne – rodzina1, <i>Paenibacillus</i> sp. JDR-2	gi 251798249 gb YP_003012980	56	2e-23
pozakomórkowe białko wiążące substancje rozpuszczalne – rodzina1, <i>Clostridium cellulolyticum</i> H10	gi 220928679 gb YP_002505588	56	1e-22

* procent podobieństwa analizowanej sekwencji względem sekwencji z bazy danych GenBank.

- **Analiza sekwencji fragmentów DNA M_306pz, M_498pz**

W wyniku eksperymentu RDA uzyskano sekwencję DNA długości 306nt:

GATCCGAAAAAGTACATTTACGACTTGTGGTCAGCGAAGATGGGCTTGAATACCATTCCGAATAAGCCAGTCA
CTTCTGGCCCTTCTTATTCTACTTGGACTGCGGCCACACTCGCTGTAGCCGTGTCCAAGAATTCGCCGCTGACG
CTAGCCGATCTGGCAGAGCGTTTCTCGATTTCGAGTTTTTCAATAACAAGGCCATCTATGAAGCGCTCCAAAC
CGTGCCCAATATCGGCGTAAGCTTTATACAGGCGGATCTGGAGAACGCGATCAGCGAAATGCTGACCGATCTT
GCCGACGGGATC

oraz sekwencję DNA o długości 498nt:

GATCCGCTTGTTCATGGCGTGGCTGAATGCGCAGACGAATCTGATGGATTTCGCTTCGCTACCTGGTGGAGAATG
AAATCATGCAGCACGGCGTTCGGAATCTGCAGATGTTTATTCGATGGAGCGGGCGGGCATTCAAGGCCAGGG
TCAGGGACAAGGACATGCTGCATCATTCTCTAGCCAGTGGCGGCTACAGCTGAGGAAGTTGGACAAGCACCA
GAGGCAGAGGAAGCCGCGGAATTCGTGGCGGATGCTGGAGCGGCCGACCACGAGGACACATTATACGATAGC
CAAGATGAAGTGGACGATGAGGATATTGAAGCTTGGAGTTAGTAGGTCGTGGTAACACTGAGTAACCTCCGAGT
ATCACCGAATATCACGAAGGCTTACTTGGTGACACTCGGTAATACCAAGTCGTGCCAAGTAACACTAGGTAAC
ACCAAGTAATACCTGCCGATGCTCAGGCCTTGTCTCGGTAATGCCTAGTCATGCCGAGGATC

Analizy zarówno na poziomie nukleotydowym, jak i aminokwasowym z wykorzystaniem programów blast nie wykazały żadnego podobieństwa do znanych sekwencji nukleotydowych i białkowych zdeponowanych w bazie danych GenBank. Również zastosowanie programu RepeatMasker nie wskazało na obecność sekwencji repetytywnych w obrębie badanych sekwencji.

Podobieństwo niektórych sekwencji uzyskanych w wyniku eksperymentu RDA do sekwencji bakteryjnych okazało się zaskakujące. Do dnia dzisiejszego nie ma danych na

temat pełnej sekwencji genomowej jakiegokolwiek przedstawiciela wątrobowców, dlatego nie można wykluczyć, iż w genomie tych organizmów występują geny o dużym podobieństwie do genów prokariotycznych. Nie możemy również wykluczyć możliwości, że w przestrzeniach międzykomórkowych plech *P.endiviifolia* sp B znajdują się niezidentyfikowane do tej pory bakterie, które wybiórczo nadal przebywają w roślinach wprowadzonych do hodowli *in vitro*. Innym wytłumaczeniem obecności fragmentów DNA płciowo-specyficznym w DNA izolowanym tylko z plech hodowanych *in vitro* jest możliwość zachodzenia rearanżacji genomowych przez lata prowadzenia hodowli wątrobowców *in vitro*.

5.2. RDA-cDNA – różnicowa analiza cDNA

W celu identyfikacji genów odpowiedzialnych za powstawanie organów rozmnażania generatywnego wątrobowca *P.endiviifolia* sp B zastosowano technikę RDA-cDNA. Technika ta, opisana po raz pierwszy przez Hubanka i Schatza w 1994 roku, stanowi adaptację metody RDA opracowanej przez Lisitsyna w 1993 roku. Metoda RDA-cDNA umożliwia identyfikację transkryptów genów ulegających specyficznemu ekspresji w puli cDNA testowanego, a nie występujących w drugiej puli cDNA – eliminującego, bądź też transkryptów genów różniących się zdecydowanie poziomem ekspresji w obu pulach. W przypadku badań opisanych w niniejszej pracy jako pulę testowaną wykorzystano dwuniciowy cDNA uzyskany z gametofitów męskich wytwarzających plemnie *P.endiviifolia* sp B, natomiast pulę eliminującą stanowił dwuniciowy cDNA uzyskany z gametofitów żeńskich wytwarzających rodnie *P.endiviifolia* sp B.

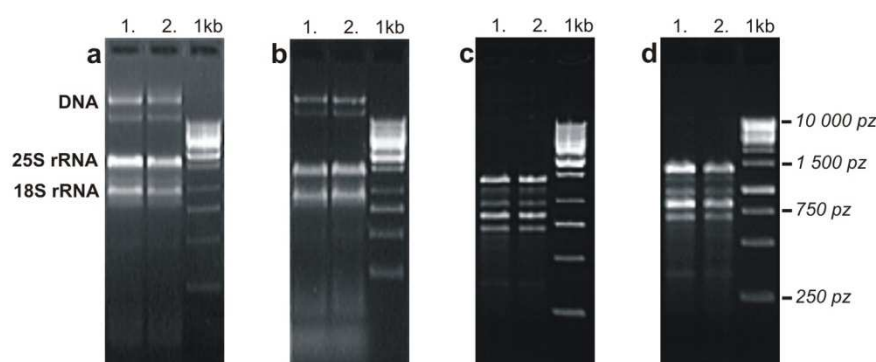
5.2.1. Porównanie wydajności metod izolacji RNA całkowitego z plech *P.endiviifolia* sp B

W celu izolacji całkowitego RNA z plech wątrobowca *P.endiviifolia* sp B zastosowano dwie metody izolacji RNA: 1) metodę ekstrakcji fenolowej na gorąco oraz 2) metodę Chomczyńskiego zmodyfikowaną przez dr P. Nuca (Pant i in. 2009). Za wyznaczniki porównania zastosowanych metod przyjęto ilość i jakość izolowanego całkowitego RNA, mRNA oraz dwuniciowego cDNA w przełożeniu na 100mg tkanki użytej do izolacji RNA. Biorąc pod uwagę trzy powyższe kryteria – bardziej wydajną metodą izolacji RNA całkowitego, wykorzystanego następnie do izolacji mRNA stanowiącego matrycę dla syntezy dwuniciowego cDNA, okazała się metoda Chomczyńskiego zmodyfikowana przez dr P. Nuca. Pomiar absorbancji preparatów RNA przy długościach fal $\lambda=260\text{nm}$, $\lambda=280\text{nm}$, $\lambda=230\text{nm}$ wskazywał na lepszą wydajność izolacji RNA w przypadku metody ekstrakcji fenolowej na gorąco (tabela 5-7).

Tabela 5-7. Porównanie wydajności zastosowanych dwóch metod izolacji całkowitego RNA z plech *P.endiviifolia* sp B

Metoda izolacji RNA całkowitego	Rodzaj plech <i>P.endiviifolia</i> sp B	Ilość tkanki użyta do izolacji [mg]	Całkowity RNA [μg]	Całkowity RNA [μg]/100mg tkanki	$\lambda_{260nm}/\lambda_{280nm}$	$\lambda_{260nm}/\lambda_{230nm}$
Metoda ekstrakcji fenolowej na gorąco	♀	57 200	5 858.8	10.24	2.02-2.22	1.28-1.49
	♂	49 000	3 913.5	7.99	2.17-2.24	1.15-1.32
Metoda Chomczyńskiego zmod. przez P. Nuca	♀	4 800	116.26	2.42	2.17-2.22	0.97-1.71
	♂	6 000	277.11	4.1	1.87-2.22	1.24-1.8

Należy jednak zwrócić uwagę, iż preparaty RNA izolowanego tą metodą były w większym stopniu zanieczyszczone DNA genomowym w porównaniu do preparatów RNA uzyskanych w wyniku izolacji RNA metodą Chomczyńskiego, co pokazały rozdziały elektroforetyczne poszczególnych preparatów RNA (zdjęcie 5-12).



Zdjęcie 5-12. Rozdział elektroforetyczny w 1,2% żelu agarozowym całkowitego RNA izolowanego (a) z gametofitów żeńskich *P.endiviifolia* sp B metodą ekstrakcji fenolowej na gorąco, (b) z gametofitów męskich *P.endiviifolia* sp B metodą ekstrakcji fenolowej na gorąco, (c) z gametofitów żeńskich *P.endiviifolia* sp B metodą Chomczyńskiego zmod. przez P. Nuca, (d) z gametofitów żeńskich *P.endiviifolia* sp B metodą Chomczyńskiego zmod. przez P. Nuca.

Co więcej, obliczenie ilości uzyskanego następnie mRNA z całkowitego RNA izolowanego metodą Chomczyńskiego na 100mg użytej tkanki do izolacji RNA wykazało od 1.3 do 4.3 razy lepszą wydajność izolacji mRNA w porównaniu do ilości mRNA uzyskanego z RNA izolowanego metodą ekstrakcji fenolowej na gorąco (tabela 5-8).

Tabela 5-8. Porównanie wydajności izolacji mRNA z RNA całkowitego z plech *P.endiviifolia* sp B izolowanego dwiema różnymi metodami.

Metoda izolacji RNA całkowitego	Rodzaj plech <i>P.endiviifolia</i> sp B	Ilość tkanki użyta do izolacji [mg]	mRNA [ng]	mRNA [ng]/100mg tkanki	$\lambda_{260nm}/\lambda_{280nm}$	$\lambda_{260nm}/\lambda_{230nm}$
Metoda ekstrakcji fenolowej na gorąco	♀	57 200	903.1	1.58	1.89-1.95	1.17-1.45
	♂	49 000	1 212.8	2.47	1.82-1.88	1.11-1.25
Metoda Chomczyńskiego zmod. przez P. Nuca	♀	4 800	332.0	6.9	1.83-1.88	2.20-2.40
	♂	6 000	196.73	3.27	1.80-1.85	1.80-1.83

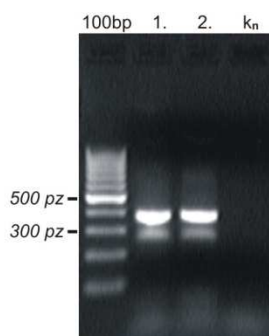
Również jakość mRNA była zdecydowanie lepsza, gdy był on izolowany z RNA całkowitego uzyskanego metodą Chomczyńskiego, o czym świadczy stosunek absorbancji $\lambda_{260nm}/\lambda_{230nm}$ w zakresie 1.8 – 2.2. Lepsza jakość mRNA była przyczyną lepszej jakości oraz o 2.8 – 5.6 razy bardziej wydajnej syntezy ds-cDNA (tabela 5-9). Z uwagi na uzyskane wyniki w dalszych etapach pracy stosowano izolację całkowitego RNA metodą Chomczyńskiego.

Tabela 5-9. Porównanie wydajności syntezy ds-cDNA na matrycy mRNA uzyskanego z RNA całkowitego z plech *P.endiviifolia* sp B izolowanego dwiema różnymi metodami.

Metoda izolacji RNA całkowitego	Rodzaj plech <i>P.endiviifolia</i> sp B	Ilość tkanki użyta do izolacji [mg]	Dwuniciowy cDNA [ng]	Dwuniciowy cDNA [ng]/100mg tkanki	$\lambda_{260nm}/\lambda_{280nm}$	$\lambda_{260nm}/\lambda_{230nm}$
Metoda ekstrakcji fenolowej na gorąco	♀	57 200	1 811.0	3.28	1.80-1.96	1.26-1.43
	♂	49 000	1 803.1	3.68	1.88-2.20	1.49-1.67
Metoda Chomczyńskiego zmod. przez P. Nuca	♀	4 800	891.35	18.57	1.83-1.85	2.00-2.13
	♂	6 000	708.45	11.8	1.80-2.40	1.82-2.22

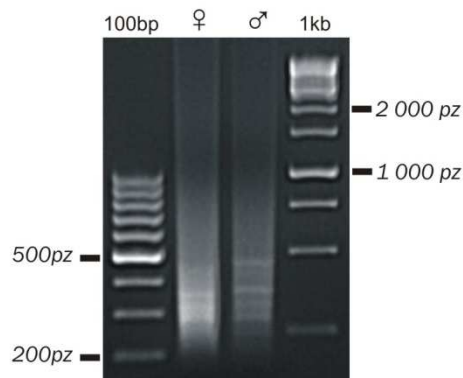
5.2.2. Identyfikacja transkryptów genów ulegających specyficznej ekspresji w gametoficie męskim *P.endiviifolia* sp B metodą RDA-cDNA

Dla przeprowadzenia analiz metodą RDA-cDNA kluczowym etapem jest uzyskanie odpowiedniej ilości dwuniciowego cDNA dwóch różnych pul. Dlatego w pierwszym kroku izolowano RNA całkowity z plech żeńskich wytwarzających rodnie oraz z plech męskich wytwarzających plemnie. Izolację RNA całkowitego przeprowadzono wykorzystując w sumie 62g plech żeńskich i 55g plech męskich, zebranych z naturalnego stanowiska wątrobowca *P.endiviifolia* sp B – Kopanina k. Poznania (materiał pobierano z dwóch sezonów: 1 – wrzesień-grudzień 2006, 2 – wrzesień-październik 2007). Jakość RNA całkowitego sprawdzono poprzez elektroforezę w żelu agarozowym oraz pomiar absorbancji przy długościach fal $\lambda=260nm$, $\lambda=280nm$, $\lambda=230nm$. Następnie izolowano frakcję (poliA⁺) mRNA z obu pul RNA całkowitego. W rezultacie otrzymano: 1.26 μ g mRNA z plech żeńskich oraz 1.41 μ g mRNA z plech męskich wątrobowca. W kolejnym etapie wyizolowany mRNA posłużył jako matryca do syntezy dwuniciowego cDNA, w wyniku której uzyskano: 2.70 μ g cDNA z plech żeńskich oraz 2.51 μ g cDNA z plech męskich wątrobowca. Jakość otrzymanych cDNA sprawdzono przeprowadzając reakcję PCR z wykorzystaniem starterów zdegenerowanych, amplifikujących fragment transkryptu genu kodującego aktynę1 *P.endiviifolia* długości ~300pz wg profilu temperaturowego podanego w punkcie 4.3.8 (METODY). Produkty reakcji PCR sprawdzono poprzez elektroforezę w żelu agarozowym (zdj. 5-13).



Zdjęcie 5-13. Rozdział elektroforetyczny w 1.5% żelu agarozowym produktów amplifikacji fragmentu transkryptu genu kodującego aktynę1 *P.endiviifolia* na matrycy dwuniciowego cDNA z plech żeńskich *P.endiviifolia* sp B (ścieżka 1) oraz na matrycy dwuniciowego cDNA z plech męskich *P.endiviifolia* sp B (ścieżka 2); k_n – kontrola negatywna reakcji PCR.

Uzyskany dwuniciowy cDNA z plech żeńskich i męskich poddano trawieniu enzymem restrykcyjnym DpnII, po 1.5µg w każdym trawieniu. Do oczyszczonych fragmentów restrykcyjnych cDNA dołączono następnie specyficzne 24-nt RDpn-adaptory. Dla każdej puli fragmentów cDNA przeprowadzono szereg reakcji PCR z wykorzystaniem 24-nt RDpn-adaptorów jako startery w celu uzyskania wystarczającej ilości amplikonów do przeprowadzenia kolejnych rund różnicowej hybrydyzacji cDNA. Jakość oczyszczonych produktów amplifikacji sprawdzono przeprowadzając elektroforezę ~1.5µg R-amplikonów w 1.5% żelu agarozowym (zdj. 5-14).

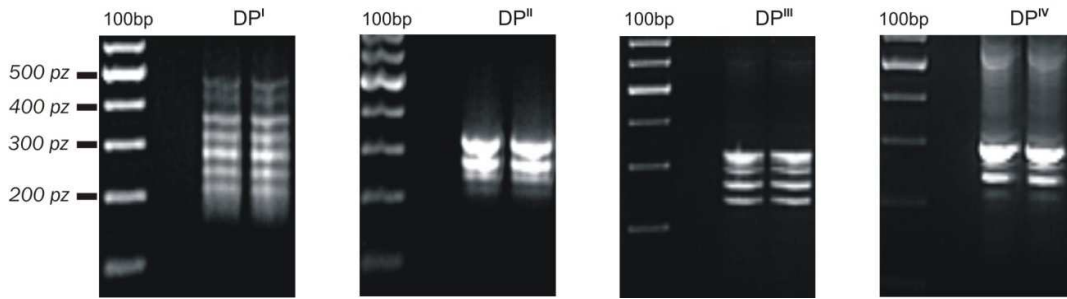


Zdjęcie 5-14. Rozdział elektroforetyczny w 1.5% żelu agarozowym R-amplikonów cDNA po oczyszczeniu; ścieżka ♀ - R-amplikony cDNA uzyskane z RNA gametofitów żeńskich *P.endiviifolia* sp B wytwarzających rodnie; ♂ - R-amplikony cDNA uzyskane z RNA gametofitów męskich *P.endiviifolia* sp B wytwarzających plemnie.

W rezultacie uzyskano ~615µg R-amplikonów cDNA z plech żeńskich oraz ~300µg R-amplikonów cDNA z plech męskich. Kolejne rundy różnicowej hybrydyzacji cDNA przeprowadzono z wykorzystaniem amplikonów cDNA z plech męskich *P.endiviifolia* sp B jako cDNA testowany, a amplikonów cDNA z plech żeńskich *P.endiviifolia* sp B jako cDNA eliminujący. Przeprowadzono cztery rundy różnicowej hybrydyzacji cDNA przy wzrastających stosunkach ilościowych biblioteki fragmentów testowanych względem biblioteki fragmentów eliminujących:

- I runda - 1:100 ,
- II runda - 1:800,
- III i IV runda - 1:400 000.

Ponadto w każdej z rund do puli fragmentów testowanych dołączano nowe adaptory, zanim pula ta została zmieszana z nadmiarem fragmentów eliminujących. Kolejne rundy hybrydyzacyjne (I - IV) wyodrębniały produkty, by w czwartej rundzie dać zbiór fragmentów różnicowych (DP^{IV}) długości w zakresie ~200 – 300pz (zdj. 5-15).

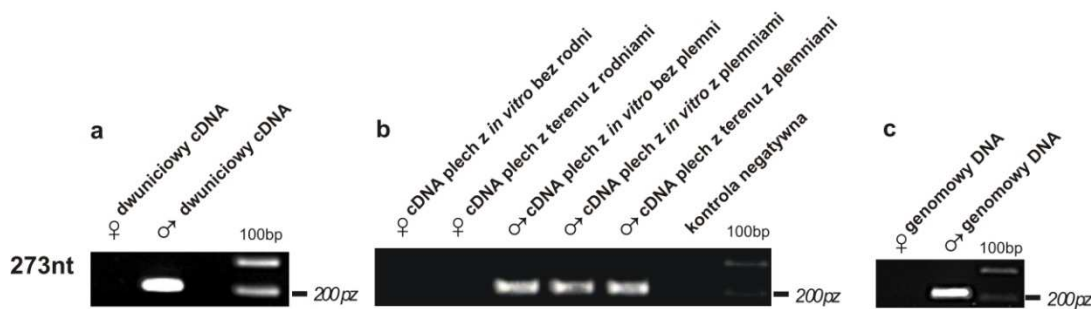


Zdjęcie 5-15. Rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym produktów różnicowych PCR po każdej z czterech rund różnicowej hybrydyzacji cDNA (DP^I - DP^{IV}).

Uzyskane fragmenty cDNA, stanowiące produkty różnicowe DP^{IV}, wyizolowano z żelu za pomocą zestawu firmy Qiagen, wklonowano do wektora pGEM-TEasy (Promega) i poddano reakcji sekwencjonowania.

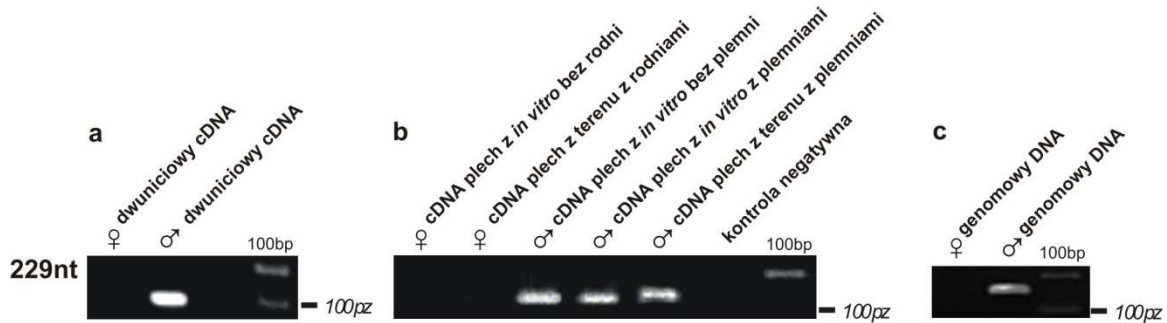
5.2.3. Analiza poziomu ekspresji wyselekcjonowanych fragmentów DP^{IV} w gametoficie żeńskim i męskim *P. endiviifolia* sp B za pomocą metody RT-PCR

W wyniku reakcji sekwencjonowania otrzymano 16 indywidualnych sekwencji cDNA. Na ich podstawie zaprojektowano 16 par starterów, które wykorzystano w celu analizy poziomu ekspresji genów, reprezentowanych przez uzyskane fragmenty cDNA, w gametoficie żeńskim i męskim *P. endiviifolia* sp B. Zastosowano metodę RT-PCR (METODY, pkt 4.11). Analizy poziomu transkryptów przeprowadzono w dwóch podejściach. W pierwszym matryce do reakcji RT-PCR stanowił dwuniciowy cDNA: testowany (z plech męskich) i eliminujący (z plech żeńskich) – cDNA wyjściowy dla eksperymentu RDA-cDNA. W drugim podejściu matryce cDNA przygotowano *de novo* z plech męskich wytwarzających plemnie i żeńskich wytwarzających rodnie zebranych z terenu w sezonie październik-listopad 2008, jak i plech hodowanych w warunkach *in vitro* nie wytwarzających plemni i rodni lub wytwarzających plemnie. W wyniku analiz ilościowych RT-PCR zidentyfikowano cztery fragmenty cDNA ulegające amplifikacji wyłącznie na matrycach cDNA z plech męskich. Dwa fragmenty cDNA długości 273nt (zdj. 5-16) oraz 229nt (zdj. 5-17) wykazały amplifikację zarówno na cDNA uzyskanym z plech męskich *P. endiviifolia* z hodowli *in vitro*, jak i cDNA uzyskanym z plech męskich pochodzących z terenu.



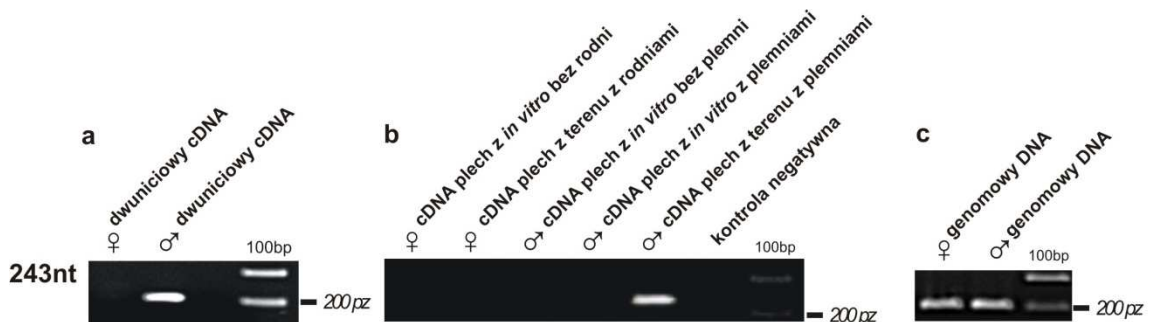
Zdjęcie 5-16. Rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym produktów reakcji RT-PCR z wykorzystaniem starterów Frd1+Rrd1 zaprojektowanych na podstawie sekwencji fragmentu cDNA długości 273nt (długość produktu PCR 203pz). Amplifikację prowadzono według programu RT

(METODY, pkt 4.11), zastosowano 29 cykli amplifikacji. Matryce reakcji stanowiły: a) dwuniciowy cDNA, wyjściowy dla przeprowadzenia eksperymentu RDA-cDNA, uzyskany z plech zebranych z terenu; b) cDNA przygotowany *de novo* z plech z hodowli *in vitro* oraz plech zebranych z terenu; c) genomowy DNA z plech z hodowli *in vitro*.

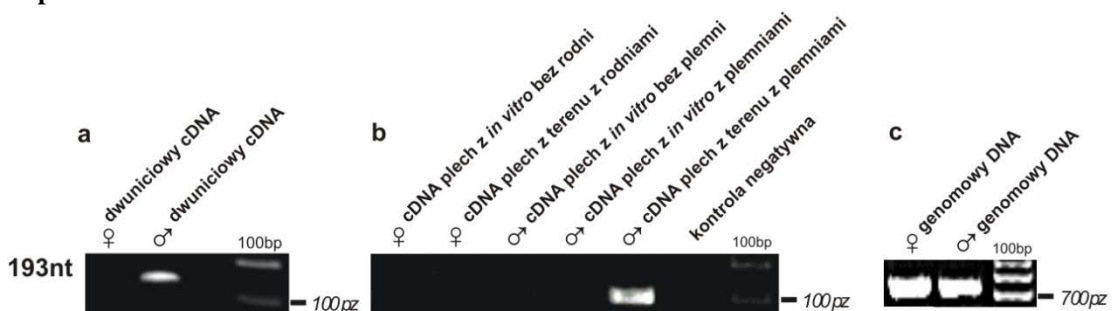


Zdjęcie 5-17. Rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym produktów reakcji RT-PCR z wykorzystaniem starterów Frd4+Rrd4 zaprojektowanych na podstawie sekwencji fragmentu cDNA długości 229nt (długość produktu PCR 153pz). Amplifikację prowadzono według programu RT (METODY, pkt 4.11), zastosowano 33 cykle amplifikacji. Matryce reakcji stanowiły: a) dwuniciowy cDNA, wyjściowy dla przeprowadzenia eksperymentu RDA-cDNA, uzyskany z plech zebranych z terenu; b) cDNA przygotowany *de novo* z plech z hodowli *in vitro* oraz plech zebranych z terenu; c) genomowy DNA z plech z hodowli *in vitro*.

W przypadku fragmentów długości 243nt (zdj. 5-18) oraz 193nt (zdj. 5-19) amplifikację zaobserwowano wyłącznie na cDNA uzyskany z plech męskich *P. endiviifolia* sp B wytwarzających plemn timer, pochodzących z terenu.



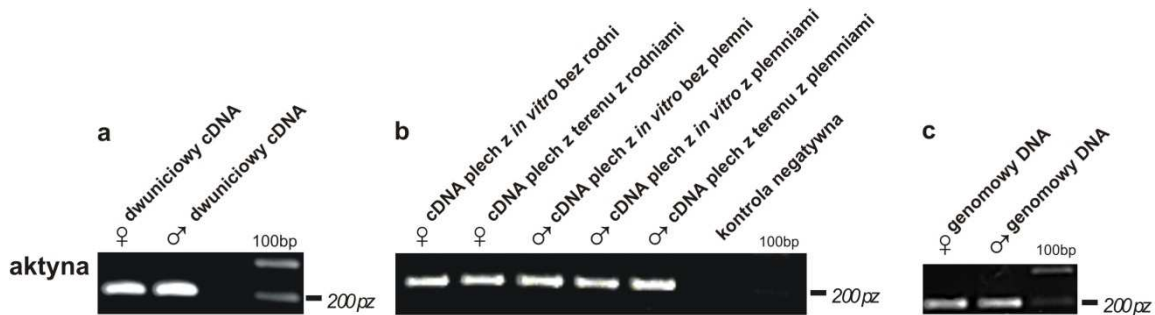
Zdjęcie 5-18. Rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym produktów reakcji RT-PCR z wykorzystaniem starterów Frd2+Rrd2 zaprojektowanych na podstawie sekwencji fragmentu cDNA długości 243nt (długość produktu PCR 198pz). Amplifikację prowadzono według programu RT (METODY, pkt 4.11), zastosowano 33 cykle amplifikacji. Matryce reakcji stanowiły: a) dwuniciowy cDNA, wyjściowy dla przeprowadzenia eksperymentu RDA-cDNA, uzyskany z plech zebranych z terenu; b) cDNA przygotowany *de novo* z plech z hodowli *in vitro* oraz plech zebranych z terenu; c) genomowy DNA z plech z hodowli *in vitro*.



Zdjęcie 5-19. Rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym produktów reakcji RT-PCR z wykorzystaniem starterów Frd6+Rrd6 zaprojektowanych na podstawie sekwencji fragmentu cDNA długości 193nt (długość produktu PCR 127pz). Amplifikację prowadzono według programu RT (METODY, pkt 4.11), zastosowano 33 cykle amplifikacji. Matryce reakcji stanowiły: a) dwuniciowy cDNA, wyjściowy dla przeprowadzenia eksperymentu RDA-cDNA, uzyskany z plech zebranych z terenu;

b) cDNA przygotowany *de novo* z plech z hodowli *in vitro* oraz plech zebranych z terenu; c) genomowy DNA z plech z hodowli *in vitro*.

Jako kontrolę reakcji RT-PCR zastosowano startery amplifikujące fragment cDNA aktyny1 *P.endiviifolia* (zdj.5-20).



Zdjęcie 5-20. Rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym produktów reakcji RT-PCR z wykorzystaniem starterów RTAKTF+RTAKTR zaprojektowanych na podstawie sekwencji fragmentu cDNA długości 372nt (długość produktu PCR 197pz). Amplifikację prowadzono według programu RT (METODY, pkt 4.11), zastosowano 29 cykli amplifikacji. Matryce reakcji stanowiły: a) dwuniciowy cDNA, wyjściowy dla przeprowadzenia eksperymentu RDA-cDNA, uzyskany z plech zebranych z terenu; b) cDNA przygotowany *de novo* z plech z hodowli *in vitro* oraz plech zebranych z terenu; c) genomowy DNA z plech z hodowli *in vitro*.

Ponadto każdą parę starterów wykorzystano również w reakcji PCR z matrycami: DNA genomowy izolowany z plech męskich i żeńskich z hodowli *in vitro* oraz zebranych z terenu, jako kontrolę pozytywną reakcji PCR. Co ciekawe, amplifikację na DNA genomowym żeńskim i męskim zaobserwowano tylko w przypadku starterów zaprojektowanych na podstawie sekwencji fragmentów cDNA długości 243nt, 193nt oraz starterów amplifikujących fragment aktyny1 (zdj. 5-18c, 5-19c, 5-20c). W przypadku starterów zaprojektowanych na podstawie sekwencji fragmentów cDNA długości 273nt oraz 229nt amplifikację zaobserwowano wyłącznie na matrycy DNA genomowego z plech męskich (zdj. 5-16c, 5-17c). Mimo przeprowadzenia eksperymentu RDA, który miał na celu selekcję sekwencji genomowych specyficznych dla genomu żeńskiego i męskiego *P.endiviifolia* sp B, dwa produkty różnicowe RDA-cDNA długości 273nt i 229nt, ulegające specyficznej amplifikacji na zarówno na cDNA, jak i na DNA genomowym plech męskich, nie zostały wykryte w eksperymencie RDA. Powodem tego jest najprawdopodobniej fakt, iż w różnicowej hybrydyzacji genomowej jedynie ok. 2 – 15% genomu reprezentowanych jest przez amplicony uzyskane w wyniku trawienia DNA genomowego i amplifikacji uzyskanych fragmentów restrykcyjnych w kolejnych reakcjach PCR. Dlatego produkty różnicowe RDA-cDNA mogły nie znaleźć się w puli fragmentów restrykcyjnych eksperymentu RDA.

5.2.4. Analiza bioinformatyczna sekwencji fragmentów cDNA ulegających specyficznemu amplifikacji na matrycach cDNA z plech męskich *P. endiviifolia* sp B

Fragmenty cDNA ulegające specyficznemu amplifikacji na cDNA z plech męskich wątrobowca *P. endiviifolia* sp B poddano analizom bioinformatycznym z wykorzystaniem zestawu programów blast dostępnych na stronie internetowej NCBI.

- **Analiza sekwencji fragmentu cDNA długości 273nt**

W wyniku eksperymentu RDA-cDNA uzyskano sekwencję cDNA długości 273nt:

```
GATCAATGAACATATTACCAAAAATGTATGTAAGCACCCACCCTAACCTGACTTCCTCAACTAGTGTGGAAAAT
GCAAAGAAGAGACTTCTCAATAGGTTAAAGACATGACAGACAACCGGGAATGCATCTCTTACAAAATTTCCC
CGTTTGTAAGAGACTTCAAACCTTCTGATGTCAGGGCCCCACCAGAACATAAATCAGGCAGAACCAGAACACAAA
TCACTCATTATAAACAGCCATGAAAGGAAGTTCTTCCAAGCAATTTGGGGATC
```

Analiza powyższej sekwencji na poziomie nukleotydowym z wykorzystaniem algorytmu blastn nie wykazała żadnego podobieństwa do znanych sekwencji nukleotydowych zdeponowanych w bazie danych GenBank. Również zastosowanie algorytmu blastx, który umożliwia przetłumaczenie sekwencji nukleotydowej na sześć potencjalnych ramek odczytu i analizę sekwencji aminokwasowych, nie wskazało żadnego podobieństwa do znanych sekwencji białkowych zdeponowanych w bazie danych GenBank.

- **Analiza sekwencji fragmentu cDNA długości 229nt**

W wyniku eksperymentu RDA-cDNA uzyskano sekwencję cDNA długości 229nt:

```
GATCATACTGACTCCAACATTGTGGTGATGCTGGTTGGGAACAAGTCTGTTTTGCGCCATTTGAGAGCTGTATC
TGCAGATGATGGCCAGTCTTTCTCAGAGAAAGAAGGTCTTTCTTTATGGAGACGTCTGCTCTTGAATCTACGA
ATGTGGAGAATGCTTTCAAACAGATTCTGACCCAGATTTACAGGGTTGTTAGTAAGAAGGCCCTTGATGTTGGA
GAGGATC
```

Analiza na poziomie nukleotydowym z wykorzystaniem algorytmu blastn nie wykazała żadnego podobieństwa do znanych sekwencji nukleotydowych zdeponowanych w bazie danych GenBank. Zastosowanie algorytmu blastx umożliwiło przetłumaczenie sekwencji nukleotydowej na sześć potencjalnych ramek odczytu oraz porównanie uzyskanych sekwencji aminokwasowych do sekwencji białkowych zdeponowanych w bazie danych GenBank. Wyniki tej analizy przedstawiono w tabeli 5-10, przy czym jako kryterium jakości dopasowania przyjęto najniższą wartość E-value.

Tabela 5-10. Wyniki analizy bioinformatycznej dla fragmentu DNA długości 229nt z wykorzystaniem algorytmu blastx. E-value = wartość E, Rab – ang. Ras related GTP-binding protein.

Fragment cDNA 229nt			
blastx	Gene ID	%*	E-value
Rab11b <i>Oryza sativa</i> Indica Group	gi 149391443 gb ABR25739.1	75	7e-26
Rab GTP-binding protein <i>Triticum aestivum</i>	gi GI:51243763 gb XP_001772994.1	73	4e-25
AtRABA1f <i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 15239462 gb NP_200894.1	71	8e-25
Rab11/RabA-family small GTPase <i>Physcomitrella patens</i> subsp. patens	gi 168041027 gb XP_001772994.1	80	3e-24

* procent podobieństwa analizowanej sekwencji względem sekwencji z bazy danych GenBank.

- **Analiza sekwencji fragmentu cDNA długości 243nt**

W wyniku eksperymentu RDA-cDNA uzyskano sekwencję cDNA długości 243nt:

```
GATCCAATATGGGGCTCGTGAGATTGCTAATGGGGTTTATGATTGGGTCTAAGATGGGTGGCAGAGTCAGGCC
TGCTGCTTGC GCAATGTGCGAGGACTTCAGCAACTGCCCAGCTATGGCGGCCACGAGAAGAACTGACTTCATG
AATATCTTCATGGCCTCCGATTGGTGCATCCACGGCGCAACCCAGCCCACTCAATGACAAAATCGTTACCACTAC
TCCACAGACCTCCACAATTGATC
```

Analiza powyższej sekwencji na poziomie nukleotydowym z wykorzystaniem algorytmu blastn nie wykazała żadnego podobieństwa do znanych sekwencji nukleotydowych zdeponowanych w bazie danych GenBank. Również zastosowanie algorytmu blastx, który umożliwia przetłumaczenie sekwencji nukleotydowej na sześć potencjalnych ramek odczytu i analizę sekwencji aminokwasowych, nie wskazało żadnego podobieństwa do znanych sekwencji białkowych zdeponowanych w bazie danych GenBank.

