

VILNIAUS UNIVERSITETAS

RAIMONDAS ŠIUKŠTA

**PAVELDIMAS MIEŽIO VIENGUBŲ IR DVIKUBŲ HOMEOZINIŲ
MUTANTŲ FENOTIPO NESTABILUMAS IR GALIMOS JO
PRIEŽASTYS**

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, biologija (01 B)

Vilnius, 2015

Disertacija rengta 2010 – 2014 metais Vilniaus universitete.

Mokslinis vadovas - prof. habil. dr. Vytautas Petras Rančelis (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B)

Konsultantas - prof. dr. Donatas Žvingila (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B)

TURINYS

SANTRUMPOS.....	4
ĮVADAS.....	5
I. LITERATŪROS APŽVALGA.....	10
1.1. Žiedinių augalų ABC(DE) žiedo raidos genetinis modelis	10
1.2. Augalų homeoseką (HD) turintys genai	15
1.3. <i>KNOX</i> genų sąsajos su fitohormonų signaliniais keliais	17
1.4. Fitohormono etileno reikšmė augalų reprodukcinei funkcijai	21
1.5. Auksino vaidmuo žiedo organų determinacijoje.....	24
1.6. VU Botanikos sodo miežio mutantų, revertantų, genetinių linijų, veislių ir hibridų kolekcija	25
1.6.1. Miežio homeoziniai <i>Hv-tweaky</i> tipo mutantai.....	27
1.6.2. <i>Hv-Hooded/Kap1</i> tipo homeoziniai miežio mutantai.....	30
II. TYRIMŲ OBJEKTAS IR METODAI	32
2.1. Tyrimų objektas	32
2.2. Tyrimų metodika.....	37
2.2.1. Cheminės medžiagos.....	37
2.2.2. Tirpalai ir jų paruošimas	38
2.2.3. DNR išskyrimas ir koncentracijos bei kokybės nustatymas.....	40
2.2.4. PGR sąlygos <i>BKn3</i> geno reguliacinėms sritims amplifikuoti	40
2.2.5. PGR produktų frakcionavimas agarozės gelyje	42
2.2.6. PGR produktų išskyrimas iš gelio ir paruošimas sekos nustatymui.....	42
2.2.7. Augalų veikimas etilenu.....	43
2.2.8. Augalų veikimas sintetiniu auksinu 2,4-D ir auksino inhibitoriais	44
2.2.9. Genų raiškos tyrimas diferencinio vaizdinimo metodu.....	44
2.2.10. DD-PGR produktų išskyrimas iš PAA gelio, jų reamplifikacija ir paruošimas sekos nustatymui	48
2.2.11. Miežio kaliaus kultūrų indukcija ir kultivavimas.....	49
III. REZULTATAI.....	52
3.1. Dvigubų mutantų <i>Hv-tw₂;Hd</i> žiedo/žiedyno fenotipo nestabilumas	52
3.2. Viengubų ir dvigubų miežio mutantų kaliaus augimo palyginimas ir HC toksino poveikis.....	58
3.3. Auksino inhibitorių atranka kaliaus kultūrose bei jų poveikis miežio mutantų pagrindinio ir ektopinio žiedo struktūrai	60
3.4. Sintetinio auksino 2,4-D poveikis miežio mutantų žiedo/žiedyno struktūrai.....	67
3.5. Etileno poveikis dvigubų mutantų pagrindinio ir ektopinio žiedo struktūrai.....	72
3.6. Viengubų ir dvigubų mutantų <i>BKn3</i> geno alelizmo nustatymas	79
3.7. Miežio <i>Hv-tweaky spike 2</i> mutacijos kaip paveldimo dvigubų mutantų fenotipo nestabilumo paleidiklio (trigerio) tyrimai	82
3.7.1. <i>Hv-tweaky</i> fenokopijų indukcija 2,4-D	82
3.7.2. <i>Hv-tw₂</i> mutanto pakitusios raiškos genų paieška ir genų charakterizavimas.....	91
IV. REZULTATŲ APTARIMAS.....	101
4.1. Dvigubų <i>Hv-tw₂;Hd</i> mutantų fenotipo nestabilumo sąsajos su auksino funkcijos sutrikimais	101
4.2. Galimas epigenetinių procesų vaidmuo dvigubų mutantų fenotipo nestabilumui atsirasti.....	106
4.3. Etileno reikšmė <i>Hv-Hooded/Kap1</i> tipo mutacijos pasireiškimui	108
IŠVADOS	114
MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS	116
PADĖKA	119
LITERATŪROS SĄRAŠAS	121

SANTRUMPOS

2,4-D – sintetinis auksinas 2,4-dichlorfenoksiacto rūgštis

ARF (angl. *Auxin Response Factor*) – auksino atsako veiksnys

BKn3 – miežio meristemos tapatumo genas *HvKnox3*

bp – bazių pora

cDNR – kopijinė DNR

EtOH – etanolis

GRF (angl. *Growth-Regulating Factor*) – augimą reguliuojantis veiksnys

HFCA – 9-hidroksi-9-fluorenkarboksirūgštis (auksino transporto inhibitorius)

HDAC – histonų deacetilazių inhibitorius

Hv-Dwh – miežio mutantas *Hv-Dense wing hood*

Hv-H – miežio mutantas *Hooded/Kap1.a*

Hv-Hcs – miežio mutantas *Hoods on center spikelet*

Hv-Hd – *Hv-Hooded/Kap1* tipo miežio mutantas

Hv-Lh – miežio mutantas *Hv-Lemma hooded*

Hv-Mf – miežio mutantas *Hv-Multiflorous*

Hv-tw – *Hv-tweaky* (angl. apipešiotas) tipo miežio mutantas/mutacija

Hv-tw No.18 – miežio mutantas *Hv-tweaky No.18*

Hv-tw₂;H – miežio dvigubi mutantai, gauti sukryžminus *Hv-tw₂ × Hv-H*

Hv-tw₂;Lh – miežio dvigubi mutantai, gauti sukryžminus *Hv-tw₂ × Hv-Lh*

Hv-twmk – miežio mutantas *Hv-tweaky and missing kernel*

MS – Murashige ir Skoog terpė augalų ląstelių kultūroms *in vitro* auginti

NPA – 1-N-naftilftalamo rūgštis (auksino polinio transporto inhibitorius)

PAA – poliakrilamidas

PCIB – 2-(p-chlorfenoksi)-2-metilpropano rūgštis (antiauksinas)

PGR – polimerazinė grandininė reakcija

SE (angl. *Standard Error*) – standartinė paklaida

TV – transkripcijos veiksnys

TCA – *trans*-cinamo rūgštis

TIBA - 2,3,5-trijodbenzorūgštis (auksino transporto inhibitorius)

WT (*wt*) (angl. *Wild Type*) – laukinio tipo augalai

ĮVADAS

Fenotipo nestabilumas gamtoje yra gana paplitęs reiškiny – natūraliomis sąlygomis jį gali sukelti įvairūs išoriniai veiksniai, tokie, kaip temperatūros ir apšvietimo pokyčiai (Bonnett, 1966), abiotinis stresas (Boyko ir Kovalchuk, 2011; Yao ir kt., 2011) bei įvairūs patogenai (Boyko ir kt., 2007; Ghareeb ir kt., 2011). Fenotipo variacija būdinga ir kai kuriems viengubiems bei dvigubiems mutantams (Forster ir kt., 2007; Babb ir Muehlbauer, 2003; Trevaskis ir kt., 2007; Wang ir kt., 2010b; Dreni ir kt., 2011; Li ir kt., 2011; Müller-Xing ir kt., 2014; Zheng ir kt., 2015; Šiukšta ir kt., 2015) ir netgi epimutantams (Zhang ir kt., 2012). Nepaisant plataus fenotipo nestabilumo paplitimo, jo mechanizmas nėra pakankamai ištirtas. Dar mažiau žinoma apie fenotipo nestabilumą, kuris atsiranda dvigubuose mutantuose, kurių tėviniams viengubiems mutantams toks kintamumo tipas nebūdingas – šia tema iki šiol pasaulyje atlikti tik pavieniai tyrimai (Müller-Xing ir kt., 2014).

Sukryžminus pleiotropinį *Hv-tw₂* mutantą, kuriam būdinga nereguliari lodikulių transformacija į reprodukcinis organus, su įvairiais *Hv-Hooded/Kap1* (*Hv-Hd*) tipo mutantais, kuriems dėl *BKn3* geno IV-jame (didžiausiame) introne įvykusios 305 bp duplikacijos vietoje akuotų vystosi ektopinės į žiedą panašios struktūros (Müller ir kt., 1995), buvo gautos dvigubų *Hv-tw₂;Hd* mutantų linijos, pasižyminčios ypač didele fenotipo variacija (Vaitkūnienė ir kt., 2004a, b). Kai kurie tokie savitos išvaizdos dvigubi mutantai gali būti naudojami dekoratyviniais tikslais (Šiuksta ir kt., 2012), tačiau didelei jų daliai be įvairiu laipsniu išsivysčiusių tėvinių (viengubų) mutantų požymių yra būdingas fenotipo nestabilumas, pasireiškiantis pradiniam mutantams nebūdingais pokyčiais, kurių spektras ženkliai pralenkia žinomų miežio ir kitų miglinių šeimos augalų mutantų fenotipus (Šiukšta ir kt., 2014; Šiukšta ir kt., 2015). Fenotipo nestabilumu pasižyminčių miežio dvigubų *Hv-tw₂;Hd* mutantų žiedo/žiedyno struktūros variacijos apima daugelį žinomų miežio ir kitų miglinių šeimos augalų mutantų fenotipų (Bonnett, 1966; Ambrose ir kt., 2000; Babb ir Muehlbauer, 2003; Duan ir

kt., 2003; Ikeda ir kt., 2007; Trevaskis ir kt., 2007; Thompson ir kt., 2009; Whipple ir kt., 2010), tačiau didžiausias šio reiškinių išskirtinumas miežio dvigubuose *Hv-tw₂;Hd* mutantuose yra jo paveldima forma. Panašaus pobūdžio, tik siauresnio spektro generatyvinės fazės grįžimo į vegetatyvinę reiškiniai – žiedyno ir žiedo reversijos – nustatyti ir tiriant dvigubus vairo Polycomb grupės genų mutantus (Müller-Xing ir kt., 2014).

Dvigubų *Hv-tw₂;Hd* mutantų fenotipo nukrypimų pobūdis primena kai kuriuos žinomus dvigubus auksino signalinės sistemos mutantus (Krizcek, 2011; Gallavotti, 2013), o tai leido *Hv-tw₂;Hd* mutantų fenotipo nestabilumą susieti su fitohormonų, pirmiausiai su auksino, balanso sutrikimais. Kita vertus, neseniai nustatyta, kad *BKn3* geno IV-ajame introne esančioje 305 bp duplikacijoje, lemiančioje *Hv-Hooded/Kap1* fenotipą (ektopinio žiedo susidarymą apatinio žiedažvynio/akuoto pereinamojoje zonoje), yra reguliacinių *cis*-elementų, atrankiai sąveikaujančių su etileno atsako baltymais, o *Hv-Hooded/Kap1* fenotipą iš dalies normalizuoja egzogeninis etilenas (Osnato ir kt., 2010). Remiantis šiais faktais buvo iškelta prielaida, jog dvigubų *Hv-tw₂;Hd* mutantų fenotipo nestabilumas taip pat gali būti susijęs ir su sutrikusia etileno kelio funkcija.

Į tyrimus įtraukus didesnę skaičių dvigubų mutantų, tokių, kaip *Hv-tw;laxatum-a* (*Hv-tw;lax-a*), *Hv-tw;tweaky No.18* (*Hv-tw;tw No.18*) ir *Hv-tw;tweaky and missing kernels* (*Hv-tw;twmk*), paaiškėjo, kad miežio dvigubų mutantų paveldimo fenotipo nestabilumo paleidiklis (trigeris) yra būtent mutantiniai *Hv-tweaky spike* tipo aleliai, todėl buvo aktualu nustatyti genų raiškos pokyčius *Hv-tw* tipo mutantuose, kurie galėtų lemti dvigubų mutantų fenotipo nestabilumą.

DARBO TIKSLAS

Įvertinti paprastojo miežio dvigubų žiedo/žiedyno raidos mutantų, gautų sukryžminus *Hv-tw* ir *Hv-Hd* tipo mutantus, fenotipo variacijos ribas ir ištirti galimas šių dvigubų mutantų fenotipo nestabilumo priežastis.

PAGRINDINIAI TYRIMŲ UŽDAVINIAI

1. Ištirti paprastojo miežio dvigubų mutantų fenotipo variacijų spektrą ir juo remiantis nustatyti žiedo raidos kryptis.
2. Remiantis miežio *BKn3* geno reguliacinių regionų sekoskaitos rezultatais, identifikuoti miežio viengubų ir dvigubų mutantų *BKn3* alelio tipą.
3. Įvertinti ir palyginti miežio viengubų ir dvigubų mutantų kaliaus augimo intensyvumą.
4. Nustatyti sintetinio auksino 2,4-dichlorfenoksiacto rūgšties (2,4-D) poveikį miežio viengubų ir dvigubų mutantų žiedyno (varpos) morfologiniam spektrui.
5. Ištirti auksino 2,4-D ir auksino inhibitorių poveikį miežio viengubų ir dvigubų mutantų pagrindinio ir ektopinio žiedo struktūrai.
6. Nustatyti egzogeninio etileno įtaką miežio viengubų ir dvigubų mutantų akuoto raidai ir pagrindinio bei ektopinio žiedo struktūrai.
7. Ištirti platesnį dvigubų mutantų spektrą ir nustatyti, kuri mutacija yra miežio dvigubų mutantų paveldimo fenotipo nestabilumo paleidiklis (triggeris).
8. Diferencinio vaizdinimo metodu atlikti preliminarią *Hv-tw₂* mutanto ir jo pradinės veislės 'Auksiniai II' genų raiškos skirtumų paiešką bei nustatyti su fenotipo nestabilumo indukcija galimai susijusius genus-kandidatus.

DARBO NAUJUMAS

Remiantis miežio dvigubų *Hv-tw₂;Hd* mutantų fenotipo nestabilumo modifikavimo sintetiniu auksinu 2,4-D ir auksino inhibitoriais tyrimų rezultatais, auksino disbalansas pirmą kartą aprašytas kaip fenotipo nestabilumo priežastis. 2,4-D poveikio viengubų ir dvigubų mutantų žiedo/žiedyno raidai ir kaliaus augimui tyrimai leido susieti miežio *Hv-tweaky* tipo mutacijas su auksino fiziologijos defektais. Atlikta preliminari *Hv-tw₂* mutanto pakitusios raiškos genų, galimai susijusių su šios mutacijos sukeliamu fenotipo nestabilumu dvigubuose mutantuose, paieška, leidusi *Hv-tw₂* mutante preliminariai identifikuoti kelis

epigenetiniame genų raiškos reguliavime, streso atsakuose ir raidos procesuose dalyvaujančius pakitusios raiškos genus.

Taip pat pirmąsyk atliktas visų (iš viso keturiolikos) VU Botanikos sodo kolekcijoje saugomų *Hv-Hooded/Kap1* (*Hv-Hd*) tipo mutantų *BKn3* geno dviejų reguliacinių sričių sekvenavimas, parodęs, kad nepaisant didelės fenotipo įvairovės, visi *Hv-Hd* tipo mutantai turi vienodą IIIc tipo alelį.

DARBO PRAKTINĖ REIKŠMĖ

Darbų metu atrinkta grupė miežio dvigubų mutantų, kurie dėl savo savitos išvaizdos gali būti tiesiogiai pritaikyti dekoratyviniams tikslams arba būti naudojami kaip pradinė selekcinė medžiaga kuriant naujas veisles. Be to, iš kelių šimtų VU Botanikos sodo kolekcijoje saugomų miežio dvigubų *Hv-tw₂;Hd* mutantų atrinkta keliolika stabiliai ektopines į lapus/stiebus panašias išaugas sudarančių ir nesudarančių genotipų, iš kurių tyrimų metu gautos genetinės linijos, sudarytos iš vieno augalo palikuonių. Tokios dvigubų mutantų linijos yra vertinga medžiaga tolimesniems miežio žiedo/žiedyno reversijos tyrimams, o auksino ir etileno poveikio miežio mutantų žiedo organų raidai ir žiedo/žiedyno reversijoms tyrimų rezultatai prisidės prie gana fragmentišku fundamentinių žinių apie šių fitohormonų reikšmę miglinių šeimos augalų reprodukciniams procesams.

Preliminari *Hv-tw₂* mutanto pakitusios raiškos genų paieška diferencinio vaizdinimo metodu leido identifikuoti keturis naujus pakitusios raiškos cDNR fragmentus, kurių sekos bus užregistruotos NCBI duomenų bazėje ir ją papildys.

GYNIMUI PRISTATOMI TEIGINIAI

1. Miežio dvigubų *Hv-tw₂;Hd* mutantų fenotipo variacija apima platų spektrą žinomų žiedo/žiedyno raidos mutacijų ir savo mastu jas pralenkia.
2. Skirtingo *Hv-Hooded/Kap1* fenotipo viengubi ir dvigubi *Hv-Hd* tipo miežio mutantai pagal tirtus žymenis turi tą patį *BKn3* geno alelį.

3. Miežio *Hv-tweaky* tipo mutacijos yra susijusios su sutrikusia auksino funkcija ir yra dvigubų mutantų fenotipo nestabilumo paleidiklis (trigeris).
4. Miežio dvigubų mutantų žiedo/žiedyno fenotipo nestabilumą lemia lokalūs ektoziniai auksino koncentracijos nuokrypiai.
5. Etileno poveikis miežio viengubų ir dvigubų mutantų žiedo/žiedyno raidai labiausiai priklauso nuo jų genetinio fono ir stipriausiai pasireiškia ektozinėms į žiedą panašioms struktūroms.

DARBO APROBAVIMAS

Disertacijos tema paskelbti du moksliniai straipsniai ISI Web of Science referuojamuose žurnaluose, turinčiuose citavimo indeksą ir vienas mokslinis straipsnis ISI aplinkos žurnale. Dar du moksliniai straipsniai publikuoti kituose recenzuojamuose užsienio žurnaluose ir vienas mokslinis straipsnis Vilniaus universiteto recenzuojamame periodiniame leidinyje (konferencijų medžiaga). Tyrimų rezultatai pristatyti penkiose tarptautinėse ir vienoje Lietuvos konferencijose.

DARBO APIMTIS

Darbą sudaro santrumpos, įvadas, literatūros apžvalga, tyrimų objektas ir metodai, rezultatai, rezultatų aptarimas, išvados, mokslinių darbų sąrašas, padėka ir literatūros sąrašas. Darbe pateikiama 21 lentelė ir 12 paveikslų. Darbo apimtis – 138 puslapiai. Panaudota 270 literatūros šaltinių.

I. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Žiedinių augalų ABC(DE) žiedo raidos genetinis modelis

Žiedo formavimosi genetinis mechanizmas yra vienas iš geriausiai ištirtų ir intensyviausiai tebetiriamų augalų morfogenezės procesų (Theißen ir kt., 2000). Visos antžeminės augalo dalys, išskyrus magnolijainių skilčialapius, vystosi iš apikalinės stiebo meristemos, o augalui artėjant reprodukcinės fazės link, iš jos susidaro žiedynų ir žiedų meristemos, lemiančios žiedo organų užuomazgų iniciaciją (Riechmann ir Meyerowitz, 1997).

Tipinės struktūros žiedinių augalų žiedas yra sudarytas iš keturių tipų organų, aplink žiedo ašį išsidėstančių keturiais menturiais: pirmasis (išorinis) – taurėlapiai (varpinių augalų – žiedažvynis(-iai)), antrasis – vainiklapiai (varpinių augalų – lodikulės), trečiasis – kuokeliai, ketvirtasis (vidinis) – piestelė(-s). Remiantis modelinių augalų baltažiedžio vairo (*Arabidopsis thaliana* L.) ir didžiojo žioveinio (*Antirrhinum majus* L.) žiedo struktūros mutantų tyrimais, nustatyta, kad žiedo vystymąsi lemia hierarchiškai veikiančių genų reguliatorių deriniai (Theißen ir kt., 2000). Analizuojant žiedo raidos mutantus, buvo sukurtas ABCD žiedo raidos genetinis modelis, pagal kurį žiedo formavimąsi lemia trijų klasių žiedo homeozinių genų (A, B ir C) sąveika: A klasės genai lemia taurėlapių, (A+B) sąveika – vainiklapių, (B+C) sąveika – kuokelių, C klasės genai – piestelių menturio vystymąsi. Vairo A klasei priklauso *APETALA1* (*API*) (*A. majus* *SQUAMOSA* (*SQUA*) homologas) ir *APETALA2* (*AP2*) (*A. majus* *LIPLESS1,2* homologas), B klasei – *APETALA3* (*AP3*) ir *PISTILLATA* (*PI*) (atitinkamai, *A. majus* *DEFICIENS* (*DEF*) ir *GLOBOSA* (*GLO*) homologai), C klasei – *AGAMOUS* (*AG*) (*A. majus* *PLENA* homologas), D klasei – *SEEDSTICK* (*STK*), *SHATTERPROOF1* (*SHP1*) ir *SHP2* (Riechmann ir Meyerowitz, 1997).

Vėliau buvo identifikuoti ir E klasės genai, atsakingi už gemalinio maišelio formavimąsi: nustatyta, kad įvykus mutacijoms vairo *SEPALLATA1* (*SEP1*), *SEP2*, *SEP3* ir *SEP4* genuose, visi žiedo organai tampa panašūs į taurėlapius, todėl šie genai išskirti į atskirą E klasę, veikiančią visuose keturiuose žiedo menturiuose. Taigi, dabartinis žiedo vystymosi genetinis modelis teigia, jog (A+B+E) klasių genų sąveika lemia taurėlapių, (B+C+E) – kuokelių, (C+E) – piestelių, (D+E) – gemalinio maišelio vystymąsi. Šių genų mutacijos sukelia žiedo organų homeozes, kuomet vietoje vieno žiedo organų vystosi kiti (Theißen ir Saedler, 2001).

Nustatyta, jog kai kurie vairo žiedo meristemos tapatumo genai turi funkcinius homologus, pavyzdžiui, vairo turi du *API-like* genus *FRUITFULL* (*FUL*) ir *CAULIFLOWER* (*CAL*), kurie kartu su *API* dalyvauja žiedo meristemų formavimesi (Ferrandiz ir kt., 2000).

Visi aptarti žiedo raidos genai, išskyrus *AP2* ir jo homologus (pastarieji priskiriami AP2/EREBP šeimai), koduoja transkripcijos veiksnius (TV), N-gale turinčius MADS domeną (akronimas iš mielių **M**CM1, augalų **A**G ir **D**EF ir žmogaus **S**RF baltymų), skirtą sąveikai su DNR (Theißen ir kt., 2000). MADS domeną turintys TV yra paplitę augaluose, gyvūnuose ir grybuose (Riechmann ir Meyerowitz, 1997). Šie TV atpažįsta genuose-taikiniuose esančius CArG *cis*-elementus, kurių konsensus yra 5'-CC(A/T)₆GG-3' (Soltis ir kt., 2007).

Nustatyta, kad visų klasių žiedo raidos genų koduojami TV su DNR sąveikauja ne monomerų, o heterotetramerų (genų „kvartetų“) pavidalu, į kurių sudėtį į įeina bent vienas ar keli SEP baltymų subvienetai bei A, B, C ir/arba D genų klasių koduojami produktai. Konkretaus genų „kvarteto“ sudėtis priklauso nuo to, kuriame žiedo menturyje šis genų kvartetą veikia. Tokia žiedo organų determinacijoje dalyvaujančių MADS TV heterotetramerizacija stipriai padidina šio komplekso atrankumą genų-taikinių *cis*-elementams (Honma ir Gotto, 2000; Theißen, 2001; Theißen ir Saedler, 2001; Ferrario ir kt., 2003; Kaufmann ir kt., 2005; Zahn ir kt., 2005). Remiantis genų „kvarteto“ modeliu, du kiekvieno

tetramero dimerai vienu metu sąveikauja su dviem toje pačioje DNR grandinėje esančiais geno-taikinio promotoriaus *cis*-elementais (CArG sekomis) ir juos fiziškai suartina (Theißen ir Saedler, 2001). Neseniai parodyta, jog *Arabidopsis SEP1-4* genų produktų funkcijos nėra visiškai persidengiančios: skirtingi *SEP* genai atpažįsta panašius, tačiau ne identiškus genus-taikinius, tarpusavyje besiskiriančius ne tik *cis*-reguliaciniuose regionuose esančių CArG sekų išsidėstymu, bet ir santykiniu atstumu tarp jų (Jetha ir kt., 2014).

Nors ABC(DE) žiedo raidos genetinis modelis buvo sukurtas remiantis magnolijainių klasės augalų (*Arabidopsis*, *Antirrhinum*) žiedo struktūros mutantų analize, šis modelis vėliau sėkmingai pritaikytas ir lelijainių klasės miglinių šeimos modeliniams augalams (*Oryza sativa* L., *Zea mays* L. ir *Triticum aestivum* L.), nors jų žiedo struktūra, palyginti su magnolijainių klasės atstovais, yra stipriai divergavusi. Migliniams augalams būdingi sudėtiniai žiedynai, sudaryti iš unikalios struktūros monomerų – varpučių (Schmidt ir Ambrose, 1998). Paprastesnius žiedynus turinčių miglinių šeimos Triticeae tribos augalų (kviečio, miežio, rugio, kvietrugio) žiedyno vystymasis susideda iš kelių stadijų: pirma, susiformuoja žiedyno meristema, iš kurios vystosi pažastinė varputės meristema; vėliau iš varputės meristemos formuojasi žiedo meristema, inicijuojanti žiedo organų užuomazgų raidą (Murai ir kt., 2002; Shitsukawa ir kt., 2006). Sudėtingesnius žiedynus turinčių miglinių augalų (kukurūzo ir ryžio) žiedyno raida kompleksiškesnė, nes žiedyno formavimuisi reikalingos pažastinės šakojimosi meristemos: kukurūzuose tai atlieka vyriškųjų žiedynų (šluotelių) šakojimosi ir varpučių poros meristema, ryžiuose – šluotelės šakojimosi meristema (Shitsukawa ir kt., 2006; Ciaffi ir kt., 2011).

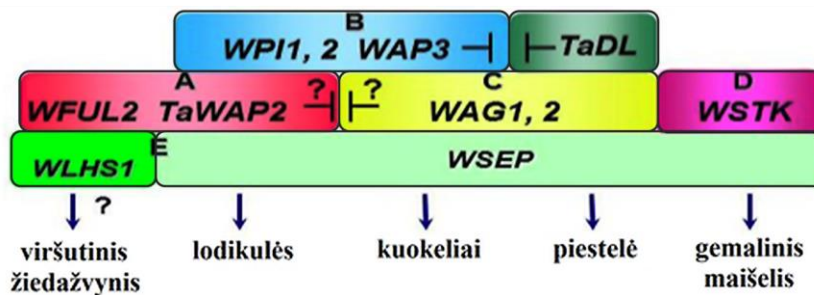
Kiekvieną Triticeae tribos augalų varputę iš apačios dengia dvi pažiedę sudarančios lancetiškos lapinės struktūros – varpažvyniai, virš kurių išsidėsto pora kiekvieno žiedo reprodukcinis organus apsupančių lapelių pavidalo organų – apatinis ir viršutinis žiedažvyniai. Nepaisant išorinio panašumo, abu žiedažvyniai yra skirtingos kilmės: apatinis žiedažvynis dengia pažastinę varputės meristemą,

turi akuotą ir kartu su varpažvyniais yra tradiciškai priskiriamas pažiedei, o viršutinis žiedažvynis yra pirmasis lapelis, susiformuojantis iš varputės meristemos (Kellogg, 2001). Nors skirtingą abiejų žiedažvynių kilmę atspindi ir jų morfologijos skirtumai (viršutinis žiedažvynis, priešingai nei apatinis, yra susidaręs susiliejus dviem apyžiedžio išorinio rato lapeliams, taip pat jie skiriasi savo dydžiu, indų kūlelių skaičiumi, jų išsidėstymu), naujausi molekuliniai tyrimai verčia tuo abejoti: ryžio žiedo raidos mutantų tyrimai atskleidė, jog viršutinis žiedažvynis, išskyrus jo marginalinę zoną, laikytinas diferencijuotu apatinio žiedažvynio variantu, t.y. abu žiedažvyniai galėtų būti traktuojami kaip taurėlapių, o ne pažiedės modifikacija (Lombardo ir Yoshida, 2015). Pavienį Triticeae tribos augalų žiedą sudaro dvi lodikulės, trys kuokeliai ir viena piestelė su dviem plunksniškėmis purkomis. Lodikulės yra prisitvirtinusios tarp viršutinio žiedažvynio ir piestelės ir genetiniu aspektu yra homologiškos vainiklapiams (Yoshida, 2012).

Kaip minėta, ABC(DE) žiedo raidos modelis buvo sėkmingai pritaikytas ir migliniams augalams, tarp kurių yra pagrindinės maistui ir pašarams vartojamos grūdinės kultūros (ryžiai, kviečiai ir kukurūzai): šiuose augaluose identifikuoti visų penkių *A. thaliana* žiedo raidą lemiančių genų klasių (A, B, C, D ir E) homologai, taip pat priklausantys MADS domeną turinčių TV grupei (Murai, 2013). Iš miglinių šeimos augalų šiuo metu geriausiai ištirta kviečio ir ryžio žiedo raidos genetika.

Nustatyta, kad kviečiai turi tris A klasei priskiriamus vairo *API/FUL-like* paralogus – *wheat FRUTFUL1/VERNALIZATION1 (WFUL1/VRN1)*, *WFUL2* ir *WFUL3*, tačiau *WFUL1/VRN1* genas funkcionuoja ne kaip A klasės genas, o yra svarbus pereinant iš vegetatyvinės fazės į generatyvinę (Litt ir Irish, 2003) (1 pav.). Kviečio B klasei atstovauja vairo *AP3* ortologui homeologiniai genai *TaMADS#51* ir *TaMADS#82* bei vairo *PI* geno ortologai *wheat P11 (WP11)* ir *WP2* (Hama ir kt., 2004). Kviečiuose nustatyti bent du C klasės genai *wheat AG1 (WAG1)* ir *WAG2*, kurie yra vairo *AG1* ortologai (Meguro ir kt., 2003;

Hirabayashi ir Murai, 2009). Ieškant kviečio D klasės genų, nepriklausomi tyrimai leido identifikuoti net penkis ortologinius kandidatus – *Triticum aestivum* *AGAMOUS-3A* (*TaAGL3A*), *TaAG-3B*, *TaAG-LIKE2* (*TaAGL2*), *TaAGL9* ir *TaAGL31* (Zhao ir kt., 2006; Paolacci ir kt., 2007), tačiau išsamesni tyrimai parodė labai didelę šių ortologų tarpusavio homologiją (kai kuriais atvejais sekos pasirodė esančios identiškoms), todėl dabar visi penki ortologai laikomi tuo pačiu *wheat SEEDSTICK* (*WSTK*) genu, ortologišku vairo *STK* genui (Yamada ir kt., 2009). Ieškant kviečio E klasės atstovų, buvo nustatyti net šeši genai – du vairo *SEP* homologai *wheat SEPALLATA* (*WSEP*) ir *wheat LEAFY HULL STERILE 1* (*WLHS1*) (Shitsukawa ir kt., 2007) bei keturi tarpusavyje homeologiniai vairo *AGL6* (*AGAMOUS-LIKE 6*) geno ortologai *TaAGL6-1A/TaAGL37*, *TaAGL6-1B/TaMADS#MADS12*, *TaAGL6-1C* ir *TaAGL6* (Murai ir kt., 1998; Zhao ir kt., 2006; Paolacci ir kt., 2007). Įdomu, jog kai kurie miglinių šeimos augalų E klasės genai įgijo naujų šios klasės genams nebūdingų savybių, pavyzdžiui, stipri *WSEP* geno raiška trijuose išoriniuose kviečio žiedo ratuose būdinga ne tik žiedo organų diferenciacijos stadijoje, tačiau išlieka ir viršutiniame žiedažvinyje. Tai rodo šio geno reikšmę ne tik žiedo organų determinacijai, bet ir tolimesnei išorinio rato žiedo organų diferenciacijai (Murai, 2013).



1 pav. Žiedo raidos ABC(DE) genetinis modelis, apibendrinantis kviečio žiedo organų determinacijoje dalyvaujančius genus ir jų tarpusavio sąveikas (pagal Murai, 2013)

Akivaizdus daugelio kviečio žiedo raidos genų pertekliškumas neabejotinai yra susijęs su aloheksaploidine šios rūšies genomo sandara, tačiau dar didesnis

daugelio klasių žiedo raidos genų skaičius yra būdingas ryžio genomui. Ryžiuose nustatyti net šeši A klasės genai – trys vairo AP1 homologai *OsMADS14/RAP1B*, *OsMADS15/RAP1A* ir *OsMADS18* (Litt ir Irish, 2003), bei trys vairo AP2 homologai *SUPERNUMERARY BRACT (SNB)*, *INDETERMINATE SPIKELET 1 (OsIDS1)* ir *MULTI-FLORET SPIKELET 1 (MFS1)* (Lee ir An, 2012; Ren ir kt., 2013), trys B klasės genai – *OsMADS16/SUPERWOMAN1 (SPW1)* (vairo AP3 homologas), *OsMADS2* ir *OsMADS4* (vairo PI homologai) (Chung ir kt., 1995; Nagasawa ir kt., 2003), du C klasės genai – *OsMADS3* ir *OsMADS58* (vairo AG homologai) (Yamaguchi ir kt., 2006), vienas D klasės genas *OsMADS13* (vairo STK homologas) (Lopez-Dee ir kt. 1999), net septyni E klasės genai – *OsMADS7/OsMADS45*, *OsMADS8/OsMADS24* (vairo SEP homologai), *OsMADS1/LHS1*, *OsMADS5/OSM5* ir *OsMADS34/PANICLE PHYTOMER 2 (PAP2)* (vairo SEP genams gimininga LOFSEP klada), *OsMADS6/MOSAIC FLORAL ORGANS 1 (MFO1)* ir *OsMADS17* (homologiškai kviečio *TaAGL6*) (Malcomber ir Kellogg, 2005; Ohmori ir kt., 2009; Li ir kt., 2010; Christensen ir Malcomber, 2012)

Nepaisant didelio kviečio ir miežio žiedyno struktūros panašumo, žinios apie pastarųjų žiedo raidos genetinės kontrolės mechanizmus vis dar tebėra labai fragmentiškos.