- **Analiza sekwencji fragmentu cDNA długości 193nt**

W wyniku eksperymentu RDA-cDNA uzyskano sekwencję cDNA długości 193nt:

```
GATCAAATGGGGAAGGCCACTTTGAAAACCAAAGGCAAATCGGGGAGTGGACGAGGCGTCACGAAAGCTTCT
TCCTCGCGATGCCGCTCTTCTTCGAAAAGGAAGGGAAAGGAGGAGAAACGAATTTCGAAAAGTGAAGGACAAA
AGGCGTCCCAAGAGAGCTTTGGGGCCTTACATGTATTTTTGCAAAGATC
```

Analiza powyższej sekwencji na poziomie nukleotydowym z wykorzystaniem algorytmu blastn nie wykazała żadnego podobieństwa do znanych sekwencji nukleotydowych zdeponowanych w bazie danych GenBank. Również zastosowanie algorytmu blastx, który umożliwia przetłumaczenie sekwencji nukleotydowej na sześć potencjalnych ramek odczytu i analizę sekwencji aminokwasowych, nie wskazało znacznego podobieństwa do znanych sekwencji białkowych zdeponowanych w bazie danych GenBank.

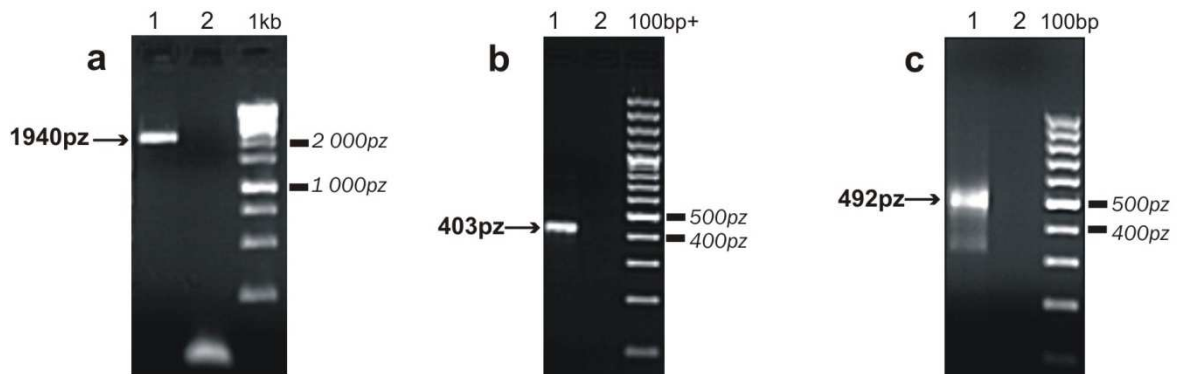
5.3. Charakterystyka końców 5' i 3' cDNA wyselekcjonowanych transkryptów w eksperymencie RDA-cDNA metodą RACE

W celu charakterystyki końców 5' i 3' cDNA czterech wyselekcjonowanych metodą RDA-cDNA fragmentów transkryptów, ulegających specyficznej amplifikacji na matrycach cDNA pochodzących z plech męskich *P.endiviifolia* sp B, wykorzystano zestaw SMARTTM RACE Amplification Kit firmy Clontech. Amplifikacje właściwych końców cDNA przeprowadzano w dwóch reakcjach RACE-PCR (METODY, pkt 4.12): w pierwszej z użyciem startera genowo specyficznego GSP1 i startera uniwersalnego UPM, w drugiej z użyciem wewnętrznego startera genowo specyficznego GSP2 i wewnętrznego startera uniwersalnego NUP. Zarówno startery GSP1, jak GSP2 zaprojektowano na podstawie sekwencji fragmentów cDNA uzyskanych w wyniku eksperymentu RDA-cDNA. Na każdym zdjęciu strzałką zaznaczono produkt będący właściwym końcem 5' lub 3' badanego

transkryptu. Dodatkowe produkty reakcji RACE-PCR, które pojawiają się na niektórych zdjęciach żeli agarozowych, stanowią niespecyficzne produkty amplifikacji (co wykazały reakcje sekwencjonowania).

5.3.1. Charakterystyka końców 5' i 3' cDNA fragmentu RDA-cDNA długości 273nt

Dla uzyskania pełnej sekwencji cDNA w pierwszym podejściu przeprowadzono reakcje RACE-PCR w celu uzyskania końca 5' badanego transkryptu. Ponieważ wyjściowa sekwencja fragmentu cDNA nie wykazała podobieństwa do żadnej znanej sekwencji, zarówno na poziomie nukleotydowym, jak i aminokwasowym, w reakcji RACE wykorzystano startery zarówno na nić cDNA uzyskaną w wyniku eksperymentu RDA-cDNA, jak i na nić do niej komplementarną, by sprawdzić która nić stanowi badany transkrypt. Jako wynik otrzymano produkt PCR, wyłącznie przy zastosowaniu startera specyficznego Frd1 i uniwersalnego UPM, długości odpowiednio 1 940pz (zdj. 5.21a). Dodatkowo na podstawie sekwencji końca 5' uzyskanej w wyniku reakcji sekwencjonowania produktu 5'RACE-PCR, zaprojektowano startery dla drugiego podejścia 5'RACE-PCR w celu sprawdzenia możliwości uzyskania wydłużenia końca 5' badanego transkryptu. W rezultacie otrzymano produkt PCR długości 403pz (zdj. 5.21b). Następnie przeprowadzono reakcje RACE-PCR w celu uzyskania końca 3' badanego transkryptu, w wyniku której otrzymano produkt długości 492pz (zdj. 5.21c).

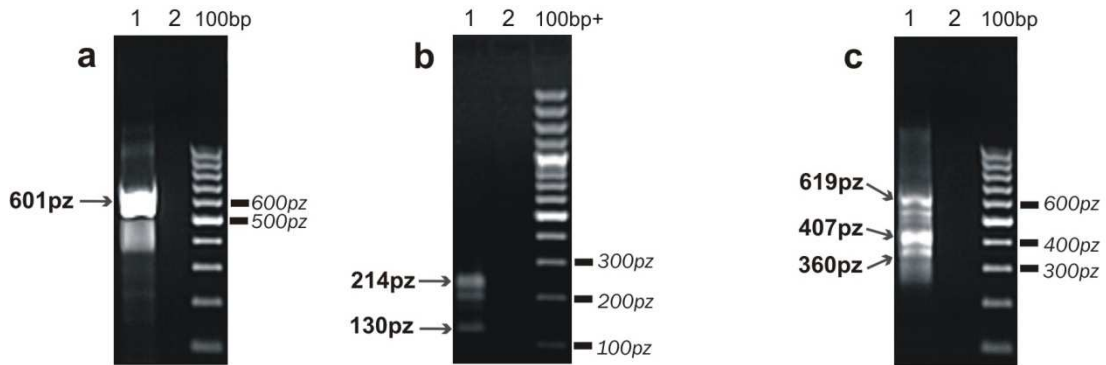


Zdjęcie 5-21. Rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym produktów reakcji RACE-PCR dla fragmentu cDNA długości 273nt. a) – produkty 5'RACE-PCR z wykorzystaniem startera specyficznego Frd1 i uniwersalnego UPM. b) – produkty drugiego podejścia 5'RACE-PCR z wykorzystaniem startera specyficznego 5TUA2 i uniwersalnego UPM. c) – produkty 3'RACE-PCR z wykorzystaniem startera specyficznego Rrd1 i uniwersalnego UPM. Amplifikację prowadzono wg programu RACE (METODY, pkt 4.12.2.). Ścieżki 1 – produkty amplifikacji RACE-PCR, ścieżki 2 – kontrole negatywne reakcji PCR (bez matrycy).

5.3.2. Charakterystyka końców 5' i 3' cDNA fragmentu RDA-cDNA długości 229nt wykazującego podobieństwo do roślinnych genów kodujących białka Rab

Dla uzyskania pełnej sekwencji cDNA w pierwszym podejściu przeprowadzono reakcje RACE-PCR w celu uzyskania końca 5' badanego transkryptu. Jako wynik otrzymano produkt PCR długości odpowiednio 601pz (zdj. 5-22a). Dodatkowo na podstawie sekwencji końca 5'

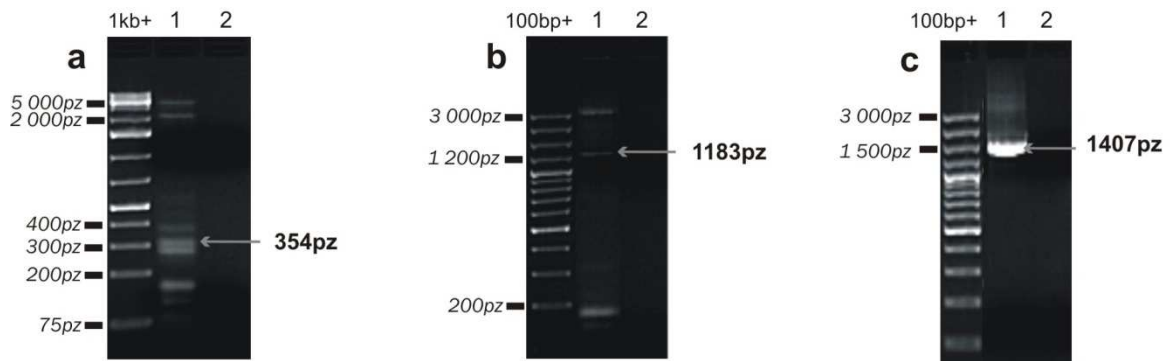
uzyskanej w wyniku reakcji sekwencjonowania produktu 5'RACE-PCR, zaprojektowano startery dla drugiego podejścia 5'RACE-PCR w celu sprawdzenia możliwości uzyskania wydłużenia końca 5' badanego transkryptu. W rezultacie otrzymano produkty PCR długości 214pz i 130 pz (zdj.5-22b). Następnie przeprowadzono reakcje RACE-PCR w celu uzyskania końca 3' badanego transkryptu, w wyniku której otrzymano produkty w zakresie ~300 do ~600pz (zdj. 5-22c).



Zdjęcie 5-22. Rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym produktów reakcji RACE-PCR dla fragmentu cDNA długości 229nt. (a) – produkty 5'RACE-PCR z wykorzystaniem startera specyficznego 5N_RAB1 i uniwersalnego NUP. (b) – produkty drugiego podejścia 5'RACE-PCR z wykorzystaniem startera specyficznego 5N_RAB2 i uniwersalnego NUP. (c) – produkty 3'RACE-PCR z wykorzystaniem startera specyficznego 3N_RAB2 i uniwersalnego NUP. Amplifikację prowadzono wg programu NRACE (METODY, pkt 4.12.2.). Ścieżki 1 – produkty amplifikacji RACE-PCR, ścieżki 2 – kontrole negatywne reakcji PCR (bez matrycy).

5.3.3. Charakterystyka końców 5' i 3' cDNA fragmentu RDA-cDNA długości 243nt

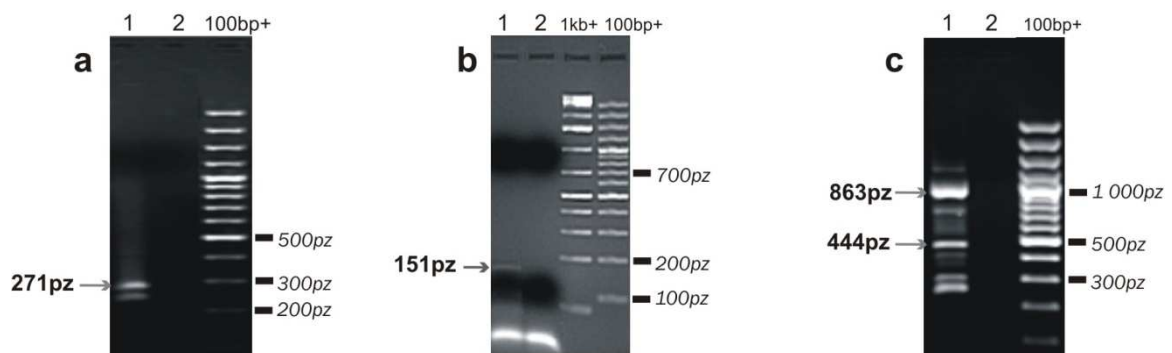
Dla uzyskania pełnej sekwencji cDNA w pierwszym podejściu przeprowadzono reakcje RACE-PCR w celu uzyskania końca 5' badanego transkryptu. Ponieważ wyjściowa sekwencja fragmentu cDNA nie wykazała podobieństwa do żadnej znanej sekwencji, zarówno na poziomie nukleotydowym, jak i aminokwasowym, w reakcji RACE wykorzystano startery zarówno na nić cDNA uzyskaną w wyniku eksperymentu RDA-cDNA, jak i na nić do niej komplementarną, by sprawdzić która nić stanowi badany transkrypt. Jako wynik otrzymano produkt PCR, wyłącznie przy zastosowaniu startera specyficznego Rrd2 i uniwersalnego UPM, długości 354pz (zdj. 5-23a). Dodatkowo na podstawie sekwencji końca 5' uzyskanej w wyniku reakcji sekwencjonowania produktu 5'RACE-PCR, zaprojektowano startery dla drugiego podejścia 5'RACE-PCR w celu sprawdzenia możliwości uzyskania wydłużenia końca 5' badanego transkryptu. W rezultacie otrzymano produkt PCR długości 1 183pz (zdj. 5-23b). Następnie przeprowadzono reakcje RACE-PCR w celu uzyskania końca 3' badanego transkryptu, w wyniku której otrzymano produkt długości 1 407pz (zdj. 5.23c).



Zdjęcie 5-23. Rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym produktów reakcji RACE-PCR dla fragmentu cDNA długości 243nt. (a) – produkty 5'RACE-PCR z wykorzystaniem startera specyficznego 3N_2SP2 i uniwersalnego NUP. (b) – produkty drugiego podejścia 5'RACE-PCR z wykorzystaniem startera specyficznego Nst1 i uniwersalnego NUP. (c) – produkty 3'RACE-PCR z wykorzystaniem startera specyficznego 5N_2SP1 i uniwersalnego NUP. Amplifikację prowadzono wg programu NRACE (METODY, pkt 4.12.2.). Ścieżki 1 – produkty amplifikacji RACE-PCR, ścieżki 2 – kontrole negatywne reakcji PCR (bez matrycy).

5.3.4. Charakterystyka końców 5' i 3' cDNA fragmentu RDA-cDNA długości 196nt

Dla uzyskania pełnej sekwencji cDNA w pierwszym podejściu przeprowadzono reakcje RACE-PCR w celu uzyskania końca 5' badanego transkryptu. Ponieważ wyjściowa sekwencja fragmentu cDNA nie wykazała podobieństwa do żadnej znanej sekwencji, zarówno na poziomie nukleotydowym, jak i aminokwasowym, w reakcji RACE wykorzystano startery zarówno na nić cDNA uzyskaną w wyniku eksperymentu RDA-cDNA, jak i na nić do niej komplementarną, by sprawdzić która nić stanowi badany transkrypt. Jako wynik otrzymano produkty PCR, wyłącznie przy zastosowaniu startera specyficznego 5'N_HMG2 i uniwersalnego NUP, w zakresie ~200 – 300pz oraz z (zdj. 5.24a). Właściwym produktem okazał się fragment długości 271pz. Dodatkowo na podstawie sekwencji końca 5' uzyskanej w wyniku reakcji sekwencjonowania produktu 5'RACE-PCR, zaprojektowano startery dla drugiego podejścia 5'RACE-PCR w celu sprawdzenia możliwości uzyskania wydłużenia końca 5' badanego transkryptu. W rezultacie otrzymano produkt PCR długości 151pz (zdj. 5-24b). Następnie przeprowadzono reakcje RACE-PCR w celu uzyskania końca 3' badanego transkryptu, w wyniku której otrzymano produkty w zakresie ~250 – 1 000 pz (zdj. 5.24c). Właściwymi produktami okazały się fragmenty długości 863pz oraz 444pz.



Zdjęcie 5-24. Rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym produktów reakcji RACE-PCR dla fragmentu cDNA długości 193nt. (a) – produkty 5'RACE-PCR z wykorzystaniem startera specyficznego 5'N_HMG2 i uniwersalnego NUP. (b) – produkty drugiego podejścia 5'RACE-PCR z wykorzystaniem startera specyficznego Nst1 i uniwersalnego NUP. (c) – produkty 3'RACE-PCR z wykorzystaniem startera specyficznego 5N_2SP1 i uniwersalnego NUP. Amplifikację prowadzono wg programu NRACE (METODY, pkt 4.12.2.). Ścieżki 1 – produkty amplifikacji RACE-PCR, ścieżki 2 – kontrole negatywne reakcji PCR (bez matrycy).

5'N_HMG2 i uniwersalnego NUP. (b) – produkty drugiego podejścia 5'RACE-PCR z wykorzystaniem startera specyficznego 2_N_5'HMG2 i uniwersalnego NUP. (c) – produkty 3'RACE-PCR z wykorzystaniem startera specyficznego 3'N_HMG2 i uniwersalnego NUP. Amplifikację prowadzono wg programu NRACE (METODY, pkt 4.12.2.). Ścieżki 1 – produkty amplifikacji RACE-PCR, ścieżki 2 – kontrole negatywne reakcji PCR (bez matrycy).

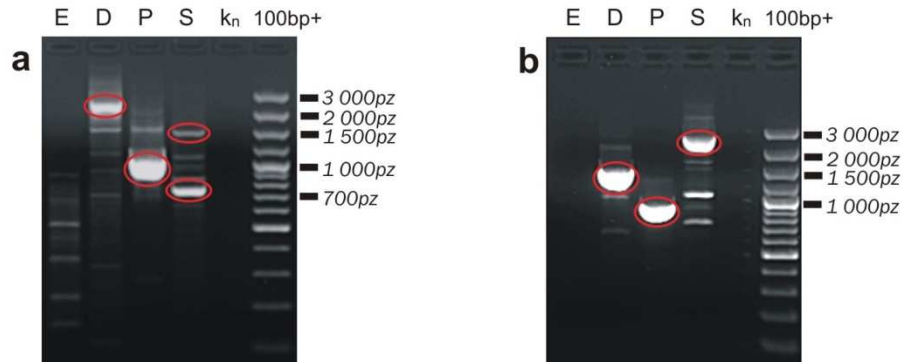
W celu udowodnienia, że amplifikowane końce 5' i 3' cDNA pochodzą z jednego transkryptu przeprowadzono reakcje amplifikacji pełnej długości sekwencji cDNA, których wyniki przedstawiono w rozdziale 5.6.

5.4. Charakterystyka pełnej sekwencji genomowej wyselekcjonowanych genów w eksperymencie RDA-cDNA metodą „spacer po genomie”

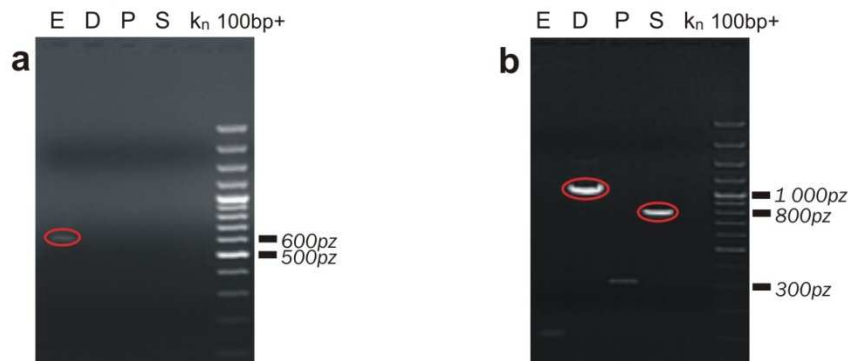
Z uwagi na fakt, że sekwencja nukleotydowa genomu wątrobowca *P. endiviifolia* sp B nie jest znana, w celu poznania pełnych sekwencji genomowych genów wyselekcjonowanych metodą RDA-cDNA wykorzystano zestaw GenomeWalker™ Universal Kit firmy Clontech. Metoda „spacer po genomie” umożliwia poznanie sekwencji genomowej znajdującej się powyżej końca 5' oraz poniżej końca 3' znanego fragmentu DNA. W pierwszym etapie przygotowano nieklonowane „biblioteki DNA genomowego” z wykorzystaniem czterech enzymów restrykcyjnych (METODY, pkt 4.13.1). Następnie przeprowadzono szereg reakcji PCR dla uzyskania sekwencji genomowych znajdujących się powyżej końca 5' oraz poniżej końca 3' wyselekcjonowanych fragmentów RDA-cDNA. Dla każdego z fragmentów cDNA przeprowadzono po jednym kroku „spaceru po genomie” poniżej ich końców 3'. Dla fragmentów cDNA długości 243nt oraz 193nt przeprowadzono po jednym kroku „spaceru po genomie” powyżej ich końców 5'. W przypadku fragmentu cDNA długości 229nt przeprowadzono trzy kroki „spaceru po genomie” powyżej jego końca 5', a w przypadku fragmentu cDNA długości 273nt przeprowadzono pięć kroków „spaceru po genomie” powyżej jego końca 5'. Liczba kroków dla każdego z badanych genów uzależniona była od stopnia pokrycia zamplifikowanych sekwencji genomowych z uzyskanymi wcześniej końcami 5' i 3' cDNA. Każdy krok „spaceru po genomie” składał się z dwóch rund reakcji PCR: w pierwszej stosowano starter genowo specyficzny w kierunku powyżej lub poniżej znanej sekwencji oraz starter uniwersalny AP1, w drugiej – wewnętrzny starter genowo specyficzny w kierunku powyżej lub poniżej znanej sekwencji i wewnętrzny starter uniwersalny AP2. W poniższej części WYNIKÓW przedstawiono zdjęcia rozdzielów elektroforetycznych przeprowadzonych drugich rund reakcji PCR każdego z kroków dla poszczególnych genów. O liczbie przeprowadzonych kroków „spaceru po genomie” decydowało nakładanie *in silico* na poznaną sekwencję genomową uzyskanych pełnych sekwencji cDNA. Z chwilą gdy stwierdzano, że cały cDNA zawierał się w poznanej

sekwencji genomowej, nie wykonywano dalszych kroków. Na wszystkich zdjęciach kolejnego podrozdziału czerwonymi elipsami zaznaczono produkty reakcji PCR, które zostały poddane reakcji sekwencjonowania. Ścieżki opisane literami „E”, „D”, „P”, „S” to nazwy „bibliotek DNA genomowego” przygotowanych odpowiednio z zastosowaniem enzymów restrykcyjnych EcoRV, DraI, PvuII, StuI i wykorzystanych jako matryce reakcji PCR.

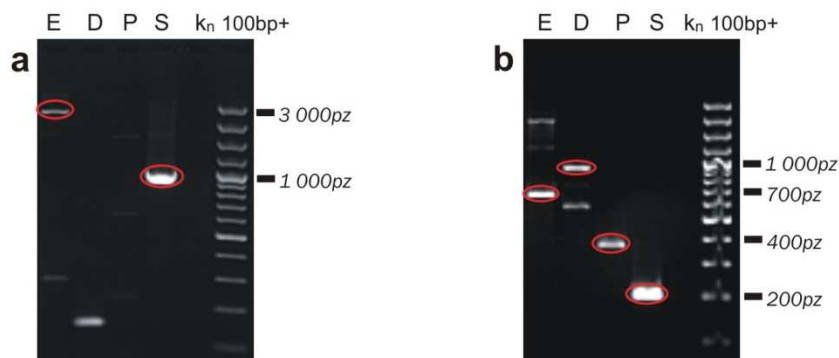
5.4.1. Charakterystyka sekwencji genomowej powyżej końca 5' i poniżej końca 3' fragmentu RDA-cDNA długości 273nt



Zdjęcie 5-25. Rozdział elektroforetyczny w 1.5% żelu agarozowym produktów reakcji PCR pierwszego kroku powyżej końca 5' (a) oraz poniżej końca 3' (b) fragmentu cDNA długości 273nt. W reakcji użyto starterów GWd1N_1Tua+AP2 (a) oraz GWg1N_1Tua+AP2 (b). Ścieżki k_n – kontrole negatywne reakcji PCR (bez matrycy). Amplifikację prowadzono wg programu NGW (METODY, pkt 4.13.2).

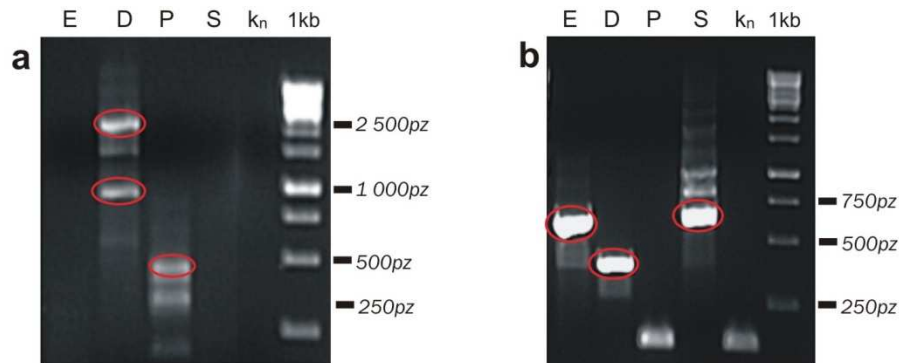


Zdjęcie 5-26. Rozdział elektroforetyczny w 1.5% żelu agarozowym produktów reakcji PCR drugiego (a) i trzeciego (b) kroku powyżej końca 5' fragmentu cDNA długości 273nt. W reakcji użyto starterów 2g1Tua+AP2 (a) oraz 3Ng1Tua+AP2 (b). Ścieżki k_n – kontrole negatywne reakcji PCR (bez matrycy). Amplifikację prowadzono wg programu NGW (METODY, pkt 4.13.2).

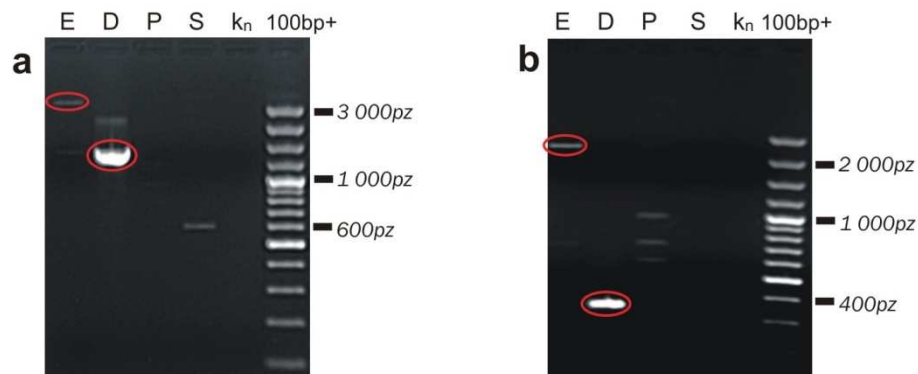


Zdjęcie 5-27. Rozdział elektroforetyczny w 1.5% żelu agarozowym produktów reakcji PCR czwartego (a) i piątego (b) kroku powyżej końca 5' fragmentu cDNA długości 273nt. W reakcji użyto starterów 4Ng1Tua+AP2 (a) oraz 5g1Tua+AP2 (b). Ścieżki k_n – kontrole negatywne reakcji PCR (bez matrycy). Amplifikację prowadzono wg programu NGW (METODY, pkt 4.13.2).

5.4.2. Charakterystyka sekwencji genomowej powyżej końca 5' i poniżej końca 3' fragmentu RDA-cDNA długości 229nt wykazującego podobieństwo do roślinnych genów kodującego białka Rab

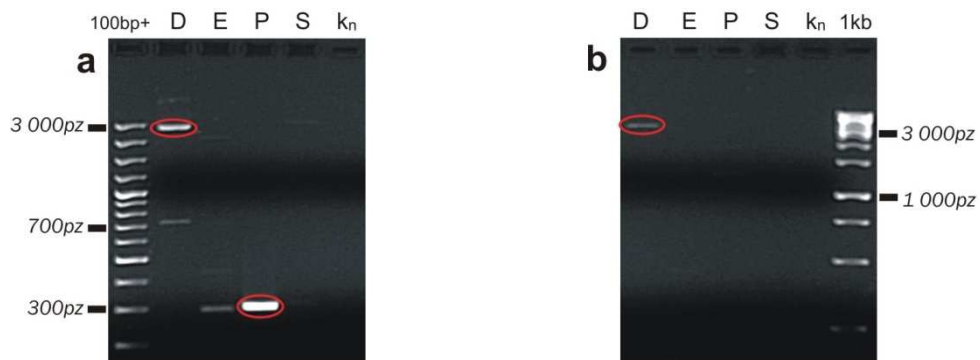


Zdjęcie 5-28. Rozdział elektroforetyczny w 1.5% żelu agarozowym produktów reakcji PCR pierwszego kroku powyżej końca 5' (a) oraz poniżej końca 3' (b) fragmentu cDNA długości 229nt. W reakcji użyto starterów 5N_RAB1+AP2 (a) oraz 3N_RAB2+AP2 (b). Ścieżki k_n – kontrole negatywne reakcji PCR (bez matrycy). Amplifikację prowadzono wg programu NGW (METODY, pkt 4.13.2).



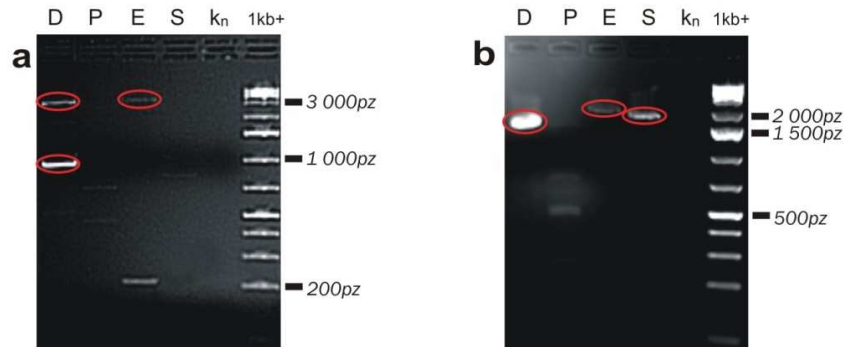
Zdjęcie 5-29. Rozdział elektroforetyczny w 1.5% żelu agarozowym produktów reakcji PCR drugiego (a) i trzeciego (b) kroku powyżej końca 5' fragmentu cDNA długości 229nt. W reakcji użyto starterów GWg2N_4+AP2 (a) oraz 3Ng4Rab+AP2 (b). Ścieżki k_n – kontrole negatywne reakcji PCR (bez matrycy). Amplifikację prowadzono wg programu NGW (METODY, pkt 4.13.2).

5.4.3. Charakterystyka sekwencji genomowej powyżej końca 5' i poniżej końca 3' fragmentu RDA-cDNA długości 243nt



Zdjęcie 5-30. Rozdział elektroforetyczny w 1.5% żelu agarozowym produktów reakcji PCR powyżej końca 5' (a) oraz poniżej końca 3' (b) fragmentu cDNA długości 243nt. W reakcji użyto starterów 5N_2SP1+AP2 (a) oraz 3N_2SP2+AP2 (b). Ścieżki k_n – kontrole negatywne reakcji PCR (bez matrycy). Amplifikację prowadzono wg programu NGW (METODY, pkt 4.13.2).

5.4.4. Charakterystyka sekwencji genomowej powyżej końca 5' i poniżej końca 3' fragmentu RDA-cDNA o długości 193nt



Zdjęcie 5-31. Rozdział elektroforetyczny w 1.5% żelu agarozowym produktów reakcji PCR powyżej końca 5' (a) oraz poniżej końca 3' (b) fragmentu cDNA długości 193nt. W reakcji użyto starterów 3'N_HMG2+AP2 (a) oraz 5N_HMG2g1+AP2 (b). Ścieżki k_n – kontrole negatywne reakcji PCR (bez matrycy). Amplifikację prowadzono wg programu NGW (METODY, pkt 4.13.2).

W celu udowodnienia, że amplifikowane końce sekwencji genomowych badanych genów pochodzą z jednego locus przeprowadzono reakcje amplifikacji pełnej długości genów.

5.5. Analiza bioinformatyczna pełnej długości sekwencji cDNA oraz odpowiednich genów wyselekcjonowanych metodą RDA-cDNA

Sekwencje uzyskane w wyniku sekwencjonowania produktów RACE oraz „spacer po genomie” edytowano używając programu ContigExpress pakietu oprogramowania VectorNTI Advance 10. Z otrzymanych sekwencji usunięto sekwencje wektora oraz starterów uniwersalnych, po czym złożono pełnej długości cDNA oraz sekwencje genomowe badanych genów. Poznanie sekwencji genomowych oraz odpowiednich cDNA umożliwiło określenie budowy poszczególnych analizowanych genów.

5.5.1. Analiza sekwencji cDNA oraz sekwencji genomowej uzyskanych z wyjściowego fragmentu cDNA długości 273nt

Eksperymenty RACE umożliwiły poznanie pełnej sekwencji cDNA badanego transkryptu, która wyniosła 2 216nt. Z wykorzystaniem narzędzia TranslateTool określono otwartą ramkę odczytu długości 448 aminokwasów (1 344nt, w pozycji 236nt transkryptu kodon start, w pozycji 1 579nt kodon stop UGA). Zarówno sekwencja cDNA, jak i białkowa zostały porównane z sekwencjami zdeponowanymi w bazie danych GeneBank za pomocą algorytmów blastx i blastp. Wyniki tych analiz przedstawiono w tabeli 5-11.

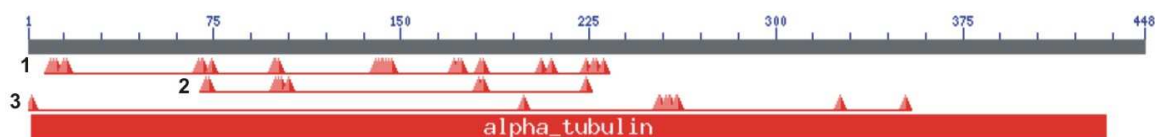
Tabela 5-11. Wyniki analizy bioinformatycznej dla cDNA długości 2 216nt oraz zawartej w nim otwartej ramki odczytu długości 448aa z wykorzystaniem algorytmów blastx i blastp. E-value = wartość E.

cDNA długości 2 216nt			
blastx	Gene ID	%*	E-value
Przewidywane białko <i>Physcomitrella patens</i>	gi 168061630 gb XP_001782790.1	99	0.0
α -tubulina <i>Physcomitrella patens</i>	gi 25396545 gb BAC24799.1	99	0.0

Hipotetyczna α -tubulina <i>Ricinus communis</i>	gi 255582570 gb XP_002532068.1	97	0.0
α -tubulina 6 <i>Zea mays</i>	gi 162462001 gb NP_001105588.1	97	0.0
α -tubulina 3, <i>TUA3 Arabidopsis thaliana</i>	gi 15241168 gb NP_197478.1	97	0.0
α -tubulina 5, <i>TUA5 Arabidopsis thaliana</i>	gi 15241179 gb NP_197479.1	97	0.0
ORF długości 448aa			
blastp	Gene ID	%*	E-value
Przewidywane białko <i>Physcomitrella patens</i>	gi 168049259 gb XP_001777081.1	97	0.0
α -tubulina <i>Physcomitrella patens</i>	gi 25396545 gb BAC24799.1	97	0.0
α -tubulina 1 <i>Oryza sativa</i>	gi 20379 gb CAA77988.1	95	0.0
α -tubulina <i>Miscanthus floridulus</i>	gi 37936228 gb CAD26891.1	95	0.0
α -tubulina 6 <i>Zea mays</i>	gi 162462001 gb NP_001105588.1	97	0.0
α -tubulina 3, <i>TUA3 Arabidopsis thaliana</i>	gi 15241168 gb NP_197478.1	97	0.0
α -tubulina 5, <i>TUA5 Arabidopsis thaliana</i>	gi 15241179 gb NP_197479.1	97	0.0

* procent podobieństwa analizowanej sekwencji względem sekwencji z bazy danych GenBank.

Analiza sekwencji aminokwasowej otrzymanej ramki odczytu wykazała przynależność badanego białka do rodziny α -tubulin (schemat 5-1).



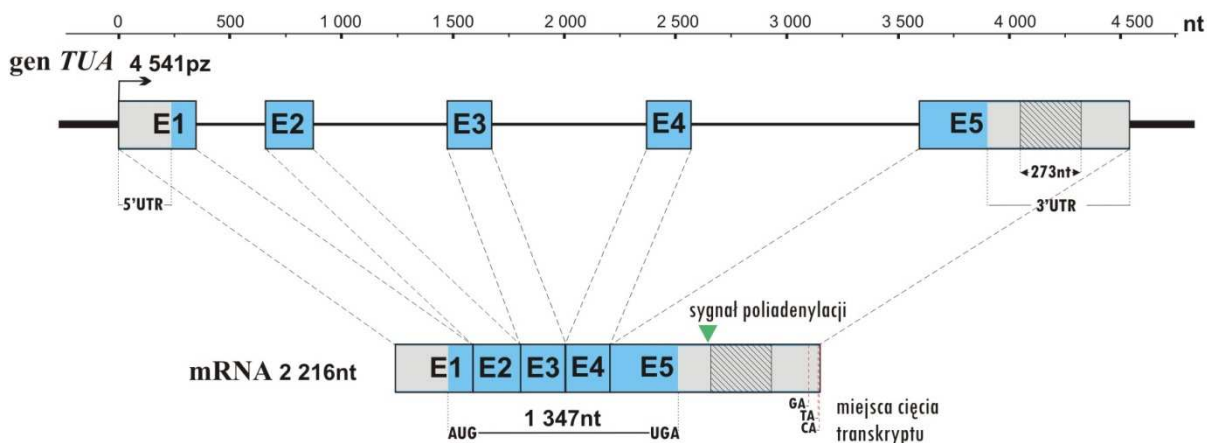
Schemat 5-1. Wynik wyszukiwania konserwatywnych domen dla ORF długości 448aa (Baza Domen Konserwatywnych - NCBI Conserved Domain Database, CDD). Linia czarna reprezentuje długość analizowanej sekwencji aminokwasowej. Czerwony kolor wskazuje na rejon analizowanego fragmentu białka z *P. endiviifolia* sp B, w którym znajduje się zidentyfikowana przez program domena α -tubuliny. Numerem 1 wskazano 30 z 30 konserwatywnych reszt aminokwasowych wiążących GTP lub GDP. Numerem 2 wskazano 9 z 9 konserwatywnych reszt aminokwasowych biorących udział w oddziaływaniach domen α/β -tubulin. Numerem 3 wskazano 11 z 11 konserwatywnych reszt aminokwasowych biorących udział w oddziaływaniach domen β/α -tubulin.

Przewidywana sekwencja białkowa została przyrównana z sekwencjami aminokwasowymi wykazującymi najwyższy stopień podobieństwa za pomocą programu ClustalW2 (w przypadku genu *P.patens* w porównaniu wykorzystano tylko jedną sekwencję aminokwasową, kodowaną przez gen gi|25396545|gb|BAC24799.1|, ze względu na identyczność tej sekwencji z sekwencją aminokwasową kodowaną przez drugi z genów *P.patens*, gi|168061630|gb|XP_001782790.1|). Porównanie to potwierdziło wysoce konserwatywny charakter białka *P.endiviifolia* sp B i jego przynależność do rodziny roślinnych α -tubulin (schemat 5-2).

OsTUA1/1-450	1	MREIISIHIGQAGIQVGNACWELYCLEHGIQPDGIMP
ZmTUA6/1-450	1	MREIISIHIGQAGIQVGNACWELYCLEHGIQPDGIMP
AtTUA3/1-450	1	MREIISIHIGQAGIQVGNACWELYCLEHGIQPDGIMP
AtTUA5/1-450	1	MREIISIHIGQAGIQVGNACWELYCLEHGIQPDGIMP
PeBTUA/1-448	1	MREIISIHIGQAGIQVGNACWELYCLEHGIQPDGIMP
PpTUA /1-449	1	MREIISIHIGQAGIQVGNACWELYCLEHGIQPDGIMP
consensus	1	*****.*****.*** *...*****.*****.
OsTUA1/1-450	68	VDLEPTVIDEVRTGSRQFLFHPQLISGKEDAANNFARGHYTVGKEIVDLCLDRVRKLDNCTGLQ
ZmTUA6/1-450	68	VDLEPTVIDEVRTGSRQFLFHPQLISGKEDAANNFARGHYTVGKEIVDLCLDRVRKLDNCTGLQ
AtTUA3/1-450	68	VDLEPTVIDEVRTGTYRQFLFHPQLISGKEDAANNFARGHYTVGKEIVDLCLDRVRKLDNCTGLQ
AtTUA5/1-450	68	VDLEPTVIDEVRTGTYRQFLFHPQLISGKEDAANNFARGHYTVGKEIVDLCLDRVRKLDNCTGLQ
PeBTUA/1-448	68	VDLEPTVIDEVRTGTYRQFLFHPQLISGKEDAANNFARGHYTVGKEIVDLCLDRVRKLDNCTGLQ
PpTUA /1-449	68	VDLEPTVIDEVRTGTYRQFLFHPQLISGKEDAANNFARGHYTVGKEIVDLCLDRVRKLDNCTGLQ
consensus	68	*****.*****.*****.*****.*****.*****.

metioniny, cysteiny, histydyny, glutaminy, asparaginy, lizyny, tyrozyny, fenyloalaniny, proliny, argininy, izoleucyny i treoniny. Najmniej, zaledwie 0.7% stanowią reszty tryptofanu. Przeważają reszty aminokwasów obdarzonych ładunkiem ujemnym. Określono również potencjalną lokalizację białka za pomocą programów PSORT, TargetP oraz ProtComp, które wykazały, że prawdopodobnie jest to rozpuszczalne białko cytoplazmatyczne.

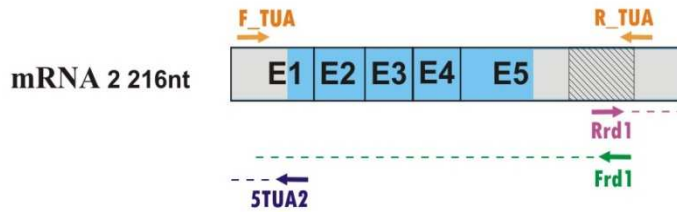
Eksperymenty typu „spacer po genomie” umożliwiły uzyskanie sekwencji genomowej długości 5 628pz, obejmującej całą sekwencję cDNA, w tym wyjściową sekwencję fragmentu RDA-cDNA długości 273nt. Po przyrównaniu sekwencji DNA z sekwencją cDNA określono długość oraz budowę genu *tua* kodującego α -tubulinę *P.endiviifolia* sp B. Za początek i koniec genu uznano fragment DNA genomowego, który pokrył się z najdłuższymi wyznaczonymi końcami 5' i 3' cDNA – w ten sposób określono długość genu *TUA* na 4 541pz. Gen ten zbudowany jest z pięciu egzonów długości odpowiednio 348pz, 215pz, 200pz, 202pz, 944pz, które przedzielone są czterema intronami typu U2 długości odpowiednio 309pz, 602pz, 695pz, 1 026pz. Długość regionu 5'UTR wynosi 235nt, regionu 3'UTR 633 nt, a długość sekwencji kodującej wynosi 1 344nt. W rejonie 4 345-4 350 genu (2 020-2 025 transkryptu) znajduje się przewidziany bioinformatycznie sygnał poliadenylacji ACTAAA (437nt za kodonem stop). W wyniku analiz sekwencji uzyskanych w reakcji 3'RACE zidentyfikowano trzy miejsca cięcia transkryptu: GA 135nt poniżej sygnału poliadenylacji, TA 158nt poniżej sygnału poliadenylacji, CA 189nt poniżej sygnału poliadenylacji. Na schemacie 5-3 przedstawiono budowę genu oraz transkryptu α -tubuliny *P.endiviifolia* sp B.



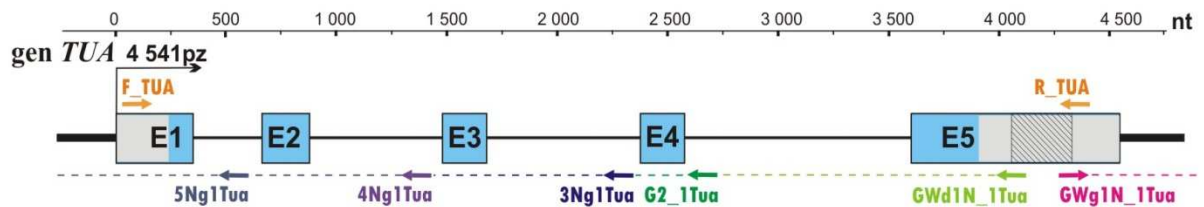
Schemat 5-3. Rysunek obrazujący budowę genu *TUA* *P.endiviifolia* sp B oraz powstającego z niego transkryptu. Prostokąty odpowiadają egzonom, w których kolorem szarym zaznaczono rejonu UTR, a kolorem błękitnym sekwencję kodującą. Linie między egzonami reprezentują introny. Obszar o ukośnym kreskowaniu wyznacza sekwencję długości 273nt, uzyskaną w wyniku eksperymentu RDA-cDNA. Dodatkowo w obrębie transkryptu zaznaczono zielonym trójkątem położenie sygnału poliadenylacji, czerwonymi pionowymi liniami miejsca cięcia transkryptu.

Na dwóch poniższych schematach przedstawiono położenie starterów, które wykorzystano do charakterystyki końców 5' i 3' cDNA (schemat 5-4) badanego fragmentu RDA-cDNA oraz

położenie starterów, które wykorzystano do charakterystyki sekwencji genomowej obejmującej badany fragment cDNA (schemat 5-5). Dla przejrzystości rysunku uwzględniono jedynie startery wewnętrzne wykorzystane podczas drugich rund reakcji PCR.



Schemat 5-4. Rysunek przedstawiający położenie starterów w eksperymentach RACE w celu charakterystyki pełnej długości cDNA zawierającego fragment RDA-cDNA długości 273nt oraz starterów służących amplifikacji pełnej długości cDNA (F_TUA/R_TUA – startery zaprojektowane na podstawie sekwencji 5’/3’UTR). Kolorem zielonym i niebieskim zaznaczono startery wykorzystane w celu wyznaczenia końca 5’ transkryptu, kolorem różowym zaznaczono starter wykorzystany w celu wyznaczenia końca 3’ transkryptu. Przerywane linie odpowiadają długościom produktów poszczególnych reakcji PCR.



Schemat 5-5. Rysunek przedstawiający położenie starterów wykorzystanych w eksperymencie „spacer po genomie” w celu charakterystyki sekwencji genomowej zawierającej sekwencję fragmentu RDA-cDNA długości 273nt oraz starterów służących amplifikacji pełnej długości genu (F_TUA/R_TUA – startery zaprojektowane na podstawie sekwencji 5’/3’UTR). Kolorami zielonymi i niebieskimi zaznaczono startery wykorzystane w poszczególnych krokach amplifikacji sekwencji DNA położonych powyżej końca 5’ badanego fragmentu RDA-cDNA; kolorem różowym zaznaczono starter wykorzystany do amplifikacji sekwencji DNA położonej poniżej końca 3’ badanego fragmentu RDA-cDNA.

Analizie poddano również procentowy udział poszczególnych nukleotydów w genie *TUA P. endiviifolia* sp B, który przedstawiono w tabeli 5-12.

Tabela 5-12. Procentowy udział poszczególnych nukleotydów w sekwencji genu *TUA P. endiviifolia* sp B

Gen <i>TUA</i>	% reszt A	% reszt G	% reszt T	% reszt C	% reszt A+T	% reszt G+C
Sekwencja genomowa	24.71	22.46	33.27	19.56	57.98	42.02
Sekwencja cDNA	24.41	24.82	30.42	20.35	54.83	45.17
Egzon 1	23.28	26.44	27.30	22.99	50.57	49.43
Intron 1	21.68	24.92	36.25	17.15	57.93	42.07
Egzon 2	26.05	25.58	25.12	23.26	51.16	48.84
Intron 2	24.25	26.08	32.89	16.78	57.14	42.86
Egzon 3	21.00	27.50	29.50	22.00	50.50	49.50
Intron 3	25.61	18.99	35.54	19.86	61.15	38.85
Egzon 4	26.24	25.74	27.72	20.30	53.96	46.04
Intron 4	25.63	15.69	37.52	21.15	63.16	36.84
Egzon 5	25.00	25.32	32.31	17.37	57.31	42.69

5.5.2. Analiza sekwencji cDNA oraz sekwencji genomowej uzyskanych z wyjściowego fragmentu RDA-cDNA długości 229nt wykazującego podobieństwo do roślinnych genów kodujących białka Rab

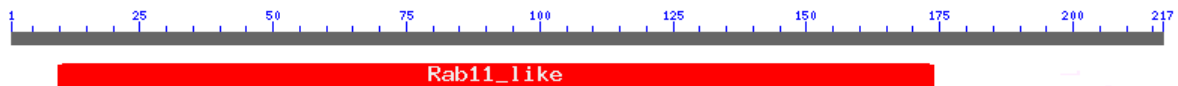
Eksperymenty RACE umożliwiły poznanie pełnej sekwencji cDNA badanego transkryptu, która wyniosła 1 330nt. Z wykorzystaniem narzędzia TranslateTool określono otwartą ramkę odczytu długości 217 aminokwasów (651nt, w pozycji 273nt transkryptu kodon start, w pozycji 923nt kodon stop UGA). Zarówno sekwencja cDNA, jak i białkowa zostały przyrównane z sekwencjami zdeponowanymi w bazie danych GeneBank za pomocą algorytmów blastx i blastp. Wyniki tych analiz przedstawiono w tabeli 5-13.

Tabela 5-13. Wyniki analizy bioinformatycznej dla cDNA długości 1 330nt oraz zawartej w nim otwartej ramki odczytu długości 217aa z wykorzystaniem algorytmów blastx i blastp. E-value = wartość E; AtRABA1f - Arabidopsis Rab GTPase homolog A1f.

cDNA długości 1 330nt			
blastx	Gene ID	%*	E-value
GTPaza z rodziny Rab <i>Selaginella moellendorffii</i>	gi 302771698 gb XP_002969267.1	92	6e-109
AtRABA1f <i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 15239462 gb NP_200894.1	82	2e-98
Białko Rab <i>Triticum aestivum</i>	gi 51243763 gb AAT99574.1	82	4e-98
Białko Rab11b <i>Zea mays</i>	gi 226509624 gb NP_001151123.1	77	7e-94
AtRabA1g <i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 15232477 gb NP_188124.1	79	4e-95
Rab11/RabA GTPaza <i>Physcomitrella patens</i>	gi 168006845 gb XP_001756119.1	77	2e-87
ORF długości 217aa			
blastp	Gene ID	%*	E-value
GTPaza z rodziny Rab <i>Selaginella moellendorffii</i>	gi 302771698 gb XP_002969267	92	2e-114
Białko Rab <i>Triticum aestivum</i>	gi 51243763 gb AAT99574	82	2e-103
Hipotetyczne białko wiążące GTP <i>Oryza sativa</i>	gi 50511479 gb AAT77401	82	2e-103
Białko Rab11b <i>Zea mays</i>	gi 226509624 gb NP_001151123	77	2e-99
Rab11/RabA GTPaza <i>Physcomitrella patens</i>	gi 168006845 gb XP_001756119	77	5e-99
AtRabA1f <i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 15239462 gb NP_200894	83	3e-100
Białko wiążące GTP <i>Pisum sativum</i>	gi 303742 gb BAA02112	77	1e-102

* procent podobieństwa analizowanej sekwencji względem sekwencji z bazy danych GenBank.

Analiza sekwencji aminokwasowej otrzymanej ramki odczytu wykazała obecność w badanej sekwencji domeny konserwatywnej występującej w białkach należących do rodziny białek Rab11 (schemat 5-6).

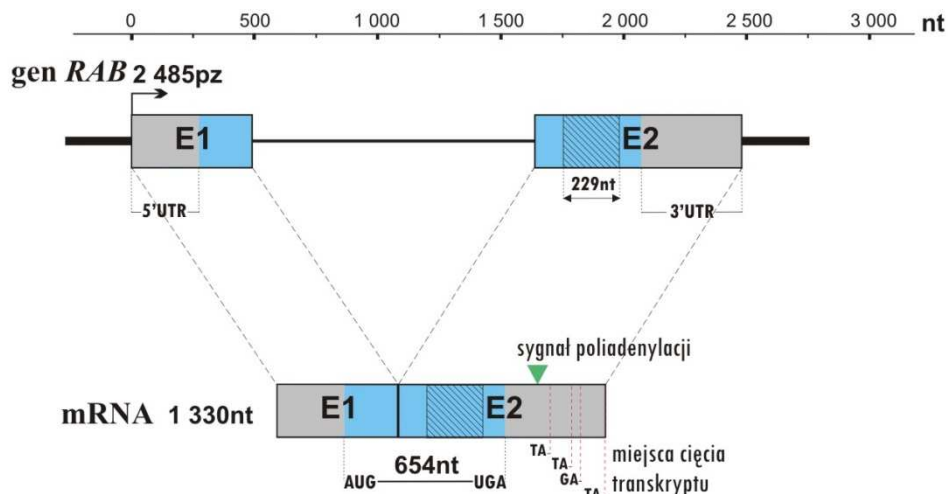


Schemat 5-6. Wynik wyszukiwania konserwatywnych domen dla ORF długości 217aa (Baza Domen Konserwatywnych - NCBI Conserved Domain Database, CDD). Linia czarna reprezentuje długość analizowanej sekwencji aminokwasowej. Czerwony kolor wskazuje na rejon analizowanego fragmentu białka z *P. endiviifolia* sp B, w którym znajduje się zidentyfikowana przez program domena o wysokim podobieństwie do domeny białek Rab11.

Przewidywana sekwencja białkowa została przyrównana z sekwencjami aminokwasowymi wykazującymi najwyższy stopień podobieństwa za pomocą programu ClustalW2.

komórki roślinnej. Białko Rab prawdopodobnie zlokalizowane jest w cytoplazmie i zaangażowane jest w transport pęcherzykowy związany z błoną komórkową.

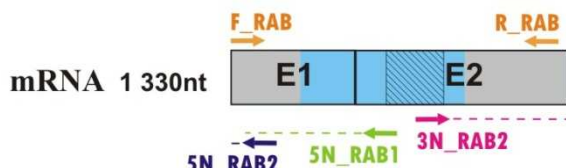
Eksperymenty typu „spacer po genomie” umożliwiły uzyskanie sekwencji genomowej długości 3 767pz, obejmującej całą sekwencję cDNA, w tym wyjściową sekwencję fragmentu RDA-cDNA długości 229nt. Po przyrównaniu sekwencji DNA z sekwencją cDNA określono długość oraz budowę genu *RAB* kodującego białko Rab *P.endiviifolia* sp B, spokrewnione z rodziną białek Ras. Za początek i koniec genu uznano fragment DNA genomowego, który pokrył się z najdłuższymi wyznaczonymi końcami 5' i 3' cDNA – w ten sposób określono długość genu *RAB* na 2 485pz. Gen ten zbudowany jest z dwóch egzonów długości odpowiednio 490pz i 845pz, które przedzielone są intronem typu U2 długości 1 150pz. Długość regionu 5'UTR wynosi 272nt, regionu 3'UTR 409 nt, a długość sekwencji kodującej wynosi 651nt. W pozycji 2 204 – 2 209 genu (1 054 – 1 059 transkryptu) znajduje się przewidziany bioinformatycznie sygnał poliadenylacji AATAA (128nt za kodonem stop). W wyniku analiz sekwencji uzyskanych w reakcji 3'RACE zidentyfikowano cztery miejsca cięcia transkryptu: TA 50nt poniżej sygnału poliadenylacji, TA 143nt poniżej sygnału poliadenylacji, GA 173nt poniżej sygnału poliadenylacji, TA 276nt poniżej sygnału poliadenylacji. Na schemacie 5-8 przedstawiono budowę genu *rab P.endiviifolia* sp B oraz transkryptu powstającego z tego genu.



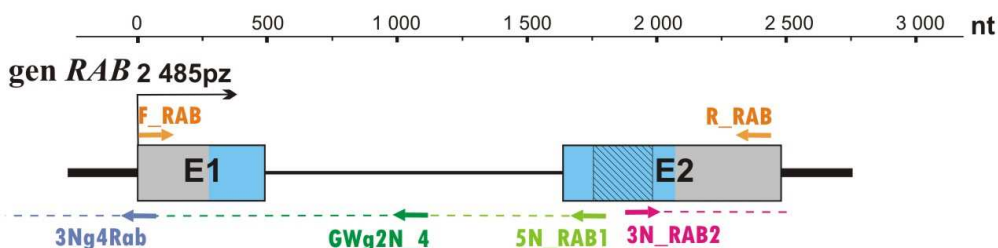
Schemat 5-8. Rysunek obrazujący budowę genu *RAB P.endiviifolia* sp B oraz powstającego z niego transkryptu. Prostokąty odpowiadają egzonom, w których kolorem szarym zaznaczono rejony UTR, a kolorem błękitnym sekwencję kodującą. Linia między egzonami reprezentuje intron. Obszar o ukośnym kreskowaniu wyznacza sekwencję długości 229nt, uzyskaną w wyniku eksperymentu RDA-cDNA. Dodatkowo w obrębie transkryptu zaznaczono zielonym trójkątem położenie sygnału poliadenylacji, czerwonymi pionowymi liniami miejsca cięcia transkryptu.

Na dwóch poniższych schematach przedstawiono położenie starterów, które wykorzystano do charakterystyki końców 5' i 3' cDNA (schemat 5-9) badanego fragmentu RDA-cDNA oraz położenie starterów, które wykorzystano do charakterystyki sekwencji genomowej

obejmującej badany fragment RDA-cDNA (schemat 5-10). Dla przejrzystości rysunków uwzględniono jedynie startery wewnętrzne wykorzystane podczas drugich rund reakcji PCR.



Schemat 5-9. Rysunek przedstawiający położenie starterów w eksperymentach RACE w celu charakterystyki pełnej długości cDNA zawierającego fragment RDA-cDNA długości 229nt oraz starterów służących amplifikacji pełnej długości cDNA (F_RAB/R_RAB – startery zaprojektowane na podstawie sekwencji 5'/3'UTR). Kolorem zielonym i niebieskim zaznaczono startery wykorzystane w celu wyznaczenia końca 5' transkryptu, kolorem różowym zaznaczono starter wykorzystany w celu wyznaczenia końca 3' transkryptu. Przerwane linie odpowiadają długościom produktów poszczególnych reakcji PCR.



Schemat 5-10. Rysunek przedstawiający położenie starterów wykorzystanych w eksperymencie „spacer po genomie” w celu charakterystyki sekwencji genomowej obejmującej sekwencję fragmentu RDA-cDNA długości 229nt oraz starterów służących amplifikacji pełnej długości genu (F_RAB/R_RAB – startery zaprojektowane na podstawie sekwencji 5'/3'UTR). Kolorami zielonymi i niebieskimi zaznaczono startery wykorzystane w poszczególnych krokach amplifikacji sekwencji DNA położonych powyżej końca 5' badanego fragmentu RDA-cDNA; kolorem różowym zaznaczono starter wykorzystany do amplifikacji sekwencji DNA położonej poniżej końca 3' badanego fragmentu RDA-cDNA.

Analizie poddano również procentowy udział poszczególnych nukleotydów w genie *RAB P. endiviifolia* sp B, który przedstawiono w tabeli 5-14.

Tabela 5-14. Procentowy udział poszczególnych nukleotydów w sekwencji genu *RAB P. endiviifolia* sp B

Gen <i>RAB</i>	% reszt A	% reszt G	% reszt T	% reszt C	% reszt A+T	% reszt G+C
Sekwencja genomowa	26.01	23.63	32.17	18.20	58.17	41.83
Sekwencja cDNA	27.89	23.83	30.30	17.97	58.20	41.80
Egzon 1	28.44	26.15	25.69	19.72	54.13	45.87
Intron	23.19	23.30	34.35	18.43	58.26	41.74
Egzon 2	26.86	23.20	32.78	17.16	59.64	40.36

5.5.3. Analiza sekwencji cDNA oraz sekwencji genomowej uzyskanych z wyjściowego fragmentu cDNA długości 243nt

Eksperymenty RACE umożliwiły poznanie pełnej sekwencji cDNA badanego transkryptu, która wyniosła 2 689nt. Z wykorzystaniem narzędzia TranslateTool określono otwartą ramkę odczytu długości 295 aminokwasów (885nt, w pozycji 1 198nt transkryptu kodon start, w pozycji 2 082nt kodon stop UAA). Zarówno sekwencja cDNA, jak i białkowa zostały

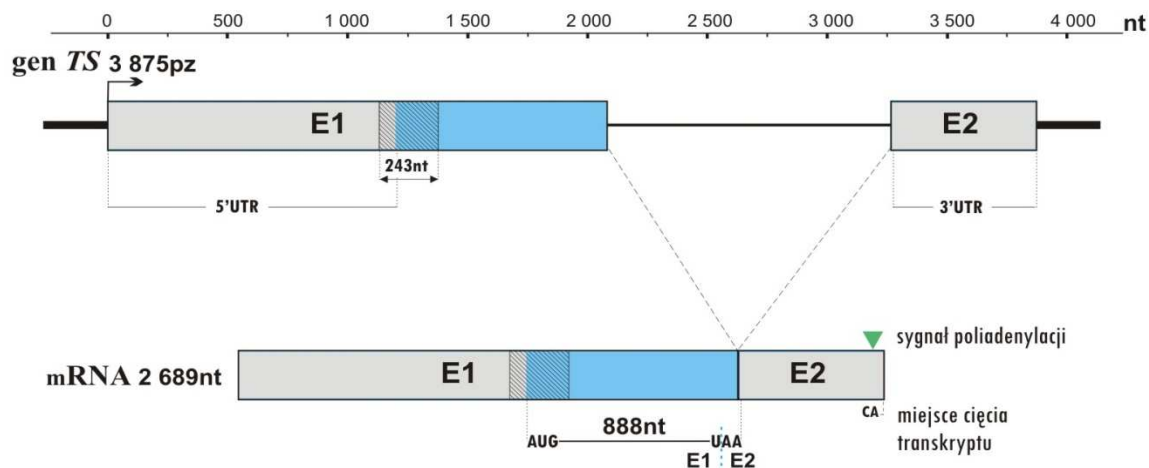
przyrównane z sekwencjami zdeponowanymi w bazie danych GeneBank za pomocą algorytmów blastn, blastx i blastp. Niestety żadna z tych analiz nie wykazała podobieństwa do znanych sekwencji nukleotydowych, czy aminokwasowych. Również programy MotifScan, oraz SMART MODE nie przyniosły żadnej informacji na temat potencjalnych motywów, czy domen obecnych w analizowanej sekwencji białkowej. Jedynie analizy z wykorzystaniem programu InterProScan wykazały obecność na aminowym końcu białka nachodzących na siebie sekwencji peptydu sygnałowego (reszty aa 1-22, zakreślone kolorem żółtym) i domeny transbłonowej (reszty aa 15-35, kolor czerwony czcionki). Poniżej przedstawiono sekwencję aminokwasową badanego białka, kolorem żółtym zakreślono reszty potencjalnego peptydu sygnałowego, natomiast czerwoną czcionką wyróżniono reszty potencjalnej domeny transbłonowej:

MHQSEAMKIFMKSVLLVAAIAG**QLLNSSHIAQAAG**LTLPPILDPIINPINN
 LTSPILDPLNNLTTPLLSPLITNLTSPILDPLNNLTSAPIVGLNLTTLVGLSLNL
 TAGTPALNLSLILGPLNLTAGTGLNLSNIIGPWNNLTGPLQTLISNFTGPAS
 NLTVATNVTVTVTLNLPSTMLNLASVFPNGMTIVPLGMTEVSISLRSLSLQG
 TNLSTVPVQFMVPVISYLNFPVSGSAGVTLDIAPGTKLAITGLTTPITRLFF
 GVSWSQTFPQLTNVLISKILPGSSQPPLYNFAPALM

Ze względu na brak jakiegokolwiek podobieństwa uzyskanej sekwencji cDNA oraz białkowej do znanych sekwencji zdeponowanych w internetowych bazach danych, badany gen nazwano *TS* – tajemnicza sekwencja. Za pomocą programu ProtParam określono właściwości fizykochemiczne przewidywanego białka, którego masę cząsteczkową oszacowano bioinformatycznie na 30.709kDa, a punkt izoelektryczny na pI=6.70. Białko to jest bogate w reszty leucyny (17.3%), treoniny (11.9%), proliny (9.8%), asparaginy (9.2%) i seryny (8.8%). W przedziale 6.4 – 7.8% występują reszty alaniny, glicyny, waliny, izoleucyny; w przedziale 0.7 – 3.1% występują reszty tyrozyny, histydyny, kwasu glutaminowego, argininy, tryptofanu, kwasu asparaginowego, lizyny, metioniny, fenyloalaniny, glutaminy. W ogóle nie występują reszty cysteiny. Aminokwasy obdarzone ładunkiem ujemnym i dodatnim występują w tej samej ilości, po sześć reszt w sekwencji białka *Ts*. Za pomocą programów PSORT, TargetP oraz ProtComp przeanalizowano sekwencję białka *Ts* pod względem jego potencjalnej lokalizacji na terenie komórki roślinnej. Analizy te niejednoznacznie wskazały na związek uzyskanego białka z błoną komórkową lub błoną peroksysomów.

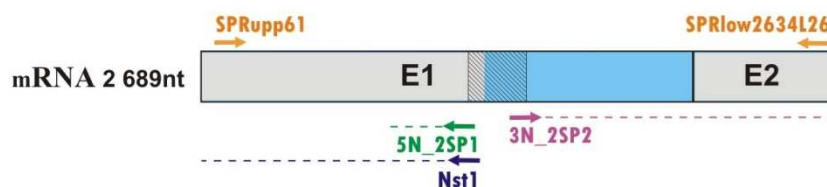
Eksperymenty typu „spacer po genomie” umożliwiły uzyskanie sekwencji genomowej długości 5 877pz, obejmującej całą sekwencję cDNA, w tym wyjściową sekwencję fragmentu RDA-cDNA długości 243nt. Po przyrównaniu sekwencji DNA z sekwencją cDNA określono długość oraz budowę genu *TS P. endiviifolia* sp B. Za początek i koniec genu uznano fragment DNA genomowego, który pokrył się z najdłuższymi wyznaczonymi końcami 5' i 3' cDNA – w ten sposób określono długość genu *TS* na 3 875pz. Gen ten zbudowany jest z dwóch

egzonów długości odpowiednio 2 803pz i 607pz, które przedzielone są intronem typu U2 długości 1 185pz. Długość regionu 5'UTR wynosi 1 197nt (jest to niezwykle długi 5' UTR jak na 5'UTR-y znane u innych roślin), regionu 3'UTR 605 nt, a długość sekwencji kodującej wynosi 888nt. W pozycji 3 833 – 3 838 genu (2 648 – 2 653 transkryptu) znajduje się przewidziany bioinformatycznie sygnał poliadenylacji AATAA (562nt za kodonem stop). W wyniku analiz sekwencji uzyskanych w reakcji 3'RACE zidentyfikowano jedno miejsca cięcia transkryptu: CA 37nt poniżej sygnału poliadenylacji. Na schemacie 5-11 przedstawiono budowę genu *TS P.endiviifolia* sp B oraz transkryptu powstającego z tego genu.

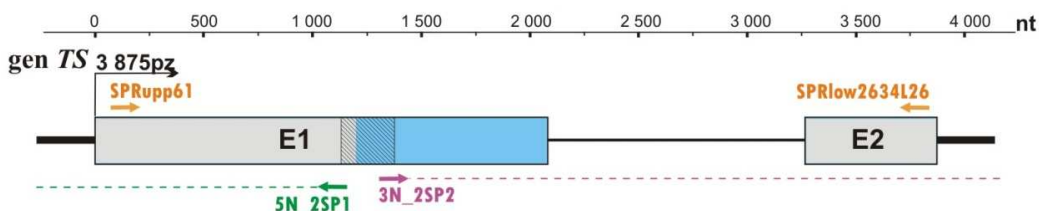


Schemat 5-11. Rysunek obrazujący budowę genu *TS P.endiviifolia* sp B oraz powstającego z niego transkryptu. Prostokąty odpowiadają egzonom, w których kolorem szarym zaznaczono rejony UTR, a kolorem błękitnym sekwencję kodującą. Linia między egzonami reprezentuje intron. Obszar o ukośnym kreskowaniu wyznacza sekwencję długości 243nt, uzyskaną w wyniku eksperymentu RDA-cDNA. Dodatkowo w obrębie transkryptu zaznaczono zielonym trójkątem położenie sygnału poliadenylacji, czerwoną pionową linią miejsce cięcia transkryptu.

Na dwóch poniższych schematach przedstawiono położenie starterów, które wykorzystano do charakterystyki końców 5' i 3' cDNA (schemat 5-12) badanego fragmentu RDA-cDNA oraz położenie starterów, które wykorzystano do charakterystyki sekwencji genomowej obejmującej badany fragment RDA-cDNA (schemat 5-13). Dla przejrzystości rysunków uwzględniono jedynie startery wewnętrzne wykorzystane podczas drugich rund reakcji PCR.



Schemat 5-12. Rysunek przedstawiający położenie starterów w eksperymentach RACE w celu charakterystyki pełnej długości cDNA zawierającego fragment RDA-cDNA długości 243nt oraz starterów służących amplifikacji pełnej długości cDNA (SPRupp61/SPRlow2634L26 – startery zaprojektowane na podstawie sekwencji 5'/3'UTR). Kolorem zielonym i niebieskim zaznaczono startery wykorzystane w celu wyznaczenia końca 5' transkryptu, kolorem różowym zaznaczono starter wykorzystany w celu wyznaczenia końca 3' transkryptu. Przerwane linie odpowiadają długościom produktów poszczególnych reakcji PCR.



Schemat 5-13. Rysunek przedstawiający położenie starterów wykorzystanych w eksperymencie „spacer po genomie” w celu charakterystyki sekwencji genomowej zawierającej sekwencję fragmentu RDA-cDNA długości 243nt oraz starterów służących amplifikacji pełnej długości genu (SPRupp61/SPRlow2634L26 – startery zaprojektowane na podstawie sekwencji 5'/3'UTR). Kolorami zielonym zaznaczono starter wykorzystany w amplifikacji sekwencji DNA położonej powyżej końca 5' badanego fragmentu RDA-cDNA; kolorem różowym zaznaczono starter wykorzystany do amplifikacji sekwencji DNA położonej poniżej końca 3' badanego fragmentu RDA-cDNA.

Analizie poddano również procentowy udział poszczególnych nukleotydów w genie *TS P. endiviifolia* sp B, który przedstawiono w tabeli 5-15.

Tabela 5-15. Procentowy udział poszczególnych nukleotydów w sekwencji genu *TS P. endiviifolia* sp B

Gen <i>TS</i>	% reszt A	% reszt G	% reszt T	% reszt C	% reszt A+T	% reszt G+C
Sekwencja genomowa	25.86	22.55	28.26	23.33	54.12	45.88
Sekwencja cDNA	26.10	22.71	26.62	24.57	52.71	47.29
Egzon 1	24.92	22.85	26.40	25.83	51.32	48.68
Intron	25.23	22.28	31.98	20.51	57.22	42.78
Egzon 2	30.31	22.08	27.35	20.26	57.66	42.34

5.5.4. Analiza sekwencji cDNA oraz sekwencji genomowej uzyskanych z wyjściowego fragmentu cDNA długości 193nt

Eksperymenty RACE umożliwiły poznanie pełnej sekwencji cDNA badanego transkryptu. W wyniku analiz uzyskanych sekwencji zidentyfikowano 2 cząsteczki cDNA różniące się długością końców 3': krótszą długości 758nt i dłuższą – 1 164nt. Z wykorzystaniem narzędzia TranslateTool określono otwartą ramkę odczytu w obu cząsteczkach cDNA. Okazało się, że w obrębie obu cDNA występuje taka sama otwarta ramka odczytu długości 120 aminokwasów (360nt, w pozycji 267 transkryptu kodon start, w pozycji 626nt kodon stop UAA). Dwa zidentyfikowane transkrypty różnią się długością oraz sekwencją nukleotydową w obrębie rejonu 3'UTR. Zarówno sekwencje cDNA, jak i białkowa zostały przyrównane z sekwencjami zdeponowanymi w bazie danych GeneBank za pomocą algorytmów blastx i blastp. Wyniki tej analiz przedstawiono w tabeli 5-16.

Tabela 5-16. Wyniki analizy bioinformatycznej dla cDNA długości 757nt i 1 164nt oraz zawartej w nich otwartej ramki odczytu długości 120aa z wykorzystaniem algorytmów blastx i blastp. E-value = wartość E; HMG – High Mobility Group.