1.2. Augalų homeoseką (HD) turintys genai

Augalų organų transformacijos fenomenas žinomas jau bent kelis šimtus metų – augalo organų transformacijas vienas iš pirmųjų dar XVIII a. aprašė J. W. Goethe savo traktate „*Versuch die Metamorphose der Pflanzen zu erklären*“ (Goethe, 1790), pavadindamas šį reiškinių metamorfoze. Kadangi kitose biologijos šakose (tokiose, kaip zoologija) šis terminas jau buvo naudojamas kitiems procesams apibūdinti, beveik po šimto metų W. Bateson pasiūlė terminą

„homeozė“, reiškiantį vienos kūno dalies transformaciją į homologinę struktūrą kitame kūno segmente (Bateson, 1894). Vaisinių muselių homeozijų molekulinės priežastys buvo išaiškintos dar po beveik šimto metų, apie 1980 m., kai W. J. Gehring surado vaisinių muselių mutantus *bithorax (bx-c)*, *fushi tarazu (ftz)* bei *Antennapedia (Ant-C)* ir nustatė, jog visi šie genai turi 3'-gale lokalizuotą 180 bp ilgio seką, koduojančią homeodomeną (HD), būdingą ir daugelio kitų organizmų raidoje dalyvaujančių homeozinių genų (Gehring ir Hiromi, 1986). Augaluose homeoseka pirmą kartą nustatyta panaudojant *A. thaliana* cDNR biblioteką (Ruberti ir kt., 1991).

HD genai koduoja didelę grupę transkripcijos veiksnių, turinčių 60 aminorūgščių ilgio homeodomeną, sudarytą iš trijų α -spiralių, iš kurių antroji ir trečioji formuoja spiralė-posūkis-spiralė (angl. *helix-turn-helix*, *HTH*) motyvą, dalyvaujantį sąveikoje su DNR (Gehring, 1998).

Remiantis augalų genomų sekvenavimo rezultatais, šiuo metu išskiriama bent keturiolika augalų HD genų klasių, kurios yra aptinkamos žiediniuose augaluose, pataisūnuose (*Selaginella moellendorffii* Hieron.) ir samanose, taigi manytina, kad šie genai buvo būdingi jau samanų ir induočių augalų bendram protėviui.

HD genai yra skirstomi priklausomai nuo HD sekos varianto, turinčio lemiamos reikšmės HD baltymų sąveikai su DNR. Augalų TALE superšeimai priskiriamos KNOX ir BEL šeimos. Abi šeimos turi TALE tipo HD, kuris nuo kanoninio 60 aminorūgščių turinčio HD skiriasi trimis papildomomis aminorūgštimis tarp 1 ir 2 α -spiralių (Bertolino ir kt., 1995; Bürglin, 1997). KNOX ir BEL šeimos laikomos seniausiomis iš visų HD genų šeimų, nes jų genai aptinkami jau vienaląsčiuose žaliadumbliuose ir raudondumbliuose, tačiau kai kurių pataisų ir dumblių TALE superšeimos genai išskirtiniai, jų negalima priskirti nei KNOX, nei BEL šeimoms (Mukherjee ir kt., 2009).

KNOX šeimos genai pagal sekos panašumą ir raiškos pobūdį skirstomi į KNOX I ir KNOX II klases (Kerstetter ir kt., 1994; Hay ir Tsiantis, 2010), kuriose

pagal turimų kodomenų struktūrą išskiriama po du poklasius (KNAT 2/6 ir KNAT1 poklasiai KNOX I klasėje, KNAT7 ir KNAT3/4/5 poklasiai KNOX II klasėje). Visų KNOX genų poklasių, išskyrus vairo SHOOT MERISTEMLESS (*STM*) genus, atstovai yra aptinkami tiek migliniuose augaluose, tiek įvairiuose magnolijainiuose, taigi šių pošeimių KNOX genai turėjo atsirasti žiedinių augalų protėvyje dar prieš diverguojant atskiriems magnolijūnų klasės poklasiams (Mukherjee ir kt., 2009). Nustatyta, kad augalų KNOX domeno seka yra panaši į gyvūnų TALE superšeimos genų MEIS ir PBC domenų sekas, todėl buvo pasiūlyta, kad augalų KNOX ir gyvūnų MEIS/PBC domenai yra kilę iš vieno bendro protėvio, MEINOX domeno (Bürglin, 1997; Bürglin, 1998; Magnani ir Hake, 2008).

Miežio *BKn3* (*Barley Knox 3*) genas yra priskiriamas TALE (angl. *Three Amino Acid Loop Extension*) superšeimos *Knox* genų šeimai, I klasei, kuriai priklausantys genai dalyvauja meristemų formavimesi, diferenciacijoje ir su organogeneze susijusiuose procesuose apikaliniuose augalo audiniuose (Scofield ir Murray, 2006; Hay ir Tsiantis, 2010).

1.3. KNOX genų sąsajos su fitohormonų signaliniais keliais

Jau daugiau nei prieš šimtą metų nustatyta, jog tam tikro fenotipo atsiradimas yra individualaus genotipo ir aplinkos veiksnių sąveikos rezultatas (Garrod, 1902). Ilgamečiai augalų tyrimai parodė, kad žiedo/žiedyno organų raidos variacijai didelės įtakos gali turėti išoriniai veiksniai, tokie, kaip aplinkos temperatūra ir fotoperiodas (Bonnett, 1966; Yagil ir Stebbins, 1969) bei patogenų sukeltos infekcijos (Ghareeb ir kt., 2011), tačiau dažniausiai minėtos žiedo/žiedyno organų vystymosi variacijos atsiranda dėl mutacijų žiedo meristemų vystymąsi ir organų identitetą lemiančiuose genuose, o taip pat genuose, susijusiuose su auksino signalo perdavimu ir transportu. Didžiausi ir dažniausiai pasitaikantys varpinių augalų žiedo/žiedyno vystymosi sutrikimai būdingi dvigubiems (taip pat

trigubiams ir keturgubiams) mutantams ir hibridams (Ambrose ir kt., 2000; Ikeda ir kt., 2007; Thompson ir kt., 2009; Yoshida ir Nagato, 2011; Lee ir An, 2012; Gallavotti, 2013), nors į tyrimus įtraukus didesnę mutantų skaičių nustatyta, kad drastiškos fenotipo variacijos būdingos tik daliai viengubų ir dvigubų mutantų ir hibridų (Babb ir Muehlbauer, 2003; Dreni ir kt., 2011; Li ir kt., 2011).

Fenotipo variacijos priežastys gali būti įvairios: jos gali atsirasti dėl auksino ir *KNOX* (angl. *Knotted1-like Homeobox*) šeimos *Kn1* geno bei kitų homeozinių genų, dalyvaujančių apikalinių meristemų palaikyme ir specializuotų meristemų diferenciacijoje, sąveikos, taip pat dėl susidariusių ektopinių auksino koncentracijos pikų sąveikos su *KNOX* genų moduliais bei dėl sutrikusios lateralinių augalo organų ir tarpų tarp jų iniciacijos (McSteen ir Leyser, 2005; Hay ir Tsiantis, 2010; Müller ir Leyser, 2011; Tvorogova ir kt., 2013). Nustatyta, jog kukurūzo *Kn1* genas tiesiogiai reguliuoja hormonų signalinio kelio genus, o *Kn1* baltymas jungiasi beveik prie pusės kukurūzo genome anotuotų *AUX-IAA* (angl. *Auxin-Indole-3-Acetic Acid*) ir *ARF* (angl. *Auxin Response Factor*) genų (Bolduc ir kt., 2012). Tyrimai parodė, jog *KNOX* genų raišką augalo lateralinių organų užuomazgose neigiamai reguliuoja auksinas (Scanlon ir kt., 2002; Hay ir Tsiantis, 2010; Tabata ir kt., 2010): *KNOX* genų raiška reaktyvinama vystantis atskiriems *Cardamine hirsuta* L. ir pomidoro sudėtinių lapų lakšteliams, tačiau kartu su *KNOX* genų ir auksino sąveika, vykstančia periferinėje stiebo apikalinės meristemos dalyje, stebima sumažėjusi *KNOX* genų raiška sudėtinių lapų užuomazgų pakraščiuose, leidžianti *PINFORMED1* (*PIN1*) auksinų įnešikliams suformuoti lokalius auksino koncentracijos maksimumus, sukeliančius sudėtinio lapo lakštelių iniciaciją (Barkoulas ir kt., 2008; Hay ir Tsiantis, 2010; Scarpella ir kt., 2010). Nustatyta, kad ektopinę *KNOX* genų raišką gali nuslopinti egzogeninis auksinas, kuris, be to, atstato sudėtinių lapų fenotipą *C. hirsuta pin1* mutantams, turintiems paprastuosius (nesudėtinius) lapus (Barkoulas ir kt., 2008).

Daugelis tyrimų rodo, kad *KNOX* genų hiperekspresija augaluose sukelia ektopinį fitohormonų (tarp jų ir auksino) koncentracijos pokyčių atsiradimą,

lemiantį įvairius augalo vystymosi sutrikimus (Chow ir McCourt, 2004; Scarpella ir kt., 2010; Tabata ir kt., 2010; Rast ir Simon, 2012). Vis dėlto, *KNOX* genų vaidmuo pirminėje ir antrinėje lapo morfogenezeje nėra iki galo išaiškintas (Koenig ir kt., 2009).

Tiesioginių auksino poveikio miežio *BKn3* geno fenotipiniam pasireiškimui tyrimų nėra, nors yra nustatyta, jog šio geno IV introne esančioje 305 bp duplikacijoje, lemiančioje *Hv-Hooded* fenotipo atsiradimą, yra bent keturi reguliaciniai *cis*-elementai, galintys tiesiogiai sąveikauti su transkripcijos veiksniais (Santi ir kt., 2003). Iki šiol toks su *BKn3* geno IV intronu susijęs reguliacijos tipas parodytas tik fitohormono etileno atsako baltymams (Osnato ir kt., 2010), tačiau šis faktas neatmeta tikimybės, jog *BKn3* geno IV introne esantys *cis*-elementai gali analogiškai sąveikauti ir su kitų fitohormonų, tarp jų ir auksino, atsako baltymais.

Eksperimentais nustatyta, kad miežio BBR (angl. *Barley B Recombinant*) baltymas gali tiesiogiai sąveikauti su *BKn3* IV introno ketvirtajame *cis*-elemente esančiais (GA)₈ pasikartojimais, o BBR baltymo hiperekspresija heterologinėje tabako sistemoje sukelia lapų ir žiedų morfologijos pakitimus – vainiklapių, taurėlapių ir lapų ištiesimą (Santi ir kt., 2003). Neseniai parodyta, kad GRF (angl. *Growth-Regulating Factor*) šeimai priklausantis miežio augimą reguliuojantis BGRF1 veiksnys veikia kaip *BKn3* geno IV introno represorius, o GRF šeimos *Arabidopsis* augimo veiksniai AtGRF4, 6 ir 7 (angl. *Arabidopsis thaliana Growth-Regulating Factor*) geba slopinti *Arabidopsis KNOX* šeimos *KNAT2* (angl. *Knotted-like from Arabidopsis thaliana2*) geno promotoriaus aktyvumą (Kuijt ir kt., 2014). Toks reguliavimo principas yra panašus į auksinų sąveiką su *KNOX* šeimos genais, be to, GRF šeimos baltymų sąveika su intronuose esančiais *cis*-elementais varpiniuose augaluose gali būti plačiai paplitęs reiškinys: *BKn3* geno IV introno ortologai randami ir kituose migliniuose augaluose, tokiuose, kaip kukurūzai, kviečiai ir ryžiai (Takumi ir kt., 2000). Tiriant ryžius nustatyta, jog ryžio *KNOX* šeimos *OSHI* genas, kuris yra miežio *BKn3* IV introno ortologas, turi

7 *cis*-elementus, svarbius tiek autoreguliacijai, tiek ir kitų genų raiškos reguliavimui (Tsuda ir kt., 2011), o ryžio OsGRF3 ir OsGRF10 baltymai gali sąveikauti su kitu ryžio *KNOX* šeimos *OsKn2* genu (Kuijt ir kt., 2014).

Neseniai nustatyta, kad miežio laukinio tipo *bkn3* geno IV introne yra 13 konservatyvių nekoduojančių sekų (angl. *Conserved noncoding sequence, CNS*), kurios taip pat gali būti laikomos reguliaciniais *cis*-elementais ir yra atitinkamų kukurūzo ir ryžio *KNOX* genų intronų ortologai (Inada ir kt., 2003). Be to, parodyta, jog 13,9 % fitohormonų signalinio kelio ir hormoninio atsako genų turi CNS (Hettiarachchi ir kt., 2014).

Dvigubų mutantų fenotipo nestabilumas gali būti nulemtas ne tik lokalių ektopinio auksino koncentracijos padidėjimo ar sumažėjimo bei sutrikusios žiedo organų tapatumo genų raiškos, bet ir dėl intensyvesnio meristeminių ląstelių dalinimosi po jų epigenetinio perprogramavimo ir diferenciacijos, kuomet vyksta chromatinio architektūros pokyčiai sąveikaujant auksino signalo perdavimo bei chromatinio remodeliavimo sistemų komponentams (Murfett ir kt., 2001; Fukaki ir kt., 2006; Szemenyei ir kt., 2008; Anzola ir kt., 2010; Iwasaki ir kt., 2013; Nguyen ir kt., 2013). Ši prielaida gali būti patikrinta palyginus viengubų ir dvigubų mutantų žiedyno variacijos skirtumus su meristeminių ląstelių augimo intensyvumu kaliaus kultūrose. LoSchiavo su kolegomis (1989) bei Arnholdt-Schmitt (1993) parodė, kad morkos ląstelių kultūrose pasireiškia egzogeninio auksino indukuojamas greitas DNR hipermetilinimas. Savo darbe išbandėme histonų deacetilazių inhibitoriaus HC toksino poveikį miežio viengubų ir dvigubų mutantų kaliaus kultūrų augimui. HC toksinas yra ciklinis tetrapeptidas, kurį sintetina kai kurios kukurūzus parazituojančio mikrofilamentinio grybo *Cochliobolus carbonum* R. R. Nelson (*Helminthosporium carbonum*) padermės (Walton, 2006), tyrimuose gali būti naudojamas kaip stresą sukeliantis veiksnys, nes šiam grybui artima rūšis *C. sativus* (Sacc.) Shoem. yra vienas svarbiausių miežio parazitų (Ghazvini ir Tekauz, 2012). Be to, HC toksinas yra epigenetiniuose procesuose dalyvaujančių histonų deacetilazių (HDAC)

inhibitorius (Walton, 2006), o jo sukeliamas poveikis kaliaus ląstelių kultūroms (Grant-Downton ir Dickinson, 2006) gali netiesiogiai atspindėti epigenetinių procesų reikšmę meristeminių ląstelių augimo skirtumams atsirasti.

1.4. Fitohormono etileno reikšmė augalų reprodukcinei funkcijai

Etilenas dalyvauja daugelyje augalų augimo ir vystymosi procesų, pradedant gametofito ir sėklos vystymusi, dygimu bei daigo augimu, baigiant augalų lyties determinacija, žiedo vystymusi ir žydėjimu, vaisių nokimu, augalo audinių senėjimu, programuota ląstelių žūtimi bei atsakais į abiotinį ir biotinį stresus (Rzewuski ir Sauter, 2008; Lin ir kt., 2009; Stepanova ir Alonso, 2009; Shakeel ir kt., 2013). Nepaisant ilgamečių etileno poveikio augalų fiziologiniams procesams ir vystymuisi tyrimų, šio fitohormono vaidmuo žiedo organogenezėje, ypač varpinių augalų, iki šiol nėra visiškai išaiškintas (Ogawa ir kt., 2007; Lin ir kt., 2009; Chandler, 2011).

Kaip minėta, etileno signalinio kelio komponentai dalyvauja įvairiuose augalų reprodukciniuose procesuose. Nustatyta, jog vienas iš žiedo organų tapatumo genų *APETALA2* (*AP2*) turi du BERF (angl. *Ethylene-Responsive Element Binding Factor*) domenus (Jofuku ir kt., 1994) ir reguliuoja kai kurių kitų žiedo homeozinių genų, tarp kurių yra *AGAMOUS* (*AG*) (Ogawa ir kt., 2007; Krogan ir kt., 2012), *APETALA3* (*AP3*), *PISTILLATA* (*PI*) ir *SEPALLATA3* (*SEP3*) (Krogan ir kt., 2012), raišką. Kitą žiedo homeozinį geną *API* aktyvina etileno atsako veiksnys ERF110 (angl. *Ethylene Response Factor 110*) (Zhu ir kt., 2013), o žiedo organų tapatumo genas *AP3* reguliuoja nuo etileno priklausomą agurkų moteriškosios lyties žiedų determinaciją (Wang ir kt., 2010a).