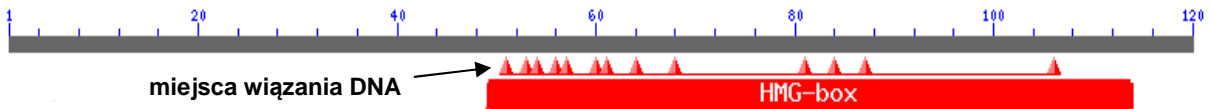
cDNA długości 757nt i 1 164nt			
blastx	Gene ID	%*	E-value
Przewidywane białko posiadające domenę HMGbox <i>Physcomitrella patens subsp. patens</i>	gi 168012074 gb XP_001758727	54	5e-18
Hipotetyczne białko VOLCADRAFT_77427 <i>Volvox carteri f. nagariensis</i>	gi 302851253 gb XP_002957151	48	2e-14

WYNIKI

Białko wiążące nukleosom <i>Ajellomyces dermatitidis</i> ER-3	gi 239606992 gb EEQ83979	47	1e-13
Białko zawierające domenę HMGbox <i>Nectria haematococca</i> mpVI 77-13-4	gi 302926833 gb XP_003054372	46	2e-13
Białko wiążące nukleosom <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb01	gi 295671110 gb XP_002796098	47	3e-13
Białko ssrp1 <i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	gi 297815172 gb XP_002875469	43	4e-12
Czynnik transkrypcyjny AtHMG <i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 15228471 gb NP_189515	40	5e-11
Hipotetyczne białko HMGbox <i>Oryza sativa</i>	gi 115462441 gb NP_001054820	40	2e-11
ORF długości 217aa			
blastp	Gene ID	%*	E-value
Przewidywane białko posiadające domenę HMGbox <i>Physcomitrella patens</i> subsp. <i>patens</i>	gi 168012074 gb XP_001758727	48	5e-19
Konserwatywne hipotetyczne białko <i>Chaetomium globosum</i>	gi 116206850 gb XP_001229234	42	3e-15
Hipotetyczne białko VOLCADRAFT_77427 <i>Volvox carteri</i> f. <i>nagariensis</i>	gi 302851253 gb XP_002957151	48	2e-14
Białko wiążące nukleosom <i>Ajellomyces dermatitidis</i> ER-3	gi 239606992 gb EEQ83979	46	6e-14
Białko wiążące nukleosom <i>Verticillium albo-atrum</i>	gi 168006845 gb XP_001756119	43	2e-14
Białko wiążące nukleosom <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	gi 225681708 gb EEH19992	45	4e-14
Białko HMG <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	gi 159478607 gb XP_001697394	29	1e-11

* procent podobieństwa analizowanej sekwencji względem sekwencji z bazy danych GenBank.

Analiza sekwencji aminokwasowej otrzymanej ramki odczytu wykazała obecność w badanej sekwencji konserwatywnej domeny HMGbox, która występuje w licznych eukariotycznych białkach chromosomowych oraz w czynnikach transkrypcyjnych (schemat 5-14).



Schemat 5-14. Wynik wyszukiwania konserwatywnych domen dla ORF długości 120aa (Baza Domen Konserwatywnych - NCBI Conserved Domain Database, CDD). Linia szara reprezentuje długość analizowanej sekwencji aminokwasowej. Czerwony kolor wskazuje na rejon analizowanego fragmentu białka z *P. endiviifolia* sp B, w którym znajduje się zidentyfikowana przez program domena o wysokim podobieństwie do domeny HMGbox. Czerwone trójkąty wskazują 13 z 13 konserwatywnych reszt aminokwasowych biorących udział w oddziaływaniu domeny HMGbox z DNA.

Przewidywana sekwencja białkowa została przyrównana z sekwencjami aminokwasowymi wykazującymi najwyższy stopień podobieństwa za pomocą programu ClustalW2. Przyrównanie to potwierdziło obecność konserwatywnych reszt aminokwasowych białka *P. endiviifolia* sp B, charakterystycznych dla domeny HMGbox (schemat 5-15).

Va-a_NBP/1-36	1	-----MPKAAAKRGAGGKKAQKRAKKDPNAPKRGLSAYMFFA
Chg_conhypP/1-36	1	-----MPKAAKSRSGAEEKKTRQKKDPNAPKRGLSAYMFFA
Ad_NBP/1-35	1	-----MPKKEKTRKTKVVRGKPKK-KKDPNAPKRGLSAYMFFA
Vc_hypp/1-35	1	-----MPKAAKEKPEAAKREKK-VKDPNAPKPLGAYMFFC
PeB_HMGbox/1-60	1	MGKATLTKGKSGSGRGVTKASSSRCRSSSKRKGKEEKRTRKVKDKRRPKRALGPYMYFC
Pp_pHMGbox/1-33	1	-----KAISSAKR---AIRKLRKQERAWRPKRAIGPYMYFC
consensus	1**.....**.*

```

Va-a_NBP/37-93      37 NEQRENVREENPGISFGQVGLLGERWKALNEKQRGPYEAKAVADKKRYEDEKAAYN---
Chg_conhypp/37-93  37 NEQRDNVREENPGVVSFGQVGLLGERWKALSQKQAPYEAKAAADKKRYEDEKQAYN---
Ad_NBP/1-92        36 NEQRDNVREENPGISFGQVGLLGERWKALNEKQAPYEAKAAADKKRYEDEKASYNARR
Vc_hypp/1-92      36 KDMRERYKAEENPGMSVTDIGKRLGELNKEVSEEDKKVYLKQAEEDDKERYNKFAAYN---
PeB_HMGbox/61-117  61 KDQRKEIQEQNPTMSFGDIGRVLGSSQWGLNKEKQKQYIRKAQTDKRRYVKEMKRYK---
Pp_pHMGbox/34-90  34 KDQHANTADNPSIPFTEIGKLLGAQWQQMNEKDKKPYIKRSEVDDKKRYEKELKRCK---
consensus         61 **.....**.....*...*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....
    
```

```

Va-a_NBP/94-102    94 -AEAEDES 102
Chg_conhypp/94-96  94 -VSV----- 96
Ad_NBP/93-105     93 KAODDESS 105
Vc_hypp/93-94     93 -KE----- 94
PeB_HMGbox/118-120 118 -PRY----- 120
Pp_pHMGbox/91-92  91 -LK----- 92
consensus         121
    
```

Schemat 5-15. Porównanie sekwencji aminokwasowych białek posiadających domenę HMGbox kodowanych przez geny *Verticillium albo-atrum* (Va-a), *Chaetomium globosum* (Chg), *Ajellomyces dermatitidis* (Ad), *Volvox carteri* (Vc) *Physcomitrella patens* (Pp) oraz *Pellia endiviifolia* sp B (PeB). Wizualizacji dokonano wykorzystując program BOXSHADE 3.21. Kolorem czarnym oznaczone są konserwatywne reszty aminokwasowe, identyczne w porównywanych sekwencjach aminokwasowych. Kolorem szarym oznaczone są konserwatywne substytucje. Kolorem białym oznaczono niekonserwatywne reszty aminokwasowe. Kreski oznaczają delecję danej reszty aminokwasowej. Po lewej stronie schematu przy nazwach białek podano długość analizowanej sekwencji aminokwasowej.

Oddzielnie porównano również fragment sekwencji białka z domeną HMGbox *P.endiviifolia* sp B do fragmentów C-końcowych białek HMG kodowanych przez geny *A.thaliana* i *O.sativa* (schemat 5-16). Uczyniono tak ze względu na zdecydowanie dłuższą sekwencję aminokwasową białek roślin okrytonasiennych.

```

Os_hHMGbox/477-531 ESDEEDEDVFADKDDSG-SPTDDSGEEGSDASLSGG---EK--EKSSKKEASSSKAPLK
At_HMG/476-536     ESDEEDEDVFMGEDDDGGSPPTDDSGGDDSDASEGGVGEIKEKSIKKEPKKEASSSKGLPP
PeB_HMGbox/1-30    -----MKGATLKTGKSGS-----GRGVTKASSSRCRSSH
consensus         .....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....

Os_hHMGbox/532-591 KRKPKGGDAEAGESEKRKPKKKKDPNAPKRAIAPFMYFASKAERANLKNNSNPELATEIAKK
At_HMG/537-595    KRKTVAADG-SSKRKPKPKKKKDPNAPKRAMSGFMFFSQMERDNIKKEHPGLAFGEVGVK
PeB_HMGbox/31-82  KRK-----GKEEKIRIRKVKDKRRPKRALGPYMYFCKDQRKBIQE-NPTMSFGDIGRV
consensus         ***.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....

Os_hHMGbox/592-640 LGERWQKMTAEKQPYVEQSQVDDKKRYAEESAAAYRGAAAMDVDSGSPASD--
At_HMG/596-646    LGDKWRQMSADDKEPYEAKAQVDKQRYKDEISDYKNPQPMNVDSGNDSDSN
PeB_HMGbox/83-120 LGSQWGLNKEKEKQKQYIRKAQTDKRRYVKEMKRYKPY-----
consensus         **..*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....
    
```

Schemat 5-16. Przyporównanie sekwencji aminokwasowych fragmentów C-końcowych białek posiadających domenę HMGbox kodowanych przez geny *Arabidopsis thaliana* (At), *Oryza sativa* (Os), oraz *Pellia endiviifolia* sp B (PeB). Wizualizacji dokonano wykorzystując program BOXSHADE 3.21. Kolorem czarnym oznaczone są konserwatywne reszty aminokwasowe, identyczne w porównywanych sekwencjach aminokwasowych. Kolorem szarym oznaczone są konserwatywne substytucje. Kolorem białym oznaczono niekonserwatywne reszty aminokwasowe. Kreski oznaczają delecję danej reszty aminokwasowej. Po lewej stronie schematu przy nazwach białek podano długość analizowanej sekwencji aminokwasowej.

Również programy MotifScan, InterProScan oraz SMART MODE potwierdziły obecność domeny HMGbox w pozycji 49-117 aa [E-value = 6.2e-26]. Ponadto program MotifScan wskazał również dwuczęściowy sygnał lokalizacji jądrowej [E-value = 2.1e+04, pozycje 32-49, 50-65] w białku *P.endiviifolia* sp B. Poniżej przedstawiono sekwencję aminokwasową prawdopodobnego białka HMGbox *P.endiviifolia* sp B z zaznaczoną na żółto domeną

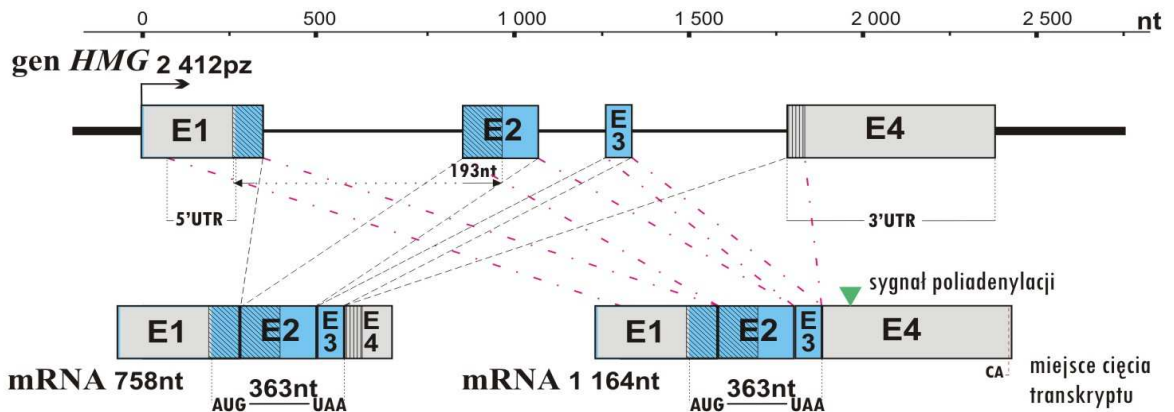
HMGbox oraz podkreślonymi resztami aminokwasowymi, stanowiącymi potencjalny sygnał lokalizacji jądrowej białka:

MGKATLTKGKSGSGRGVTKASSSRCRSSSKRKGKEEKRIKRVKDKRRPKRALGPYMYFCKDQRKEIQ
EQNPTMSFGDIGRVLGSQWGKLNENEKQKYIRKAQTDKRRYVKEMKRYKPRY

Podobnie programy PSORT, TargetP oraz ProtComp wskazały jądrową lokalizację białka *P.endiviifolia* sp B w komórce roślinnej jako na najbardziej prawdopodobną.

Za pomocą programu ProtParam określono właściwości fizykochemiczne przewidywanego białka, którego masę cząsteczkową oszacowano bioinformatycznie na 14.12kDa, a punkt izoelektryczny na pI=10.72. Spośród aminokwasów wchodzących w skład sekwencji białkowej białka HMGbox *P.endiviifolia* sp B największy procent stanowią reszty: lizyny (20%), argininy (13.3%), glicyny (9.2%) i seryny (8.3%). W przedziale 3 – 6 występują reszty: alaniny, kwasu asparaginowego, glutaminy, kwasu glutaminowego, izoleucyny, leucyny, metioniny, proliny, treoniny, tyrozyny. Najmniej, w zakresie 0.8 – 1.7% występują reszty: asparaginy, cysteiny, fenyloalaniny oraz tryptofanu. Natomiast histydyna nie występuje w ogóle. Aminokwasy obdarzone ładunkiem dodatnim stanowią zdecydowaną większość (40 reszt) w porównaniu do ujemnie naładowanych (11 reszt). Obecność sygnału lokalizacji jądrowej, domeny HMGbox oraz obdarzenie silnym ładunkiem dodatnim może świadczyć o potencjalnym wiązaniu białka z chromatyną lub oddziaływaniu z nukleosomem.

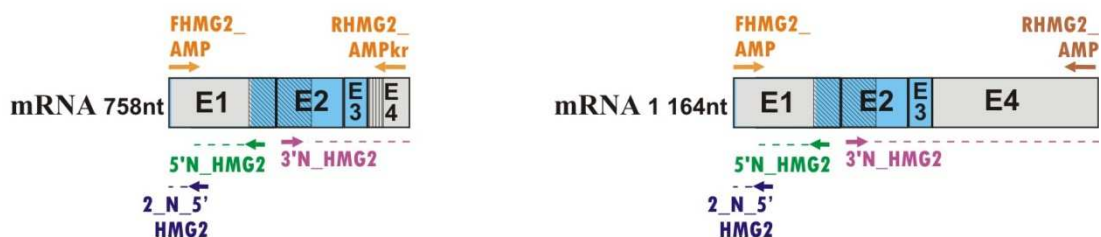
Eksperymenty typu „spacer po genomie” umożliwiły uzyskanie sekwencji genomowej długości 3 886pz, obejmującej całą sekwencję cDNA, w tym wyjściową sekwencję fragmentu RDA-cDNA długości 193nt. Po przyrównaniu sekwencji DNA z sekwencją cDNA określono długość oraz budowę genu *HMG* kodującego białko zawierające domenę HMGbox *P.endiviifolia* sp B. Za początek i koniec genu uznano fragment DNA genomowego, który pokrył się z najdłuższymi wyznaczonymi końcami 5' i 3' cDNA – w ten sposób określono długość genu *HMG* na 2 412pz. Gen ten zbudowany jest z czterech egzonów długości odpowiednio 342pz, 212pz, 75pz i 584pz, które przedzielone są trzema intronami typu U2 długości odpowiednio 582pz, 185pz i 432pz. Długość regionu 5'UTR wynosi 266nt, regionu 3'UTR 584 nt, a długość sekwencji kodującej wynosi 360nt. W pozycji 1 957 – 1 962 genu (710 – 715 dłuższego transkryptu) znajduje się przewidziany bioinformatycznie sygnał poliadenylacji ATAAA (80nt za kodonem stop w dłuższym transkrypcie). W przypadku krótszego transkryptu nie zidentyfikowano sygnału poliadenylacji, mimo to transkrypt ulega poliadenylacji w pozycji 129nt za kodonem stop. W wyniku analiz sekwencji uzyskanych w reakcji 3'RACE zidentyfikowano miejsce cięcia dłuższego transkryptu: CA 535nt poniżej sygnału poliadenylacji. Na schemacie 5-17 przedstawiono budowę genu *HMG P.endiviifolia* sp B oraz transkryptów powstających z tego genu.



Schemat 5-17. Rysunek obrazujący budowę genu *HMG P.endiviifolia* sp B oraz powstających z niego transkryptów. Prostokąty odpowiadają egzonom, w których kolorem szarym zaznaczono rejony UTR, a kolorem błękitnym sekwencję kodującą. Linie między egzonami reprezentują introny. Obszar o ukośnym kreskowaniu wyznacza sekwencję długości 193nt, uzyskaną w wyniku eksperymentu RDA-cDNA. Obszar o pionowym kreskowaniu wyznacza fragment 3'UTR, który podlega alternatywnemu splicingowi. Dodatkowo w obrębie transkryptu zaznaczono zielonym trójkątem położenie sygnału poliadenylacji, czerwoną pionową linią miejsce cięcia transkryptu.

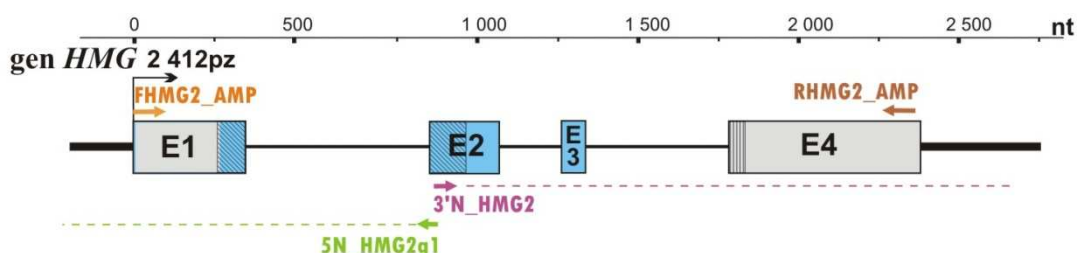
Nałożenie sekwencji cDNA na sekwencję genomową pozwoliło nie tylko na poznanie struktury genu, ale również na zidentyfikowanie zdarzenia alternatywnego splicingu, którego rezultatem są dwa transkrypty powstające z genu *HMG*. Trzeci intron posiada dwa alternatywne miejsca akceptorowe 3': pierwsze w pozycji 431-432 intronu 3, drugie w pozycji 48-49 egzonu 4. W zależności od tego, które zostanie wybrane w trakcie splicingu, rozpoznawany jest jeden z dwóch sygnałów poliadenylacji. Kiedy egzon 4 jest dłuższy, na końcu 5' wybierany jest wcześniejszy sygnał poliadenylacji (niezidentyfikowany metodami bioinformatycznymi), a kiedy jest krótszy – wybierany jest późniejszy sygnał poliadenylacji (przewidziany bioinformatycznie). Dlatego również w zależności od zdarzenia splicingowego transkrypt powstający z genu *HMG* ma różną długość rejonu 3'UTR: 129nt w krótszym transkrypcie, 535nt w dłuższym transkrypcie.

Na dwóch poniższych schematach przedstawiono położenie starterów, które wykorzystano do charakterystyki końców 5' i 3' cDNA (schemat 5-18) badanego fragmentu RDA-cDNA oraz położenie starterów, które wykorzystano do charakterystyki sekwencji obejmującej badany fragment RDA-cDNA (schemat 5-19). Dla przejrzystości rysunków uwzględniono jedynie startery wewnętrzne wykorzystane podczas drugich rund reakcji PCR.



Schemat 5-18. Rysunek przedstawiający położenie starterów w eksperymentach RACE w celu charakterystyki pełnej długości cDNA zawierającego fragment RDA-cDNA długości 193nt oraz starterów służących amplifikacji pełnej długości cDNA (FHM2_AMP/RHM2_AMPkr i RHM2_AMP –

startery zaprojektowane na podstawie sekwencji 5'/3'UTR). Kolorem zielonym i niebieskim zaznaczono startery wykorzystane w celu wyznaczenia końca 5' transkryptu, kolorem różowym zaznaczono starter wykorzystany w celu wyznaczenia końca 3' transkryptu. Przerwane linie odpowiadają długościom produktów poszczególnych reakcji PCR.



Schemat 5-19. Rysunek przedstawiający położenie starterów wykorzystanych w eksperymencie „spacer po genomie” w celu charakterystyki sekwencji genomowej obejmującej sekwencję fragmentu RDA-cDNA długości 193nt oraz starterów służących amplifikacji pełnej długości genu (FHM2_AMP/RHMG2_AMPkr i RHMG2_AMP – startery zaprojektowane na podstawie sekwencji 5'/3'UTR). Kolorem zielonym zaznaczono starter wykorzystany w amplifikacji sekwencji DNA położonej powyżej końca 5' badanego fragmentu RDA-cDNA; kolorem różowym zaznaczono starter wykorzystany do amplifikacji sekwencji DNA położonej poniżej końca 3' badanego fragmentu RDA-cDNA.

Analizie poddano również procentowy udział poszczególnych nukleotydów w genie *hmg P. endiviifolia* sp B, który przedstawiono w tabeli 5-17.

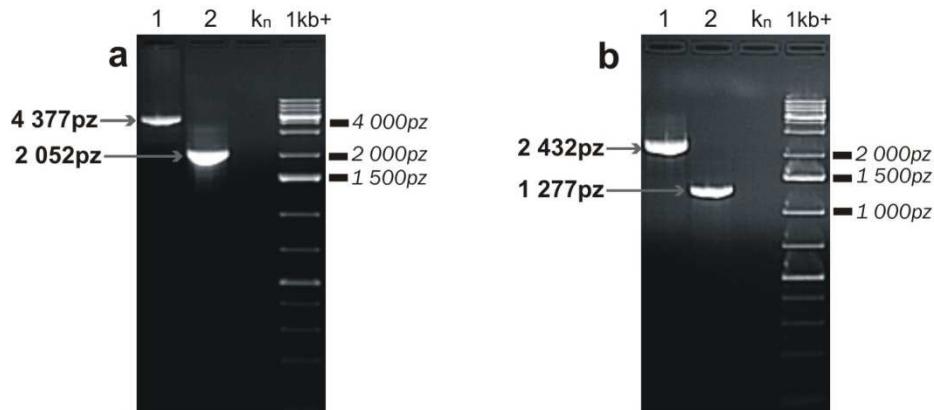
Tabela 5-17. Procentowy udział poszczególnych nukleotydów w sekwencji genu *hmg P. endiviifolia* sp B

Gen <i>HMG</i>	% reszt A	% reszt G	% reszt T	% reszt C	% reszt A+T	% reszt G+C
Sekwencja genomowa	30.31	20.07	29.06	20.56	59.37	40.63
Sekwencja cDNA dł.	32.39	22.59	23.45	21.56	55.84	44.16
Sekwencja cDNA kr.	30.47	24.14	22.16	23.22	52.64	47.36
Egzon 1	23.39	21.35	25.73	29.53	49.12	50.88
Intron 1	26.80	17.35	36.77	19.07	63.57	36.43
Egzon 2	37.26	27.36	18.87	16.51	56.13	43.87
Intron 2	24.32	17.30	37.30	21.08	61.62	38.38
Egzon 3	45.33	18.67	16.00	20.00	61.33	38.67
Intron 3	32.41	17.82	30.79	18.98	63.19	38.81
Egzon 4	33.73	22.09	24.83	19.35	58.56	41.44

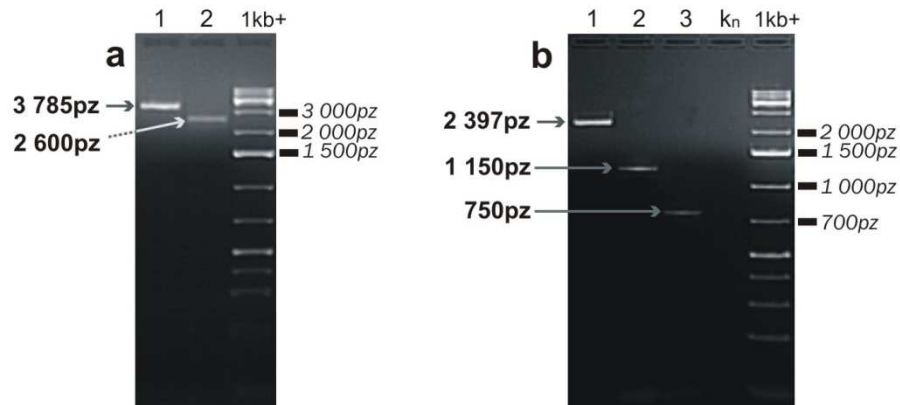
5.6. Amplifikacja pełnej długości cDNA oraz genów

W celu udowodnienia, że amplifikowane końce 5' i 3' cDNA oraz sekwencje genomowe badanych genów pochodzą z jednego transkryptu lub locus przeprowadzono szereg reakcji amplifikacji pełnej długości sekwencji cDNA i genów (METODY, pkt 4.14). Za matrycę do amplifikacji transkryptów posłużył cDNA uzyskany z plech męskich wątrobowca *P. endiviifolia* sp B zebranych z terenu, wykorzystany m.in. w analizach RT-PCR. Do amplifikacji sekwencji genomowych badanych genów posłużył DNA genomowy

izolowany z plech męskich z hodowli *in vitro* zestawem DNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen). Amplifikację prowadzono wg programu AMP (METODY, pkt 4.14), wykorzystując polimerazę DyNAzyme[™] EXT DNA Polymerase firmy Finnzymes. Startery dla amplifikacji poszczególnych genów zaprojektowane zostały na podstawie uzyskanych najbardziej wysuniętych w kierunku 5' i 3' sekwencji z rejonów 5'UTR oraz 3'UTR cDNA odpowiednich genów.



Zdjęcie 5-32. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR w 1% żelu agarozowym. Ścieżka a1 – amplifikacja 4 377pz z 4 541pz pełnej długości genu *TUA*. Ścieżka a2 – amplifikacja 2 052nt z 2 216nt pełnej długości cDNA genu *TUA*. Ścieżka b1 – amplifikacja 2 432pz z 2 485pz pełnej długości genu *RAB*. Ścieżka b2 – amplifikacja 1 277nt z 1 330nt pełnej długości cDNA genu *RAB*. Ścieżki k_n – kontrole negatywne reakcji PCR (bez matrycy).



Zdjęcie 5-33. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR w 1% żelu agarozowym. Ścieżka a1 – amplifikacja 3 785pz z 3 875pz pełnej długości genu *TS*. Ścieżka a2 – amplifikacja 2 600nt z 2 689nt pełnej długości cDNA genu *TS*. Ścieżka b1 – amplifikacja 2 397pz z 2 412pz pełnej długości genu *HMG*. Ścieżka b2 – amplifikacja 1 150nt z 1 165nt pełnej długości dłuższego cDNA genu *HMG*. Ścieżka b3 – amplifikacja 750nt z 759nt pełnej długości krótszego cDNA genu *HMG*. Ścieżki k_n – kontrole negatywne reakcji PCR (bez matrycy).

6. DYSKUSJA

6.1. Identyfikacja fragmentów DNA specyficznych dla DNA genomowego męskiego i żeńskiego *Pellia endiviifolia* sp B przy zastosowaniu techniki RDA

Dotychczasowe doniesienia na temat molekularnych mechanizmów związanych z determinacją płci w gromadzie wątrobowców dotyczą przede wszystkim rozdzielnopłciowego wątrobowca *Marchantia polymorpha*, należącego do klasy *Marchantiopsida*. *M. polymorpha* charakteryzuje się nietypową w stosunku do większości wątrobowców, wysoce skomplikowaną strukturalnie budową plechy, a ponadto należy do klasy stanowiącej jedynie ok. 15% gatunków wątrobowców. Natomiast *Pellia endiviifolia* sp B (podklasa *Pelliidae*) jest przedstawicielem prostych plechowatych wątrobowców klasy *Jungermanniopsida*, obejmującej większość obecnie żyjących wątrobowców (He-Nygren i in. 2006). Najstarsze zachowane szczątki wątrobowców z dolnego dewonu i karbonu przypominają najbardziej współczesnych przedstawicieli klasy *Jungermanniopsida*, co świadczy, że są one bardzo starą grupą (Szweykowscy 2003), a być może najstarszą wśród wątrobowców i roślin lądowych (He-Nygren i in. 2006). Obecnie nie ma żadnych danych molekularnych na temat różnic w sekwencjach genomowych między osobnikami męskimi i żeńskimi wśród rozdzielnopłciowych przedstawicieli klasy *Jungermanniopsida*, mimo iż znane są gatunki o cytologicznych różnicach w budowie chromosomów związanych z płcią. W 1981 r. Newton opisała kariotyp *P. endiviifolia*, w którym zidentyfikowała osiem chromosomów autosomalnych i dziewiąty chromosom, tzw. m-chromosom ze względu na jego znacznie mniejszą wielkość w stosunku do pozostałych chromosomów garnituru. Co więcej, 9-ty chromosom gametofitu męskiego scharakteryzowano jako mniejszy od żeńskiego chromosomu 9-go zarówno na podstawie idiogramów chromosomów uzyskanych z materiału europejskiego, jak i japońskiego (Newton 1981). Doniesienia literaturowe o różnicy w wielkości 9-tych chromosomów *P. endiviifolia* sp B popierają zdjęcia chromosomów wybarwionych barwnikiem DAPI wykonane przez dr Aleksandrę Rojek z Zakładu Ekspresji Genów UAM i dr Maję Orzechowską z Katedry Anatomii i Cytologii Roślin Uniwersytetu Śląskiego. Istnieje więc duże prawdopodobieństwo, że różniące się morfologicznie m-chromosomy plech męskich i żeńskich reprezentują chromosomy płci, a co za tym idzie, będzie można zidentyfikować sekwencje genomowe charakterystyczne dla płci *P. endiviifolia* sp B.

Metoda różnicowej analizy genomowej – RDA umożliwia klonowanie i sekwencjonowanie fragmentów DNA różnicujących dwa wysoce podobne genomy. Technika RDA pozwala na wykrycie różnego rodzaju zmiennych rejonów DNA w dwóch porównywanych genomach: może być wykorzystana do identyfikacji delecji, insercji, rearanzacji, miejscowych mutacji w obrębie genomu lub też patogennych organizmów infekujących porównywane genomy (Lisitsyn i in. 1993). Różnicowa analiza genomowa znalazła szerokie zastosowanie w poszukiwaniu sekwencji gatunkowo, czy osobniczo specyficznych pośród wielu gatunków ssaków, jak i organizmów prokariotycznych (Navin i in. 1996, Toyota i in. 1996, Everts i in. 2000, Wallner i in. 2004, Allen i in. 2003). Również szereg zastosowań tej metody można spotkać w analizach różnic między genomami organizmów roślinnych: Panaud i in. (1998) wykorzystali metodę RDA do charakterystyki zróżnicowania genomowego między dwoma daleko spokrewnionymi gatunkami z rodziny *Poaceae*: ryżem *Oryza sativa* oraz włośnicą ber (proso włoskie) *Setaria italica*. Stosując DNA genomowy ryżu jako fragmenty testowane grupa ta zidentyfikowała jedenaście sekwencji specyficznych dla ryżu. Ich analiza ujawniła przynależność do grupy rozrzuconych sekwencji repetytywnych, z których siedem odpowiada różnym elementom transpozycyjnym genomu ryżu. Pomyślnie zastosowanie metody RDA umożliwiło również identyfikację męsko specyficznych fragmentów restrykcyjnych u rozdzielнопłciowej *Silene latifolia*, u której płęć determinowana jest przez loci znajdujące się na dwóch morfologicznie różnych chromosomach: X w przypadku osobników żeńskich i Y w przypadku osobników męskich. U *S. latifolia* zidentyfikowano cztery męsko specyficzne fragmenty DNA położone na chromosomie Y. Zostały one wykorzystane następnie do identyfikacji polimorfizmów DNA w kolekcji mutantów wytwarzających kwiaty obupłciowe lub bezpłciowe. Niektóre z mutantów posiadały cytologicznie wykrywalne delecje w obrębie chromosomu Y, które korelowały z utratą męsko specyficznych fragmentów RDA. Trzy z tych fragmentów wykryły fragmenty genomowe, które były połączone z regionem usuniętym w niektórych mutantach obupłciowych i bezpłciowych. Na podstawie fenotypów mutantów oraz widocznych cytologicznie delecji w obrębie męskiego chromosomu, fragmenty te przyporządkowano pozycji na chromosomie Y blisko locus odpowiadającego za supresję rozwoju słupka. Mapowanie sekwencji RDA ujawniło również nowy, wcześniej nie opisany locus chromosomu Y, który jest odpowiedzialny za wczesny rozwój pręcików (Donnison i in. 1996).

W niniejszej pracy technikę RDA wykorzystano w celu sprawdzenia, czy różnice w obrazach chromosomów metafazowych izolowanych z gametofitów męskich i żeńskich *P. endiviifolia* sp B świadczą o rzeczywistych różnicach w składzie sekwencji genomowych. Materiał wyjściowy dla przeprowadzenia eksperymentu RDA pochodził ze sterylnej hodowli

P. endiviifolia sp B *in vitro*. Korzystanie z plech wątrobowców bezpośrednio ze stanowisk terenowych niesie ze sobą zagrożenie zanieczyszczenia badanych plech przez DNA pochodzący ze strzępek grzybów żyjących w mikoryzie z wieloma gatunkami wątrobowców (Read i in. 2000). Grzybnia przerasta plechę z wyjątkiem rejonu merystematycznego plech, tzn. 2 – 3 mm poniżej wierzchołka plech oraz obszaru organów rozmnażania płciowego (Ligrone i in. 2007). Dlatego wprowadzając do hodowli *in vitro* wątrobowca *P. endiviifolia* sp B wykorzystano wyłącznie fragmenty plech wolne od tkanki grzybów (Fiedorow i Szweykowska-Kulińska 1998). Eksperyment RDA przeprowadzono w czterech układach z wykorzystaniem dwóch szóstkowych enzymów restrykcyjnych BamHI oraz HindIII, by uzyskać jednocześnie informacje na temat różnic w sekwencjach genomowych plech żeńskich i męskich. Ponieważ reprezentacja ampliconów fragmentów testowanych i eliminujących otrzymanych przy użyciu jednego enzymu restrykcyjnego pozwala na uzyskanie 2 – 15% sekwencji genomowej, zastosowanie różnych enzymów restrykcyjnych miało na celu otrzymanie różnych reprezentacji fragmentów restrykcyjnych, pochodzących z różnych obszarów DNA genomowego, zwiększając tym samym szanse na wyróżnienie fragmentów specyficznych dla każdego z DNA genomowego (Baldocchi i Flaherty 1997). Dla każdego układu przeprowadzono cztery rundy różnicowej hybrydyzacji DNA przy wzrastających stosunkach ilościowych biblioteki fragmentów testowanych względem biblioteki fragmentów eliminujących. W przypadku eksperymentu RDA z wykorzystaniem enzymu BamHI otrzymano wyraźne produkty różnicowe DP^{IV} długości w zakresie ~300 – 600pz (rozdział WYNIKI, zdj. 5-3, 5-4). Natomiast w eksperymencie RDA z wykorzystaniem enzymu HindIII od trzeciej po czwartą rundę hybrydyzacji zaobserwowano znacznie słabszą amplifikację produktów różnicowych DP^{III} i DP^{IV} oraz większą heterogenność produktów amplifikacji. Powodem takiej sytuacji mogły być nieodpowiednie stosunki fragmentów testowanych względem eliminujących w dwóch ostatnich rundach hybrydyzacji. W eksperymentach RDA zbyt wysoki lub zbyt niski stosunek w trakcie hybrydyzacji prowadzi albo do braku produktów różnicowych, albo do amplifikacji produktów z wysokim tłem w postaci niespecyficznych produktów amplifikacji, czego rezultatem mogą być produkty różnicowe otrzymane w eksperymencie z zastosowaniem enzymu HindIII (Ausubel i in. 2003). Dlatego też startery zaprojektowane na podstawie sekwencji produktów różnicowych DP^{IV} uzyskanych przy zastosowaniu żeńskich i męskich ampliconów HindIII dały produkty amplifikacji zarówno na matrycy DNA genomowego żeńskiego jak i męskiego. Inną przyczyną, z powodu której nie zidentyfikowano fragmentów DNA specyficznych dla DNA genomowego żeńskiego i męskiego *P. endiviifolia* sp B z wykorzystaniem enzymu HindIII w eksperymencie RDA może być fakt, iż reprezentacje ampliconów testowanych stanowią

zaledwie do 15% sekwencji genomowej wykorzystanej w różnicowej hybrydyzacji DNA, wśród których niekoniecznie zostały uchwycone sekwencje występujące wyłącznie w testowanym DNA genomowym lub też fragmenty amplikonów różnicujących dwie badane pule DNA nie znalazły się w zakresie amplifikacji dla polimerazy DNA użytej w reakcjach PCR. Dlatego jeśli żadne produkty różnicowe nie zostały zidentyfikowane w kolejnych rundach hybrydyzacji, należy przeprowadzić eksperyment RDA z zastosowaniem innego enzymu restrykcyjnego (Baldocchi i Flaherty 1997). Z tego względu eksperyment RDA opisany w niniejszej pracy przeprowadzono równocześnie z wykorzystaniem enzymu BamHI. W wyniku reakcji PCR z wykorzystaniem starterów zaprojektowanych na podstawie sekwencji produktów różnicowych DP^{IV} uzyskanych przy zastosowaniu żeńskich i męskich amplikonów BamHI otrzymano specyficzną amplifikację na matrycy DNA genomowego żeńskiego *P.endiviifolia* sp B dla 3 par starterów (rozdział WYNIKI, zdj. 5-7) oraz specyficzną amplifikację na matrycy DNA genomowego męskiego *P.endiviifolia* sp B dla 7 par starterów (rozdział WYNIKI, zdj. 5-8, 5-9). Reakcje te przeprowadzono na DNA izolowanym z plech hodowanych *in vitro*, odpowiadającym trzem różnym osobnikom żeńskim oraz trzem różnym osobnikom męskim. Dodatkowo przeprowadzono reakcje PCR na DNA genomowym izolowanym z plech męskich i żeńskich zebranych z terenu w celu sprawdzenia, czy uzyskane sekwencje będą również amplifikowane specyficznym na matrycach DNA z plech naturalnie rosnących w terenie *P.endiviifolia* sp B. Niestety w przypadku reakcji PCR na DNA pochodzącym z plech z terenu uzyskano produkty zarówno na matrycy DNA genomowego męskiego i żeńskiego z plech z terenu (rozdział WYNIKI, zdj. 5-10), bądź uzyskano szereg niespecyficznych produktów reakcji PCR (rozdział WYNIKI, zdj. 5-11). Uzyskane fragmenty DNA nie reprezentują więc odcinków DNA różnicujących plechy żeńskie i męskie *P.endiviifolia* sp B. Ponieważ DNA użyty w eksperymencie różnicowej analizy genomowej izolowany był z plech hodowanych *in vitro* niewykluczone, iż w trakcie samej hodowli doszło do rearanżacji genomowych, w obrębie których znalazły się produkty różnicowe opisane w niniejszej pracy. Duplikacje, inwersje, czy też delecje obserwowano niejednokrotnie w obrębie chromosomów hodowli *in vitro* mikrospor, kallusa i kultur zawiesinowych różnych roślin okrytonasiennych (Orton 1980, Joachimiak i Ilnicki 2003). Być może bardziej odpowiednim podejściem byłoby użycie do tego eksperymentu DNA izolowanego z plech z terenu, mimo obecności strzępek grzybów mikoryzowych. Teoretycznie wzrastając na tym samym podłożu, plechy żeńskie i męskie powinny zawierać strzępki tych samych rodzajów grzybów. Tym samym DNA genomowy żeński i męski powinien zawierać takie samo zanieczyszczenie DNA grzybów, które zostałyby wyeliminowane w kolejnych rundach różnicowych hybrydyzacji. Ponadto należałoby również uwzględnić ewentualne różnice

między populacjami zasiedlającymi różne stanowiska, które mogą cechować się dynamiką sekwencji genomowych. W przeprowadzonym eksperymencie RDA plechy *P.endiviifolia* sp B pochodziły z jednego stanowiska i dodatkowo z hodowli *in vitro* odpowiadających trzem osobnikom. Dlatego otrzymany wynik dotyczy jedynie bardzo wąskiej grupy osobników hodowanych w warunkach aksenicznych, a nie odzwierciedla rzeczywistego stanu różnic w DNA genomowym męskim i żeńskim gatunku *P.endiviifolia* sp B.