Tyrimai parodė, kad etileno receptoriaus *ETR2* geno raiška *Arabidopsis* žiedyno ir žiedo meristemose, besivystančiuose vainiklapiuose ir sėklapradžiuose yra intensyvesnė nei kituose audiniuose ir organuose (Sakai ir kt., 1998), o meliono mutantinio etileno receptoriaus *CmETR1/H69A* geno įterpimas į

Nicotiana tabacum genomą sukelia kuokelių vystymosi sutrikimus bei modifikuoja žiedo architektūrą (Takada ir kt., 2005). Taip pat nustatyta, jog žydėjimo metu vyksta ženklus etileno sintezės suaktyvėjimas *Petunia* (Tang ir kt., 1994) ir *Prunus domestica* (Fernández-Otero ir kt., 2006) augaluose. Šie faktai suponuoja galimą etileno svarbą augalų žiedo/žiedyno vystymuisi, be to, etileno poveikis atskirų žiedo organų raidai taip pat nėra visiškai ištirtas: didžiausias dėmesys skiriamas etileno poveikiui augalų žydėjimo laiko reguliavimui (Achard ir kt., 2007; Lin ir kt., 2009; Trivellini ir kt., 2011; Morita ir kt., 2012; Zhu ir kt., 2013; Shahri ir Tahir, 2014), fotoperiodizmui (Kęsy ir kt., 2008), vainiklapių augimui ir ilgėjimui (Lin ir kt., 2009; Luo ir kt., 2013; Pei ir kt., 2013), lyties reguliacijai (Wang ir kt., 2010a; Manzano ir kt., 2013) ir žiedų senėjimui (Reid ir Wu, 1992; Müller ir kt., 2002; Nukui ir kt., 2004; Wagstaff ir kt., 2005; Lin ir kt., 2009; Trivellini ir kt., 2011; Ichimura ir Niki, 2014; Shahri ir Tahir, 2014), tačiau didžioji dalis šių tyrimų atliekama su *Arabidopsis* ir kitais dviskilčiais augalais, kadangi didelė dalis ekonomiškai svarbių dekoratyvinių augalų yra dviskilčiai, be to, kai kurie iš jų yra didelės apimties biotechnologinių projektų objektai (Kinouchi ir kt., 2006; Serek ir kt., 2006; Morita ir kt., 2012; Wang ir kt., 2013).

Žydėjimo pradžios laikas ir žydėjimo trukmė gali būti reguliuojama egzogeniniu etilenu (Nukui ir kt., 2004; Trivellini ir kt., 2011), taip pat veikiant augalą tokiais etilenu išskiriančiais junginiais, kaip etefonas (Crisosto ir kt., 1989; Serek ir kt., 2006; Liu ir Chang, 2011), bei naudojant etileno inhibitorius (Reid ir Wu, 1992; Wagstaff ir kt., 2005; Trivellini ir kt., 2011). Nors žydėjimo laiko ir fotoperiodizmo reguliavime dalyvauja ne organų tapatumo, o kitų specifinių grupių genai, parodyta, kad tiek dviskilčių, tiek vienaskilčių augalų žydėjimo laiką lemiančių genų raiškos reguliavimui svarbus etilenas (Wuriyangan ir kt., 2009; Morita ir kt., 2012; Wang ir kt., 2013).

Žinių apie etileno veikimą varpiniuose augaluose stygius ir fragmentiškumas rodo ir tai, kad etileno vaidmuo šios augalų grupės žiedo/žiedyno organų raidos reguliavime gali būti labai savitas dėl miglinių

šeimos atstovams būdingų išskirtinių žiedo/žiedyno morfologijos ypatumų: šiems augalams būdingos sudėtinės varpos, sudarytos iš įvairių žiedų skaičių turinčių varpučių, kurios turi savitus tik miglinių šeimai būdingus organus – varpažvynius, žiedažvynius ir lodikules (Forster ir kt., 2007). Nors etileno poveikio varpinių augalų vystymuisi tyrimai dažniausiai apsiriboja minėtomis reprodukciniomis struktūromis, negausūs tyrimai apžvelgia ir etileno poveikį kitų varpinių augalų organų vystymuisi, tarp jų ir kviečio lapams (Banowetz, 1993), miežio žiedažvynių suaugimui su grūdu (Taketa ir kt., 2008), ryžio tarpubamblių ilgėjimui (Qi ir kt., 2011), *Lolium temulentum* L. ląstelių sienelių degradavimui ir senėjimo procesams (Halgren ir Banowetz, 2012), ryžio daigų šaknelių ir grūdų vystymuisi (Ma ir kt., 2013). Tyrimai taip pat parodė, kad etilenas yra svarbus ryžio žydėjimo laiko kontrolei (Wuriyangan ir kt., 2009), kviečio plaukėjimo reguliavimui (Banowetz, 1993) ir miežio krūmijimuisi (Lauer, 1991), taip pat ryžio šluotelių šakojimuisi (Ma ir kt., 2013). Ženklus endogeninės kilmės etileno ir jo pirmtako ACC (1-aminociklopropano-1-karboksirūgšties) koncentracijos padidėjimas ryžio šluotelės apatinėse varputėse, palyginti su anksčiau žydinčiomis viršutinėmis, rodo galimą etileno vaidmenį varpučių vystymosi laiko reguliavimui (Yang ir kt., 2006).

Nustatyta, jog miežio homeozinių mutantų, kurių akuotai dėl *KNOX/KNAT* šeimos *BKn3* geno IV introne atsiradusios didelės 305 bp duplikacijos yra įvairiu laipsniu transformuoti į ektopinius žiedus (Müller ir kt., 1995), mutantinis *Hv-Hooded/Kap1* fenotipas gali būti iš dalies nuslopintas etileno pirmtaku etefonu. Minėtą mutantinio fenotipo supresiją lydi etileno atsako genų *BERF1* (angl. *Barley Ethylene Response Factor 1*) ir *BEIL1* (angl. *Barley Ethylene Insensitive Like 1*), koduojančių transkripcijos veiksnius, sąveikaujančius su *BKn3* geno IV introne esančiais reguliaciniais elementais, raiškos sustiprėjimą (Osnato ir kt., 2000). Taip pat nustatyta, jog *KNOX/KNAT* šeimos genų sąveika su etilenu yra svarbi varpinių augalų žiedyno (varpos), varputės ir žiedo organų meristemų reguliavimui (Hamant ir kt., 2002; Hay ir kt., 2004).

1.5. Aukso vaidmuo žiedo organų determinacijoje

Auksinas yra svarbus daugeliui augalo augimo ir raidos procesų reguliuoti. Šio fitohormono vaidmenį augalo morfogenezei išaiškinti padėjo genetinė ir molekulinė aukso funkcijos mutantų analizė ir aukso polinio transporto inhibitorių bei aukso antagonistų poveikio tyrimai, parodę, kad auksinas veikia kaip augalų morfogenas (Benkova ir kt., 2009). Tyrimai atskleidė, kad aukso susikaupimas stiebo apikalinės meristemos periferinėse ląstelėse yra kritiškai svarbus augalo lapų ir žiedo užuomazgų susidarymui (Reinhardt ir kt., 2000). Be to, auksinas reguliuoja ir daugelį kitų žiedo raidos įvykių, įskaitant žiedo organų iniciaciją, augimą ir išsidėstymą (Cheng ir Zhao, 2007; Sundberg ir Ostergaard, 2009). Daugeliui aukso biosintezės, transporto ir signalinio kelio mutantų būdingi įvairūs žydėjimo sutrikimai, iš kurių charakteringiausi yra žiedo organų skaičiaus ir tarpų tarp atskirų žiedo organų pokyčiai bei piestelės morfologijos anomalijos (Krizek, 2011).

Vykstant augalo reprodukciniams vystymuisi, inicijuojamas žiedyno meristemos susidarymas, o vėliau šios meristemos periferinėje zonoje dėl suintensyvėjusios aukso biosintezės bei kryptingos pernašos periodiškai susidaro lokali aukso sankaupos (aukso koncentracijos maksimumai), žyminčios žiedo meristemų susidarymo vietas (Reinhardt ir kt., 2003; Heisler ir kt., 2005; Cheng ir kt., 2006). Nustatyta, kad žiedyno ir žiedo meristemose yra aktyvi genų, koduojančių aukso biosintezės fermentus, raiška, lemianti aukso koncentracijos padidėjimą šiose srityse (Cheng ir kt., 2006; Stepanova ir kt., 2008). Vairenio aukso persikirstymui atskirose žiedyno ir žiedo meristemų zonose taip pat svarbūs ir ląstelių membranose poliškai išsidėstę aukso įnešikliai AUX1 (AUXIN1) ir LAX1,2,3 (LIKE AUX1 1,2,3) (Bainbridge ir kt., 2008) bei aukso išnešikliai PIN (PIN-FORMED) (Reinhardt ir kt., 2003).

Auksino svarbą žiedo meristemų iniciacijai akivaizdžiai parodo nuslopinta vairo *pin* mutantų, kuriuose yra sutrikusi auksino pernaša, žiedo iniciacija: šie mutantai sudaro žiedų neturinčius smeigtuko (angl. *pin*) pavidalo žiedynus, o tokį mutantinį fenotipą atstato egzogeninis auksinas (Okada ir kt., 1991; Reinhardt ir kt., 2000). Taigi, stiprūs auksino funkcijos trikdžiai dažniausiai visiškai sustabdo žiedų susidarymą, nors daugelis auksino biosintezės, pernašos ir signalinio kelio mutantų prieš visišką reprodukcinės raidos nuslopinimą vis dėlto sugeba sudaryti pavienius nenormalios struktūros žiedus (Krizek, 2011). Nustatyta, kad mutacijos vairo auksino pernašos baltymus koduojančiuose genuose (*PIN-FORMED*, *PINOID*) lemia pavienių žiedų, turinčių mažiau taurėlapių, kuokelių ir mezginės lizdų, bet daugiau taurėlapių, susidarymą (Bennett ir kt., 1995), o mutacijos įvairiuose auksino biosintezės fermentus koduojančiuose genuose (vairo *YUCCA*, petunijos *FLOOZY*) dažniausiai lemia drastišką žiedo organų skaičiaus sumažėjimą (Tobena-Santamaria ir kt., 2002; Cheng ir kt., 2006). Ryškus žiedo organų skaičiaus sumažėjimas auksino biosintezės mutantuose galimai rodo, kad didžiojoje dalyje žiedo meristemos ląstelių auksino koncentracija yra žemiau slenkstinės vertės, reikalingos žiedo užuomazgos iniciacijai ir augimui. Šių mutantų pavieniai žiedai gali susidaryti dėl retsykliais atsirandančių kritinę slenkstinę vertę viršijančių auksino sankaupų, kurių pakanka žiedo organų iniciacijai, tačiau tokio auksino koncentracijos gradiento orientacija žiedo meristemoje yra atsitiktinė, o tai lemia šių mutantų žiedo organų tapatumo, pozicijos ir skaičiaus pokyčius (Krizek, 2011).

1.6. VU Botanikos sodo miežio mutantų, revertantų, genetinių linijų, veislių ir hibridų kolekcija

Miežio genetinė kolekcija pradėta kaupti 1975 m., Botanikos sode įkūrus Augalų genetikos skyrių. Pirmieji šios kolekcijos mutantai buvo cheminės mutagenozės būdu iš lietuviškos veislės 'Auksiniai II' gauti originalūs kiekybiniai,

morfologiniai ir chlorofiliniai miežio mutantai bei vėlesnėse kartose iš kai kurių genetiškai nestabilių *Hv-tweaky spike* tipo mutantų atsiradę revertantai. Vėliau ši kolekcija kelis kartus ženkliai papildyta kituose miežio mutagenezės eksperimentuose gautais *Hv-tweaky spike*, *Hv-branched ear* ir kitų tipų mutantais. Vienas iš didžiausių minėtų originalių mutantų privalumų yra jų bendra kilmė (tuo pačiu ir vienodas genetinis fonas, taigi, tokie mutantai laikytini beveik izogeninėmis linijomis), o taip pat ir ilgalaikis kultivavimas toje pačioje geografinėje vietovėje, leidęs gauti prie lokalių ekologinių sąlygų iš dalies adaptuotas augalų populiacijas, kurios yra ne tik įdomus fundamentinių tyrimų objektas, bet ir vertinga pirminė medžiaga veislių kūrimui (Rančelis ir kt., 2001).

1987 m. originalios kilmės mutantų kolekciją papildė iš N. Vavilovo instituto (VIR) (Sankt Peterburgas, Rusija) atsisiųsti lizininiai miežio mutantai bei 16 genetinių linijų, skirtų miežio genetiniam kartografavimui. 2001 m. ir 2002 m. kolekcija buvo papildyta iš Švedijos Šiaurės Genų Banko (angl. *Nordic Gene Bank*) gautais *Hv-laxatum* (*Hv-lax*) tipo miežio mutantais (16 *Hv-lax* mutantų ir 3 jų pradinės veislės 'Bonus', 'Foma' ir 'Kristina'). 2002 m. kolekcija taip pat pagausėjo iš USDA-ARS Nacionalinės Smulkiųjų Grūdų Kolekcijos (angl. *USDA-ARS National Small Grains Collection, GSHO*) (Aberdeen, Idaho, JAV) parsisiųstais įvairias *Hv-Hooded/Kap1* ir naujais *Hv-laxatum* tipo bei kitais morfologiniais žiedo/žiedyno raidos miežio mutantais.

Nors dalis originalių ir parsisiųstų veislių, mutantų, genetinių linijų ir revertantų laikui bėgant buvo prarasta, VU BS miežio genetinė kolekcija yra gausiausia indukuotų augalų mutantų kolekcija Lietuvoje. Vėliau ši kolekcija taip pat ženkliai pasipildė dvigubais (*Hv-tw₂ × Hv-Hd*; *Hv-Hd × Hv-Hd*) ir trigubais (*[Hv-tw₂ × Hv-Hd] × Hv-lax*) mutantais, gautais 2003 m. keliais etapais atlikus turimų viengubų mutantų kryžminimus. Šiuo metu VU Botanikos sodo miežio genetinė kolekciją sudaro 16 veislių (9 iš jų lietuviškos), 155 viengubi mutantai ir genetinės linijos, 71 revertantas bei 375 dvigubi ir trigubi mutantai.

1.6.1. Miežio homeoziniai *Hv-tweaky* tipo mutantai

Miežio mutantai, turintys „apipešiotas“ varpas (angl. *tweaked ears*), yra žinomi jau seniai (Reid ir Wiebe, 1968; Sjøgaard ir Wettstein-Knowles, 1987), tačiau šio tipo mutacijų genetinė prigimtis iki šiol nėra išaiškinta. *Hv-tweaky* fenotipas atsiranda tada, kai vienas ar daugiau varpos tarpubamblių yra pailgėję ir dėl varpos ašiai nebūdingo apvalaus skerspjūvio tampa panašūs į stiebo segmentą. Dėl šios priežasties vizualiai atrodo, jog tokiose varpos srityse yra prarasti varpučių tripletai. Neretai varpos tarpubambliai, esantys iš karto už pailgėjusio segmento, yra sutrumpėję ir sutankėję, todėl varpose atsiranda varpučių santalkos, suteikiančios joms būdingą „apipešiotą“ fenotipą (Reid ir Wiebe, 1968).

Pirmasis *Hv-tweaky spike* (angl. apipešiotą varpa) tipo mutantas (*Hv-tw*) VU Botanikos ir genetikos katedroje buvo gautas dar 1974 m. iš lietuviškos vasarinio miežio veislės ‘Auksiniai II’ cheminės mutagenezės būdu, mirkant grūdus etilenimino ir detergentų tirpaluose (Rančelis, 1977). Pakartotinio mutagenezės eksperimento metu 1982 m. iš tos pačios ‘Auksiniai II’ veislės buvo gauti dar du nauji *Hv-tw₁* ir *Hv-tw₂* mutantai bei du dvigubi *Hv-Eceriferum;tw₂* (*Hv-E₁₋₂tw₂*) mutantai, neturintys vaškinės kutikulės (Vaitkūnienė, 1992). Vėliau, 1987 m., iš miežio veislės ‘Auksiniai 3’ nepriklausomai gauti dar aštuoni *Hv-tw* tipo mutantai (*Hv-tw₃₋₁₁*), taip pat trys *Hv-branched ear* mutantai (*Hv-be₁₋₃*) šakotomis varpomis bei serija kompaktines varpas turinčių *Erectum* mutantų *Hv-T₁₋₂₃* (Rančelis ir kt., 2001).

Komplementacijos tyrimai parodė, kad visi VU Botanikos ir genetikos katedroje gauti *Hv-tw* tipo mutantai tarpusavyje yra aleliniai (Vaitkūnienė, 1992). Be to, visos *Hv-tw* tipo mutacijos yra recesyviosios, o šio tipo mutantai – pleiotropiniai, jiems būdingas daugybinis pakitusių požymių kompleksas, pradedant gradientine varpos raida (Rančelis, 1982; Balčiūnienė, 1987; Žilinskaitė 1987; Vaitkūnienė, 1992) ir homeozine nereguliaria lodikulių transformacija į reprodukcinis organus (Balčiūnienė ir kt., 2000; Bieliūnienė, 2001), baigiant

genetiniu nestabilumu (Rančelis, 1982; Žilinskaitė, 1987) ir dideliu imuniniu nepakankamumu (Rančelis, 1993; Rančelis ir kt., 1994; Mačkinaite ir kt., 1996; Balčiūnienė, 2001).

Varpos vystymosi skirtumai tarp *Hv-tw* tipo mutantų ir laukinio tipo (*WT*) augalų atsiranda labai anksti, dar V-oje organogenezės stadijoje pradėjus formuotis ir diferencijuotis varpučių užuomazgoms. Skirtingai nei *WT*, šioje stadijoje pradeda intensyviai vystytis *Hv-tw* tipo mutantų varpų terminalinėje dalyje esantys žiedai, todėl viršutinė mutantų varpos dalis iš dvieilės pereina į netaisyklingą daugiaeilę, suformuojančią savitos išvaizdos „karūną“, o varpos pamatinės dalies žiedai lieka prastai išsivystę ir sterilūs (Bieliūnienė, 2001) (2 pav., A). Varpos poliškumas lemia ir tokias *Hv-tw* mutantų ypatybes, kaip chromosomų aberacijų priklausomybė nuo žiedo padėties varpoje: *Hv-tw* ir *Hv-tw₁* mutantams didesnis chromosomų aberacijų dažnis nustatytas apatinėje varpos dalyje esančiose ląstelėse (Bieliūnienė ir Rančelis, 1996).

Pleiotropiniams *Hv-tw* tipo mutantams taip pat būdinga vienos arba abiejų lodikulių transformacija į kuokelius, piesteles ar įvairius chimerinius šių organų darinius, nors pasitaiko ir nepakitusios struktūros žiedų, turinčių dvi normalias lodikules. Skirtingai nei daugelio kitų žiedo raidos mutantų, *Hv-tw* tipo mutantų lodikulių transformacija yra nereguliaraus pobūdžio – lodikulių transformacijos tipu ir laipsniu gali skirtis ne tik toje pačioje varpoje esantys žiedai, bet ir abi to paties žiedo lodikulės (Balčiūnienė ir kt., 2000; Bieliūnienė, 2001). Kartu su lodikulių transformacija *Hv-tw* tipo mutantams būdingas ir žiedo organų skaičiaus nestabilumas, dažniausiai pasireiškiantis kuokelių praradimu (Bieliūnienė ir kt., 2003).

Daliai *Hv-tw* tipo mutantų pirmosiose kartose pasireiškėdavo genetinis nestabilumas, dėl kurio tarp šių mutantų palikuonių atsirasdavo normalaus arba beveik normalaus fenotipo augalų – revertantų. Įdomu tai, kad reversijos (grįžtamosios mutacijos $Hv-twtw \rightarrow Hv-TwTw$) buvo būdingos tik *Hv-tw*, *Hv-tw₁* ir *Hv-tw₂* mutantams, kilusiems iš ‘Auksiniai II’ veislės, o iš ‘Auksiniai 3’ veislės

gautiems *Hv-tw₃₋₁₁* mutantams reversijų pasitaikydavo retai, todėl šie mutantai genetiškai nestabiliais nelaikytini (Rančelis, 1982; Žilinskaitė, 1987). Dėl pleiotropinės *Hv-tw* tipo mutacijų prigimties daugelis šio lokuso revertantų išlaiko pavienius kiekybinius mutantinio komplekso požymius, tokius, kaip padidėjęs baltymų kiekis grūduose (Rančelis, 1993), pakitusi aminorūgščių sudėtis (Rančelis, 1996) ir kt. Nustatyta, kad *Hv-tw* → *Hv-Tw* revertantų kiekybinių požymių įvairovę atspindi ir jų DNR polimorfizmas, nustatytas naudojant RAPD bei ISSR genetinius žymenis (Žvingila ir kt., 2012). Retais atvejais tarp *Hv-tw₂* mutanto revertantų buvo aptikta augalų, turinčių naujų, ekonomiškai naudingų savybių, pavyzdžiui, didesnis atsparumas grybinėms ligoms (Rančelis ir kt., 2001).

Kai kurių *Hv-tw* tipo mutantų genetinis nestabilumas pasireiškia ne tik reversijomis, bet ir padidėjusiu chromosomų aberacijų ir seserinių chromatidžių mainų dažniu (Balčiūnienė ir kt., 2000) bei padidėjusiu spontaninių DNR trūkių dažniu (Žukas ir kt., 2000), be to, šiems mutantams būdingas padidėjęs laisvųjų radikalų kiekis grūduose ir grūdo lukštuose (Rančelis ir kt., 1991; Bieliūnienė, 1993; Indriūnaitė ir kt., 1994), didesnis jautrumas γ -spinduliams bei padidėjęs atsparumas etileniminui (Rančelis, 1993).

Kaip minėta, visi VU Botanikos ir genetikos katedroje indukuoti *Hv-tw* tipo mutantai buvo gauti iš lietuviškų vasarinio miežio veislių ‘Auksiniai II’ ir ‘Auksiniai 3’. Veislė ‘Auksiniai II’ išvesta 1933 m. sukryžminus danišką veislę ‘Abed Kenia’ su vokiška veisle ‘Ackermanns Isaria’ ir rajonuota Lietuvoje 1950–1990 m. Veislė ‘Auksiniai 3’ sukurta 1973 m. sukryžminus geografiškai tolimas veisles ‘Carina’ (Vokietija, Prancūzija) ir ‘Tarra 26’ (Japonija). Veislė ‘Auksiniai 3’ Lietuvoje rajonuota nuo 1987 m. (Bivilienė, 2011).

Be originalios kilmės *Hv-tw* mutantų tyrimuose VU Botanikos sodo kolekcijoje taip pat saugomi dar du *Hv-tweaky* tipo mutantai *Hv-tweaky No.18* (*Hv-tw No.18*) bei *Hv-tweaky and missing kernel (Hv-twmk)*, atsisiųsti iš USDA-ARS Nacionalinės Smulkiųjų Grūdų Kolekcijos (JAV). Komplementacijos

tyrimai parodė, kad abu šie mutantai yra nealeliniai originaliems *Hv-tweaky spike* tipo mutantams. Jiems abiemis taip pat būdingas „trūkių“ ir „karūnų“ susidarymas varpose ir žiedo organų skaičiaus nestabilumas, tačiau, priešingai nei originaliems *Hv-tweaky spike* tipo mutantams, *Hv-tw No.18* ir *Hv-twmk* nebūdingos lodikulių transformacijos.

1.6.2. *Hv-Hooded/Kap1* tipo homeoziniai miežio mutantai

Miežiai, turintys modifikuotus trišakius akuotus (angl. *trifurcate awns*), primenančius „kepurėles“ (angl. *Hood* – gobtuvas, kepurė), yra natūraliai aptinkami Himalajų kalnų slėniuose Nepale. ‘Hooded Atlas’ miežio veislė šešiaeilėmis varpomis buvo sukurta iš maždaug 5000 augalų per 18 metų. Mėginimai Šiaurės Amerikoje introdukuoti šio tipo mutantus ir jų hibridus nebuvo sėkmingi: veislės, turinčios *Hv-Hooded* požymį, kiek plačiau augintos tik vakarinių valstijų aukštikalnėse, o didžioji dalis šių pasėlių buvo naudojami šiaudų gamybai (Suneson ir Hoyle, 1958).

Miežio *Hv-Hooded/Kap1* (*K*) mutacija yra dominuojančioji, tačiau esama duomenų, kad daugeliu atvejų heterozigotinius augalus (*Kk*) galima nesunkiai atskirti nuo homozigotinių (*KK*), taigi šią mutaciją galima traktuoti kaip nevisiškai dominuojančią (Stebbins ir Yagil, 1966).

Hv-Hooded/Kap1 fenotipą lemia *K* lokuse esančio meristemų tapatumo geno *BKn3* didžiausiame IV-ajame introne įvykusi 305 bp duplikacija, sukianti ektopinę (gr. *Ektopos* – nutolęs) šio geno raišką apatinio žiedažvynio užuomazgos distalinėje dalyje, dėl kurios vietoje akuoto arba ant jo vystosi įvairios struktūros ir išsivystymo laipsnio ektopiniai žiedai (Müller ir kt., 1995). Šiuo metu žinomi bent penki *BKn3* geno aleliai: tai laukinio tipo (*wt*) I, II ir IIIa tipo aleliai, lemiantys normalaus akuoto vystymąsi apatinio žiedažvynio distalinėje dalyje (šie aleliai neturi 305 bp duplikacijos *BKn3* geno IV-jame introne), bei du mutantiniai dominuojantieji *BKn3* geno aleliai IIIb (*K^e*) ir IIIc (*K*): *K^e* alelis (angl. *Elevated*

hood) dominuoja prieš laukinio tipo alelius, bet yra recesyvus *K* alelio atžvilgiu ir sukelia ektopinio žiedo susidarymą ant akuoto, o *K* alelis dominuoja visų kitų *BKn3* geno alelių atžvilgiu ir sukelia ektopinio žiedo susidarymą tiesiogiai ant apatinio žiedažvynio (Badr ir kt., 2000). *BKn3* geno skirstymas į alelius (I, II, IIIa, b, c) yra pagrįstas savitų diagnostinių DNR žymeklių (20 bp insercijos promotoriuje, 33 bp insercijos bei 305 bp duplikacijos IV-ajame introne, vieno nukleotido polimorfizmų) buvimu konkrečiose šio geno sekos vietose. Aleliams saviti polimorfiniai DNR žymekliai ir jų pozicijos *BKn3* gene pateikti 1 lentelėje.

1 lentelė. Aleliams saviti diagnostiniai DNR žymekliai *BKn3* geno reguliacinėse srityse (pagal Badr ir kt., 2000)

nt pozicija Alelio tipas	Insercijos promotoriuje					Insercijos IV-ajame introne										
	74	127	163 ^a	295	300	427 ^b	460	581	710	859	866	868	921	1097 ^c	1140 ^d	1642
I	T	C	-	C	C	+	G	G	A	G	C	G	C	-	-	T
II	-	T	+	T	C	+	G	-	A	T	T	C	T	+	-	C
IIIa	-	T	+	T	T	+	G	G	G	T	C	G	T	-	-	C
IIIb (<i>K^e</i>)	-	T	+	T	T	+	G	G	G	T	C	G	T	-	+	C
IIIc (<i>K</i>)	-	T	+	T	T	-	G	G	G	T	C	G	T	-	+	C

^a20 bp insercija: (+) – yra, (-) – nėra; ^b33 bp insercija: (+) – yra, (-) – nėra; ^c2 bp (TC) insercija: (+) – yra, (-) – nėra; ^d305 bp duplikacija: (+) – yra, (-) – nėra

Taip pat buvo nustatyti bent penki *Hv-Hooded/Kap1* mutaciją slopinantys *suK* (angl. *Suppressor of K*) lokusai, kurių koduojami produktai galimai dalyvauja IV-ojo introno atliekamame *BKn3* geno raiškos reguliavime. Skirtingi *SuK* lokusai sukelia įvairaus laipsnio dalinę *Hv-Hooded/Kap1* tipo mutantų fenotipo normalizaciją, pasireiškiančią trumpų akuotų susidarymu vietoje ektopinių žiedų (Roig ir kt., 2004).

II. TYRIMŲ OBJEKTAS IR METODAI

2.1. Tyrimų objektas

Tyrimams naudotos kelios VU Botanikos sode saugomų vasarinio miežio *Hordeum vulgare* ssp. *vulgare* L. viengubų ir dvigubų mutantų grupės:

1. *Hv-Hooded/Kap1* (*Hv-Hd*) tipo mutantų kolekcija, dalis kolekcijoje saugomų *Hv-laxatum* (*Hv-lax*) tipo mutantų (*Hv-lax ab* (GSHO 1573), *Hv-lax-ac* (GSHO 1574) ir *Hv-lax-ae* (GSHO 2041)) bei *Hv-tweaky* tipo mutantai *Hv-tweaky No.18* (*Hv-tw No.18*; GSHO 111) ir *Hv-tweaky and missing kernel* (*Hv-twmk*; GSHO 1119)), gauti iš USDA-ARS Nacionalinės Smulkiųjų Grūdų Kolekcijos (JAV).
2. *Hv-laxatum* tipo *Hv-lax-a.434* mutantas, gautas iš Šiaurės genų banko (Švedija).
3. Du originalios kilmės recesyvieji aleliniai *Hv-tweaky spike* tipo mutantai *Hv-tw* ir *Hv-tw₂*, gauti iš 'Auksiniai II' veislės, kuri mūsų tyrimuose buvo naudota kaip laukinis tipas (*WT*).
4. Dvigubų *Hv-tw₂;Hd*, *Hv-tw;lax*, *Hv-tw;twmk* ir *Hv-tw;tw No.18* mutantų linijos (vieno augalo palikuonys), varpose sudarančios (+) arba nesudarančios (-) ektopines į lapus/stiebus panašias išaugas.

Kadangi egzistuoja didelė *Hv-Hd* tipo miežio mutantų fenotipo įvairovė, iš 14 VU Botanikos sodo kolekcijoje saugomų *Hv-Hd* mutantų buvo pasirinkti du alternatyvaus fenotipo mutantai, labiausiai besiskiriantys varpos architektūra: tai mutantai *Hv-Hooded/Kap1.a* (*Hv-H* (Colsess II); GSHO 67) ir *Hv-Lemma hooded* (*Hv-Lh*; GSHO 932, <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/acc/display.pl?1514053>) (2 pav., B).

Hv-H mutantas buvo sukurtas kryžminimo būdu į 'Atlas 46' veislės miežius įterpus mutantinį *Hv-Kap1* geną iš 'Colsess' veislės ir vėliau atlikus 10 grįžtamųjų kryžminimų su pradine veisle (Stebbins ir Yagil, 1966). Tokia naujai sukurta veislė buvo pavadinta Colsess II. Šešiaeilis *Hv-H* (Colsess II) mutantas ant apatinių žiedažvynių distalinės dalies vietoje akuotų sudaro invertuotus gerai išsivysčiusius ektopinius žiedus (Müller ir kt., 1995).

Hv-Lemma hooded (Hv-Lh) mutanto istorija sudėtingesnė: šį mutantą išskyrė T. Tsuchiya iš Clho 6868 linijos, kurios kilmė yra tokia: *Triple Bearded Mariout* (Clho 2523)/*Hooded Awn* (Clho 6176) // *Brittle Rachis* (Clho 6170)/Lyallpur (PI 57959) (<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/acc/display.pl?1037950>). Palyginti su kitais *Hv-Hooded/Kap1* tipo mutantais, *Hv-Lh* pasižymi unikaliu fenotipu: šio šešiaeilio mutanto ektopiniai žiedai vystosi ant akuotų, o jų struktūra įvairi, pradedant normaliais akuotais ir nežymiais sustorėjimais ant jų, baigiant visiškai išsivysčiusiais steriliais ektopiniais žiedais. Be to, šio mutanto varpažvyniai yra virtę akuotus turinčiais žiedažvyniais, ant kurių taip pat vystosi ektopiniai žiedai ir/arba jų užuomazgos.

Kartu su dviem minėtais *Hv-Hooded/Kap1* mutantais kai kuriems tyrimams naudoti ir keli kiti šešiaeiles varpas turintys *Hv-Hd* tipo mutantai – tai *Hv-Dense wing hood (Hv-Dwh; GSHO 928)*, *Hv-Hoods on center spikelet (Hv-Hcs; GSHO 666)* ir daugiaeilis *Hv-Multiflorous (Hv-Mf; GSHO 79)* (2 pav., B).

Hv-Dwh mutantui būdingi sutrumpėję varpos tarpambliai (tankesnės varpos) bei stipriai redukuoti ektopiniai žiedai, iš kurių likusios tik žiedažvynio/akuoto pereinamojoje zonoje esančios dvi savitos gerai išsivysčiusios trikampio formos išaugos – sparnai.

Hv-Hcs mutanto ektopiniai žiedai yra dar labiau redukuoti nei *Hv-Dwh* – labai prastai išsivystę užuomazgų pavidalo sparnai išlikę tik centrinėje varpučių eilėje, o šoninės varpučių eilės neturi nei akuotų, nei jokių ektopinių struktūrų. Be to, *Hv-Hcs* mutanto varpoms būdingi gerai išreikšti, nusmailėję ir ištįsę varpažvyniai, savo išvaizda primenantys nedidelius akuotus.

Hv-Mf mutantas iš kitų *Hv-Hd* tipo mutantų išsiskiria daugiaeilėmis varpomis, o šio mutanto ektopiniai žiedai yra gerai išsivystę, tačiau smulkesni nei *Hv-H* mutanto.