Dość zaskakujące okazały się wyniki analiz bioinformatycznych otrzymanych sekwencji, gdyż niektóre z nich wykazały znaczne podobieństwo do sekwencji kodujących białka bakteryjne. Obecnie nie ma danych na temat pełnej sekwencji genomowej jakiegokolwiek przedstawiciela roślin z rodziny wątrobowców, dlatego nie można wykluczyć, iż geny pochodzenia prokariotycznego mogą znajdować się w genomach wątrobowców. Podobieństwo sekwencji M_282 oraz M_462 było najwyższe do dwóch białek bakteryjnych: dioksygenazy fitinyloCoA oraz hydrolazy glikozydowej z rodziny 32. Jednakże tego samego typu enzymy występują również u roślin. Wiele homologów dioksygenaz fitinyloCoA istnieje zarówno u zwierząt, roślin i bakterii. U *A.thaliana* enzym ten bierze udział w rozkładzie chlorofilu wywołanego procesem starzenia się liści (Araujo i in. 2010). Z kolei hydrolazy glikozydowe to niezwykle powszechne enzymy odgrywające ważne role m.in. w degradacji biomasy składającej się z celulozy, hemicelulozy, w obronie antybakteryjnej, jak również w podstawowych funkcjach komórki takich jak biosynteza glikanów oraz mobilizacji materiałów zapasowych (Lammen i in. 2009).

U *A.thaliana* zidentyfikowano osiem enzymów należących do rodziny 32 hydrolaz glikozydowych (<http://www.arabidopsis.org/browse/genefamily/GlycosideHydrolase.jsp>). Niewykluczone, iż sekwencje wyselekcjonowane *P.endiviifolia* sp B są pochodzenia bakteryjnego, jednakże sekwencje *P.endiviifolia* sp B mogą być na tyle odległe od młodszych ewolucyjnie organizmów eukariotycznych, w tym roślin wyższych, że uchwycenie ich podobieństwa w analizach bioinformatycznych może być niemożliwe.

W przypadku podobieństwa sekwencji M_451, M_314, M_270 do zewnątrzkomórkowych białek bakteryjnych trudno o pokrewieństwo z sekwencjami roślinnymi. Niewykluczone, że oprócz grzybów żyjących w symbiozie z wątrobowcami, również w obrębie przestrzeni międzykomórkowych plech koegzystują niezidentyfikowane do tej pory szczepy bakterii. Ponieważ plechy hodowli *in vitro* nie były badane mikroskopowo pod kątem organizmów egzo- i endosymbiotycznych, nie można wykluczyć takiej możliwości. Materiał wyjściowy do przeprowadzenia eksperymentu RDA pochodził ze sterylnej hodowli *in vitro*. Jednakże pożywki stosowane w trakcie hodowli nie posiadały dodatku antybiotyków, które zabezpieczyłyby hodowlę przed ewentualnymi zakażeniami

bakteryjnymi. Niejednokrotnie w literaturze odnotowywano zasiedlanie roślinnych kultur *in vitro* przez szereg szczepów bakteryjnych, mimo zachowania sterylnych warunków pracy i hodowli (Orlikowska i Zawadzka 2006). Hallman i in. opisali endofity bakteryjne z różnych grup systematycznych, które przemieszczają się zarówno w ksylemie, jak też aktywnie penetrują tkanki roślinne z pomocą enzymów hydrolitycznych. Mogą one pozostawać w stanie utajonym, jak też aktywnie kolonizować tkanki. Również zewnętrzne powierzchnie roślin są naturalnym środowiskiem dla bakterii. Teoretycznie egzofity są łatwiejsze do usunięcia w procesie odkażania inicjalnych eksplantatów niż endofity, jednak sterylizacja może być nieskuteczna ze względu na szereg strategii przystosowawczych bakterii (np. tworzenie mikrośrodowiska o charakterze biofilmu, odpornego na czynniki fizyczne i chemiczne) (Orlikowska i Zawadzka 2006). W trakcie hodowli oraz pobierania materiału do izolacji DNA w pożywce nie zaobserwowano oznak zmętnienia, przebarwienia lub nacieków na powierzchni, które mogłyby świadczyć o infekcji bakteryjnej. Jednak wiele bakterii rozmnaża się intensywnie i staje się widoczna w starzejących kulturach. Dlatego prawdopodobne wydaje się, że sekwencje M_451, M_314, M_270 mogą pochodzić z bakteryjnych zanieczyszczeń hodowli *in vitro* wątrobowca *P.endiviifolia* sp B. Analizując genom człowieka odkryto przykłady horyzontalnego transferu 40 genów bakterii do tego genomu (Salzberg i in. 2001). Mamy również przykłady transferu olbrzymich fragmentów DNA mitochondrialnego i chloroplastowego do genomów jądrowych roślin wyższych (Ratajczak i in. 2007). Innymi słowy wyniki naszych analiz są niejasne: mogą one odzwierciedlać zanieczyszczenie endofitycznymi bakteriami plech hodowanych *in vitro* (dla części ze zidentyfikowanych fragmentów jest to najbardziej prawdopodobny scenariusz), mogą reprezentować przykłady rearanżacji genomowych i wreszcie przykłady lateralnego transferu genów między bakteriami i rośliną. Co jednak niezwykle ciekawe, to analizując geny, które ulegają specyficznej ekspresji w gametoficie męskim odkryliśmy, że dwa z tych genów występują tylko w genomie męskim, a brak ich w genomie żeńskim. Zagadnienie to zostało omówione w następnym rozdziale, przy okazji omawiania genów ulegających specyficznej ekspresji w plechach męskich.

6.2. Identyfikacja genów, których ekspresja związana jest z pojawianiem się organów rozmnażania generatywnego wytwarzanych przez gametofity męskie *P.endiviifolia* sp B przy zastosowaniu techniki RDA-cDNA

Oprócz braku danych molekularnych na temat różnic w sekwencjach genomowych między osobnikami męskimi i żeńskimi wśród rozdzielnopłciowych przedstawicieli klasy *Jungermanniopsida*, brak również jakichkolwiek informacji na temat genów, których

ekspresja warunkuje rozwój organów rozmnażania płciowego w tej grupie roślin. Wątrobowce stanowią bardzo dogodny obiekt badań cytologicznych, genetycznych i molekularnych, gdyż (w porównaniu do roślin kwiatowych) dominującym pokoleniem w ich cyklu życiowym jest gametofit zbudowany z komórek o haploidalnym zestawie chromosomów. W celu przybliżenia wiedzy o genach zaangażowanych w rozwój organów rozmnażania generatywnego w klasie *Jungermanniopsida* wątrobowców przeprowadzono eksperyment RDA-cDNA z wykorzystaniem jako obiekt badawczy rozdzielnopłciowego wątrobowca *P.endiviifolia* sp B.

Ze względu na niejednoznaczny charakter wyników uzyskanych w eksperymencie RDA, w którym DNA genomowy izolowano z plech hodowanych *in vitro*, w eksperymencie RDA-cDNA postanowiono wykorzystać plechy zebrane z terenu do izolacji całkowitego RNA, a następnie do syntezy dwuniciowego cDNA. Dla przeprowadzenia analiz metodą RDA-cDNA kluczowym etapem jest uzyskanie odpowiedniej ilości dwuniciowego cDNA dwóch różnych pul. Dlatego w pierwszym kroku izolowano RNA całkowity z plech żeńskich wytwarzających rodnie oraz z plech męskich wytwarzających plemnie. Materiał zielony pobierano w ciągu dwóch sezonów: 1 – wrzesień-grudzień 2006, 2 – wrzesień-październik 2007. Plechy oczyszczono z ryzoidów oraz resztek gleby za pomocą skalpela w jak największym stopniu, po czym płukano trzykrotnie w wodzie miliQ. Założenie eksperymentu z wykorzystaniem plech z terenu tyczyło się wyeliminowania zagrożenia ze strony grzybów, współżyjących z wątrobowcami z rodzaju *Pellia*. Izolacja całkowitego RNA z plech z terenu wiąże się z zanieczyszczeniem RNA wątrobowca przez RNA strzępek grzyba. W eksperymencie przyjęto założenie, że plechy żeńskie i męskie wzrastając na tym samym podłożu i tym samym stanowisku, powinny zawierać strzępki tych samych rodzajów grzybów. Tym samym całkowity RNA żeński i męski powinien zawierać takie samo zanieczyszczenie RNA grzybów, które zostanie wyeliminowane w kolejnych rundach różnicowych hybrydyzacji cDNA.

W celu izolacji całkowitego RNA z plech wątrobowca *P.endiviifolia* sp B zastosowano dwie metody izolacji RNA: 1) metodę ekstrakcji fenolowej na gorąco oraz 2) metodę Chomczyńskiego zmodyfikowaną przez dr P. Nuca (Pant i in. 2009). Biorąc pod uwagę trzy kryteria: 1) ilość i jakość izolowanego całkowitego RNA, 2) ilość i jakość izolowanego mRNA, 3) ilość i jakość dwuniciowego – bardziej wydajną metodą izolacji całkowitego RNA, wykorzystanego następnie do izolacji mRNA stanowiącego matrycę dla syntezy dwuniciowego cDNA, okazała się metoda Chomczyńskiego zmodyfikowana przez dr P. Nuca. Ilość uzyskanego następnie mRNA z całkowitego RNA izolowanego metodą Chomczyńskiego na 100mg użytej tkanki do izolacji RNA była od 1.3 do 4.3 razy wyższa w

porównaniu do ilości mRNA uzyskanego z RNA izolowanego metodą ekstrakcji fenolowej na gorąco. Również jego jakość była lepsza, czego rezultatem była lepsza jakość oraz o 2.8 – 5.6 razy bardziej wydajna synteza dwuniciowego cDNA. Jakość preparatów RNA izolowanych z plechy wątrobowca *P.endiviifolia* sp B najprawdopodobniej zależała od rodzaju buforu użytego do ekstrakcji tkanki. Zdecydowanie lepszym buforem okazał się bufor zawierający tiocyjanian guanidyny i tiocyjanian amonu, które najwyraźniej w większym stopniu umożliwiają zniszczenie struktur komórek roślinnych i izolację lepszej jakości całkowitego RNA do dalszych eksperymentów, w porównaniu do buforu stosowanego w metodzie ekstrakcji fenolowej na gorąco. Ponadto niebezpiecznym w izolacji RNA metodą ekstrakcji fenolowej na gorąco może okazać się chlorek litu zawarty w buforze, gdyż jego obecność w trakcie wytrącania kwasów nukleinowych preferuje odzyskiwanie dłuższych cząsteczek bez współstrącenia krótszych kwasów nukleinowych, wśród których mogą znajdować się transkrypty istotnych lub kluczowych genów, ulegające ekspresji w obranym przez badaczy procesie.

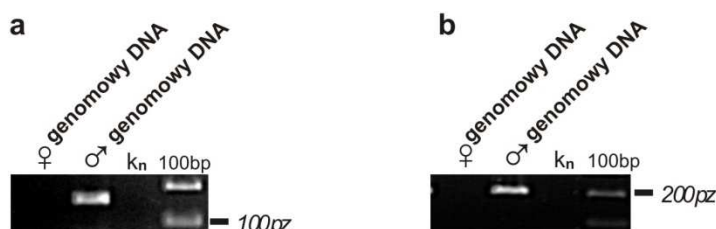
Różnicową analizę cDNA przeprowadzono z wykorzystaniem amplikonów cDNA z plech męskich *P.endiviifolia* sp B jako cDNA testowany, a amplikonów cDNA z plech żeńskich *P.endiviifolia* sp B jako cDNA eliminujący w czterech cyklach różnicowej hybrydyzacji. Jako efekt końcowy po czwartej rundzie hybrydyzacyjnej otrzymano zbiór fragmentów różnicowych (DP^{IV}) długości w zakresie ~200 – 300pz (rozdział WYNIKI, zdj. 5-15). Na podstawie sekwencji tych produktów zaprojektowano startery wykorzystane w reakcjach RT-PCR, mających na celu analizę poziomu ekspresji wyselekcjonowanych transkryptów w plechach żeńskich i męskich *P.endiviifolia* sp B. Analizy RT-PCR przeprowadzono w dwóch podejściach. W pierwszym matryce do reakcji RT-PCR stanowił dwuniciowy cDNA: testowany (z plech męskich) i eliminujący (z plech żeńskich) – cDNA wyjściowy dla eksperymentu RDA-cDNA. W drugim podejściu matryce cDNA przygotowano *de novo* z plech męskich wytwarzających plemnie i żeńskich wytwarzających rodnie zebranych z terenu w sezonie październik-listopad 2008, jak i plech hodowanych w warunkach *in vitro* nie wytwarzających plemni i rodni lub wytwarzających plemnie. W wyniku analiz półilościowych RT-PCR zidentyfikowano cztery fragmenty cDNA ulegające amplifikacji wyłącznie na matrycach cDNA z plech męskich. Dwa fragmenty cDNA długości 273nt oraz 229nt wykazały amplifikację zarówno na cDNA uzyskanym z plech męskich *P.endiviifolia* sp B z hodowli *in vitro*, jak i cDNA uzyskanym z plech męskich pochodzących z terenu. Z kolei fragmenty długości 243nt oraz 193nt wykazały amplifikację wyłącznie na cDNA uzyskanym z plech męskich *P.endiviifolia* sp B wytwarzających plemnie, pochodzących z terenu. Dlaczego nie zostały one zidentyfikowane w plechach męskich

wytwarzających plemnie hodowanych z *in vitro*? Plemnie plech męskich z hodowli aksenicznej wyraźnie różniły się morfologicznie od plemni plech męskich naturalnie rosnących w środowisku. Były one znacznie mniejsze i jaśniejsze. Plechy męskie pochodzące z terenu zbierano w dwóch różnych stadiach rozwojowych plemni: młodszym, w którym plemnie wykazywały jasnozielone zabarwienie oraz starszym, w którym zabarwienie plemni było brązowe. Różnice w samej morfologii wytwarzanych plemni przez plechy pochodzące z różnych warunków ich wzrostu mają najwyraźniej swoje odzwierciedlenie w ekspresji genów związanych z mechanizmami wytwarzania plemni. Dodatkowo w naszych warunkach hodowli *in vitro* nie udaje nam się doprowadzić do zapłodnienia i wytworzenia sporofitów. Może to wynikać z niemożności wytworzenia w pełni funkcjonalnych plemni. Świadczyć o tym może właśnie obserwacja ekspresji genów w plechach wytwarzających plemnie i pochodzących z terenu. Mogą istnieć niescharakteryzowane dotąd czynniki abiotyczne/biotyczne, które są konieczne aby powstały dojrzałe, zdolne do produkcji plemników plemnie, a których brak w warunkach hodowli *in vitro*. Hodowla *in vitro* zapewnia warunki do wzrostu plech wątrobowców, jednakże są to warunki sztuczne, w których rozwój plech jest zdecydowanie różny od rozwoju w naturalnych warunkach środowiska, co z pewnością wywiera wpływ na prawidłowy rozwój roślin oraz ekspresję genów. Brak transkryptów w plechach z plemniami hodowanych *in vitro* może świadczyć o niepełnym, zahamowanym rozwoju plemni, który jest uniemożliwiony przez sztuczne warunki wzrostu, tym samym wpływając na brak ekspresji określonych genów. W trakcie trwania hodowli *in vitro* w okresie 2006 – 2010 ani razu nie zaobserwowano, by plechy żeńskie wytwarzały rodnie. Obserwacja ta przemawia więc również za stwierdzeniem, iż akseniczna kultura wątrobowca *P.endiviifolia* sp B uniemożliwia prawidłowy rozwój organów rozmnażania generatywnego. W świetle powyżej przedstawionych spostrzeżeń, właściwe wydaje się podejście w przeprowadzonym eksperymencie RDA-cDNA, w którym izolacja całkowitego RNA z plech *P.endiviifolia* sp B prowadzona była z materiału zebranego z terenu.

Mimo użycia do izolacji RNA materiału zebranego z terenu, wyizolowano również fragmenty transkryptów genów ulegających ekspresji w plechach męskich, niewytwarzających plemni i hodowanych *in vitro*. Transkrypty reprezentowane przez fragmenty cDNA długości 273nt oraz 229nt należą więc do transkryptów genów ulegających specyficznej ekspresji w plechach męskich *P.endiviifolia* sp B.

Cztery pary starterów, amplifikujące fragmenty transkryptów specyficznych dla plech męskich wykorzystano również w reakcji PCR z matrycami DNA genomowego izolowanego z plech męskich i żeńskich pochodzących z hodowli *in vitro* oraz zebranych z terenu. Co

ciekawe, amplifikację na DNA genomowym żeńskim i męskim zaobserwowano tylko w przypadku starterów zaprojektowanych na podstawie sekwencji fragmentów cDNA długości 243nt, 193nt. Chociaż eksperymenty RT-PCR pokazały obecność tych fragmentów w cDNA uzyskanym z plech męskich pochodzących z terenu, to najwyraźniej geny te obecne są zarówno w DNA genomowym męskim i żeńskim zarówno plech z hodowli *in vitro*, jak i z terenu. Jednak ich ekspresja jest najwyraźniej charakterystyczna dla plech męskich wytwarzających plemnie rosnących w naturalnych warunkach środowiska. Z kolei startery zaprojektowane na podstawie sekwencji fragmentów cDNA długości 273nt oraz 229nt dały produkty wyłącznie na matrycy DNA genomowego izolowanego z plech męskich pochodzących zarówno z hodowli *in vitro* jak (rozdział WYNIKI, zdjęcia nr 5-16c, 5-17c) i z terenu (zdjęcie 6-1).



Zdjęcie 6-1. Rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym produktów reakcji PCR z wykorzystaniem (a) starterów Frd1+Rrd1 zaprojektowanych na podstawie sekwencji fragmentu cDNA długości 273nt (fragment transkryptu genu kodującego α -tubulinę), (b) starterów Frd4+Rrd4 zaprojektowanych na podstawie sekwencji fragmentu cDNA długości 229nt (fragment transkryptu genu kodującego białko Rab). Amplifikację prowadzono według programu RT (METODY, pkt 4.11), zastosowano 29 cykli amplifikacji. Matryce reakcji stanowił DNA genomowy z plech z terenu *Pellia endiviifolia* sp B. kn – kontrola negatywna reakcji PCR (bez matrycy).

Najprawdopodobniej więc fragmenty tych dwóch wyselekcjonowanych transkryptów pochodzą z genów, które są unikalne dla genomu osobników męskich *P.endiviifolia* sp B. Geny te nie zostały wykryte w opisanym poprzednio eksperymencie RDA. Wytłumaczeniem może być fakt, iż w różnicowej hybrydyzacji genomowej jedynie ok. 2 – 15% genomu jest reprezentowane przez amplikony uzyskane w wyniku trawienia DNA genomowego i amplifikacji uzyskanych fragmentów restrykcyjnych w kolejnych reakcjach PCR (Balocchi i Flaherty 1997). Wykorzystanie amplikonów otrzymanych z użyciem enzymów BamHI oraz HindIII najwyraźniej nie uchwyciło rejonu genomowego, w którym znajdują się te geny. Dlatego produkty różnicowe RDA-cDNA mogły nie znaleźć się w puli fragmentów różnicowych eksperymentu RDA.

Poczynione obserwacje upoważniały mnie do podjęcia eksperymentów mających na celu sklonowanie pełnej sekwencji cDNA oraz pełnej sekwencji genomowej wyselekcjonowanych czterech transkryptów w celu określenia budowy kodujących ich genów. Wstępna analiza bioinformatyczna wytypowanych fragmentów cDNA tylko w jednym przypadku wykazała podobieństwo uzyskanej sekwencji do sekwencji kodującej

znane białko roślinne z rodziny Rab (fragment długości 229nt). Pozostałe trzy fragmenty mogły pochodzić z rejonów UTR, dlatego niemożliwe było określenie ich podobieństwa do innych, zdeponowanych w publicznych bazach danych, sekwencji. Koniecznym więc było poznanie pełnych sekwencji cDNA dla przeprowadzenia ich analiz porównawczych. W celu uzyskania pełnych sekwencji cDNA posłużono się techniką RACE, a w przypadku sekwencji genomowych – techniką „spacer po genomie” z wykorzystaniem zestawów firmy Clontech. Obie techniki w połączeniu z analizami bioinformatycznymi, umożliwiły poznanie pełnych sekwencji cDNA oraz pełnych struktur badanych genów: określenie długości egzonów, intronów, oraz regionów mRNA nie ulegających translacji. Możliwe także stało się określenie prawdopodobnych sekwencji aminokwasowych kodowanych białek, dla których przeprowadzono szereg analiz bioinformatycznych

6.2.1. Analiza bioinformatyczna genu i białka α -tubuliny oraz jego potencjalna funkcja w plechach męskich *P. endiviifolia* sp B

Z wyjściowego fragmentu cDNA długości 273nt otrzymano cDNA długości 2 216nt, w obrębie którego określono otwartą ramkę odczytu długości 448aa. Analiza porównawcza przewidzianej sekwencji białkowej wykazała 95-97% podobieństwo do α -tubulin innych gatunków roślin. Poniżej w tabeli 6-1 przedstawiono porównanie szczegółów budowy genów kodujących α -tubuliny wybranych gatunków roślin (na podstawie danych dostępnych w bazie GenBank; 18.10.10) względem genu wątrobowca *P. endiviifolia* sp B. W porównaniu wykorzystano dane dotyczące genów uwzględnionych w rozdziale WYNIKI, punkt 5.5.1.

Tabela 6-1. Porównanie budowy niektórych genów kodujących α -tubuliny wybranych gatunków roślin.

Gen z rodziny TUA	<i>Arabidopsis thaliana</i> *	<i>Oryza sativa</i>	<i>Physcomitrella patens</i>	<i>Pellia endiviifolia</i> sp B
cDNA [nt]	1 736/1 726	1 725	1 700	2 216
CDS [nt]	1 353/1 353	1 353	1 350	1 347
5'UTR [nt]	138/105	99	258	235
Egzon 1 [nt]	251/219	212	113	348
Intron 1 [nt]	84/83	910	359	309
Egzon 2 [nt]	216/216	216	416	215
Intron 2 [nt]	78/78	82	316	602
Egzon 3 [nt]	201/201	201	201	200
Intron 3 [nt]	112/112	598	127	695
Egzon 4 [nt]	510/510	510	510	202
Intron 4 [nt]	92/92	118	158	1 026
Egzon 5 [nt]	562/585	590	309	944
3'UTR [nt]	244/268	273	292	281
Białko [aa]	450/450	450	449	448
Kodon STOP	TGA/TGA	TAG	TGA	TGA

* w porównaniu uwzględniono dwa geny *A.thaliana* ze względu na ich niemal identyczną sekwencję kodującą (AT5G19780/AT5G19770).

Z powyższego porównania wynika, że zidentyfikowany gen wątrobowca jest wysoce konserwatywny w porównaniu do opisanych genów roślinnych, zarówno jeśli wziąć pod uwagę liczbę egzonów genu oraz aminokwasów budujących prawdopodobne białko. Białko *P.endiviifolia* sp B jest jedynie krótsze o 1 – 2 reszt aminokwasowych od wszystkich tu porównywanych. Przewidziana sekwencja aminokwasowa zawiera w swej N-końcowej części konserwatywne miejsce wiązania GTP (GGGTGSG, 42-48 aa), które jest niezbędne do polimeryzacji α/β -tubulin (Kirschner i Mitchison 1986). Ponadto zidentyfikowanych zostało po 11 konserwatywnych reszt aminokwasowych odpowiedzialnych za oddziaływanie α/β -tubulin oraz β/α -tubulin tworzących powierzchnię do oligomeryzacji ich podjednostek.

Analizy RT-PCR fragmentu cDNA długości 273nt, pochodzącego z rejonu 3'UTR transkryptu genu α -tubuliny *P.endiviifolia* sp B, wykazały jego amplifikację wyłącznie na matrycach cDNA z plech męskich, zarówno hodowanych *in vitro*, jak i zebranych z terenu (rozdział WYNIKI, punkt 5.2.3, zdjęcie 5-16). Można więc wywnioskować, iż zidentyfikowany gen kodujący α -tubulinę ulega specyficznej ekspresji w plechach męskich *P.endiviifolia* sp B. Ponieważ fragment transkryptu tego genu ulegał również amplifikacji na cDNA izolowanym z plech hodowanych *in vitro* nie wytwarzających plemni, nie można jednoznacznie stwierdzić, iż jest on bezpośrednio zaangażowany w proces wytwarzania plemni u tego wątrobowca. α -tubuliny wraz z β -tubulinami są podstawowym składnikiem mikrotubul, będących głównym budulcem cytoszkieletu komórki, jak również wici i rzęsek nadających komórkom zdolność lokomocji.

Mikrotubule odgrywają również ogromną rolę w trakcie podziałów komórkowych tworząc wrzeciono mitotyczne czy fragmoplast. Dodatkowo zidentyfikowano nietypowe mikrotubule w komórkach charakteryzujących się wzrostem wierzchołkowym jak włosniki, czy kiełkujące ziarna pyłku. Ludwig i in. (1988) zaobserwowali, że transkrypt genu *TUA1* *A.thaliana* ulega akumulacji w kwiatach, ale nie w liściach czy korzeniach dojrzałych roślin. Ponadto największa ilość tego transkryptu była odnotowana w trakcie tworzenia pręcików. Cztery lata później Carpenter i in. (1992) pokazali, że promotor genu *TUA1* jest preferencyjnie aktywny w postmitotycznych ziarnach pyłku, z pewną aktywnością w młodych pylnikach, dnie kwiatu oraz kilku tkankach wegetatywnych. Dojrzałe, niekiełkujące ziarno pyłku wydaje się nie posiadać mikrotubul. Po wykiełkowaniu złożona sieć mikrotubul gromadzi się w komórce formując wraz z filamentami aktynowymi sieć dla przemieszczania jądra wegetatywnego i komórek plemnikowych wewnątrz łagiewki pyłkowej. Identyfikacja białek podobnych do kinezyn w łagiewce pyłkowej sugeruje, że mikrotubule mogą odgrywać rolę w transporcie komórek plemnikowych, organelli i/lub pęcherzyków endocytotycznych. Interfazowa sieć mikrotubul większości komórek roślinnych jest prostopadła do kierunku ich

elongacji. Sieć mikrotubul łągiwki jest w przybliżeniu równoległa do kierunku jej wzrostu. Dodatkowo oprócz mikrotubul komórki wegetatywnej, również komórki plemnikowe zawierają wiązkę mikrotubul, która łączy je z błoną komórkową, prawdopodobnie utrzymując prawidłowy kształt łągiwki oraz położenie tych komórek w trakcie wzrostu łągiwki. Tak więc istnieje korelacja między ekspresją genu *TUAI* i gromadzeniem rozległych mikrotubul w trakcie rozwoju gametofitu męskiego *A.thaliana* (Carpenter i in. 1992). Również badania nad rodziną genów kodujących α -tubuliny u kapusty chińskiej (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*) wykazały, że gen *TUBAI* ulegał wysokiej ekspresji w stadium diad i tetrad mikrosporocytów, natomiast o wiele niższej w mikrosporach. Jego ekspresja wzrastała ciągle od momentu powstania mikrospor do stadium tetrad, w której komórki ulegały aktywnym podziałom, po czym wykazała najniższy poziom w stadium dojrzałych mikrospor (Zhang 2008), co wskazuje również na ważną rolę określonego typu izoformy α -tubuliny na proces powstawania gametofitu męskiego u roślin okrytonasiennych. Przeprowadzono również badania na temat złożonej funkcji mikrotubul w rozwoju ziaren pyłku u przedstawiciela roślin nagonasiennych – świerku Wilsona (*Picea wilsonii*). Yu i in. wykazali, że gen *PwTUAI* ulegał podwyższonej ekspresji w kiełkujących ziarnach pyłku, zależnie od jonów Ca^{2+} oraz boru. Nadekspresja białka PwTua1 usprawnia dojrzewanie pyłku oraz wzrost łągiwki pyłkowej zarówno u *P.wilsonii* jak i *A.thaliana*. Gen *PwTUAI* odgrywa więc kluczową rolę w regulacji komponentów ściany komórkowej pyłku w taki sposób, który promuje jego kiełkowanie oraz wzrost łągiwki pyłkowej (Yu i in. 2009). Niewykluczone, że w procesach wytwarzania męskich komórek płciowych w gametofitach wątrobowców bierze udział wyselekcjonowany gen α -tubuliny. Jeśli zwrócić uwagę na budowę gamet męskich mszaków to są to ruchliwe, silnie wydłużone, helikalne komórki, opatrzone dwiema wiciami (Szweykowscy 2003). Ponieważ do zapłodnienia dochodzi w wodzie, komórki te muszą być odpowiednio przystosowane do warunków środowiska wodnego. Podczas spermatogenezy u mszaków nieodróżnicowane komórki parenchymy ulegają stopniowemu przekształceniu w komórki o opływowych kształtach zawierających minimalną ilość organelli. W trakcie tego procesu powstaje złożony aparat lokomotoryczny. Co ważne, centriole dwuwiciowych gamet męskich mszaków powstają *de novo* w późnych etapach spermatogenezy (Renzaglia i in. 2000). Kluczowe dla tego procesu są białkowe elementy cytoszkieletu, a zwłaszcza unikalne dla tych komórek złożone układy mikrotubul: ciała podstawowe oraz wici (Renzaglia i Garbary 2000). Histogeneza męskich organów płciowych dostarcza dane na temat zjawisk cytoplazmatycznych takich jak zachowanie plastydu oraz organizacja polarnośći komórek spermatocytów. Liczba organelli i ich przestrzenne rozmieszczenie ustalone są już podczas

podziałów, tak by rodząca się spermatyda była przygotowana do szybkiego zróżnicowania się do komórki zdolnej do poruszania się w środowisku wodnym (Renzaglia i in. 2000).

Obecność specyficznego transkryptu α -tubuliny w plechach męskich *P.endiviifolia* sp B może świadczyć więc o zapotrzebowaniu na ten konkretny typ tubuliny do organizacji aparatu lokomotorycznego plemników *P.endiviifolia* sp B, czy też do zbudowania odpowiedniego cytoszkieletu dla wewnątrzkomórkowej organizacji komórek plemników. Nie należy zapominać, że gen ten znajduje się tylko w genomie męskim *P.endiviifolia* sp B. Ciekawym będzie przeanalizować budowę promotora tego genu i porównać z promotorami genów α -tubulin roślin wyższych, o których wiadomo, że ulegają ekspresji w trakcie rozwoju gametofitu męskiego.

6.2.2. Analiza bioinformatyczna genu i białka z rodziny Rab oraz jego potencjalna funkcja w plechach męskich *P.endiviifolia* sp B

Z wyjściowego fragmentu cDNA długości 229nt otrzymano cDNA długości 1 330nt, w obrębie którego określono otwartą ramkę odczytu długości 217aa. Analiza porównawcza przewidzianej sekwencji białkowej wykazała 77-92% podobieństwo do białek z rodziny Rab innych gatunków roślin. Poniżej w tabeli 6-2 przedstawiono porównanie szczegółów budowy genów kodujących białka Rab wybranych gatunków roślin (na podstawie danych dostępnych w bazie GenBank; 18.10.10) względem genu wątrobowca *P. endiviifolia* sp B. W porównaniu wykorzystano dane dotyczące genów uwzględnionych w rozdziale WYNIKI, punkt 5.5.2.

Tabela 6-2. Porównanie budowy niektórych genów kodujących białka z rodziny Rab wybranych gatunków roślin. (-) oznacza brak danego elementu w genie.

Gen z rodziny RAB	<i>Selaginella moellendorffii</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>Physcomitrella patens</i>	<i>Pellia endiviifolia</i> sp B
cDNA [nt]	949	1 084	1 123	1 532	1 330
CDS [nt]	654	654	654	651	654
5'UTR [nt]	133	128	184	351	272
Egzon 1 [nt]	351	349	402	288	490
Intron 1 [nt]	106	163	602	232	1 150
Egzon 2 [nt]	469	574	722	229	845
Intron 2 [nt]	63	-	-	581	-
Egzon 3 [nt]	129	-	-	1 017	-
3'UTR [nt]	162	141	292	531	409
Białko [aa]	217	217	217	216	217
Kodon STOP	TGA	TGA	TAG	TAA	TGA

Z powyższego porównania wynika, że zidentyfikowany gen wątrobowca jest bardziej podobny do genu rzodkiewnika oraz ryżu, zarówno jeśli wziąć pod uwagę liczbę egzonów genu oraz aminokwasów budujących prawdopodobne białko. Przewidziana sekwencja aminokwasowa zawiera motywy niezbędne do wiązania GTP/GDP oraz efektorów:

- motyw G1 (tzw. pętla P, GDSGVGKS, 21-27 aa) wiążący jony Mg^{2+} oraz reszty fosforanowe;
- motyw G3 (WDTAGQ, 57-61 aa), w którym sekwencja DXXG oddziałuje z γ -fosforanem GTP;
- motyw G4 (GNKSD, 115-119 aa), w którym sekwencja NKXD to region rozpoznający specyficznie reszty fosforanowe;
- motyw G5 (ETSAL, 150-155 aa), w którym sekwencja ETSA oddziałuje z resztą kwasu asparaginowego motywu G4.

Motywy te wspólnie odpowiedzialne są za wiązanie GTP i GDP oraz hydrolizę GTP. Biologiczna funkcja białek G silnie zależy od ich modyfikacji potranslacyjnych. Rodziny białek Ras, Rho i Rab zawierają charakterystyczną sekwencję na swym C-końcu, która podlega modyfikacjom decydującym o ich komórkowej lokalizacji i interakcji z efektem. Większość białek Rab posiada dwie reszty cysteiny w różnych motywach (XXCC, XCXC, CCXX, CCXXX, XCCX, gdzie X reprezentuje jakikolwiek aminokwas), do których dołączane są reszty geranylowe (Agarwal i in. 2009). W przypadku białka *P.endiviifolia* sp B reszty te są również obecne (GCCS, 213-216 aa).

Analizy RT-PCR fragmentu cDNA długości 229nt, stanowiącego fragment transkryptu genu kodującego białko z rodziny Rab *P.endiviifolia* sp B, wykazały jego amplifikację wyłącznie na matrycach cDNA z plech męskich, zarówno hodowanych *in vitro*, jak i zebranych z terenu (rozdział WYNIKI, punkt 5.2.3, zdjęcie 5-17). Można więc wywnioskować, iż zidentyfikowany gen kodujący białko Rab ulega specyficznej ekspresji w plechach męskich *P.endiviifolia* sp B. Ponieważ fragment transkryptu tego genu ulegał również amplifikacji na cDNA plech pochodzących z hodowli *in vitro* nie wytwarzających plemni, nie można jednoznacznie stwierdzić, iż jest on bezpośrednio zaangażowany w proces wytwarzania plemni u tego wątrobowca.

Białka Rab stanowią ogromną rodzinę białek wiążących GTP, regulujących ruch pęcherzykowy między określonymi przedziałami komórkowymi, ścieżek endo- i egzocytozy w komórkach eukariotycznych. Białka te są zachowawcze ewolucyjnie i wykazują dużą homologię od drożdży po ssaki i rośliny. Ostatnie doniesienia sugerują, że białka Rab regulują specyficzność i ukierunkowanie transportu pęcherzyków z kompartmentu wyjściowego do docelowego. Wiadomo również, że Rab GTPazy mogą pełnić różne funkcje, które mogą się zająć z innymi, tymi pełnionymi przez innych członków tej rodziny. Tak więc jedno białko Rab może odgrywać kluczową rolę w transporcie pęcherzykowym między retikulum endoplazmatycznym a aparatem Golgiego, jak również w procesach sekrecji, czy utrzymaniu polarności komórek roślinnych (Bischoff i in. 1999). Dla przykładu, gen *NtRAB2* *Nicotiana tabacum* ulega silnej ekspresji w pyłku, jak również w innych szybko rosnących

tkankach o podniesionych wymaganiach aktywności sekrecyjnej. Transkrypty tego genu nie zostały natomiast wykryte w pełni rozwiniętych tkankach, jak np. liście. Białko NtRab2 odgrywa decydującą rolę w transporcie między retikulum endoplazmatycznym a aparatem Golgiego, co ma związek z prawidłowym wzrostem łagiewki pyłkowej. Dominująca negatywna mutacja genu *NtRAB2*, która utrzymuje to białko w nieaktywnej formie ze związanym GDP, powoduje zahamowanie transportu białek niezbędnych do wzrostu łagiewki, tym samym blokując jej elongację (Cheung i in. 2002). Z kolei białko Rab11 tytoniu zostało zlokalizowane przede wszystkim w regionie wierzchołka łagiewki pyłkowej, który prawie wyłącznie wypełniony jest przez pęcherzyki transportowe. Mutant genu kodującego białko Rab11 wykazał ograniczony wzrost łagiewki pyłkowej oraz obniżoną płodność. Właściwa regulacja aktywności GTPazy Rab11 jest kluczowa dla transportu pęcherzykowego skupionego w szczycie łagiewki pyłkowej oraz dla wzrostu łagiewki pyłkowej, a tym samym białko rozstrzyga o sukcesie reprodukcyjnym tytoniu (de Graaf i in. 2006). Istnieją więc geny kodujące białka Rab, które odgrywają kluczową rolę w procesie rozwoju i wzrostu gametofitu męskiego roślin okrytozalążkowych. Również u *A.thaliana* zidentyfikowano białka Rab biorące udział w rozwoju łagiewki pyłkowej. Gen *RABA4D* ulega specyficznej ekspresji w kiełkującym pyłku i jest niezbędny dla prawidłowej regulacji wzrostu łagiewki pyłkowej u rzodkiewnika. Całkowita inaktywacja tego genu prowadzi do zaburzenia polarnego wzrostu i zmienionego wzoru wzrostu ściany komórkowej *in vitro*, podczas gdy *in vivo* utrata jego aktywności powoduje zaburzenia wzrostu łagiewki oraz zmniejszoną efektywność kierowania jej w stronę okienka zalążka. Innym białkiem *Arabidopsis* zlokalizowanym w wierzchołkach rosnących łagiewek pyłkowych oraz włośnikach jest RabA4b, blisko spokrewnione z RabA4D oraz podobne do białka Rab11 tytoniu. Jest ono ważnym białkiem regulującym polarny wzrost zarówno łagiewki, jak i włośników (Szumlanski i Nielsen 2009). W słupkach roślin kwiatowych łagiewki pyłkowe wydłużają się kierunkowo od znamienia do zalążka, by dostarczyć komórki plemnikowe wymagane do podwójnego zapłodnienia. Łagiewki wydłużają się poprzez wzrost wierzchołkowy, w którym nowe składniki błony są włączane do plazmalemmy, a obfite ilości materiałów budujących ścianę komórkową ulegają sekrecji przy końcu łagiewki, by wesprzeć jej wzrost. Niezwykle wydajny system transportu pęcherzyków najwyraźniej leży u podłoża szybkiego wzrostu łagiewki. Intensywny cytoplazmatyczny strumień transportuje ogromną liczbę pęcherzyków wydzielniczych do wierzchołkowego regionu wydłużającej się łagiewki pyłkowej. Pęcherzyki te gromadzą się w dużej gęstości na samym koniuszku łagiewki, gotowe do fuzji z błoną komórkową. Niosą one złożone polisacharydy i glikoproteiny dla rozwoju ściany komórkowej, a także dostarczają szeroki zakres białek błony komórkowej, ściany komórkowej oraz białek sekrecyjnych, łącznie z

możliwymi cząsteczkami sygnałowymi, czy enzymami hydrolitycznymi (Cheung i in. 2002). Dlatego białka Rab nie tylko są ważne dla samego wzrostu łagiewki pyłkowej, ale również najprawdopodobniej determinują zdolność fuzji błon komórkowych łagiewki i woreczka zalążkowego oraz precyzują błony docelowe, poprzez działanie jako molekularne przełączniki i regulatory składników budujących błonę komórkową (Jürgens i Geldner 2002).

Istnieje więc możliwość, że zidentyfikowany gen *P.endiviifolia* sp B kodujący białko z rodziny Rab pełni ważną funkcję w procesie formowania plemników tego wątrobowca. Nie należy zapominać, że gen ten znajduje się tylko w genomie męskim *P.endiviifolia* sp B. Co prawda w przypadku wątrobowców gametofit męski stanowi cała roślina, w porównaniu ze zredukowanym do kilku komórek gametofitem roślin okrytonasiennych. Jednakże plemniki wątrobowców, podobnie jak łagiewki pyłkowe, charakteryzują się spolaryzowaną budową komórkową. Niewykluczone więc, że również u wątrobowców białka Rab odgrywają ważne role w trakcie organizacji oraz utrzymania budowy komórek plemników. Ponadto istnieją pewne dane związane z obecnością białek Ypt/Rab w organellach ruchu u glonów *Volvox carteri* i *Chlamydomonas reinhardtii*. Analizy typu western wykazały obecność kilku białek Ypt równomiernie rozmieszczonych wzdłuż całej długości wici (Huber i in. 1996). Być może rola białek Ypt/Rab związana jest z umożliwianiem specyficznych interakcji między różnymi białkami błony komórkowej wici oraz zapewnieniem dotarcia ruchliwych komórek do miejsca docelowego, którym w przypadku plemników wątrobowców jest komórka jajowa rodni.

6.2.3. Analiza bioinformatyczna genu i białka TS oraz jego potencjalna funkcja w plechach męskich *P.endiviifolia* sp B

Z wyjściowego fragmentu cDNA długości 243nt otrzymano cDNA długości 2 689nt, w obrębie którego określono otwartą ramkę odczytu długości 295aa. Analiza porównawcza przewidzianej sekwencji białkowej z sekwencjami dostępnymi w publicznych bazach danych nie wykazała podobieństwa do znanych sekwencji białkowych, jak również nukleotydowych. Z tego względu gen ten nazwano *TS* – tajemnicza sekwencja.

Analizy RT-PCR fragmentu cDNA długości 193nt, stanowiącego fragment transkryptu genu *ts* z pogranicza 5'UTR i sekwencji kodującej, wykazały jego amplifikację wyłącznie na matrycach cDNA z plech męskich z terenu, które wytwarzały plemniki (rozdział WYNIKI, punkt 5.2.3, zdjęcie 5-18). Można więc wywnioskować, iż zidentyfikowany gen ulega specyficznej ekspresji w trakcie procesu tworzenia plemni przez gametofity męskie rosnące w naturalnych warunkach środowiska.

Sekwencja prawdopodobnego białka Ts nie wykazuje obecności konserwatywnych domen, czy motywów. Z wykorzystaniem programów bioinformatycznych zidentyfikowano jedynie potencjalny peptyd sygnałowy (reszty 1-22aa) oraz potencjalną domenę transbłonową (reszty 15-35aa). Niestety przeprowadzone analizy nie wskazały jednoznacznie na docelowe miejsce lokalizacji przewidywanego białka. Skład aminokwasowy białka Ts, w którym największy udział stanowią reszty leucyny, treoniny i proliny może świadczyć o specyficznej roli tego białka. Roślinne białka bogate w leucynę pełnią wielorakie funkcje w procesach transdukcji sygnałów (Vernon i Forsthoefel 2002). Dla przykładu kinazy RLK (ang. LRR-receptor-like kinases) oraz spokrewnione z nimi receptory RLP (ang. receptor-like proteins) stanowią ogromną rodzinę białek błony komórkowej z zewnątrzkomórkowo zorientowanymi domenami LRR. Biorą one udział w szeregu procesach: rozwojowych, związanych z odbieraniem sygnałów ze środowiska lub związanych z obroną komórki przed patogenami (Morris i Walker 2003, Dievart i Clark 2004). Inna grupa białek bogatych w leucynę, F-box/LRR, pośredniczy w ukierunkowanej degradacji białek w odpowiedzi na zmiany hormonalne lub rozwojowe (Kuroda i in. 2002). We wszystkich tych białkach charakterystyczne domeny LRR (ang. Leucine-Rich Repeat) bogate w reszty leucyny są krytyczne dla funkcjonowania tych białek przez rozpoznanie odpowiedniego liganda lub przez połączenie z innym składnikiem ścieżki sygnałowej, w której biorą udział. Domeny LRR zbudowane są z tandemowo powtórzonych motywów bogatych w reszty leucyny długości od ok. 18 do 29 aminokwasów (Forsthoefel i in. 2005). Konserwatywne powtórzenia LRR zidentyfikowano również w białkach Pex (ang. pollen extensin-like), ekstensynach specyficznie występujących w ścianach ziaren pyłku roślin okrytozalążkowych (Stratford i in. 2001). Ekstensyny są podrodziną białek bogatych w hydroksyprolinę zawierających charakterystyczne powtórzenia motywu Ser-Pro_{3,7} (Baumberger i in. 2003). Wiadomo, że białka te uczestniczą w morfogenezie, zabliznianiu się ran, odpowiedzi na atak patogenu, stabilizacji korykalnych mikrotubul i mechanicznym wzmocnianiu ścian komórkowych. Dokładna rola białek Pex nie jest bezpośrednio określona. Obecność konserwatywnego motywu LRR być może wpływa na zdolność wiązania przez białka Pex ligandów np. cząsteczek pochodzących ze słupka, co umożliwia rozpoznanie odpowiedniej tkanki słupka dla wzrostu łagiewki pyłkowej (Stratford i in. 2001).

Niestety w białku Ts *P. endiviifolia* sp B nie występują zarówno konserwatywne motywy LRR, jak również powtórzenia charakterystyczne dla ekstensyn. Reszty leucyny i proliny rozproszone są wzdłuż całej sekwencji aminokwasowej, bez regularnego ich rozłożenia. Niewykluczone, iż wyselekcjonowany gen *TS* koduje białko specyficzne tylko dla plech wątrobowców, które mimo braku znanych obecnie motywów, może być składnikiem

błony/ściany komórkowej plemników. Obecność wielu reszt proliny dawałoby możliwość kowalencyjnego połączenia ze składnikami ściany wzmacniając jej mechaniczną wytrzymałość (Iiyama i in. 1994). Plemniki są niezwykle cennym przekaźnikiem informacji genetycznej, która musi być chroniona przed urazami mechanicznymi, chemicznymi czy patogennymi. Być może białko Ts jest na tyle ważnym składnikiem ściany komórkowej plemników, że uniemożliwia wzrost strzępek grzybów, żyjących w symbiozie z wątrobowcami z rodzaju *Pellia*, we fragmenty plech wytwarzających plemnie, ze względu na istotność zawartych w nich plemników. Z kolei reszty leucyny, najliczniej występujące w sekwencji aminokwasowej Ts mogłyby brać udział w wiązaniu cząsteczek sygnałowych pochodzących ze środowiska i transdukcji sygnału do wnętrza plemników. Obecnie niewiadomo, w następstwie jakich bodźców dochodzi do przepływu plemników w kierunku rodni u wątrobowców. Możliwe, że rodnie produkują specyficzne cząsteczki, które działają na zasadzie atraktantów przyciągających plemniki do zawartych w gametofitach żeńskich rodni. Stąd białko Ts mogłoby brać udział w rozpoznawaniu tego rodzaju cząsteczek.

6.2.4. Analiza bioinformatyczna genu i białka HMGbox oraz jego potencjalna funkcja w plechach męskich *P.endiviifolia* sp B

Z wyjściowego fragmentu cDNA długości 193nt otrzymano dwa cDNA: krótszy długości 759nt i dłuższy – 1 165nt. W obrębie obu określono identyczną otwartą ramkę odczytu długości 120aa. Analiza porównawcza przewidzianej sekwencji białkowej wykazała 45-48% podobieństwo do białek zawierających domenę HMGbox *Physcomitrella patens* oraz kilku gatunków grzybów. Poniżej w tabeli 6-3 przedstawiono porównanie szczegółów budowy genów kodujących białka HMGbox mchu oraz wybranych gatunków grzybów (na podstawie danych dostępnych w bazie GenBank; 18.10.10) względem genu wątrobowca *P. endiviifolia* sp B. W porównaniu wykorzystano dane dotyczące genów uwzględnionych w rozdziale WYNIKI, punt 5.5.4.

Tabela 6-3. Porównanie budowy niektórych genów kodujących białko z domeną HMGbox mchu, wątrobowca oraz wybranych gatunków grzybów. (?) oznacza brak danych w bazie GenBank. (-) oznacza brak danego elementu w genie. Liczby oznaczają długości poszczególnych elementów genu.

Gen z rodziny HMG	<i>Physcomitrella patens</i>	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Verticillium albo-atrum</i>	<i>Pellia endiviifolia</i> sp B
cDNA [nt]	279	291	573	1 165
CDS [nt]	279	291	309	363
5'UTR [nt]	?	?	23	266
Egzon 1 [nt]	207	61	13	342
Intron 1 [nt]	265	54	291	582
Egzon 2 [nt]	73	231	290	212
Intron 2 [nt]	-	-	56	185
Egzon 3 [nt]	-	-	270	75
Intron 3 [nt]	-	-	-	432

Egzon 4 [nt]	-	-	-	584
3'UTR [nt]	?	?	240	584
Białko [aa]	92	96	102	120
Kodon STOP	TGA	TGA	TAA	TAA

Z powyższego porównania wynika, że zidentyfikowany gen wątrobowca różni się zdecydowanie od pozostałych wykorzystanych w porównaniu. Jest on najbardziej złożonym strukturalnie genem o największej długości transkryptu oraz największej długości kodowanego białka. Dodatkowo z genu *HMG* wątrobowca powstają dwa transkrypty o różnej długości, co związane jest z alternatywnym miejscem akceptorowym 3' w trzecim intronie oraz dwoma preferencyjnie wybieranymi sygnałami poliadenylacji transkryptu. W zależności od tego, które miejsce splicingowe zostanie wybrane, rozpoznawany jest jeden z dwóch sygnałów poliadenylacji: wcześniejszy kiedy egzon 4 jest dłuższy, późniejszy kiedy egzon 4 jest krótszy. Dlatego również w zależności od zdarzenia splicingowego transkrypt powstający z genu *HMG* ma różną długość rejonu 3'UTR: 129nt w krótszym transkrypcie, 535nt w dłuższym transkrypcie. Ponieważ w obu transkryptach potencjalna ramka odczytu pozostaje niezmieniona, niewykluczone, że długość transkrybowanej cząsteczki mRNA ma wpływ na jej stabilizację. Niestety w obrębie obu transkryptów nie znaleziono potencjalnych sygnałów stabilizacji lub degradacji z użyciem informacji dostępnych w publicznych bazach danych. Istnieje możliwość, że transkrypty *Pellia endiviifolia* sp B posiadają specyficzne sygnały degradacji lub stabilizacji, które nie są jeszcze scharakteryzowane. Długi 3'UTR może świadczyć o skierowywaniu tej izoformy na ścieżkę NMD (ang. Nonsense Mediated Decay), pomimo braku przedwczesnego kodonu stop w komórce (Baker i Parker 2004). Warto nadmienić, że ostatni intron, który podlega alternatywnemu splicingowi, nie zmienia kodowanej ramki odczytu, która kończy się wraz z ostatnim kodonem egzonu poprzedzającego omawiany intron.

W obrębie przewidzianej sekwencji aminokwasowej zidentyfikowano w pozycji 49-118aa domenę HMGbox wiążącą się z DNA niezależnie od jego sekwencji, charakterystyczną dla białek HMGB. W pozycji 59 sekwencji aminokwasowej znajduje się konserwatywna reszta fenyloalaniny, która jako pierwsza interkaluje między zasady DNA oraz w pozycji 89 konserwatywna reszta tryptofanu, ważna dla prawidłowego związania się domeny HMGbox (Bianchi i Agresti 2005). Analizy RT-PCR fragmentu cDNA długości 193nt, stanowiącego fragment transkryptu genu kodującego białko z domeną HMGbox *P.endiviifolia* sp B, wykazały jego amplifikację wyłącznie na matrycach cDNA z plech męskich z terenu, które wytwarzały plemnie (rozdział WYNIKI, punkt 5.2.3, zdjęcie 5-19). Można więc wywnioskować, iż zidentyfikowany gen ulega specyficznej ekspresji w trakcie procesu tworzenia plemni przez gametofity męskie rosnące w naturalnych warunkach środowiska.

Dojrzałe, dwuwiciowe plemniki wątrobowców to heliakalnie zwinięte komórki z zlokalizowanym proksymalnie aparatem lokomotorycznym i czterema organellami: dwoma mitochondriami, ciasno upakowanym centralnie ułożonym jądrem, oraz dystalnym plastydem (Renzaglia i in. 2000). Analiza sekwencji aminokwasowej białka z domeną HMGbox *P.endiviifolia* sp B z wykorzystaniem programu ProtParam, wykazała wysoce zasadowy charakter tego białka, o punkcie izoelektrycznym 10.72, porównywalnym z białkami histonowymi odpowiedzialnymi za upakowanie DNA komórek eukariotycznych. Wiadomo, iż domena HMGbox oddziałuje z dwuniciowym DNA, powodując jego zgięcie, modulując strukturę chromatyny i umożliwiając formowanie innych kompleksów nukleoproteinowych. Specyfika tych oddziaływań nie jest zależna od samej sekwencji kwasu deoksyrybonukleinowego, lecz od struktury jaką przyjmuje. Strukturami szczególnie rozpoznawanymi są małe zaokrąglenia (ang. DNA-minicircles), czterobieżne skrzyżowania DNA (ang. four-way junction) oraz superzwinięte rejonu DNA. U grochu *Pisum sativum* wykazano, że miejsca wiązania białek HMGB również zależą od struktury DNA, ale wykazują dodatkowo preferencje do strukturalnie elastycznych rejonów liniowego DNA zawierających deformujące trakty TpT i TpG (Graaser i in. 2007). Ekspresja genu kodującego białko z domeną HMGbox wyłącznie w plechach produkujących plemnie *P.endiviifolia* sp B może stanowić przesłankę, iż białko to odgrywa ważną rolę w procesie pakowania materiału genetycznego w plemnikach tego wątrobowca. Inną możliwością może stanowić wpływ tego białka na regulację ekspresji genów w plechach męskich *P.endiviifolia* sp B. Domena HMGbox wykazuje również zdolność do zginania łańcucha DNA, nawet o 90°, co może promować wiązanie wielu innych białek aktywujących proces transkrypcji z danego locus. Białka HMGB posiadają zdolność bezpośredniego oddziaływania z nukleosomem. Co ciekawe białko HMGB1 *A.thaliana* konkuruje z histonem H1 o miejsce wiązania DNA. Zastąpienie histonu przez to białko może indukować zmianę struktury chromatyny umożliwiając dostęp czynników regulatorowych do ich docelowych miejsc w nukleosomie. Innym sposobem oddziaływań jest przyłączenie białka HMGB do DNA i nagięcie go w taki sposób, żeby promotor i czynnik transkrypcyjny mogły stabilnie oddziaływać ze sobą lub też by promować rekrutację kolejnych białek kompleksu inicjującego transkrypcję (Bianchi i Agresti 2005, Graaser i in. 2007). Członkowie grupy białek HMGB zostali scharakteryzowani nie tylko w wielu roślinach wyższych, ale również u mchu *Physcomitrella patens*. Oprócz typowych białek lokalizujących w jądrze komórkowym, u mchu po raz pierwszy wśród roślin zidentyfikowano również jedno białko HMGB, które występuje wyłącznie w plastydach (Kullerich i in. 2008).

Obecność w gametoficie męskim *Pellia endiviifolia* sp B, wytwarzającym plemnie, białka biorącego udział w remodelowaniu struktury chromatyny lub oddziałującego z czynnikami transkrypcyjnymi jest bardzo prawdopodobna. Takie białko mogłoby działać na kilka sposobów: po pierwsze przez inicjowanie lub wzmacnianie ekspresji genów odpowiedzialnych za podziały i odróżnicowanie komórek parenchymy w komórki, które w rezultacie utworzą plemnie. Inną możliwością może być jego udział w podziałach komórek pierwotnych plemników i w tworzeniu plemników w już rozwiniętej plemni.

7. WNIOSKI I PERSPEKTYWY BADAWCZE

- 1) W wyniku eksperymentu RDA z wykorzystaniem jako materiał wyjściowy plechy żeńskie i męskie *P.endiviifolia* sp B hodowane *in vitro* uzyskano 3 fragmenty ulegające specyficznej amplifikacji na DNA genomowym żeńskim oraz 7 fragmentów ulegających specyficznej amplifikacji na DNA genomowym męskim. Uzyskane fragmenty DNA nie reprezentują odcinków DNA różnicujących gatunkowo plechy żeńskie i męskie *P.endiviifolia* sp B, gdyż w wypadku ich amplifikacji na DNA genomowym izolowanym z plech z terenu produkty reakcji PCR otrzymano zarówno na matrycy DNA genomowego męskiego i żeńskiego, bądź uzyskano szereg niespecyficznych produktów reakcji. Jedną z przyczyn, że nie udało się zidentyfikować fragmentów żeńsko- i męsko specyficznych na poziomie gatunkowym mogą być rearanżacje DNA zachodzące w genomach roślin hodowanych *in vitro*. Otrzymany wynik dotyczy zatem jedynie bardzo wąskiej grupy osobników hodowanych w warunkach aksenicznych, a nie odzwierciedla rzeczywistego stanu różnic w DNA genomowym męskim i żeńskim gatunku *P.endiviifolia* sp B.
- 2) Warto byłoby przeprowadzić eksperyment RDA z wykorzystaniem plech z terenu *P.endiviifolia* sp B, zebranych z co najmniej trzech różnych stanowisk, w celu uwzględnienia w trakcie tego typu analiz ewentualnej dynamiki sekwencji genomowych między populacjami tego gatunku wątrobowca.
- 3) Analizy bioinformatyczne produktów różnicowych RDA wykazały podobieństwo niektórych sekwencji do sekwencji kodujących białka bakteryjne. Wyniki tych analiz są dość niejasne i mogą one: 1) odzwierciedlać zanieczyszczenie endofitycznymi bakteriami plech hodowanych *in vitro*, 2) reprezentować przykłady rearanżacji genomowych, 3) reprezentować przykłady lateralnego transferu genów między bakteriami i rośliną.
- 4) Jako punkt wyjścia do wydajnej syntezy dwuniciowego cDNA najlepszym rozwiązaniem okazało się zastosowanie izolacji całkowitego RNA z plech wątrobowca *P.endiviifolia* sp B metodą Chomczyńskiego zmodyfikowaną przez dr P. Nuca.
- 5) W wyniku eksperymentu RDA-cDNA otrzymano zbiór fragmentów różnicowych (DP^{IV}) długości w zakresie ~200 – 300pz. Analizy RT-PCR z wykorzystaniem specyficznych starterów zaprojektowanych na podstawie uzyskanych sekwencji oraz z wykorzystaniem dwóch rodzajów matryc (ds-cDNA wyjściowych dla eksperymentu

RDA-cDNA oraz przygotowanych *de novo* zarówno z plech hodowanych *in vitro* jak i z terenu) zidentyfikowały cztery fragmenty cDNA ulegające amplifikacji wyłącznie na matrycach cDNA z plech męskich. Dwa fragmenty cDNA długości 273nt oraz 229nt (fragmenty transkryptów genów kodujących α -tubulinę oraz białko Rab) wykazały amplifikację zarówno na cDNA uzyskanym z plech męskich *P. endiviifolia* z hodowli *in vitro*, jak i cDNA uzyskanym z plech męskich pochodzących z terenu. Dwa kolejne fragmenty długości 243nt oraz 193nt (fragmenty transkryptów genów kodujących odpowiednio białko z domeną HMGbox oraz białko bogate w reszty leucyny i proliny Ts) wykazały amplifikację wyłącznie na cDNA uzyskanym z plech męskich *P. endiviifolia* sp B wytwarzających plemnie, pochodzących z terenu.

- 6) Pozytywny wynik eksperymentu RDA-cDNA świadczy o właściwym wyborze plech *P. endiviifolia* sp B z terenu do przeprowadzenia tego typu analiz.
- 7) Chociaż eksperymenty RT-PCR pokazały obecność fragmentów transkryptów genów kodujących białko z domeną HMGbox oraz białko bogate w reszty leucyny i proliny Ts w cDNA uzyskanym z plech męskich pochodzących z terenu, to najwidoczniej geny te obecne są zarówno w DNA genomowym męskim i żeńskim zarówno plech z hodowli *in vitro*, jak i z terenu. Jednak ich ekspresja jest najwyraźniej charakterystyczna dla plech męskich wytwarzających plemnie rosnących w naturalnych warunkach środowiska.
- 8) Startery zaprojektowane na podstawie sekwencji fragmentów transkryptów genów kodujących α -tubulinę oraz białko Rab dały produkty wyłącznie na matrycy DNA genomowego izolowanego z plech męskich pochodzących zarówno z hodowli *in vitro* jak i terenu. Najprawdopodobniej geny te są unikalne dla genomu osobników męskich *P. endiviifolia* sp B.
- 9) Eksperymenty typu 5' i 3'RACE oraz „spacer po genomie” pozwoliły na poznanie dokładnej struktury wyselekcjonowanych genów z określeniem liczby i długości egzonów, intronów, a także regionów nie ulegających translacji. Zaobserwowano duże podobieństwo budowy genów kodujących α -tubulinę oraz białko Rab *P. endiviifolia* sp B, mchu *P. patens* i roślin okrytozalążkowych, co może świadczyć, że geny te powstały bardzo wcześnie w trakcie ewolucji świata ożywionego. W przypadku genu kodującego białko z domeną HMGbox, gen wątrobowca różni się zdecydowanie od znanych genów roślinnych i grzybowych. Z kolei gen *TS*, kodujący potencjalne białko bogate w reszty leucyny i proliny może należeć do grupy genów specyficznych tylko

- dla wątrobowców, gdyż nie wykazuje on żadnego podobieństwa do znanych obecnie sekwencji.
- 10) W świetle przedstawionej literatury można sądzić, że zidentyfikowane w pracy geny mogą brać udział w procesach związanych z wytwarzaniem plemni przez plechy męskie wątrobowca *P.endiviifolia* sp B. Potwierdzenie tej tezy wymaga jednak przeprowadzenia dalszych badań.
 - 11) Dla uzyskania odpowiedzi na pytanie, jaka jest lokalizacja potencjalnych białek *P.endiviifolia* sp B na terenie komórki roślinnej można byłoby stworzyć odpowiednie konstrukty genowe zawierające sekwencje nukleotydowe kodujące wyselekcjonowane geny połączone z sekwencją genu reporterowego, np. GFP. Konstrukty takie należałoby następnie wprowadzić do komórek plech wątrobowca, np. za pomocą metody mikrowstrzeliwania.
 - 12) Hodowla *in vitro* zapewnia warunki do wzrostu plech wątrobowców, jednakże są to warunki sztuczne, w których rozwój plech jest zdecydowanie różny od rozwoju w naturalnych warunkach środowiska, co z pewnością wywiera wpływ na prawidłowy rozwój roślin oraz ekspresję genów. Mogą istnieć niescharakteryzowane dotąd czynniki pogodowe/biologiczne, które są konieczne aby powstały dojrzałe, zdolne do produkcji plemników plemnie oraz komórki jajowych rodnie, a których brak w warunkach hodowli *in vitro*. Dlatego należałoby ustalić kontrolowane warunki hodowli *in vitro* tak, aby przynajmniej większość roślin wytwarzała organy rozmnażania płciowego. Wiadomo, że u niektórych roślin determinacja płci kontrolowana jest na drodze hormonalnej. Badania z wykorzystaniem różnych gatunków roślin takich jak *Cucumis sativus* (Yin i Quin 1995), *Mercurialis annua* (Boissay i in. 1996), *Zea mays* (Irish 1996) wykazały, że gibereliny indukują rozwój płci męskiej, natomiast cytokininy płci żeńskiej. Z kolei u mchu *Polytrichum commune* kwas giberelinowy stymulował wzrost spletków, podczas gdy cytokinina BA hamowała jego rozwój, a indukowała rozwój pączków gametoforu (Khryanin 2002). Niewykluczone, że u *P.endiviifolia* sp B jednym z czynników wpływających na rozwój organów rozmnażania generatywnego są hormony. Dlatego należałoby w trakcie hodowli *in vitro* przeprowadzić testy z dodatkiem hormonów do pożywki w celu sprawdzenia ich ewentualnego wpływu na rozwój plech w warunkach *in vitro*.
 - 13) Obecnie nie dysponujemy technikami, które umożliwiłyby wyłączenie funkcji wybranych genów w plechach wątrobowców z rodzaju *Pellia* oraz obserwację efektów tego wyłączenia. Ciekawym podejściem może być wykorzystanie w tym celu

dwóch roślin modelowych: stosunkowo bliskiego krewniaka wątrobowców, mchu *Physcomitrella patens* oraz rośliny okrytozalążkowej *Arabidopsis thaliana*. Pierwszą grupę badanych roślin stanowić mogą mutanty z unieczynnionymi potencjalnymi ortologami genów ulegających specyficznej ekspresji w męskich gametofitach *P.endiviifolia* sp B, w których ewentualne zaburzenia rozwoju plemni oraz ziaren pyłku będą dowodem na istotność wyselekcjonowanych genów w procesach gametogenezy u roślin lądowych. Zarówno mutanty mchu i rzodkiewnika mogą następnie zostać transformowane konstruktami niosącymi zidentyfikowane geny wątrobowca. Jeśli w tak uzyskanych roślinach dojdzie do przywrócenia funkcji wyciszonych genów, będzie to kolejny dowód świadczący o ważności wyselekcjonowanych genów dla prawidłowego przebiegu gametogenezy.

- 14) Ponieważ gen *TS* *P.endiviifolia* sp B koduje potencjalne białko, które nie wykazuje podobieństwa do znanych obecnie sekwencji aminokwasowych, zaproponowane powyżej eksperymenty w celu ustalenia jego funkcji są niemożliwe do przeprowadzenia. Nie mogąc określić ortologów genu *TS* wątrobowca u innych roślin, należałoby udowodnić obecność białka Ts w plechach *P.endiviifolia* sp B. W tym celu należałoby zamówić przeciwciała dla białka Ts, a następnie przeprowadzić detekcję białka Ts w plechach wątrobowca techniką Western.