2 pav. Miežio homeozinių *Hv-tw₂* (A) ir *Hv-Hooded/Kap1* (B) tipo mutantų varpos. Iš kairės į dešinę: A – laukinio tipo (veislės ‘Auksiniai II’) ir *Hv-tw₂* mutanto varpos; B – *Hv-Lemma hooded*, *Hv-Hooded/Kap1.a*, *Hv-Multiflorous*, *Hv-Hoods on center spikelet* ir *Hv-Dense wing hood* mutantų varpos

Tyrimams taip pat atrinkta grupė miežio dvigubų mutantų, gautų 2003 m. sukryžminus *Hv-tw* tipo mutantus tarpusavyje arba su įvairiais *Hv-Hd* tipo mutantais (Vaitkūnienė ir kt., 2004a, b). Dėl dominuojančios *Hv-Hd* mutacijos prigimties, siekiant užtikrinti hibridizacijos kontrolę *Hv-tw₂* mutantas visais atvejais buvo naudotas kaip motininis augalas. Kadangi visi *Hv-tw* tipo aleliai yra recesyvieji, *Hv-tw* požymio raiška individe rodo homozigotinę šio tipo alelio būklę. Be to, homeozinės transformacijos *Hv-tw* ir *Hv-Hd* tipų mutantuose vyksta skirtinguose lygmenyse – *Hv-Hd* tipo mutacijos sukelia akuoto transformaciją į ektopinį žiedą, *Hv-tw* mutacijos lemia varpos poliškumą ir lodikulių transformacijas į reprodukcinis organus, o tai taip pat leido atskirai įvertinti *Hv-tw* ir *Hv-Hd* alelių veikimą dvigubuose mutantuose.

Atlikus kryžminimus, daugelyje kartų buvo vykdoma dvigubų *Hv-tw₂;Hd* mutantų atranka ir stabilizavimas: šiuo etapu dalis dvigubų mutantų sėkmingai stabilizuoti iki stabiliai *Hv-tw* ir *Hv-Hd* požymius išlaikančių variantų, kuriuos galima naudoti dekoratyviniais tikslais (Siuksta ir kt., 2012), tačiau kita dvigubų mutantų dalis išliko nestabilūs ir ši paveldima fenotipo nestabilumo forma išliko iki pat F₁₀ kartos, kurios augalai buvo naudojami mūsų tyrimuose. Be to, daliai dvigubų mutantų, pasižyminčių fenotipiniu nestabilumu, atsirado naujų, tėvinėm formoms nebūdingų požymių, tokių, kaip nestabilus įvairių ektopinių į lapus/stiebus panašių išaugų susidarymas varpose, pailgėję ir/arba sustorėję varpų tarpambliai bei plataus spektro pagrindinio ir ektopinio žiedo variacijos, ženkliai pralenkiančios viengubų mutantų fenotipinės variacijos ribas. Visi kryžminimai buvo atlikti VU GMF Botanikos ir genetikos katedros šiltnamyje ir VU Botanikos sode.

Tyrimams naudotos dvigubų mutantų linijos (vieno augalo palikuonys), gautos iš F₆ individų ir abiejų mutantų požymius išlaikančios bent trejose kartose. Konkrečios dvigubų mutantų linijos tyrimams parinktos remiantis dviem kriterijais: pirma, pagal žiedo/žiedyno struktūrą (atsižvelgiant tiek į *Hv-tw*, tiek į *Hv-Hd* fenotipą), antra, pagal žiedo/žiedyno variaciją (ektopinių į lapus/stiebus panašių struktūrų susidarymą). Tyrimams naudotų dvigubų mutantų linijų aprašymas pateiktas 2 lentelėje

Glausta informacija apie dvigubų mutantų linijas (kryžminimui naudoti tėviniai mutantai, linijos numeris, gebėjimas varpose formuoti į lapus/stiebus panašias išaugas) taip pat nurodyta visose Rezultatų dalies lentelėse ir paveiksluose.

2 lentelė. Tyrimams naudotų miežio viengubų ir dvigubų mutantų fenotipo charakteristika

Mutantas ¹	Varpų eiliškumas ²	Varpų architektūros ypatumai	Ektopinio žiedo padėtis ³
<i>WT</i> ('Auksiniai II') (-)	2	Ilgos varpos, turinčios vidutiniškai išsivysčiusius sterilius šoninės varpučių eilės žiedus	-
<i>Hv-tw₂</i> ir <i>Hv-tw</i> (-)	2 <i>tw</i>	Varpos trumpos, žiedų išsivystymas gradientinis nuo sterilių varpos apačioje iki stambiausių daugiaeilėje varpos viršūnėje. Varpos tarpubambliai gali būti pailgėję	-
<i>Hv-tw No.18</i> (-)	2	Daugelis varpų tyri varpučių nesudarančių „trūkių“ bei savitų daugiaeilėlių varpučių santalkų – „karūnų“	-
<i>Hv-tw;tw No.18</i>	2 <i>tw</i>	Dvieilės varpos, gali turėti „trūkių“ ir „karūnų“	-
<i>Hv-twmk</i>	2	Kai kurios varpos turi „trūkių“, varpos retos, neturi varpažvynių	-
<i>Hv-tw;twmk</i> ir <i>Hv-twmk;tw</i>	2 <i>tw</i>	Dvieilės varpos, gali „karūnų“	-
<i>Hv-Lh</i> (-)	6	Varpažvyniai virtę žiedažvyniais	↑↑/↑↑↑
<i>Hv-tw₂;Lh N11</i> (+)	2 <i>tw</i>	Dalis šoninės varpučių eilės žiedų fertilūs, kai kurie varpų tarpubambliai pailgėję	↑↑/↑↑↑
<i>Hv-tw₂;Lh N13</i> (-)	<i>int tw</i>	Varpos trumpos, varpažvyniai virtę žiedažvyniais	↑/↑↑
<i>Hv-tw₂;Lh N17</i> (+)	2 <i>tw</i>	Stambūs šoninės varpučių eilės žiedai, kai kurie varpų tarpubambliai pailgėję	0/↑
<i>Hv-tw₂;Lh N19</i> (+)	<i>int tw</i>	Centrinės varpučių eilės ektopiniai žiedai ant akuoto, šoninės varpučių eilės ektopiniai žiedai išvystę tiesiogiai ant žiedažvynio	↑/↑↑
<i>Hv-Mf</i> (-)	> 6	Tiek pagrindiniai, tiek ektopiniai žiedai smulkūs	0
<i>Hv-tw₂;Mf N14</i> (+)	<i>int tw</i>	Centrinės varpučių eilės žiedai turi ektopinio žiedo užuomazgą ant akuoto, šoninės varpučių eilės ektopiniai žiedai išsivystę tiesiogiai ant žiedažvynio	↑
<i>Hv-Dwh</i> (-)	6	Tankios varpos dėl sutrumpėjusių varpos tarpubamblių	0
<i>Hv-tw₂;Dwh N25</i> (-)	2	Šakotos varpos (pamatinėje dalyje)	↑/↑↑
<i>Hv-H</i> (-)	6	Ant vieno apatinio žiedažvynio gali būti išsidėstę keli ektopiniai žiedai	0/↑
<i>Hv-tw₂;H N8</i> (-)	<i>int tw</i>	Vyrauja ektopinių žiedai užuomazgos, kai kurie žiedažvyniai pailgėję	↑/↑↑
<i>Hv-tw₂;H N21</i> (+)	2 <i>tw</i>	Ektopiniai žiedai pasitaiko retai ir yra nežymių sustorėjimų akuoto distalinėje dalyje pavidalo	↑/↑↑
<i>Hv-Hcs</i> (-)	6	Ektopinių žiedų užuomazgos tik ant centrinės varpučių eilės žiedų, ant šoninės varpučių eilės žiedažvynių nėra nei akuotų, nei ektopinių žiedų	0
<i>Hv-H;Hcs N9</i> (-)	6	Labai stambūs ektopiniai žiedai su ištįsusiais sparnais virtusiais akuotėliais	0/↑
<i>Hv-lax</i>	2	Ilgos ir retos varpos	-
<i>Hv-tw;lax</i>	2	Varpos gali turėti „trūkių“, „karūnų“, pailgėjusius varpažvynius ir žiedažvynius	-

¹Ektopinių į lapus/stiebus panašių išaugų susidarymas varpose: (+) – susidaro, (-) – nesusedaro, (+/-) – susidaro lauko sąlygomis, nesusedaro šiltnamio sąlygomis. ²Varpų eiliškumas: 2 – dvieilės, 6 – šešiaeilės, > 6 – daugiaeilės, 2 *tw* – *Hv-tw* požymių („trūkių“ ir „karūnų“) turinčios dvieilės, *int tw* – *Hv-tw* požymių turinčios *intermedium* (išilgai varpos ašies kintančio eiliškumo). ³Ektopinio žiedo padėtis: (-) – ektopinių žiedų neturi, 0 – ektopiniai žiedai išsivystę ant apatinių žiedažvynių distalinės dalies, ↑/↑↑/↑↑↑ – ektopiniai žiedai išsivystę ant trumpų (↑), vidutinių (↑↑) arba ilgų (↑↑↑) akuotų

2.2. Tyrimų metodika

2.2.1. Cheminės medžiagos

3 lentelė. Tyrimams naudotos cheminės medžiagos, fermentai ir jų gamintojai

Cheminė medžiaga	Formulė/koncentracija/ būvis	Gamintojas, šalis
2-chloretilfosono rūgštis (etefonas)	$C_2H_6ClO_3P$	Sigma-Aldrich, JAV
2-(p-chlorfenoksi)-2-metilpropano rūgštis (PCIB)	$C_{10}H_{11}ClO_3$	Sigma-Aldrich, JAV
2,4-dichlorfenoksiacto rūgštis (2,4-D)	$C_8H_6Cl_2O_3$	Alfa Aesar, Vokietija
3-(trimetoksil)propilmetakrilatas Selectophore™ (<i>bind</i> -silanas)	$C_{10}H_{20}O_5Si$	Sigma-Aldrich, JAV
9-hidroksi-9-fluorenkarboksirūgštis (HFCA)	$C_{14}H_{10}O_3$	Sigma-Aldrich, JAV
Acto rūgštis	CH_3COOH , 100 %	Sigma-Aldrich, Vokietija
Agar-agaras	-	Roth, Vokietija
Agarozė (TopVision™)	-	Thermo Scientific, Lietuva
Akrilamidas	C_3H_5NO	Roth, Vokietija
Amonio persulfatas	$(NH_4)_2S_2O_8$	Sigma-Aldrich, JAV
Azotas	Suskystintas	Elme Messer Gaas, Latvija
Boro rūgštis	H_3BO_3	Sigma-Aldrich, Japonija
Bromfenolio mėlis	$C_{19}H_9Br_4O_5SNa$	Riedel-de Haën, Vokietija
Chloroformas	$CHCl_3$	Roth, Vokietija
D(+)-sacharozė	$C_{12}H_{22}O_{11}$	Roth, Vokietija
dNTP mišinys	Po 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Thermo Scientific, Lietuva
Dichlordimetilsilanas (<i>repel</i> -silanas)	$(CH_3)_2SiCl_2$, 2 % tirpalas oktametilciklo-oktasilane	Sigma-Aldrich, JAV
DNR molekulinis ilgio žymuo	GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, $0,1 \mu g \cdot \mu L^{-1}$	Thermo Scientific, JAV
Etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA)	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	Sigma-Aldrich, JAV
Etanolis (EtOH)	C_2H_5OH , 96,4 %	Vilniaus degtinė, Lietuva
Etidžio bromidas	$C_{21}H_{20}N_3Br$	Roth, Vokietija
Formaldehidas	CH_2O , 36 %	Chempur, Lenkija
MgCl ₂ tirpalas	25 mM	Thermo Scientific, Lietuva
Mineralinė alyva	-	Sigma-Aldrich, JAV
Murashige ir Skoog (MS) bazinių druskų mišinys	-	Sigma-Aldrich, JAV

3 lentelės tęsinys

MS terpės vitaminų tirpalas	1000×	Sigma-Aldrich, JAV
N-1-naftilftalamo rūgštis	C ₁₈ H ₁₃ NO ₃	Sigma-Aldrich, JAV
N,N'-metilenbisakrilamidas	C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂	Sigma-Aldrich, JAV
N,N,N',N'-tetrametiletilendiaminas (TEMED)	C ₆ H ₁₆ N ₂	Roth, Vokietija
Natrio hidroksidas	NaOH	Roth, Vokietija
Polioksietilensorbitano monolauratas (<i>Tween</i> [®] 20)	C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆	Sigma-Aldrich, Prancūzija
Sacharozė	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Roth, Vokietija
Sidabro nitratas	AgNO ₃	Riedel-de Haën, Vokietija
<i>Taq</i> buferinis tirpalas	10×, -MgCl ₂ , +(NH ₄) ₂ SO ₄	Thermo Scientific, Lietuva
<i>Taq</i> DNR polimerazė	Rekombinantinė, 5 U·μL ⁻¹	Thermo Scientific, Lietuva
<i>trans</i> -cinamo rūgštis	C ₉ H ₈ O ₂	Sigma-Aldrich, Vokietija
Tris(hidroksimetil)aminometanas (TRIS)	C ₄ H ₁₁ NO ₃	Fisher Scientific, JAV
2,3,5-trijodbenzenkarboksirūgštis	C ₇ H ₃ I ₃ O ₂	Sigma-Aldrich, JAV
Urėja	CH ₄ N ₂ O	Roth, Vokietija

2.2.2. Tirpalai ir jų paruošimas

5× TRIS-Boratinis-EDTA (TBE) buferinis tirpalas elektroforezei (500 mL, pH = 8,3). Tirpalui paruošti atsveriami 27,23 g TRIS, 13,92 g H₃BO₃ ir 0,19 g EDTA, ir ištirpinama distiliuotame vandenyje. Buferinis tirpalas laikomas kambario temperatūroje.

1,5 % agarozės gelis *BKn3* geno PGR produktų analizei (100 mL). Pasveriami 1,5 g agarozės, įpilama 20 mL 5× TBE buferinio tirpalo ir distiliuoto vandens iki 100 mL. Tuomet agarozės suspensija maišant šildoma mikrobangų krosnelėje kelis kartus iki užvirimo. Agarozei visiškai ištirpus, tirpalas aušinamas vandens vonioje maždaug iki 50–55 °C, tuomet į jį įlašinama 10 μL etidžio bromido (5 mg·mL⁻¹) tirpalo ir gelis supilamas į gelio užpylimo rėmelį su įstatytomis šukomis, kol visiškai sustings.

6× bromfenolio mėlio tirpalas PGR produktų įnešimui į agarozės gelį. Tirpalą sudaro 0,2 % bromfenolio mėlio, 0,002 M EDTA ir 40 % sacharozės. Tirpalas laikomas +4 °C tamsoje.

30 % akrilamido ir bisakrilamido (29:1) tirpalas (100 mL). Nedideliame distiliuoto vandens tūryje ištirpinama 29 g akrilamido bei 1 g N,N'-metilenbisakrilamido, ir įpilama distiliuoto vandens iki 100 mL. Tirpalas filtruojamas per filtrinį popierių ir laikomas +4 °C tamsoje.

6 % amonio persulfato tirpalas (5 mL). Pasveriamas 0,3 g amonio persulfato ir ištirpinamas 5 mL distiliuoto vandens. Tirpalas filtruojamas per filtrinį popierių, išpilstomas į *Eppendorf* tipo mėgintuvėlius po 833 µL ir laikomas –20 °C temperatūroje tamsoje.

6 % denatūruojantis poliakrilamidinis (PAA) gelis DD-PGR produktų analizei (80 mL). Tirpalas ruošiamas prieš pat gelio užpylimą. Pasveriamas 40,4 g urėjos, įpilama 16 mL 5× TBE buferinio tirpalo bei 60 mL distiliuoto vandens ir tirpinama ant magnetinės maišyklės (Ika RH b 2, Vokietija) silpnai šildant (ne daugiau nei iki +50 °C). Tuomet tirpalas atvėsinaamas iki kambario temperatūros, į jį įpilama 833 µL šviežiai atitirpinto 6 % amonio persulfato ir distiliuoto vandens iki 80 mL galutinio tūrio. Prieš pat gelio užpylimą polimerizacijos reakcijai pradėti į gautą tirpalą įlašinama 200 µL TEMED.

Silano tirpalas PAA geliui prie stiklo priklijuoti (1,5 mL). Sumaišoma 1,425 mL 96,4 % EtOH, 75 µL ledinės acto rūgšties ir 4,5 µL *bind*-silano. Tirpalas gaminamas prieš pat naudojimą.

FIX/STOP tirpalas PAA geliui fiksuoti ir dažymo sidabru reakcijai sustabdyti (1,5 L). Tirpalo sudėtis: 10 % EtOH ir 0,5 % acto rūgšties. FIX/STOP tirpalas laikomas +4 °C temperatūroje tamsoje. PAA geliui fiksuoti naudojamas šaltas (+4 °C) FIX/STOP tirpalas, dažymo sidabru reakcijai sustabdyti – kambario temperatūros FIX/STOP tirpalas. Tirpalas gali būti naudojamas 3×.

Sidabro dažai PAA geliui impregnuoti (1,5 L). Pasveriamas 2,25 g AgNO₃ ir ištirpinamas 1,5 L distiliuoto vandens. Tada įpilama 2,25 mL 36 %

formaldehido. Sidabro dažai laikomi kambario temperatūroje tamsoje, tirpalą galima naudoti 7×.

Tirpalas PAA geliui ryškinti po impregnacijos sidabro dažais (1,5 L).