8. LITERATURA

- Agarwal P., Reddy M.K., Sopory S.K., Agarwal P.K., 2009. Plant Rabs: Characterization, Functional Diversity, and Role in Stress Tolerance. *Plant Mol Biol Rep* 27:417–430
- Agresti A. i Bianchi M.E., 2003. HMGB proteins and gene expression. *Curr. Op. in Gen. & Develop* 13:170–178
- Allen C.E., 1917. A chromosome difference correlated with sex differences in *Sphaerocarpos*. *Science* 46:466–467
- Araujo W.L., Ishizaki K., Nunes-Nesi A., Larson T.R., Tohge T., Krahnert I., Witt S., Obata T., Schauer N., Graham I.A., Leaver C.J., Fernie A.R., 2010. Identification of the 2-Hydroxyglutarate and Isovaleryl-CoA Dehydrogenases as Alternative Electron Donors Linking Lysine Catabolism to the Electron Transport Chain of Arabidopsis Mitochondria. *The Plant Cell* 22:1549–1563
- Ashton, N.W., Champagne, C.E.M., Weiler, T., and Verkoczy, L.K., 2000. The bryophyte *Physcomitrella patens* replicates extrachromosomal transgenic elements. *New Phytologist* 146:391–402
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K., 2003. *Current Protocols in Molecular Biology*.
- Baker K.E. i Parker R., 2004. Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression., *Curr. Op. in Cell Biol.* 16:293–299
- Baldocchi R.A. i Flaherty L., 1997. Isolation of Genomic Fragments from Polymorphic Regions by Representational Difference Analysis. *Methods* 13(4):337–346
- Barthelmess A., 1940. Mutationsversuche mit einem Laubmoos *Physcomitrium piriforme*. II. Morphologische und physiologische Analyse der univalenten und bivalenten Protonemen einiger Mutanten. *Z Vererbungsl* 79: 153–170
- Baumberger N., Doesseger B., Guyot R., Diet A., Parsons R.L., Clark M.A., Simmons M.P., Bedinger P., Goff S.A., Ringli C., Keller B., 2003. Whole-Genome Comparison of Leucine-Rich Repeat Extensins in Arabidopsis and Rice. A Conserved Family of Cell Wall Proteins Form a Vegetative and a Reproductive Clade. *Plant Physiology* 131:1313–1326
- Bateman R.M., Crane P.R., DiMichele W. A., Kenrick P.R., Rowe N.P., 1998. Early evolution of land plants: phylogeny, physiology and ecology of the primary terrestrial radiation. *Rev. Ecol. Syst.* 29: 263–292
- Bell P.R. i Hemsley A.R., 2000. Green plants: their origin and diversity. Cambridge University Press
- Bendtsen J.D., Nielsen H., von Heijne G., Brunak S., 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340: 783–795. [SignalIP]
- Bernhard D.L. i Renzaglia K.S., 1995. Spermiogenesis in the moss *Aulacomnium palustre*. *Bryologist* 98:52–70
- Bezanilla M., Pan A., Quatrano R.S., 2003. RNA interference in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Physiology* 133:470–474
- Bianchi M.E. i Agresti A., 2005. HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr. Op. in Gen. & Develop.* 15:496–506
- Bischoff F., Molendijk A., Rajendrakumar C.S.V., Palme K., 1999. GTPbinding proteins in plants. *Cell Mol Life Sci* 55:233–256
- Boissay E., Delaigue M., Sallaud C., Esnault R., 1996. Predominant Expression of a Peroxidase Gene in Staminate Flowers of *Mercurialis annua*. *Physiol. Plant.* 96:251–257
- Bopp M., 1990. Hormones of the moss protonema. In: Chopra R.N., Bhatla S.C. (eds) Bryophyte development: physiology and biochemistry. CRC Press, Boca Raton: 55–77
- Brown, R. C. i Lemmon, B. E., 1990a. Monoplastidic cell division in lower land plants., *Am. J. Bot.* 77: 559–571
- Boutla A., Kalantidis K., Tavernarakis N., Tsagris M., Tabler M., 2002. Induction of RNA interference in *Caenorhabditis elegans* by RNAs derived from plants exhibiting post-transcriptional gene silencing. *Nucleic Acids Res.* 30(7): 1688–1694

- Breslauer K.J., Frank R., Blocker H., Marky L.A., 1986. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 83:3746-3750
- Brun F., Gonneau M., Laloue M., Nogué F., 2003. Identification of *Physcomitrella patens* genes specific of bud and gametophore formation. *Plant Science* 165:1267–1274
- Burgeff H., 1943. Genetische Studien an Marchantia. Einführung einer neuen Pflanzenfamilie in die genetische Wissenschaft. Gustav Fischer, Jena
- Carpenter J.L., Ploense S.E., Snustad D.P., Silflow C.D., 1992. Preferential expression of an alpha-tubulin gene of Arabidopsis in pollen. *The Plant Cell* 4:557–571
- Cassab G., 1998. Plant cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 281–309
- Cheung A.Y., Chen C.Y., Glaven R.H., de Graaf B.H.J., Vidali L., Hepler P.K., Wu H.M., 2002. Rab2 GTPase Regulates Vesicle Trafficking between the Endoplasmic Reticulum and the Golgi Bodies and Is Important to Pollen Tube Growth. *The Plant Cell* 14:945–962
- Chiyoda S., Ishizaki K., Kataoka K., Yamato K.T., Kohchi T., 2008. Direct transformation of the liverwort *Marchantia polymorpha* L. by particle bombardment using immature thalli developing from spores. *Plant Cell Rep* 27:1467–1473
- Chomczyński P. i Sacchi N., 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159
- Cove D.J., 1992. Regulation of development in the moss, *Physcomitrella patens*. In: Russo V.E.A., Brody S., Cove D., Ottolenghi S. (eds) *Development. The molecular genetic approach*. Springer, Berlin: 179-193
- Cove D.J. i Knight C.D., 1993 The moss *Physcomitrella patens*, a model system with potential for the study of plant reproduction. *Plant Cell* 5:1483-1488
- Crandall-Stotler B.J., 1984. Musci, hepatics and anthocerotites-an essay on analogues. *New manual of bryology* 2:1093-1129
- Crandall-Stotler B.J., 1986. Morphogenesis, developmental anatomy and bryophyte phylogenetics; contraindications of monophyly. *J. Bryol.* 14:1-23
- Crandall-Stotler B. i Stotler R., 2000. Morphology and classification of the Marchantiophyta. 21–70. in Shaw, A. J. and B. Goffinet, editors. *Bryophyte Biology*. Cambridge University Press.
- de Graaf B.H., Cheung, A.Y., Andreyeva, T., Lévasseur, K., Kieliszewski, M., Wu, H.M., (2005). Rab11 GTPase-regulated membrane trafficking is crucial for tip-focused pollen tube growth in tobacco. *Plant Cell* 17: 2564–2579
- Dievart A. i Clark S.E., 2004. LRR-containing receptors regulate plant development and defense. *Development* 131:251–261
- Donnison I.S., Siroky J., Vyskot B., Saedler H., Grant S.R., 1996. Isolation of Y Chromosome-Specific Sequences From *Silene latifolia* and Mapping of Male Sex-Determining Genes Using Representational Difference Analysis. *Genetics* 144:1893-1901
- Duckett J.G. i Ligrone R., 1995. The formation of catenate foliar gemmae and the origin of oil bodies in the liverwort *Odotoschisma denudatum* (Mart.) Dum. (Jungermanniales): a light and electron microscope study. *Ann. Bot* 76:405-419
- Duckett J.G., Renzaglia K.S., Pell K., 1990. Desiccation causes the proliferation of multicellular hairs but not mucilage papillae in *Cryptothallus mirabilis*: a correlated light and electron microscope study. *Can. J. Bot.* 68:697-706
- Emanuelsson O., Nielsen H., Brunak S., von Heijne G., 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* 300: 1005-1016. [TargetP]
- Engel P.P., 1968. The induction of biochemical and morphological mutants in the moss *Physcomitrella patens*. *Am J Bot* 55:438-446
- Everts R.E., Versteeg S.A, Renier C., Vignaux F., Groot P.C., Rothuizen J., van Oost B.A., 2000. Isolation of DNA markers informative in purebred dog families by genomic representational difference analysis (gRDA). *Mammalian Genome* 11:741–747

- Ferrandiz C., Gu Q., Martiensson R., Yanofsky M.F., 2000. Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFUL, APETALA1 and CAULIFLOWER. *Development* 127:725–734
- Fiedorow P., Szweykowska-Kulińska Z., 1998. In vitro collection of polish liverwort species of the genus *Pellia* Raddi, 1820 (*Hepaticae, Metzgeriales*). *Biological bulletin of Poznań* 35(1):33-37
- Forsthoefel N.R., Cutler K., Port M.D., Yamamoto T., Vernon D.M., 2005. PIRLS: A Novel Class of Plant Intracellular Leucine-rich Repeat Proteins. *Plant Cell Physiol.* 46(6):913–922
- Frank W., Decker E.L., Reski R., 2005. Molecular tools to study *Physcomitrella patens*. *Plant Biol.*7(3):220-7
- Fujisawa M., Hayashi K., Nishio T., Bando T., Okada S., Yamato K.T., Fukuzawa H., Ohyama K., 2001. Isolation of X and Y chromosome-specific DNA markers from a liverwort, *Marchantia polymorpha*, by representational difference analysis. *Genetics.* 159:981-985
- Fujisawa M., Nakayama S., Nishio T., 2003. Evolution of ribosomal DNA unit on the X chromosome independent of autosomes units in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Chromosome Res.* 11:695-703
- Fulford M., 1960. The young stages of the leafy Hepaticae: a resume. *Phytomorphology* 6:199-235
- Garbary D.J., Renzaglia K.S., Duckett J.G., 1993. The phylogeny of land plants: a cladistic analysis based on male gametogenesis. *Pl. Syst. Evol.* 188:237-269
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A., 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (W) John M. Walker (red): *The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press: 571-607.* [ProtParam]
- Girod P.A., Fu H., Zryd J.P., Vierstra R.D., 1999. Multiubiquitin Chain Binding Subunit MCB1 (RPN10) of the 26S Proteasome Is Essential for Developmental Progression in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 11:1457-1472
- Goldman M.H., Goldberg R.B., Mariani C., 1994. Female sterile tobacco plants are produced by stigma-specific cell ablation. *EMBO J.* 13:2976–2984
- Grasser K.D., 1995. Plant chromosomal high mobility group (HMG) proteins. *The Plant Journal* 7(2):185-192
- Gustavsson S., Lebrun A.S., Norden K., Chaumont F., Johanson U., 2005. A novel plant major intrinsic protein in *Physcomitrella patens* most similar to bacterial glycerol channels. *Plant Physiol* 139:287-295
- Heitz E., 1928. Das Heterochromatin der Moose. *Jahrb Wiss Bot* 69:762-818
- He-Nyngren X., Juslen A., Ahonen I., Glennly D., Piippo S., 2006. Illuminating the evolutionary history of liverworts (Marchantiophyta)-towards a natural classification. *Cladistics* 22:1–31
- <http://expasy.org/tools/protparam.html> [ProtParam]
- <http://genes.mit.edu/GENSCAN.html> [GenScan]
- <http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenesh&group=programs&subgroup=gfind> [FGENESH]
- <http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=protcompan&group=programs&subgroup=proloc> [ProtComp]
- http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan [MotifScan]
- <http://repeatmasker.org> [RepeatMasker]
- <http://smart.embl-heidelberg.de/> [SMART]
- <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> [SignalIP]
- <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/> [TargetP]
- <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/> [TMHMM2.0]
- http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html [BOXSHADE]
- <http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/> [InterProScan]
- <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> [CLUSTALW]
- <http://www.expasy.org/> [Expasy]
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> [BLAST]
- <http://www.softberry.com/berry.phtml> [Softberry]

<http://wolfsort.org/> ; <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html> [PSORT]

- Hohe A. i Reski R. 2002. Optimisation of a bioreactor culture of the moss *Physcomitrella patens* for mass protoplast production. *Plant Science* 163:69-74
- Horstmann V., Huether C. M., Jost W., Reski R., Decker E.L., 2004. Quantitative promoter analysis in *Physcomitrella patens*: a set of plant vectors activating gene expression within three orders of magnitude. *BMC Biotechnology* 4:13
- Hubank M. i Schatz D.G., 1994. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic. Acids. Res.* 22:5640-5648
- Huber H., Beyser K., Fabry S., 1996. Small G proteins of two green algae are localized to exocytic compartments and to flagella. *Plant Molecular Biology* 31:279-293
- Iiyama K., Lam T.B-T., Stone B.A., 1994. Covalent Cross-Links in the Cell Wall. *Plant Physiol.* 104: 315-320
- Imaizumi T., Kadota A., Hasebe M., Wada M., 2002. Cryptochrome light signals control development to suppress auxin sensitivity in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 14:373-386
- Irish E.E., 1996. Regulation of Sex Determination in Maize. *BioEssays* 18:363-369
- Ishizaki K., Chiyoda S., Yamato K.T., Kohchi T., 2008. Agrobacterium-Mediated Transformation of the Haploid Liverwort *Marchantia polymorpha* L., an Emerging Model for Plant Biology. *Plant Cell Physiol.* 49(7): 1084-1091
- Joachimiak A. i Ilnicki T., 2003. Nuclear morphology, polyploidy, and chromatin elimination in tissue culture of *Allium fistulosum* L. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 72(1):11-17
- Jost W., Link S., Horstmann V., Decker E. L., Reski R., Gorr G., 2005. Isolation and characterisation of three moss-derived beta-tubulin promoters suitable for recombinant expression. *Current Genetics* 47:111-120
- Jürgens G. i Geldner N., 2002. Protein Secretion in Plants: from the *trans*-Golgi Network to the Outer Space. *Traffic* 3:605-613
- Kasahara M., Kagawa T., Sato Y., Kiyosue T., Wada, M., 2004. Phototropins mediate blue and red light-induced chloroplast movements in *Physcomitrella patens*. *Plant Physiology* 135:1388-1397
- Kaufmann K., Melzera R., Theißen G., 2005. MIKC-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. *Gene* 347: 183-198
- Kenrick P. i Crane P.R., 1997b. The origin and early evolution of plants on land. *Nature* 389: 33-39
- Khryanin V.N., 2002. Role of Phytohormones in Sex Differentiation in Plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 49(4):545-551
- Kirschner M. i Mitchison T., 1986. Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell* 45:329-342
- Knapp E., Reuss A., Risse O., Schreiber H., 1939. Quantitative Analyse der mutationsauslösenden Wirkung monochromaten UV-Lichtes. *Naturwissenschaften* 27:307
- Kohli A., Twyman R.M., Abranches R., Wegel E., Stoger E., Christou P., 2003. Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Mol. Biol.* 52: 247-258
- Kuroda H., Takahashi N., Shimada H., Motoaki S., Shinozaki K., 2002. Matsui M. Classification and expression analysis of Arabidopsis F-box-containing protein genes. *Plant Cell Physiol.* 43:1073-1085
- Kulerich B., Stemmer Ch., Merkle T., Launholt D., Gorr G., Grasser K. D., 2008. Chromosomal high mobility group (HMG) proteins of the HMGB-type occurring in the moss *Physcomitrella patens*. *Gene* 407:86-97
- Kuta E. i Przywara L., 1985. Badania cytologiczne nad mszakami. II. *Wiadomości Botaniczne.* 29(3): 189-200
- Lammens W., Roy K.L., Schroeven L., Van Laere A., Rabijns A., Van den Ende W., 2009. Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications. *Jour. of Exp. Bot.* 60(3):727-740
- Ligrone R., Duckett J.G., Renzaglia K.S., 1993. The gametophyte-sporophyte junction in land plants. *Adv. Bot. Res.* 19:231-317
- Ligrone R., Carafa A., Lumini E., Bianciotto V., Bonfante P., Duckett J.G., 2007. Glomeromycotean associations in liverworts: a molecular, cellular, and taxonomic analysis. *Am. Jour. of Bot.* 94(11):1756-1777

- Lisitsyn N., Wigler M., 1993. Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 259:946-951
- Ludwig S.R., Oppenheim D.G., Silflow C.D. and Snustad D.P., 1988. The α -tubulin gene of *Arabidopsis thaliana*. Primary structure and preferential expression in flowers. *Pl.Mol. Biol.* 10:311-21
- Małuszyńska J., 1994. Chromosom B – pasożyt czy funkcjonalny składnik genomu? *Postępy Biologii Komórki*. 21: 15-26
- McCourt R.M., 1995. Green algal phylogeny. *Trends Evol. Ecol.* 10:159-163
- Mishler B.D., Lewis L.A. Buchheim M.A., Renzaglia K.S., Garbary D.J., Delwiche C.F., Zechman F.W., Kantz T.S., Chapman R.L., 1994. Phylogenetic relationships of the green algae and bryophytes. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 81:451–483
- Morris E.R. i Walker J.C., 2003. Receptor-like protein kinases: the keys to response. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:339–342
- Nakai K. i Kanehisa M., 1991. Expert system for predicting protein localization sites in gram-negative bacteria. *Proteins*. 11(2): 95-110. [PSORT]
- Nakayama S., Fujishita M., Sone T., Ohshima K., 2001. Additional locus of rDNA sequence specific to the X chromosome of the liverwort, *Marchantia polymorpha*. *Chromosome Res.* 9: 469-473
- Navin A., Prekeris R., Lisitsyn N.A., Sonti M.M., Grieco D.A., Narayanswami S., Lander E.S., Simpson E.M., 1996. Mouse Y-Specific Repeats Isolated by Whole Chromosome Representational Difference Analysis. *Genomics* 36:349–353
- Newton M.E., 1979. Chromosome morphology and bryophyte systematics, W: Clarke GCS, Duckett J.G. (red.) *Bryophyte Systematics*. System Assoc Spec Academic Press, London. 14: 207-229
- Newton M.E. 1981. Evolution and speciation in *Pellia*, with special reference to the *Pellia megaspora-endiviifolia* complex (Metzgeriales), II. Cytology *J.Bryol* 11:433-440
- Nickrent D.L., Parkinson C.L., Palmer J.D., DUFF R.J., 2000. Multigene phylogeny of land plants with special reference to bryophytes and the earliest land plants. *Mol. Biol. and Evol.* 17:1885–1895
- Niklas K.J., 1997. *The Evolutionary Biology of Plants*. The University of Chicago Press
- Nishiyama T., Fujita T., Shin T., Seki M., Nishide H., Uchiyama I., Kamiya A., Carninci P., Hayashizaki Y., Shinozaki K., Kohara Y., Hasebe M., 2003. Comparative genomics of *Physcomitrella patens* gametophytic transcriptome and *Arabidopsis thaliana*: implication for land plant evolution. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 100: 8007–8012
- Nishiyama T. i Kato M., 1999. Molecular phylogenetic analysis among bryophytes and tracheophytes based on combined data of plastid coded genes and the 18S rRNA gene. *Mol. Biol. and Evol.* 16:1027–1036
- Oehlkers F. i Bopp M. 1957. Entwicklungsphysiologische Untersuchungen an Moosmutanten: II. Die Korrelation zwischen Sporogon und Kalyptra bei Mutanten von *Funaria* and *Physcomitrium*. *Z Vererbungslehre* 88: 608-618
- Okada S., Fujisawa M., Sone T., 2000. Construction of male and female PAC genomic libraries suitable for identification of Y-chromosome-specific clones from the liverwort, *Marchantia polymorpha*. *Plant J.* 24:421-428
- Orlikowska T. i Zawadzka M., 2006. Bakterie w kulturach tkanek roślinnych *in vitro*. *Biotechnologia* 4(75):64–77
- Orton T.J., 1985. Genetic instability during embryogenic cloning of celery. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 4: 159-169
- Qiu Y.L., Cho Y., Cox J.C, Palmer J.D., 1998. The gain of three mitochondrial introns identifies liverworts as the earliest land plants. *Nature* 394:671–674
- Qiu Y.L., Li L., Wang B., Chen Z., Knoop V., Groth-Malonek M., Dombrowska O., Lee J., Kent L., Rest J., Estabrook G.F., Hendry T.A., Taylor D.W., Testa C.M., Ambros M., Crandall-Stotler B., Duff R.J., Stech M., Frey W., Quandt D., Davis C.C., 2006. The deepest divergences in land plants inferred from phylogenomic evidence. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 103:15511-15516
- Quodt V., Faigl W., Saedler H., Munster T., 2007. The MADS-domain protein PPM2 preferentially occurs in gametangia and sporophytes of the moss *Physcomitrella patens*. *Gene* 400:25–34

- Pagni M., Ioannidis V., Cerutti L., Zahn-Zabal M., Jongeneel C.V., Falquet L., 2004. MyHits: a new interactive resource for protein annotation and domain identification. *Nucleic Acids Res.* 32(Web Server issue):W332-335. [MotifScan]
- Panaud O., Vitte C., Hivert J., Muzlak S., Talag J., Brar D., Sarr A., 2002. Characterization of transposable elements in the genome of rice (*Oryza sativa* L.) using Representational Difference Analysis (RDA). *Molecular Genetics and Genomics* 268(1):113-121
- Pant B.D., Musialak-Lange M., Nuc P., May P., Buhtz A., Kehr J., Walther D., Scheible W.R., 2009. Identification of Nutrient-Responsive Arabidopsis and Rapeseed MicroRNAs by Comprehensive Real-Time Polymerase Chain Reaction Profiling and Small RNA Sequencing. *Plant Physiology* 150:1541-1555
- Paton J.A., (1999). The liverwort flora of the British Isles. Harley Books: 525-530
- Ratajczak L., Wojtaszek P., Woźny A., 2007. Biologia komórki roślinnej. T.2. Funkcja.
- Read D.J., Duckett J.G., Francis R., Ligrone R., Russell A., 2000. Symbiotic fungal associations in ‘lower’ land plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society London, B* 355:815-831
- Rensing S.A., Rombauts S., Hohe A., Lang, D., Duwenig E., Rouzé P., Van de Peer Y., Reski R., 2002a. The transcriptome of the moss *Physcomitrella patens*: comparative analysis reveals a rich source of new genes. (http://www.plant-biotech.net/Rensing_et_al_transcriptome2002.pdf)
- Rensing S.A., Rombauts S., Van de Peer Y., Reski R., 2002b. Moss transcriptome and beyond. *Trends Plant Sci*, 7:535-538
- Renzaglia K.S. i Bartholomew S.E., 1985. Sporeling development in *Fossombronia cristula* Aust. with special reference to apical organization and growth. *Bryologist* 88:337-343
- Rensing S.A., Fritzowsky D., Lang D., Reski R., 2005. Protein encoding genes in an ancient plant: analysis of codon usage, retained genes and splice sites in a moss, *Physcomitrella patens*. *BMC Genomics* 6:43-56
- Renzaglia K.S. i Duckett J.G., 1987. Spermatogenesis of *Blasia pusilla*, from antheridial initial through mature spermatozoid. *Bryologist* 90:468-501
- Renzaglia K.S. i Duckett J.G., 1991. Towards an understanding of the difference between the blepharoplasts of mosses and liverworts, and comparisons with hornworts, biflagellate lycopods and charophytes: a numerical analysis. *New Phytol.* 117:187-208
- Renzaglia K.S., Maden A.R., Duckett J.G., Whittier D.P., 1994. Monoplastidy in spermatogenesis of *Lycopodium obscurum*. *Can. J. Bot.* 72:1436-1444
- Renzaglia K.S., Duff R.J., Nickrent D.L., Garbary D.J., 2000. Vegetative and reproductive innovations of early land plants: implications for a unified phylogeny. *Phil.Trans. R. Soc. Lond. B* 355:769-793
- Reski R., 1999. Molecular genetics of *Physcomitrella*, *Planta* 208:301-309
- Salamov A. i Solovyev V., 2000. Ab initio gene finding in *Drosophila* genomic DNA. *Genome Res.* 10: 516-522. [FGENESH].
- Salzberg S.L., White O., Peterson J., Eisen J.A., 2001. Microbial genes in the humangenome: lateral transfer or gene loss? *Science* 292:1903-1906
- Samigullin T. K., Yacentyuk S.P., Degtyaryeva G.V., Valiehoroman K.M., BOBROVA V.K, CAPESIUS I., Martin W.F., Troitsky A.V., Filin V.R., Antonov A. S., 2002. Paraphyly of bryophytes and close relationship of hornworts and vascular plants inferred from analysis of chloroplast rDNA ITS (cpITS) spacer sequences. *Arctoa* 11:31-43
- Sawahel W., Onde S., Knight C.D., Cove D.J., 1992. Transfer of foreign DNA into *Physcomitrella patens* protonemal tissue using the gene gun. *Plant Mol Biol Rep* 10:314-315
- Schaefer D., Zryd J.P., Knight C.D., Cove D.J., 1991. Stable transformation of the moss, *Physcomitrella patens*. *Mol Gen Genet* 226:418-424
- Schultz J., Milpetz F., Bork F., Ponting C.P., 1998. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (95):5857-5864
- Schuster R.M., 1953. Boreal hepatics, a manual of liverworts of Minnesota and adjacent regions. *Am. Midl. Nat.* 49:257-684.

- Schuster R.M., 1966. The Hepaticae and Anthocerotae of North America, east of the hundredth meridian, vol. 1. New York: Columbia University Press.
- Schuster R.M., (1992). The Hepaticae and Anthocerotae of North America. Vol V. Field Museum of Natural History, Chicago.
- Shaw J. i Renzaglia K.S., 2004. Phylogeny and diversification of Bryophytes. *Am. Jour. of Bot.* 91(10):1557–1581
- Singer S.D., Krogan N.T., Ashton N.W., Clues about the ancestral roles of plant MADS-box genes from a functional analysis of moss homologues. 2007, *Plant Cell Rep* 26:1155–1169
- Singrun CH., Hsam S.L., Zeller F.J., Wenzel G., Mohler V., 2004. Localization of a novel recessive powdery mildew resistance gene from common wheat line RD30 in the terminal region of chromosome 7AL. *Theor. Appl. Genet.* 109:210–214
- Sone T., Fujisawa M., Takenaka S., Nagasawa S., Yamaoka S., 1999. Bryophyte 5S rDNA was inserted into 45S rDNA repeat units after the divergence from higher land plants. *Plant Mol. Biol.* 41:679–685
- Stech M., Frahm J.P., Hilger H.H., Frey W., 2000. Molecular relationship of Treubia Goebel (Treubiaceae, Treubiopsida) and high taxonomic level classification of the Hepaticophytina. Studies in austral temperate rain forest bryophytes 6. *Nova Hedwigia* 71:195–208
- Stech M. i Frey W., 2001. CpDNA-relationship and classification of the liverworts (Hepaticophytina, Bryophyta). *NovaHedwigia* 72:45–58
- Stech M. i Frey W., 2004. Molecular circumscription and relationships of selected Gondwanan species of Haplomitrium (Calobryales, Haplomitriopsida, Hepaticophytina). Studies in austral temperate rain forest bryophytes. *Nova Hedwigia* 78:57–70
- Stewart W.N. i Rothwell G.W. 1993. Paleobotany and the evolution of plants. Cambridge University Press.
- Stratford S., Barnes W., Hohorst D.L., Sagert J.G., Cotter R., Golubiewski A., Showalter A.M, McCormick S., Bedinger P., 2001. A leucine-rich repeat region is conserved in pollen extensin-like (Pex) proteins in monocots and dicots. *Plant Molecular Biology* 46:43–56
- Strepp R., Scholz S., Kruse S., Speth V., Reski R., 1998. Plant nuclear gene knockout reveals a role in plastid division for the homolog of the bacterial cell division protein FtsZ, an ancestral tubulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:4368–4373
- Szumilanski A.L. i Nielsen E., 2009. The Rab GTPase RabA4d Regulates Pollen Tube Tip Growth in Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell* 21:526–544
- Takenaka M., Yamaoka S., Hanajiri T., Shimizu-Ueda Y., Yamato K.T., Fukuzawa H., Ohyama K., 2000. Direct transformation and plant regeneration of the haploid liverwort Marchantia polymorpha L. *Transgenic Res* 9:179–185
- Touzet P., Hueber N., Burkholz A., Barnes S., Cuguen J., 2004. Genetic analysis of male fertility restoration in wild cytoplasmic male sterility G of beet. *Theor. Appl. Genet.* 109:240–247.
- Toyota M., Canzian F., Ushijima T., Hosoya Y., Kuramoto T., Serikawa T., Imai K., Sugimura T., Nagao M., 1996. A rat genetic map constructed by representational difference analysis markers with suitability for large-scale typing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:3914–3919
- Tyrka M., Stefanowska G., Brzeziński W., 2001. Transfer genów z *Aegilops ventricosa* do *Triticum aestivum*. *Biotechnologia* 2(53): 57–62
- Vanderpoorten A. i Goffinet B., 2009. Introduction to Bryophytes. Cambridge University Press
- Vaughn K.C., Sherman T.D., Renzaglia K.S., 1993. A centrin homologue is a component of the multilayered structure in bryophytes and pteridophytes. *Protoplasma* 175:58–66
- Vaughn K.C. i Harper J.D., 1998. Microtubule organizing centers and nucleating sites in land plants. *Int. Rev. Cytol.* 181:75–149
- Vaughn K.C. i Renzaglia K.S., 1998. Origin of bicentrioles in anthocerote spermatogenous cells. In *Bryology for the twenty-first century* (ed. J.W. Bates, N.W. Ashton & J.G. Duckett): 189–203. Leeds: The British Bryological Society and Maney Publishing

- Vernon D.M. i Forsthoefel N.R., 2002. Leucine-rich repeat proteins in plants: diverse roles in signaling and development. *Recent Res. Dev. Plant Biol.* 2:201–214
- Wallner B., Piumi F., Brem G., Muller M., Achmann R., 2004. Isolation of Y Chromosome-specific Microsatellites in the Horse and Cross-species Amplification in the Genus *Equus*. *Journal of Heredity* 95(2):158–164
- Wellmann C.H., Osterloff P.L., Mohluddin U., 2003. Fragments of the earliest land plants. *Nature* 425:282–284
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18(22): 6531-6535
- Xia G., Li Z., Wang S., Xiang F., Liu J., Chen P., Liu D., 1998. Asymmetric somatic hybridization between haploid common wheat and UV-irradiated *Haynaldia villosa*. *Plant Sci.* 137:217-223
- Yamato K.T., Ishizaki K., Fujisawa M., Okada S., Nakayama S., Fujishita M., Bando H., Yodoya K., Hayashi K., Bando T., Hasumi A., Nishio T., Sakata R., Yamamoto M., Yamaki A., Kajikawa M., Yamano T., Nishide T., Choi S.H., Shimizu-Ueda Y., Hanajiri T., Sakaida M., Kono K., Takenaka M., Yamaoka S., Kuriyama C., Kohzu Y., Nishida H., Brennicke A., Shin T., Kohara Y., Kohchi T., Fukuzawa H., Ohyama K., 2007. Gene organization of the liverwort Y chromosome reveals distinct sex chromosome evolution in a haploid system. *PNAS* 104(15):6472–6477
- Yin T.J. i Quinn J.A., 1995. Tests of a Mechanistic Model of One Hormone Regulating Both Sexes in *Cucumis Sativus* (Cucurbitaceae). *Am. J. Bot.* 82:1537–1546
- Yu J.L., Li Y.Z., Li L.L., Lin J.X., Zheng C., Zhang L.Y., 2009. Overexpression of PwTUA1, a pollen-specific tubulin gene, increases pollen tube elongation by altering the distribution of α -tubulin and promoting vesicle transport. *Journal of Experimental Botany* 60(9):2737–2749
- Zhang J., Li Y., Shi G., Chen X., Wang J., Hou X., 2009. Characterization of α -tubulin gene distinctively presented in a cytoplasmic male sterile and its maintainer line of non-heading Chinese cabbage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89(2):274–280

WYKAZ SKRÓTÓW

A	adenina lub alanina
aa	reszty aminokwasowe
APH	gen kodujący fosfotransferazę amino glikozydów
BIP	gen zaangażowany w wytwarzanie pączków gametofor u <i>Physcomitrella patens</i> (ang. Bud Induced in <i>Physcomitrella</i>)
Blast	ang. Basic Local Alignment Search Tool
C	cytozyna lub cysteina
CaMV	wirus mozaiki kalafiora
CDD	baza domen konserwatywnych (ang. Conserved Domain Database)
cDNA	komplementarny DNA (ang. complementary DNA)
CDS	sekwencja kodująca (ang. coding sequence)
CoA	koenzym A
D	kwas asparaginowy
dNTP	deoksyrybonukleotydy
dC	deoksycytidyna
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy
dNTP	deoksyrybonukleotyd
DEPC	pirowęglan dietylu
DP	produkty różnicowe (ang. Difference Products)
ds-cDNA	dwuniciowy cDNA (ang. double-stranded cDNA)
DTT	ditiotreitol
E	egzon lub kwas glutaminowy
EDTA	etylenodiaminotetraoctan
EPSPS	kwas 4-(2-Hydroksyetylo)-1-piperazynopropanosulfonowy
EST	sekwencyjny znacznik ekspresji (ang. Expressed Sequence Tag)
FISH	hybrydyzacja fluorescencyjna <i>in situ</i> (ang. Fluorescent <i>In situ</i> Hybridization)
FtZ1	eukariotyczny homolog bakteryjnego białka kodującego pierwotną tubulinę, odpowiedzialny za podział chloroplastów (ang. Filamenting Temperature-Sensitive mutant Z)
G	guanina lub glicyna
gDNA	DNA genomowy
GDP	guanozyno-5'-difosforan
GFP	białko zielonej fluorescencji (ang. Green Fluorescence Protein)
GlpF-like	wewnątrzkomórkowe białko roślinne o homologii do bakteryjnego transportera glicerolu typ II
GTP	guanozyno-5'-trifosforan
GUS	β -glukuronidaza
HMGbox	domena białkowa, grupa białek o wysokiej ruchliwości (ang. High Mobility Group box)
HPH	gen kodujący fosfotransferazę hygromycyny
I	intron lub izoleucyna
IGS	sekwencje międzygenowe (ang. InterGenic Spacers)
IPTG	izopropyl- β -D-tiogalaktopiranozyd
ITS	ang. Internal Transcribed Spacers
K	lizyna
kDa	kilodalton
kpz	kilo par zasad
L	leucyna
lacZ	gen β -galaktozydazy
LB	pożywka do hodowli bakterii wg Luria-Bertani
LRR	białko bogate w powtórzenia leucynowe (ang. leucine rich repeat protein) lub powtórzenia bogate w leucynę
MADSbox	gen kodujący białko z domeną MADS
MCBI	gen kodujący białko 26S proteasomu (ang. multi-ubiquitin chain binding 1)

WYKAZ SKRÓTÓW

MPa	megapaskal
Mpz	mega par zasad
MTOC	centrum organizacji mikrotubul (ang. Microtubule-Organizing Centres)
mRNA	informacyjny RNA (ang. messenger RNA)
N	asparagina
NCBI	ang. National Center for Biotechnology Information
NMD	rozkład zależny od kodonu nonsensownego (ang. Nonsense Mediated Decay)
<i>NPTII</i>	gen kodujący kodujący fosfotransferazę neomycyny
nt	nukleotyd
ORF	otwarta ramka odczytu (ang. Open Reading Frame)
P	prolina
PAC	biblioteka genomowa na bazie faga P1 (ang. P1-derived artificial chromosome vectors)
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. Polymerase Chain Reaction)
<i>PcEMB7</i>	gen kodujący białko związanego z somatyczną embriogenezą u <i>Picea glauca</i>
Pdf1	białko specyficzne merystemu wierzchołkowego pędu <i>A.thaliana</i> (ang. protodermal factor 1)
Pex	białko pyłku podobne do ekstensyn (ang. pollen extensin-like protein)
pI	punkt izoelektryczny
<i>PPM</i>	gen kodujący białko z domeną MADS u <i>Physcomitrella patens</i> (<i>Physcomitrella patens</i> MADS-box gene)
Prp	białka bogate w reszty proliny
pz	para zasad
Q	glutamina
R	arginina
Rab	białko z rodziny Rab, spokrewnione z białkami Ras (ang. Ras-related in brain)
RACE	szybka amplifikacja końców cDNA (ang. Rapid Amplification of cDNA Ends)
<i>rbcL</i>	gen kodujący karboksylazę rybulozo-bifosforanu (ang. ribulose biphosphate carboxylase)
RDA	różnicowa hybrydyzacja genomowa (ang. Representational Difference Analysis)
RDA-cDNA	różnicowa hybrydyzacja cDNA (ang. Representational Difference Analysis of cDNA)
rDNA	rybosomowy DNA
Rlk	białko z rodziny kinaz podobnych do receptorów LRR (ang. LRR-receptor-like kinases)
Rlp	białko podobne do receptorów (ang. receptor-like protein)
RNA	kwas rybonukleinowy
RNaza	rybonukleaza
rps4	gen chloroplastowy kodujący białko rybosomowe S4 (ang. ribosomal protein S4)
rRNA	rybosomowy RNA
RT-PCR	ang. reverse transcription and PCR amplification
S	seryna
SDS	dodecylosiarczan sodowy
SMART	ang. Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript
<i>STIG1</i>	gen ulegający specyficznej ekspresji w strefie sekrecyjnej znamienia
T	tymina lub treonina
<i>Taq</i>	polimeraza DNA z <i>Thermus aquaticus</i>
Tm	temperatura topnienia
Tris	trihydroksymetyloaminometan
tRNA	transportujący RNA
trnF	gen chloroplastowy kodujący tRNA fenyloalaniny (ang. phenylalanine tRNA _(GAA))
trnL	gen chloroplastowy kodujący tRNA leucyny (ang. the leucine tRNA _(UAA))
TS	gen kodujący tajemniczą sekwencję <i>Pellia endiviifolia</i> sp B
TUA	α -tubulina
U	jednostka enzymatyczna lub uracyl w sekwencji nukleotydowej
U2	intron typu U2
UTR	region mRNA nie podlegający translacji (ang. UnTranslated Region)
V	walina
W	tryptofan

WYKAZ SKRÓTÓW

X	dowolny aminokwas
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolilo- β -D-tiogalaktozyd
YR	region chromosomu Y (ang. Y chromosome Region)
ZmRCP	gen kodujący białko czapeczki korzeni

ANEKS

LOCUS tua 4541 bp DNA linear
 DEFINITION *Pellia endiviifolia* species B, alpha-tubulin gene, genomic sequence
 ACCESSION HQ634384

```

1 atccagagtc tttgtttgca aagggcactc gtgagcgtcc tcgacacgct cgcttttggtg
61 cactctttac gctccggttc tctccagctt gtttgaacga cagacgctcc cgattcacaa
121 gtaaatccat tagatctctt cctattacag aggaactggt gactactttt ggatctagag
181 aagccgcctg tgacttgatg agggagaagt taggttgctg agaccccgag ggaagatgag
241 agaaatcata agcattcata ttggacaggc cggcattcaa gttggtaacg catgctggga
301 gctttactgt ttggagcatg ggattcagcc cgatggctgc atgtcctcgt gcgtttcttc
361 ttgtgctttc attgcttctc cttaatgtgt gcagtaggaa gagctcgatg gtggcaagct
421 caggatatga aatggatttt atggttcggg atggaattgt cacatggctg agttttttct
481 tcactgtgaa ctgaggccta tctgaatgat tgttaagcac gttggctctg tggagtgttt
541 ccattgtatt ttagttgact taatgtgcta gtggagtgtg tttacgcacc ttctaactct
601 caagtatcta ctctagtgta tttcatgagg caataaagta ctggcaatgt cctgcagaga
661 cacgagtggt gtagtggag acgatgcgtt caatacattt ttcagtgaaa caggtgctgg
721 aaagcacggt cccagagccg tttcgttga tttggagcct acggtcattg atgaagtctg
781 aaccggcacc taccgtcaac tgtttcacc tgaacagcta atatctggaa aggaagatgc
841 tgccaacaac tttgcccgcg ggcattacac tggtagtagt aggttctgtc atatcctccg
901 acaagggaga gaggggcttg tgcattgctc ctggtacaag cagccggctc atgaactcca
961 tttcattcac agttgcgagg caatatttag ttgcgtgggt tctgcacgac gaactattat
1021 ttctgtgaat cataccggtt gagatcccag tgtgttgctt gtcattcattg gaatttggag
1081 ctttttgaag tttaaaaacc actcgcgaca tttgttgctc ttccggagctt tccctaaggg
1141 gatttgcttg gagcattgga gtactttaag ttcgtcgcta ggaaccttgg gaatgattat
1201 tttccgaggg agcgaaggaa ataaagcttc gagatgttat tctgtggtct tgtgaatggg
1261 aattttcgtt gcatgtgatg tgacatttga gaacagggcg ttttttagtcc cttattcggc
1321 atctttaaaa aatctgacgc agcttgaatg ataccgttcc aaatacatag gagatattat
1381 aatttttagg tgaagagaaa tatatggcgt agttagcatt tgcgtaacct gaagtctgtg
1441 gattggcctaa ggttgttagt tctgttgggt gcagtgggca aggagattgt tgcactctgt
1501 ctgcacgctg tgaggaaact tgcggataac tgcaccgggt tgcaaggatt ccttgtcttc
1561 aatgctggtg gtggtgggtac aggcctcagc ctgggtcctt tactactcga gcgactctct
1621 gttgactacg gaaagaagtc aaagcttggg ttactatat atccttctcc gcaggtgagt
1681 tttttcttat cccagacgat atctatttt cagatcattg attacttaca tctgggacta
1741 cccttgggtg atgctcagct tctgactgat taatcaacac catttgctta tgaacagat
1801 gtacaagggg gcattgtttt gctgaaacat cactccaagt aactataaat atcattgggg
1861 ttgcataatc tgacatgggg ataggtgatg aatgttcatt tctaataatag cattgtttgg
1921 tttcgtgatg tttgataata cttgtgcata ggacaatcgt atgtactacc ctcaagaatt
1981 ataactttcc tcaagaagtc tatttttgag ttttttggtg agagttccag tttgaaatgg
2041 ggtcgtatgt attgttgctc aggtatcaac agctgtagtc gagccatata acagtgctgt
2101 ttcaacgcac tcaacttttag agcactatga tgttgctgtg ctggtggata atgaggctat
2161 atacgacatc tgcaggecgt cactggacat tgaacgaccg acttacacaa accctaaccc
2221 tcttattttc caaatcattt catccttgac cacgtccttg cgttttgatg gcgctttgaa
2281 tgttgatata actgagttcc agaccaactt ggtaccctat cctcggattc atttcatgct
2341 ttcttcatat gctcctgtga tttctgcaga gaaagcctat cagcagcagt tatccgtgcc
2401 tgaaattact aatgcagttt ttgagccctc aagcatgatg gccaaagtgt atcctcggca
2461 tggaaagtat atggcttgtt gctctgatga ccgaggtgat gtggttccca aggacgttaa
2521 tgctgcagtg gccacaatta aaacgaaacg cactgttcag tttgttgact ggtacagatc
2581 tacctctttt gttctcaaac accactcaca actgtattta ttttttataa tattcaaac
2641 tttttttggt tataactcct ttggttttaa gtttgagttt gcttgaattt tcttgaaaat
2701 ttggtacaga ttttttttac cctgactttg tgggttctag tcttttctac tgttctctc
2761 tcttttacag ctatttgcac gtgaaattgt ccaactcaat tcttaactag acaaggactt
2821 agttttctgt cataccctct gtgacctatt ttccagctcc cttcccttct aacaacaagg
2881 tccctcacac acccctttat ctctocactg atgcattggt tggaaattct agtgcactc
2941 tccctctaat cattgagagc agttacctca tattctccat tttcattttg gatgggtccaa
3001 ttccctgatg agctgtccta cattttctgt tgtgtgatca ccaatatcac ttttccatca
3061 gagatttata ttgagagatt tatattagct gaagatcaat ttcacagcat gctatttctc
3121 tcacacaggg aaaccaaatg gtcctcttga tgcattatga gccttattgg ttgtagcttg
3181 acctagacag tatgggtcgc tataatatagg aaagcaacag gtagagtagt ttgaagaaat
3241 tagccagtca gctgcttacc ctactcctga ccttcaaac tttgcaacaa tccacaacag
3301 tttttggagt ggtaagttcc atcttttctt ccatagatgg caaggttga attcatttct
3361 gtctgggtata tttcacttgg ataattttta agaattaaac aagcagaaca gtaactacct
3421 ttgaaacact ccggatcctc tcaagtgtgt gaacagttt aggcacattg ttgtgtcttc
3481 cattcttatg atattacaat caagccttag gaacttctta gtattagtca tgaatttagt
3541 atttctctt caccggagaca agtttcagac ctaactatct tgacttctgt tctgcaggtg
3601 tccctactgg tccaagtgtg tccaacttca tcaagcacc cactggttac cagggggtga
3661 tctggctaag gtacaaaggg cagtgtgcat gatcagtaac aacacagcag ttgcagaggt
3721 gttctcactg attgatcaca agtttgatct catgtatgct aagcgtgctt ttgtgactg
3781 gtatgtggga gaaggtatgg aagaggggtg atctctcaga gcccggaag acctgtctg
3841 actggagaag gattatgaag aagtgggtgc agagttaggt gatgggtgat gtgagaaga
3901 atattgacaa cttttatggt ttacttggat aatagacatt gacagttgaa cctctaggtc
3961 atgtgacagc attgtaccat gcaccagtct gttgcatgct accagatctg tggaggatgg
4021 gtacttttct cctatcatgg gtgatcccca aattgcttgg aagaacttcc tttcatggct
4081 gtttataatg agtgatttgt gttctggttc tgctgattt atgttctggt ggggacctgc
4141 atcagaagtt tgaagtctct tacaacgggg gaaatttga agagatgcat tcccggttgt
4201 ctgctcatgct tctttaacct attgagaagt ctcttcttg cattttccac actagttgag