Pasveriami 22,5 g NaOH ir ištirpinama 1,5 L distiliuoto vandens. Į gautą natrio šarmo tirpalą įpilama 3 mL 36 % formaldehido. Ryškinimo tirpalas laikomas kambario temperatūroje tamsoje, tirpalą galima naudoti 3×.

2.2.3. DNR išskyrimas ir koncentracijos bei kokybės nustatymas

DNR buvo išskiriama iš *H. vulgare* L. lapų. Augalų audiniai homogenizuojami suskystintame azote, DNR išskiriama naudojant rinkinį „Genomic DNA Purification Kit“ (Fermentas, Lietuva) pagal gamintojo pateiktas rekomendacijas. DNR išskyrimo procedūros atliktos naudojant termobloką Thermomixer Comfort (Eppendorf, Vokietija) bei centrifugą Centrifuge 5424 (Eppendorf, Vokietija).

Išskirtos DNR koncentracija bei kokybė nustatyti bekiuvečiu spektrofotometru ND-1000 (NanoDrop™, JAV). Amplifikacijai naudojami 50 ng·μL⁻¹ koncentracijos DNR tirpalai, kurie ilgą laiką gali būti saugomi –20–80 °C temperatūroje.

2.2.4. PGR sąlygos *BKn3* geno reguliacinėms sritims amplifikuoti

Geno *BKn3* reguliacinių sričių, turinčių diagnostinius žymenis (20 bp insercija promotoriuje, 33 bp insercija bei 305 bp duplikacija IV introne), amplifikacija buvo atlikta naudojant pateiktus pradmenis, kurių sekos pateiktos 4 lentelėje.

4 lentelė. Pradmenys, naudoti *BKn3* geno alelizmui nustatyti

Amplifikuojama <i>BKn3</i> geno sritis	Fragmento dydis, bp	Pradmuo	Pradmens seka (5'→3')
Promotoriaus fragmentas, apimantis 20 bp inserciją	913	Kn23 (tiesioginis)	GGC ATT GTG TGG CAA TGC GTG ACA
		Kn24 (atvirkštinis)	ACA CTA CTC TCG AGC ACC TTC CTC
IV introno fragmentas, apimantis 33 bp inserciją	954	Kn5 (tiesioginis)	CCA TGC AGC TAC CTC TTG TCC TCG
		Kn6 (atvirkštinis)	GGA AAG CAT CCA ACG TCT CTT GAC
IV introno fragmentas, apimantis 305 bp duplikaciją	649	pA (tiesioginis)	TTC TTT GTG TGT GTT CTG GGG A
		pB (atvirkštinis)	AGG TTT GAA CTT GGA CTC GCC

PGR mišiniai ruošiami aseptinėmis sąlygomis laminariniame bokse SAFE 2020 (Thermo Scientific, Vokietija). Amplifikacija atliekama plonasieniuose polipropilenuose 0,2 mL tūrio mėgintuvėliuose. Reakcijos mišinys ruošiamas be *Taq* DNR polimerazės, jos į mišinį įpilama po pradinės denatūracijos pradmenų prisijungimo metu. PGR mišinio sudėtis:

10× <i>Taq</i> buferinis tirpalas	5 μL
dNTP mišinys (2 mM)	4 μL
MgCl ₂ (25 mM)	4 μL
Pradmenys (tiesioginis ir atvirkštinis)	po 1
(10 pmol·μL ⁻¹)	μL
DNR (50 ng·μL ⁻¹)	2 μL
Dejonizuotas H ₂ O (18,3 MΩ)	28 μL
<hr/>	
Iš viso:	45 μL

Į reakcijos mišinį prieš amplifikaciją įpilama po 15 μL mineralinės alyvos, o pirmojo amplifikacijos ciklo metu pradmenų prisijungimo etape į kiekvieną mėgintuvėlį įpilama po 5 μL skiestos *Taq* pol (0,3 μL *Taq* pol + 4,7 μL

dejonizuoto H₂O; galutinis amplifikacijos reakcijos tūris 50 µL). Amplifikacija atlikta termocikleriu Mastercycler Personal (Eppendorf, Vokietija), PGR režimas:

Pradinė DNR denatūracija	97 °C, 5 min.	
Pradmenų prisijungimas	65 °C, 3 min. (įpilama skiestos <i>Taq</i> pol)	
DNR sintezė	72 °C, 2 min	
DNR denatūracija	94 °C, 1 min	35×
Pradmenų prisijungimas	65 °C, 1 min	
DNR sintezė	72 °C, 2 min	

PGR produktai iki frakcionavimo saugomi +4 °C temperatūroje arba ilgesnį laiką gali būti saugomi –20–80 °C.

2.2.5. PGR produktų frakcionavimas agarozės gelyje

Prieš frakcionavimą PGR produktai (50 µL) sumaišomi su 10 µL 6× bromfenolio mėlio tirpalo ir frakcionuojami 1,0 % agarozės gelyje 0,5× TBE buferiniame tirpale, 4 V·cm⁻¹ režimu. Elektroforezė atliekama elektroforezės vonelėje MS Maxi (Clever Scientific Ltd, Jungtinė karalystė), prijungtoje prie srovės šaltinio PowerPacTM HC (Bio-Rad, Singapūras). Gelių dokumentavimui ir analizei naudojama BioDocAnalyze (Biometra, Vokietija) sistema.

2.2.6. PGR produktų išskyrimas iš gelio ir paruošimas sekos nustatymui

Frakcionuoti PGR produktai išpjaunami ir išskiriami iš 1,0 % agarozės gelio naudojant rinkinį „ZymoCleanTM Gel DNA Recovery Kit” (Zymo Research, JAV) pagal gamintojo rekomendacijas. Išskirtų PGR fragmentų grynumas patikrinamas 1,0 % agarozės gelyje, jų koncentracija ir švarumas nustatomi

lašelinu spektrofotometru. Iš gelio išskirtų amplifikacijos produktų sekvenavimas atliktas firmoje BaseClear (Nyderlandai).

2.2.7. Augalų veikimas etilenu

Etileno poveikio miežio homeoziniams viengubiems ir dvigubiems mutantams tyrimai buvo atlikti VU Gamtos mokslų fakulteto Botanikos ir genetikos katedros šiltnamyje 2012 m. žiemą. Prieš sėjimą grūdų paviršius sterilinamas 1 min. 70 % EtOH, tuomet grūdai 18 min. NaClO 2,25 % tirpale (komercinio baliklio „ACE“ ir vandens (1:1) tirpalas), galiausiai grūdai plaunami 5× steriliu distiliuotu H₂O ir paliekami brinkti 12–16 val.

Eksperimentui reikalingos etileno dujos išsiskiria vykstant etileno pirmtako 2-chloretilfosfono rūgšties (etefono) hidrolizei, kai tirpalo pH > 4,5 (Biddle ir kt., 1976). Augalų veikimas etilenu atliktas remiantis Yagil ir Sebbins (1969) bei Osnato ir kt. (2010) darbais. Augalai purškiami 10 mM koncentracijos etefonu 50 mM fosfatiniame buferiniame tirpale (pH = 7), kuriame ištirpdyta 0,1 % nejoninio detergento *Tween*[®] 20, padidinančio tirpalo adheziją su augalo paviršiumi. Etefono tirpalu purškiami augalai, turintys 4–5 lapus, nes šios vystymosi stadijos metu vyksta miežio žiedyno ir žiedo meristemų iniciacija (Yagil ir Stebbins, 1969). Purškiama 2× su 18 val. pertrauka, nupurškus augalai nedelsiant uždengiami skaidriais plastikiniais maišais. Kontrolinės grupės augalai purškiami buferiniu tirpalu be etefono. Bandymo metu ištirta po 12–17 kiekvienos eksperimentinės grupės viengubų ir dvigubų mutantų augalų.

Pagrindinio ir ektopinio žiedo struktūros tyrimui naudojama šviežiai surinkta tiriamoji medžiaga, kuri, esant reikalui, gali būti ilgesnį laiką saugoma +4 °C temperatūroje tamsoje arba fiksuojama Carnoy fiksatoriumi (etanolio ir ledinės acto rūgšties tirpalas santykiu 3:1). Žiedai preparuojami ir analizuojami naudojantis stereomikroskopu (Motic SMZ-143, Vokietija), sujungtu su

fotokamera (Moticam 2000, Vokietija). Tiriant dvigubų mutantų linijas, varpose formuojančias į lapus/stiebus panašias struktūras, analizuotos varpos ar varpų segmentai, turintys išsivysčiusių žiedų.

2.2.8. Augalų veikimas sintetiniu auksinu 2,4-D ir auksino inhibitoriais

2,4-dichlorfenoksiacto rūgšties (2,4-D) ir auksino inhibitorių poveikio viengubiems ir dvigubiems homeoziniams mutantams tyrimai atlikti tiek lauko, tiek šiltnamio sąlygomis 2012–2013 m.

2,4-D poveikiui *in vivo* tirti naudota $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D koncentracija. Tirpalui paruošti, reikiamas kiekis 2,4-D tirpinamas 0,1 M NaOH tirpalu titruojant tol, kol visiškai ištirpsta (tirpalo pH ≈ 7). Tuomet įpilama 0,1 % nejoninio detergento *Tween*[®] 20 ir gerai išmaišoma.

Auksino polinio transporto inhibitoriaus 9-hidroksi-9-fluorenkarboksirūgšties (HFCA) ir antiauksino 2-(p-chlorfenoksi)-2-metilpropano rūgšties (PCIB) poveikiui *in vivo* tirti ruošiamas 200 μM koncentracijos tirpalas. Tuo tikslu reikiamas kiekis HFCA ir PCIB ištirpinamas nedideliame tūryje 96 % EtOH (galutinė EtOH koncentracija tirpale 0,1 %), tuomet įpilamas reikiamas kiekis distiliuoto H₂O ir 0,1 % nejoninio detergento *Tween*[®] 20.

Paruoštais 2,4-D, HFCA ir PCIB tirpalais nedelsiant purškiami 4–5 lapų stadijos augalai.

2.2.9. Genų raiškos tyrimas diferencinio vaizdinimo metodu

Potencialiems genų raiškos skirtumams tarp mutanto *Hv-tw₂* ir jo pradinės veislės 'Auksiniai II' nustatyti naudotas diferencinio vaizdinimo (angl. *Differential display*) metodas.

2.2.9.1. RNR išskyrimas ir paruošimas atvirkštinei transkripcijai

Visuminė RNR išskiriama iš 4,5 lapo turinčių šiltnamio sąlygomis augintų augalų apikalinės stiebo dalies, viduje turinčios varpos užuomazgą. Prieš visuminės RNR išskyrimą stiebo segmentas be lapų kelis kartus plaunamas steriliu distiliuotu H₂O. Augalo audiniai homogenizuojami suskystintame azote, RNR išskiriama rinkiniu „InnuPREP Plant RNA Kit (Analytik Jena AG, Vokietija) pagal gamintojo protokolą. RNR išskyrimas atliekamas aseptinėmis sąlygomis laminariniame bokse, darbo metu visi darbiniai paviršiai valomi RNAzių inhibitoriaus tirpalu RNase-Exitus Plus & Trade (AppliChem, Vokietija).

Išskirtos visuminės RNR integralumas tikrinamas 1 % agarozės gelyje 0,5× TBE buferiniame tirpale, esant 4 V·cm⁻¹ įtampai. Kokybiškuose preparatuose neturi būti likę DNR pėdsakų, frakcionuotos visuminės RNR profilyje turi matytis ryškių kontūrų nedegradavusios 28 S (4–5 kb) ir 18 S (≈2 kb) rRNR bei diskrečios juostelės mažos (0,1–0,3 kb) bei didelės (7–15 kb) molekulinės masės RNR. Kokybiškų visuminės RNR preparatų koncentracija iš švarumas įvertinami lašeline spektrofotometru.

2.2.9.2. Atvirkštinė transkripcija ir diferencinio vaizdinimo PGR

Visi genų raiškos tyrimo diferencinio vaizdinimo metodu etapai (atvirkštinė transkripcija, diferencinio vaizdinimo PGR (angl. *Differential display PCR*, toliau DD-PGR), DD-PGR produktų denatūracijai ir dvipakopė reamplifikacija) atlikti naudojant rinkinį „RNAspectraTM Red Kit 7“ (GenHunter, JAV) pagal gamintojo protokolą. Atvirkštinei transkripcijai naudojama tik geros kokybės šviežiai išskirta (nešaldyta) visuminė RNR. Atvirkštinei transkripcijai atlikti naudoti trys oligo-dT pradmenys, besiskiriantys 3'-gale esančiu nukleotidu (pradmenys H-T₁₁A, C arba G). DD-PGR atlikta naudojant minėtų trijų H-T₁₁A,

C, G pradmenų kombinacijas su 8 atsitiktinės sekos oligotridekameriniais pradmenimis (H-AP49–56, iš viso 24 pradmenų kombinacijos). Diferenciniam vaizdinimui naudotų pradmenų sekos pateiktos 5 lentelėje.

5 lentelė. Pradmenys, naudoti genų raiškos skirtumams diferencinio vaizdinimo metodu nustatyti

Pradmuo	Pradmens seka (5'→3')
H-T ₁₁ A	AAG CT ₁₁ A
H-T ₁₁ C	AAG CT ₁₁ C
H-T ₁₁ G	AAG CT ₁₁ G
H-AP49	AAG CTT TAG TCC A
H-AP50	AAG CTT TGA GAC T
H-AP51	AAG CTT CGA AAT G
H-AP52	AAG CTT GAC CTT T
H-AP53	AAG CTT CCT CTA T
H-AP54	AAG CTT TTG AGG T
H-AP55	AAG CTT ACG TTA G
H-AP56	AAG CTT ATG AAG G

2.2.9.3. Vertikalios elektroforezės sistemos stiklų paruošimas DD-PGR produktams PAA gelyje frakcionuoti

DD-PGR produktai frakcionuojami 6 % PAA gelyje denatūruojančiomis sąlygomis, naudojant vertikalios elektroforezės sistemą Sequencing Cell Sequi-Gen[®] GT (Bio-Rad, JAV) bei srovės šaltinį PowerPac[™] HV (Bio-Rad, JAV). Elektroforezė atliekama esant 1800 V įtampai 1× TBE buferiniame tirpale.

Kadangi DD-PGR produktai po frakcionavimo PAA gelyje dažomi sidabru, prieš elektroforezę abu gelio kasetės stiklai (38 cm × 50 cm) paruošiami taip, kad elektroforezei pasibaigus gelis lengvai atliptų nuo vieno stiklo, o prie

stiklo, su kuriuo kartu bus dažomas, liktų prilipęs. Stiklų paruošimas atliekamas traukos spintoje. Iš pradžių abu stiklai kruopščiai plaunami karštu vandeniu su detergentu, tada kelis kartus skalaujami distiliuotu H₂O ir išdžiovinami. Tuomet abiejų stiklų darbiniai paviršiai 3× valomi 96 % EtOH plaušų nepaliekančia popierine servetėle, keičiant valymo kryptį skersai ir išilgai stiklo.

Ant stiklo, prie kurio dažymo metu liks prilipęs gelis, plaušų nepaliekančia servetėle tolygiai paskleidžiama 1,5 mL šviežiai paruošto *bind*-silano tirpalo ir paliekama džiūti 5 min. Stiklui nudžiūvus, jo paviršius 2× valomas 96 % EtOH plaušų nepaliekančia popierine servetėle, keičiant valymo kryptį skersai ir išilgai stiklo.

Stiklas, prie kurio PAA gelis nelimpa, tolygiai padengiamas 1,5 mL *repel*-silano tirpalu ir paliekamas džiūti 5 min. Tada nuo stiklo lengvai trinant plaušų nepaliekančia servetėle nuvalomas *repel*-silano perteklius.

Iš taip paruoštų stiklų, 0,4 mm storio vinilinių tarpiklių, „ryklio dantų“ tipo šukų ir svertinių veržtuvų sumontuojama elektroforezės kasetė ir pagal elektroforezės sistemos gamintojo rekomendacijas užpilamas PAA gelis. Amplifikacijos produktų denatūracija prieš elektroforezę atliekama naudojant „RNAspectra“ rinkinyje esantį formamido dažą pagal gamintojo pateiktas rekomendacijas.

Mutanto *tw*₂ ir jo pradinės veislės ‘Auksiniai II’ DD-PGR amplifikacijos produktai, gauti naudojant tą pačią pradmenų kombinaciją, gelyje leidžiami gretimuose takeliuose, kad po frakcionavimo būtų galima identifikuoti cDNR juosteles, kurių raiška mutante *tw*₂ ir jo pradinėje veislėje ‘Auksiniai II’ buvo skirtinga.

2.2.9.4. PAA gelio dažymas sidabru

PAA dažymui sidabru naudojamas modifikuotas Sanguinetti ir kt. (1994) pasiūlytas protokolas. Elektroforezei pasibaigus, gelio kasetė atvėsinama iki

kambario temperatūros ir išardoma atsargiai atskiriant abu kasetės stiklus. PAA gelis kartu su stiklu merkiamas į +4 °C temperatūros FIX/STOP tirpalą ir nuolat judinant fiksuojamas 5 min. Tuomet gelis perkeliamas į vonelę su sidabro dažais ir nuolat judinant impregnuojamas 6–7 min. Ištrauktas iš sidabro dažų gelis kelioms sekundėms įmerkiamas į dejonizuotą H₂O ir perkeliamas į vonelę su ryškinimo tirpalu, kuriame inkubuojamas 5–10 min., kol geltoname fone išryškėja tamsios spalvos DD-PGR produktų juostelės. Ryškinimo reakcija nutraukiama 2 min. panardinus gelį į kambario temperatūros FIX/STOP tirpalą.