```

4261 gaagtcaggt tagggtgggg tgcttacata cattttgta atatgttcat tgatcgattt
 4321 tagtggggct ttctgatttc ttttactaaa tcagaactct agtaattggt ggttctttat
 4381 ccactgtgac gagtcagata ctccggcattg cccagttcaa agggattgta tggatggggt
 4441 tcaaaacact tggcataaatt gcttaaaatt gtggatcca atagaaaaga atgggctttc
 4501 taagctataa atggagcact atgcacctc aatttccatg t

//

LOCUS alpha-tubulin 2216 bp mRNA linear
DEFINITION Pellia endiviifolia species B, alpha-tubulin mRNA, complete cds
ACCESSION HQ634388

1 atccagagtc tttgtttgca aagggcactc gtgagcgtcc tcgacacgct cgctttgggtg
 61 cactctttac gctccggttc tctccagctt gtttgaacga cagacgctcc cgattcacia
 121 gtaaatccat tagatctctt cctattacag aggaactgtt gactactttt ggatctagag
 181 aagccgcctg tgactttgta agggagaagt taggttgctg agaccccgag ggaagatgag
 241 agaaatcata agcattcata ttggacagge cggcattcaa gttggtaacg catgctggga
 301 gctttactgt ttggagcatg ggattcagcc cgatggctgc atgtcctcag acacgagtgt
 361 ggtagtggga gacgatgctg tcaatacatt tttcagtga acaggtgctg gaaagcacgt
 421 tcccagagcc gttttcgttg atttggagcc tacggtcatt gatgaagttc gaaccggcac
 481 ctaccgtcaa ctgtttcacc ctgaacagct aatatctgga aaggaagatg ctgccaaaca
 541 ctttgcccgc gggcattaca ctgtgggcaa ggagattggt gatcctctgc tcgaccgtgt
 601 gaggaaactt gccgataact gcacggggtt gcaaggattc cttgtcttca atgctgttgg
 661 ttggtggtaga ggctcaggcc ttgggtcctt actactcgag cgactctctg ttgactacgg
 721 aaagaagtca aagcttggat ttactatata tccttctccg caggtatcaa cagctgtagt
 781 cgagccatag aacagtgtgc tttcaacgca ttcactttta gacatactg atgttctgtg
 841 gctgttggat aatgaggcta tatacgacat ctgcaggcgt tcattggaca ttgaacgacc
 901 gacttacaca aaccttaacc gtcttatttc tcaaatcatt tcatccttga ccacgtcctt
 961 gcgttttga ggcgcttga atgttgatg actgagttc cagaccaact tggtaacccta
 1021 tcctcggatt catttcatgc tttcttcata tgctcctgtg atttctgcag agaaagccta
 1081 tcacgagcag ttatccgtgc ctgaaattac taatgcagtt tttgagccct caagcatgat
 1141 ggccaagtgt gatcctcggc atggaaagta tatggcttgt tgtctgatgt accgaggtga
 1201 tgtggttccc aaggacgtta atgctgcagt ggccacaatt aaaacgaac gcactgttca
 1261 gtttggtagc ttgtgtccta ctggcttcaa gtgtggcacc aattatcagc caccactgt
 1321 tgtaccaggg ggtgatctgg ctaaggtaga aagggcagtg tgcattgatca gtaacaacac
 1381 agcagttgca gagggttct cacgtattga tcacaagttt gatctcatgt atgctaagcg
 1441 tgcttttgtg cactgggatg tgggagaagg tatggaagag ggtgaattct cagaagcccg
 1501 ggaagacctt gctgcactgg agaagatta tgaagaagtt ggtgcagagt caggtgatgg
 1561 tgatggtgat gaagaatatt gacaactttt atggtttact tggataatag acattgacag
 1621 ttgaacctct aggtcatgtg acagcattgt accatgcacc agtctgttgc atgtcaccag
 1681 atctgtggag gatgggtact tttccctat catgggtgat ccccaaattg cttggaagaa
 1741 ctctccttca tggctgttta taatgagtga ttgtgttctt ggttctgctt gatttatggt
 1801 ctgggtggggc cctgcacag aagtttgaag tctcttaca acggggaaat ttgtaagaga
 1861 tgcattccta gttgtctgtc atgtctctt aaacctatga gaagtctctt ctttgcattt
 1921 tccacactag ttgaggaagt caggttaggg tggggtgctt acatacattt tggtaatatg
 1981 ttcattgatc gattttagtg ggcctttctg atttcttcta ctaaatcaga actctagtaa
 2041 ttgttgggtc tttatccact gtgacgagtc agatactcgg cattgcccag tcaaaagga
 2101 ttgtatggat gggtttcaa acacttggca taattgctta aaattgtggt atccaataga
 2161 aaagaatggg ctttctaagc tataaatgga gcactatgca tcctcaattt ccatgt

//

/product="alpha-tubulin" 448aa
 /translation="MREIISIHIGQAGIQVGNACWELYCYLEHGIQPDGRMSDTSVVV
 GDDAFNTFFSETGAGKHVPRAVFDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPQLISGKEDAANN
 FARGHYTVGKEIVDLCLDRVRKLDNCTGLQGFLVFNNAVGGTGSGLGSLLLERLSVD
 YGKSKLGFITYSPQVSTAVVEPYNSVLSHSLLEHTDVAVLLDNEAIYDICRRSLD
 IERPTYTNLNRLLSQIISLTTSLRFDGALNVDITFQTNLVPYPRIHFMMLSSYAPVI
 SAEKAYHEQLSVPEITNAVFEPSMMAKCDPRHGKYMACLMYRGDVPKDVNAAVAT
 IKTKRVTQVFDWCPTGFKCGINYPPTVPPGGDLAKVQRAVCMISNNTAVAEVFSRID
 HKFDLMYAKRAVHWYVGEEMEGEFSEAREDLAALKDYEEVGAESGDGDGDEEY"



LOCUS rab 2485 bp DNA linear
DEFINITION Pellia endiviifolia species B Rab protein encoding gene, genomic sequence
ACCESSION HQ634385

1 ggattcgtcg aataggcagc acaaaacatg tgtggagagc ttcggatgag gcaagtgttt
 61 aggttatggc cttgtcccat cgttggaaata tattaaacga ttgtgctcct ttgggaaact
 121 ctctaacctc cgcagagcac acatttgact gattgttato aaatcatgct tggttacgac
 181 ttctagtcca ttcatacagc gaaacacgag gactaacagt tctgtgaaga acatcaaat
 241 cgcaaggaaa cgggcaggtt taagaagcga aaatggctta cagatcggat gatgattacg
 301 actatattat caaggtgggt ctgatcggcg attctgggtg ttgtaaatct aaccttctct
 361 caaggtttac tcggaacgag ttcagtctgg agtcgaagtc cacaatcggg gtcgagtttg
 421 caacacgcag catcaatgct gatagcaaac tcataaaggc tcagatatgg gatacagcag
 481 gccaaagaag gtgtgcagat cgggataccc caaagtgaat aatagttgct gtttttcgag
 541 gtgtccgacg gatgcttgat gtctcttga gttgtgaac tttgattaaa actagaccgt
 601 ttgactagcg agactccgtg ctgtctccta agtgatgaac tctgattcag ggaagtctct
 661 ggtagttaat tactatcctc gaagtttggt ctagaagggg ttggtgatct gtggaactgc
 721 cttctttcgt ttattgatcg aggcccgctc tatgttcgaa gtggcaaaat cataatatta

```

781 aactttatct gcgtaagct tctttcgata gcgttggtc taccagatct gtgaaaacga
841 aacagtcgta agcttttccc cattgtcctg agtttacgcg aagtcggatc gaggtgcatc
901 atggatggtg taaagggttc gtgctgtaat tgtcttctgt taagttaagg gccttgaaga
961 tgtgtcggag caatgccaaag ggctgcatg taatttttcc atatcagggg tgactgtcta
1021 attattttga aaatatact taagcattat gtatgttcac agatcataag acgttggcta
1081 atatatatac tgcgacattt aagtcactcc acgtttttga acaaacatc tccagatatac
1141 tttcagagtct ggcttggatt ggatttggag gattagccgt gtatggactg tccagaaggg
1201 taacatacat catcaacctt gattttgaat agaaacctgg acacgtcagt ttgttttct
1261 aagttaaagg agttttagg tgcgtcttag cagctttgta gacgttcgtg ttctaacccc
1321 tcgtgatcgt aattaccttt ggtgatataa ggttgaggaa ttggcatttt tgttggatc
1381 agttttgta aggggaaatt tcgaccatt caacggctac cagcttctgt cgacacatcc
1441 ggtctccagt cattatgcta cattgaatac gtgtctagtc tgtgattaga ttcttcgata
1501 tttctgtctc gttttagtgt ttgatctgtc gcattaccct gatgggtcat caatagcttg
1561 accgtgagac cagcatttcc aagccaatg aaatggtcgt ttggaagagg gattatggtt
1621 ggggctgtc ggacctgcag gtatagggct attacaagt cttattatcg aggagcggg
1681 tgggcatat tggtatatg tattacacga catgtaact ttgaaaatgt ggaaaagatg
1741 ctgaaagagt tgaaggatca tactgactcc aacattgtgg tgatgctggt tgggaacaag
1801 tctgttttgc gccatttgag agctgtatct gcagatgatg gccagctctt ctcagagaaa
1861 gaaggtcttt tctttatgga gacgtctgct cttgaatcta cgaatgtgga gaatgcttc
1921 aaacagattc tgaccagat ttacagggtt gttagtaaga agcccttga tgttggagag
1981 gatccatcag ctgttctcgg taaaggacaa acaattagtg ttgggaacaa agatgatgct
2041 actgcaacaa agaaggtggg gtgttgttct gcatagaatt tcatgcgtag ctgggcca
2101 ttctggcctc ttctctttca ttacatcatg tgaatttcaa gccatgcat gtataccgtt
2161 ggtctggtta attttgtct ttcaattgt tgtatttctt aaacaataac attatatgct
2221 tttaacagct tgggcttag atgcattccc aaggctataa tatgagactc aatcagctgt
2281 gtacataatc tgttgggtga acgactgacc aagcataagt agtgtctact ttctgtagag
2341 gttactatac ctctgcagaa ggtccctgat ttttgggtgt gatataattgt ctaccagtca
2401 atttgatct tggaacatc tacattcctt caagcagtaa tacttgtatc tgatatctgg
2461 catctgctct ccaagaattt ggata

```

//

LOCUS rab 1330 bp mRNA linear
DEFINITION *Pellia endiviifolia* species B Rab protein mRNA, complete cds
ACCESSION HQ634389

```

1 ggattcgtcg aataggcacg acaaaacatg tgtggagagc ttcggatgag gcaagtgttt
61 aggttatggc cttgtcccat cgttggaaata tattaaaacga ttgtgctcct ttgggaaact
121 ctctaaccat cgcagagcac acatttgact gattgttatc aaatcatgct tggttacgac
181 ttctagtcga ttcatacagg cgaaacacgg gactaacagt tctgtgaaga acatcaaat
241 cgcaaggaaa cgggcagggt taagaagcga aaatggctta cagatcagat gatgattacg
301 actatttatt caaggtgggt ctgatcggcg attctggtgt tggtaaatct aacctctct
361 caaggtttac tcggaacgag ttcagtctgg agtcgaagtc cacaatcggg gtcgagtttg
421 caacacgcag catcaatgtc gatagcaaac tcataaaggc tcagatattg gatcacgacg
481 gccaaagaa gtagagggct attacaagt cttattatcg aggagcggg ggggcattat
541 tggatatatg tattacacga catgtaact ttgaaaatgt ggaaaagatg ctgaaaagat
601 tgaaggatca tactgactcc aacattgtgg tgatgctggt tgggaacaag tctgttttgc
661 gccatttgag agctgtatct gcagatgatg gccagctctt ctcagagaaa gaaggtcttt
721 tctttatgga gacgtctgct cttgaatcta cgaatgtgga gaatgcttc aaacagattc
781 cgaccagat ttacagggtt gttagtaaga agcccttga tgttggagag gatccatcag
841 ctgttctcgg taaaggacaa acaattagtg ttgggaacaa agatgatgct actgcaacaa
901 agaaggtggg gtgttgttct gcatagaatt tcatgcgtag ctgggcca ttctgcccct
961 ttctctttca ttacatcatg tgaatttcaa gccatgcat gtataccgtt ggattggtta
1021 attttgttct ttcaattgt tgtatttctt gaacaataac attatatgct tttaaagctt
1081 cttagatgca ttccaaggc tataatatga gactcaatca gctgtgtaca taatctgttg
1141 gttgaacgac tgaccaagca taagtagtgt ctacttctgt agagtgttac tatacctctg
1201 cagaaggtcc ctgatttttg gtgggtgat attgtctacc agtcaattgt gatcttggaa
1261 ccatctacat tccttcaagc agtaataact gtagctgata tctggcatct gctctccaag
1321 aatttggata

```

/

```

/product="Rab protein" 217aa
/translation="MAYRSDDDYDYLKVVLLIGDSGVGKSNLLSRFTRNEFSLESKST
IGVEFATRSINVDSKLIKAQIWDTAGQERYRAITSAYYRGAVGALLVYDITRHVTFEN
VERWLKELKDHTSDNIVVMLVGNKSVLRHLRAVSADDGQSFSEKEGLFFMETSALST
NVENAFKQIPTQIYRVVSKKALDVGEDPSAVPGKQTISVGNKDDVTATKKVCCSA"

```



LOCUS ts 3875 bp DNA linear
DEFINITION *Pellia endiviifolia* species B ts gene with unknown function, genomic sequence
ACCESSION HQ634386

```

1 agctgtggtt cgttcaacga gtggacttgt taaaatttcc gcatccaaca cacggcatgg
61 attggatttc gattgagtct acatggccac agtagtttct atggccgcaa tgatttggga
121 atttctcgtc agaaaattga accgaaatga aaattcgttt ccaaaaatcg atttctcgtg
181 ctgaaatcgc atgggcgaaa ctatggaatg tagtaatact atggaagggg gtgagaactt
241 tgacgggtaca tgatacgttc ggaaggcttg ggaactact tcaatggaca ctagtgaagt
301 ctacaaagaa atctactcca atgcgttggc ttaaaggaaa actttcactt gttacgtgg
361 acaacgttaa tagttttcag agattccctg aaattacgca acaaaaagaa ggaaaagaat
421 ctgaagagct ctgctgtcca ttgagaaatg cttctgatat ctaagagatg ggttcaact

```

481 taaggccaaa gttctccaga tacaaggtt caggtcaatg aagaaaatct gtgagttctt
541 gactggaaag ctgcctaatt tcgagatcag ttgcccttaa cgcagtgctt gcgattgaga
601 gttctgtagc ttaaagccaa accgcagtg agtaaattta ttagttaaac tcggttagtt
661 gtctcgcaga aaagcatccg ctgaagaact tcggtcacog ttctgcacgg gcottgtttt
721 cgccagtaat ggagcgggta cagaagcagt accgacctga agtctcttct acgggccata
781 atatcatcgt acttctaggg catgcagaag ataaacctatg attcgggact tcgatgttga
841 atggctggtt tttcaaatga gggttccaga ctatgattta gaaacctcga tgcgtgtcca
901 agaccatttc tctgcttcac gagaactttc cgtttgttcg gtttccatg tacggttagt
961 attcagtttt ctgttttgtt tgcttgccag ttttctctc ccaactcgag tgcgagactt
1021 gtagcgagaa ggaaggggca gactgtcgat ccattgatat ctctcagca ttcttcagg
1081 acggcctcct ccagacacgg agctcattct tgcggcacta gtccgtggag atcaattgtg
1141 gaggtctgtg agtagctggt aacgatttgt ctttgagttg gctgggttgc ccggtgtag
1201 caccaatcgg aagccatgaa gatattcatg aagtcagttc ttctcgtggc cgccatagct
1261 gggcagttgc tgaattcctc gcacattgag caagcagcag gcttgactct gccaccatc
1321 ttagacccaa tcataaacc cattaacaat ctacagagcc ccatattgga tccctcaac
1381 aatcttacga ctcccctctc cagccctatc accaatctta caagccccat tttggacct
1441 ctgaacaatc ttacatctgc accgatcgtg ggcttgaatc tcaccacagt cttggggctt
1501 ctcaatctca cagccgggtac tctgctctc aaactgagca ccatcctcgg tccgctgaat
1561 ctacagctg gcacaggcct caacctcagc aacatcatcg gcccatggaa caatctcaca
1621 gggcctctgt agacaatcct gagcaatttc acaggtcocg cgtccaacct caccgtggct
1681 acaaacgtga cagtgcgggt cacacttaac ctcccagta cgatgctcaa tttagcgagc
1741 gtcttccoga acggcatgac catagttccg ctaggaaatga cggaaagtct catcagcctc
1801 cgttccctgc aaggcaccaa tttgtcgaca gtgcccgtgc agttcatggt tccggtgatc
1861 tctaacctta atttccctgt cagtggctcg gctgggttga cgtcagacat agcccctggc
1921 acgaaactcg ccatcactgg actgacgacc ccgatcacca ggctgtttt cggggtctct
1981 tggcagacat tcccgcagct gacgaacggt ttgatctcta aaattctccc cggctcgtcc
2041 cagccgggtc cgctgtacaa ctctgcctgc cccgctctga tgtgtaatc tctgcaacc
2101 ttaggtttaa ctgcccacat tgtgaatttc atgaatgaat gtgattctg cttcgaatga
2161 tgacaatcga taattattct ataaggttgg aatttcaggc atttcatata cttaacaggg
2221 tcctggattc tcttacttgt tactcagatc ctatacatg attcggtcgt gaccaggaag
2281 cgctgaaatg cagtacaact aatcctgaag gggatttctg attagagtta acgagtgctc
2341 ccattgaagt atctaagtaa atgaagtgtc ttggattgat gaggccaaga gacgctctg
2401 gagattccat gtctcagctc acagactcca ccacgagcgg ataggattga ggattttcta
2461 tttagtttaa ctaccgactg tccacattga ggtgtcttag atttacgggg tgacgagatg
2521 cttgtagatt ccatgtcaga gctcacgaac tccgccacca taggatagtt caatagtgtc
2581 ccctagggca tgttctgag aggagaagag aaacctcag ttttacttt tgttgtgttc
2641 tctacgtctt tccagatctg gaagactcta tcgttctcca tctctctcgt tcatgtggaa
2701 gaactccatt tcttccgag aataggtttt gtatcacttt ccttcagtta ggataagacc
2761 ctttgaattg agcccagttg cgcacaaatgt ctaactgata ctgaaggaat aatgtttctc
2821 tttggagaag gaactgacga ggggocagat caatgtttta attttctct tgagctggt
2881 gcacggccaa acaatcatga tccatctaca gagcgtgata atttagtaat tggatccctt
2941 caggaacatt ttacaattct ttggttgggt gaagttagat gcgggagatt atacacacat
3001 tcgatttttt ttcagtttgt tgcaacagtc gtttactcaa tctgtttatg gtccggacca
3061 ggagatcttt ctctccaggt acataattga cataattgta ttagtagatc attgtgaac
3121 acgaaagctg tcgaggattc atcaaatcgt tcgggctttc cactctcgga gctcaacggg
3181 tgaatgattc aacgggatac cggagtcggt tgcgagtttt ctgcgatgct cctgacctct
3241 taacctgtcg ttggttgggt gcgcgcagaa aggagaggat tatggagcag tttctcatga
3301 ccacccaatg aatcaagatt gaccacagag ctgccaccag tacatcatgt acaggtcact
3361 gcaaaaatttc ttaactcgca cagaaaacaga ttcgatgact cgatagcctt acgccaacgc
3421 agaaatgcta tatgtactaa ttgaactctc cgttgattcg aaatttggaa cagaagtgt
3481 cgcttctctg cgaccaagtc acacagtgat gccgagattg gagaaggttt ccaaagttaga
3541 tgatcatgca tggacgaacg tacagcttgt tttcaccoga gacacgattt tcttcaacaa
3601 tcgaagggca tattgtgtgc actcaacaat tttggttatt tacgcccatt aattctggag
3661 atagcgttcc gcagtttggc cgtttcgcgg gagaccaact gggttgattc aaagtcaaga
3721 gacactgtac aacttattcg atatattatt gctctgcaaa acagggcaaa agttttggtc
3781 aggaacatga acaattaatt ctagcgatgc ggttccagct tcttggcgat atgaataatt
3841 tgtgtatgag actgaacgaa ataaatttgc attca

//

LOCUS ts 2689 bp mRNA linear

DEFINITION *Pellia endiviifolia* species B ts mRNA encoding protein with unknown function, complete cds

ACCESSION HQ634390

1 agctgtggtt cgttcaacga gtggacttgt taaaatttcc gcatccaaca cacggcatgg
61 attggatttc gattgggtct acatggccac agtagtttgc atggcccga tgaatttggg
121 atttctgctg agaaaattga accgaaatga aaattcgttt ccaaaaatcg atttcgcgtg
181 catgaatcgc atgggcgaaa ctatggaatg tagtaatact atggaagggg gtgagaactt
241 tgacgggtaca tgatagcttc ggaaggcttg gggaaactact tcaatggaca ctagtgaagt
301 ctacaaagaa atctactcca atgcgcttgg ttaaaggaaa actttcactt gtaacgtgg
361 acagcgttaa tagttttacg agattccctg aaattacgca acaaaaagaa ggaaaagaat
421 ctgaagaact ctgctgtcca ttgagaaatg cttctgatat ctaagagatg ggttcaact
481 taaggccaaa gttctccaga tacaaggtt caggtcaatg aagaaaatct gtgagttctt
541 gactggaaag ctgcctaatt tcgagatcag ttgcccttaa cgcagtgctt gcgattgaga
601 gttctgtagc ttaaagccaa accgcagtg agtaaattta ttagttaaac tcggttagtt
661 gtctcgcaga aaagcatccg ctgaagaact tcggtcacog ttctgcacgg gcottgtttt
721 cgccagtaat ggagcgggta cagaagcagt accgacctga agtctcttct acgggccata
781 atatcatcgt acttctaggg catgcagaag ataaacctatg attcgggact tcgatgttga
841 atggctggtt tttcaaatga gggttccaga ctatgattta gaaacctcga tgcgtgtcca

```

901 agaccatttc tctgcttcac gagaacttcc cgtttgctcg gtttcccatg tacgggttagt
961 attcagtttt ctgtttttgtt tgccctggcag ttttcgcttc ccaactcgag tgcgagactt
1021 gtagcgagaa ggaagggtca gactgtcgat ccattgatat ctccctcagca ttcttcagggt
1081 accggctcct ccagacacgg agctcattct tgcggcacta gtccgtggag atcaatttgtg
1141 gaggtctgtg gagtagtggg aacgatttgt cattgagtgg gctgggttgc gccgtggatg
1201 caccaatcgg aagccatgaa gatattcatg aagtcagttc ttctcgtggc cgccatagct
1261 gggcagttgc tgaattcctc gcacattgcy caagcagcag gcctgactct gccaccatc
1321 ctgaccctcc tcataaaccc cattaacaat ctcaacgacc ccatattgga tcccctcaac
1381 aatcttacga ctcccctcct cagccctatc accaatctta caagccccat tttggaccct
1441 ctgaacaatc ttacatctgc accgatcgta ggcttgaatc tcaccacagt ctgggggtct
1501 ctcaatctca cagccgggtac tctgtctctc aacctgagca ccatcctcgg tccgtgaa
1561 ctccacagctc gcacagggct caacctcagc aacatcctcg gcccatggaa caatctcaca
1621 ggcccattgc agacaatcct gagcaatttc acaggtcccg cgtccaacct caccgtgggt
1681 acaaacgtga cagtgcaggt cacacttaac ctcccagta cगतgctcaa tttagcgagc
1741 gtcttcccga accggcatgac catagtcccg cttagaatga cggaggtctc catcagcctc
1801 cgtctccttg aaggcaccaa tttgtcgaca gtgccggtgc agttcatggt tccggtgatc
1861 tctctacctc atttccctgt cagtggctcg gctgggtgta cgtcgcacat agcccctggc
1921 acgaaactcg ccatcactgg actgacgacc ccgatcacca ggctgttttt cgggggtctct
1981 tggcagacat tcccgcagct gacgaacgtt ttgatctcta aaattctccc cggctcgtcc
2041 cagccgggtcc cgctgtacaa cttgcgctc cccgctctga tgtaaaaggag aggattatgg
2101 agcagtttct catgaccacc caatgaatca agattgacca cagagctgcc accagttacat
2161 catgtacagc tcaactgaaa atttcttaac tcgcacagaa acagattcga tgactcgata
2221 gccttacgcc gacgcagaaa tgctatatgt actaattgaa ctctccggtg attcgaatt
2281 tggaaacagaa gttgtcgctt ctctgcgacc aagtccacaca gtgatgcca gattggagaa
2341 ggtttccaaa gtagatgac atgcatggac gaacgtacag cttgttttca cccgagacac
2401 gattttcttc aacaatcgaa gggcatatg tgtgcaactc acaattttgg ttatttacgc
2461 ggattaattc tggagatagc gttccgcagt ttggccggtt cgcggggagac caactgggtt
2521 gattcaaaag caagagacac tgaacaactt attcgatata ttattgctct gccaaacagg
2581 gcaaaagttt tggtcaggaa catgaacaat taattctagc gatgcggttc cagcttcttg
2641 gcgatatgaa taatttgtgt atgagactga acgaaataaa tttgcatc

```

//

```

/product="Ts" 295aa
/translation="MHQSEAMKIFMKSVLLVAAIAGQLLNSSHIAQAAGLTLPPILDP
IINPNNLTSPILDPILNLTPLLSPIITNLTSPIIDPLNLTSPAPIVGLNLTTLVGLSL
NLTAGTVALNLSITLGPLNLTAGTGLNLSNIIGPWNNLTGPLQITILSNFTGPASNLTV
ATNIVTIVLNLSTMLNLASVFPNGMTIVPLGMEVSIISLRSLQGTNLSTVVPQFMV
PVISYLNFPVSGSAGVTLDIAPGTKLAITGLTTPITRLLFFVSWQTFPQLTNVLIISKI
LPGSSQPVPVLYNFAVPALM"

```



LOCUS HMGbox 2412 bp DNA linear
DEFINITION *Pellia endiviifolia* species B gene encoding protein with HMGbox domain, genomic sequence

ACCESSION HQ634387

```

1 gcctctttca atctctatgt gcctctttgc ctctcctttt ctccctcacc tccagctttc
61 tcagatccctg cgtcccctct ggaatgtatt cccgtaagat tcccgcgaac gagaagcaact
121 tgtgacagag tatcttgctt agttaccgag tagctcagac ctccagaatcc ttgaaaaagc
181 tagcccatgc atcaatgttg atgatctaga ttcccgatcc gaccgcgagg ctgcgcaactc
241 gccattagga agagagcctc gatcaaatgg ggaaggccac tttgaaaaac aaaggcaaat
301 cggggagtggy acgagggctc acgaaagctt ctctcctcgc atgtaaatct tcaattcgat
361 tcttagaatt cgataggaag tgtcccctg catattcgtc tgattggatt cgggatgttc
421 ttcaaacctt taaggaactt tttgactctc agtgcagcgc agcatttcgt ctgactctc
481 tccgtaggaa tttcgagatt ctttgttctc tcgttacaat atcgtttgag atatgactgg
541 atcatttggc ccatgcatca gttatattgt aaccttttga tcatcaggat gtctagaggt
601 ccgaaagaga atagttagaa cacgctagac tattagttag aagctagaca aaagcctgta
661 tacttgattt tcaatttgat gattcgatca atacttcaat ccaggaatga tcttcatttt
721 gttttgattg tctgatcaat tcttcaatca atgaattatc tacatttcac tttgattatt
781 caataattaa accttgcagt caaggattct tttcaattca ccttgactgt tacattggctc
841 cgtcagttaa atatagatat accttgcgac gccttagata aatttgcctg gtttcgaatt
901 aaccttctat gatgacgtcg ctaggccgct ctctctcgaa aaggaaagga aaggaggaga
961 aacgaattcg aaaagtgaag gacaaaaggg gtcccaagag agctttgggg ccttacatgt
1021 atttttgcaa agatcaaaaga aaggaaatcc aagaacagaa tcccacgatg tcttttgggtg
1081 acatcggagc agttcttggg agccagtggy gtaaattgaa cgagaaagaa aaacaggtag
1141 ctatcgaatc acttgccttt tggattccag ggcaactgaa ctagtgttcc cataatcctc
1201 caaatactct cctactttga tctttcacgt tagatcgaat agccgctgaa gaatgttcaa
1261 tctgtcatga agagtctctt atttgacaat tattttcgtt tgggtgatct atctctgca
1321 gaaatatata cgaaaggctc aaaccgataa aagaagatac gtcaaggaga tgaaacgcta
1381 caagccccgc tattaagtaa gttgaggtga tctaactgct caatcaataa tcttttgggt
1441 ctattccata aatctactct cacttcgata ttttcatctc ttcaactttt tagagttcaa
1501 ggctctgtaa aacttccctc gattcgaaag cgtgtatcac gagatgattc acatgatcaa
1561 cagaccatgg aacttcttgg agaatcaagc tacttgcctt aaaatacgcg ccaaaacatc
1621 tgttgatcac agtggaaaga atgcaataag aaaaagaagt gttcatgcaa attatgatga
1681 gctcaacagc ttcagacatg gtgaacgact tctagacta attagtctcg cggatgtcaa
1741 gcaatcctcc taatcatcac aagttgtaat gagactagtg ttaagaatag tatgagaatg
1801 tttttgaaact ggtcccttaa aattgcagga actggagagc ttccaggtct aatttgggtg
1861 ccacaactca cctacaggca gagagataga aggtgcgatg aggaactttc cgaaggggct

```

ANEKS

```
1921 gttgggcagg ctcaattgta gtaagaaatc agactgaata aaaaaaatca tgtaatcttg
1981 aaggaggagg agaattcgaa gccttcgaac ttctttgagt ggagaataat tagagacgta
2041 cttacggctg caataaaaagt gtcaaaaatga agaacttccg ggatccattc tttccaaata
2101 tctctggaga cataaacttg agaaagagat caaccagacc aaatcagaaa agtcatcctg
2161 cagagcgtag cgagaacaga caagtgcaac gtattaaccg aacatttctt aaatacaaga
2221 tctagatttc gaattgcaga ttccagcagc gacaaatcgt cctgtacgaa gtgaggaaa
2281 ttcattgttg aagaaggtg cacatgtggt ccaatztatc tcgtagatcg ccgagttttg
2341 attcctggct gtctctacac tgttttttaa tccagatcaa tccaaaatgt cgaaaaacta
2401 gtctcattct ca
```

//

LOCUS HMGbox 1212 bp mRNA linear

DEFINITION Pellia endiviifolia species B mRNA encoding protein with HMGbox domain, complete cds

ACCESSION HQ634391

```
1 gccctcttca atctctatgt gccctctttg ctctcctttt ctccctcacc tccagctttc
61 tcagatcctg cgtcccctct ggaatgtatt cccgtaagat ttcccgcaac gagaagcact
121 tgtgacagag tatcttgctt agttaccgag tagctcagac ctcagaatcc ttgaaaacgc
181 tagcccatgc atcaatggtg atgatctaga ttccgatcc gaccccgagg ctgccactc
241 gccattagga agagagcctc gatcaaatgg ggaaggccac tttgaaaacc aaaggcaaat
301 cggggagtg gaggagcgtc acgaaagctt ctctctcgcg atgccgctct tcttcgaaaa
361 ggaaaggaaa ggaggagaaa cgaattcgaa aagtgaagga caaaaggcgt cccaagagag
421 ctttggggcc ttacatgtat ttttgcaaag atcaaagaaa ggaaatcaa gaacagaatc
481 ccacgatgtc ttttggtgac atcggacgag ttcttggaag ccagtggggg aaattgaacg
541 agaaagaaaa acgaaaatat atacgaaagg ctcaaaccga taaaagaaga tacgtcaagg
601 agatgaaacg ctacaagccc cgctattaag aactggagag cttccaggtc taatttggtg
661 tccacaactc acctacaggc agagagatag aagggtgcgat gaggaaactt cggaaaagggc
721 tgttggggcg gctcacttgt agtaagaaat cagactgaat aaaaaaatc atgtaatctt
781 gaaggaggag gagaattcga agccttcgaa ctctcttgag tggagaataa ttagagacgt
841 acttacggct gcaataaaaag tgtcaaaaatg aagaacttcc gggatccatt ctttccaaat
901 atctctggag acataaaactt gagaagagaga tcaaccagac caaatcagaa aagtcatoct
961 gcagagcgta gcgagaacag acaagtgcaa cgtattaacc gaacatttcc taaatacaag
1021 atctagattt cgaattgcag attccagcag cgacaaatcg tcctgtacga agtgaggaaa
1081 gttcattggt gaagaaaggt gcacatgtgg tccaatztat ctcgtagatc gccgagtttt
1141 gattcctggc tgtctctaca ctgtttttaa atccagatca atccaaaatg tcgaaaaacta
1201 agtctcattc tc
```

//

```
/product="HMGbox protein" 120aa
/translation="MGKATLKTGKSGSGRGVTKASSSRCSRSSSKRKGKEEKRIKVK
DKRRPKRALGPYMYFCKDQRKEIQEQNPTMSFGDIGRVLGSQWGLNEKEKQKYIRKA
QTDKRRYVKEMKRYKPRY"
```