Šiuo būdu dažytas PAA gelis per naktį paliekamas džiūti, o ryte nuskaitymas skaitytuvu.

2.2.10. DD-PGR produktų išskyrimas iš PAA gelio, jų reamplifikacija ir paruošimas sekos nustatymui

Atlikus nuskaitymą, išdžiūvęs sidabru dažytas PAA gelis įmerkiamas į dejonizuotą H₂O ir 1 val. rehidratuojamas. Tada gelis ištraukiamas iš vandens, iš jo skalpeliu išpjaunamos diferencinės raiškos cDNR juostelės ir dedamos į plonasienius polipropilėninius 0,2 mL tūrio mėgintuvėlius. Reamplifikacija atliekama du kartus, reamplifikacijai II naudojant 100× skiestus reamplifikacijos I produktus. Kiekvieno cDNR pavyzdžio reamplifikacija II atliekama trigubame tūryje (trijuose mėgintuvėliuose), kad susidarytų pakankamas sekos nustatymui cDNR kiekis. Reamplifikacija I ir II atlikta naudojant rinkinį „RNAspectra“ pagal gamintojo rekomendacijas.

Reamplifikacijos II produktai frakcionuojami 1 % agarozės gelyje 0,5× TBE buferiniame tirpale. Frakcionuoti reamplifikacijos II fragmentai išskiriami iš agarozės gelio ir paruošiami sekvenavimui taip pat, kaip aprašyta 2.6. skyriuje.

Sėkmingai sekvenuotas cDNR sekos lyginamos su NCBI duomenų bazėje esančia informacija naudojantis BLASTN paieškos įrankiu. Papildomai homologiškų sekų paieška atlikta EMBL-EBI bei DDBJ duomenų bazėse.

2.2.11. Miežio kaliaus kultūrų indukcija ir kultivavimas

Dėl intensyvios ląstelių proliferacijos kaliaus kultūros yra tinkama modelinė sistema augalo meristemoms *in vitro* tirti. Mūsų tyrimuose kaliaus kultūros buvo naudojamos sintetinio auksino 2,4-D ir auksino inhibitorių poveikiui miežio viengubiems ir dvigubiems mutantams tirti.

2.2.11.1. MS terpės miežio kaliaus indukcijai ruošimas

Kaliaus indukcijai ir auginimui naudojama Murashige ir Skoog (MS) terpė. Terpė ruošama iš MS terpės bazinių druskų mišinio, MS terpės 1000× vitaminų tirpalo ir kitų organinių priedų, kurių kiekiai MS terpėje nurodyti 6 lentelėje.

Ruošiant terpę, iš pradžių nedideliame kiekyje distiliuoto H₂O ištirpinamas reikiamas kiekis MS terpės bazinių druskų mišinio, įpilama 1000×vitaminų tirpalo ir suberiama sacharozė. Reikiamas kiekis 2,4-D ištirpinamas keliuose lašuose 96 % EtOH ir greitu judesiu supilamas į ruošiamą terpę. Tada į terpę įpilamas trūkstamas tūris distiliuoto H₂O ir pakoreguojamas pH (pH = 5,6–5,8). Galiausiai į terpę suberiamas agaras ir autoklavuojama (autoklavas Astell AMA 240 BT, Jungtinė Karalystė) 121 °C 15 min. Autoklavuota terpė atvėsinama iki 50 °C laminariniame bokse, išpilstoma po 10–13 mL į sterilias 5 cm skersmens Petri lėkštes ir paliekama sustingti.

6 lentelė. Neorganiniai ir organiniai MS terpės komponentai ir jų kiekiai

MS terpės komponentas	Kiekis MS terpėje
MS terpės makro- ir mikrodruskų mišinys	4,3 g·L ⁻¹
MS terpės vitaminų tirpalas (1000×)	1,0 mL·L ⁻¹
2,4-D	3, 6 arba 9 mg·L ⁻¹
Sacharozė	30,0 g·L ⁻¹
Agaras	8,0 g·L ⁻¹

Kaliaus kultūrų modelinėje sistemoje buvo tiriama 2,4-D koncentracijos įtaka miežio mutantų kaliaus indukcijai ir augimui, todėl šiam eksperimentui gaminamos trys MS terpės modifikacijos su trimis 2,4-D koncentracijomis (įprasta kaliaus indukcijai $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ir $9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

2.2.11.2. Miežio gemalo preparavimas

Kaliaus indukcijai grūdai sterilinami taip pat, kaip aprašyta 2.2.7. skyriuje. Išbrinkę grūdai preparuojami steriliame laminariniame bokse stebint per binokuliarinį stereomikroskopą. Grūdas dedamas ant objektinio stiklelio vagele žemyn. Viename jo gale matoma šviesesnė dėmė – gemalo su skydeliu (lot. *scutellum*) kontūrai. Skalpelio ir preparavimo adata nuo grūdo pašalinamas kietas išorinis lukštas, tada išpjaunamas gemalas su embrionine ašimi bei nedidele dalimi skydelio ir eksplantas padedamas ant terpės paviršiaus adaksialine puse (embriono ašimi) žemyn.

Gemalų eksplantai auginami termostate INB 500 (Memmert, Vokietija) tamsoje, $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Po 4 sav. iš jų susiformavusio kaliaus augimas įvertinamas pasvėrus analitinėmis svarstyklėmis Kern ABJ (Vokietija). Susiformavęs kalius taip pat gali būti naudojamas įvairių medžiagų poveikiui *in vitro* tirti (žr. 2.2.11.3. skyrių). Tokiu atveju kalius perkeliamas į naują MS terpę, kurioje tokiomis pačiomis sąlygomis termostate auginamas dar 4 sav.

2.2.11.3. Aukšinių inhibitorių poveikio kaliaus augimui tyrimas

Auksino inhibitorių poveikio miežio kaliaus augimui tyrime naudoti du antiauksinai, 2-(p-chlorofenoksi)-izobutano rūgštis (PCIB) ir *trans*-cinamo rūgštis (TCA)) bei trys auksino polinio transporto inhibitoriai, 9-hidroksifluoren-9-karboksirūgštis (HFCA), 2,3,5-trijodbenzorūgštis (TIBA) ir 1-N-naftilftalomo rūgštis (NPA). Galutinė visų inhibitorių koncentracija atitinkamose MS terpės

modifikacijose 30 μM . Kadangi visos medžiagos yra jautrios aukštai temperatūrai, reikiamas kiekis auksino inhibitorių ištirpdomas keliuose lašuose 96 % EtOH (galutinė EtOH koncentracija terpėje 0,1 %) ir greitu judesiu supilamas į autoklavuotą ir iki 50–55 °C atvėsintą MS terpę. Auksinų inhibitorių poveikis kaliaus augimui tiriamas esant tiek įprastai (3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), tiek padidintai (6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 2,4-D koncentracijai MS terpėje.

Kadangi terpėje esant auksino inhibitorių kaliaus indukcija nevyksta, auksino inhibitorių poveikis tiriamas naudojant jau susiformavusį kalių, 8 sav. augintą MS terpėje su 3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D. Po šio laiko, kiekvienas kalius aseptinėmis sąlygomis dalinamas į 6 dalis, kiekviena kurių pasverama analitinėmis svarstyklėmis ir subkultivuojama į MS terpę su vienu iš penkių auksino inhibitorių bei ant kontrolinės MS terpės be šių medžiagų. Kaliaus segmentų masės prieaugis įvertinamas po 4 sav. kultivavimo atitinkamoje MS terpės modifikacijoje. Kaliaus augimo intensyvumas išreiškiamas kaliaus augimo indeksu GI (angl. *Growth Index*), kuris skaičiuojamas pagal formulę:

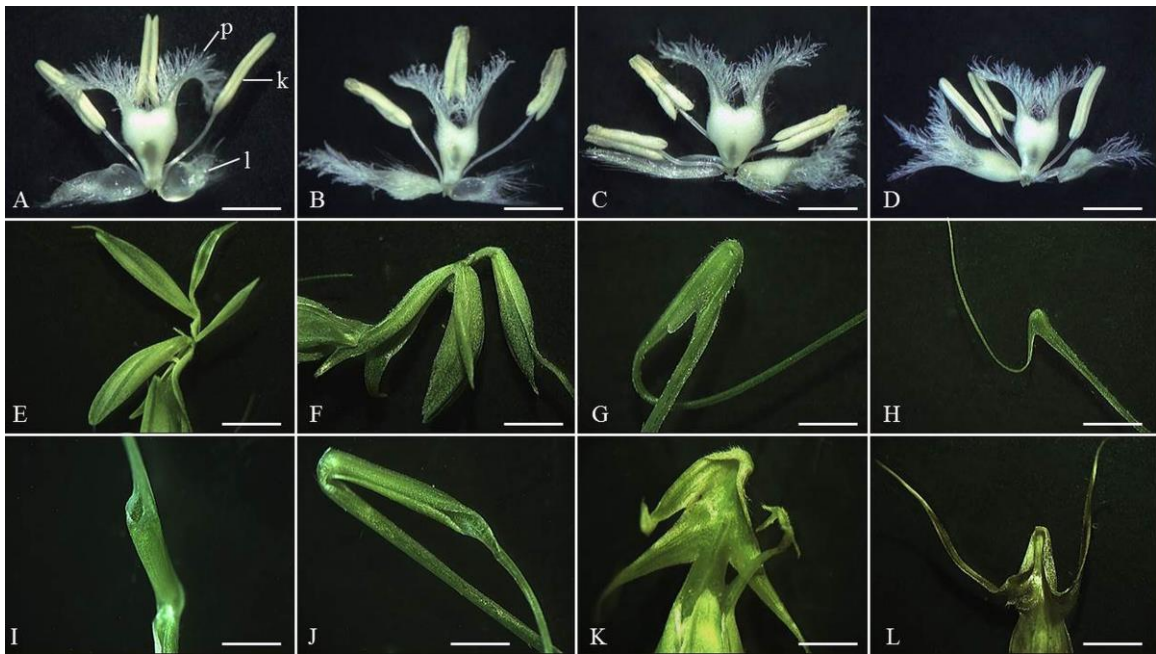
$$\text{GI} = (m - m_0)/m_0$$

m_0 – pradinė kaliaus segmento masė, m – kaliaus segmento masė po 4 sav. augimo atitinkamoje terpėje.

III. REZULTATAI

3.1. Dvigubų mutantų *Hv-tw₂;Hd* žiedo/žiedyno fenotipo nestabilumas

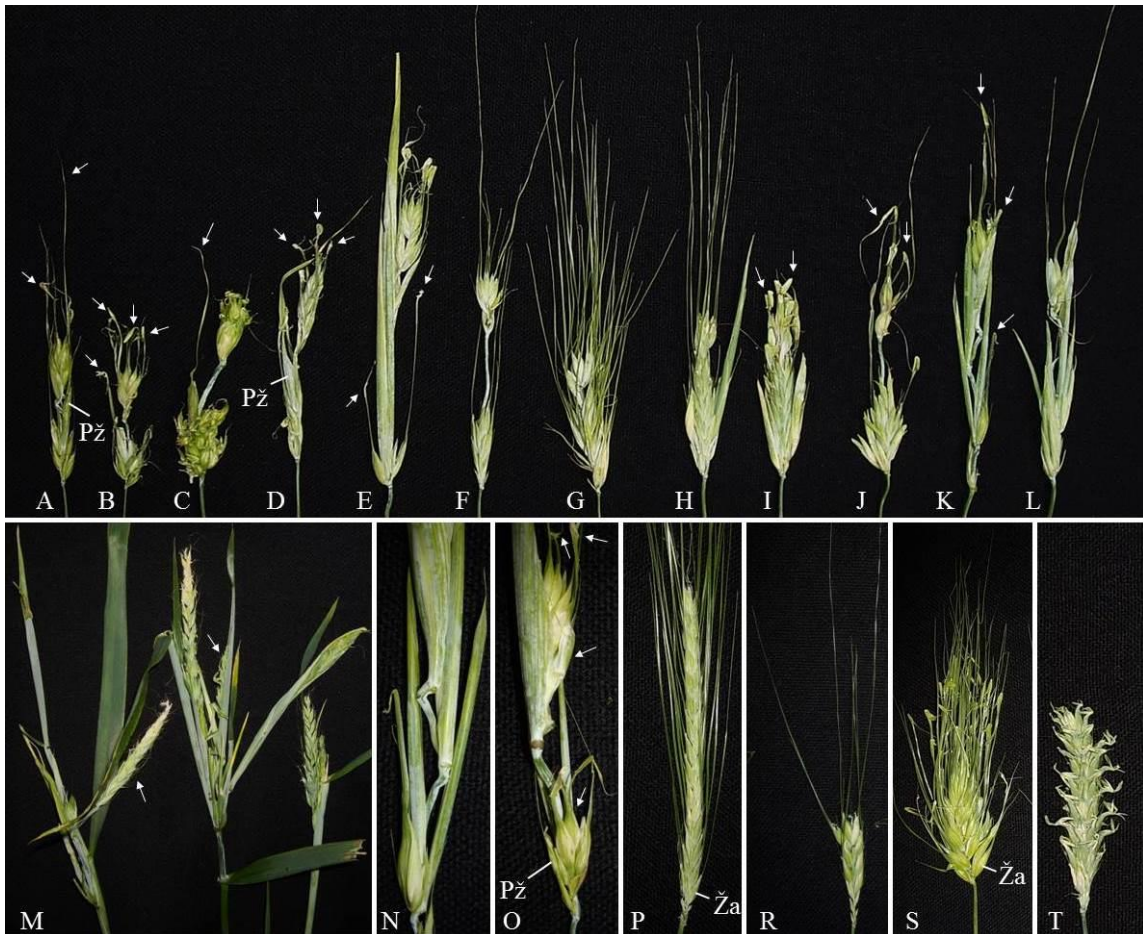
Dvigubuose *Hv-tw₂;Hd* mutantuose, gautuose sukryžminus viengubus homeozinius žiedo/žiedyno *Hv-tw₂* ir *Hv-Hd* mutantus, besiskiriančius skirtinguose raidos etapuose pasireiškiančiomis homeozėmis, įvairios variacijos tiek pagrindiniame žiede, tiek ir vietoje akuoto arba ant jo išsivysčiusiame ektopiniame žiede bei varpos architektūroje yra savaime tikėtinas reiškinys.



3 pav. Miežio dvigubų *Hv-tw₂;Hd* mutantų žiedo variacijos. (A–D) Pagrindinio žiedo struktūros variacija: (A) *WT* žiedas (l – lodikulės, k – kuokelis, p – piestelė); (B–D) žiedai su transformuotomis lodikulėmis. (E–L) žiedažvynio/akuoto pereinamosios zonos variacijos: (E, F) keli ektopiniai žiedai ant to paties akuoto; (G, H) skirtingų vystymosi stadijų invertuotos „kepurės“ (angl. *cap*) pavidalo ektopinės struktūros; (I, J) vamzdelio pavidalo (angl. *tube-like*) (I) neinvertuotos ir (J) invertuotos padėties ektopinės struktūros; (K, L) sparnų variacija – (K) dvigubi sparnai, (L) sparnai, perienantys į akuotėlius. Mastelio atkarpos: (A–D) 1 mm, (E–G, I–L) 2 mm, (H) 4 mm

Ištyrus kai kuriuos VU Botanikos sode saugomus *Hv-tw₂;Hd* dvigubus mutantus nustatyta, jog šių mutantų pagrindinio bei ektopinio žiedo struktūros

variacijų mastas stipriai pralenkia viengubiems (tėviniams) mutantams būdingas variacijas (3 pav.), be to, buvo nustatyta naujų, viengubiems mutantams nebūdingų varpos struktūros variantų (4 pav.)



4 pav. Miežio dvigubų mutantų žiedyno variacijos. (A–L) *Hv-tw₂;Lh* žiedyno variantai: (A–E) varpos su varpučių neturinčiomis sritimis („trūkais“), apačioje gaubiamomis į pažiedes/lapus panašių struktūrų; (F) ilgas „trūkis“ be į pažiedes/lapus panašių struktūrų; (G) varpa su trumpu „trūkiu“; (H–L) įvairaus dydžio į stiebus panašios struktūros varpose (rodyklės žymi nežymias ektopines išaugas ant akuotų). (M–O) *leafy* tipo dvigubi mutantai: (M) *Hv-tw₂;H N6* (rodyklės žymi ektopines varpas), (N–O) *Hv-tw₂;Lh* (P–S) Viengubų mutantų varpos: (P) *WT*; (R) *Hv-tweaky spike 2 (Hv-tw₂)*; (S) *Hv-Lemma hooded (Hv-Lh)*; (T) *Hv-Hooded/Kap1 (Hv-H)*. Ža – žiedažvynis su akuotu, Pž – pailgėjęs žiedažvynis

Laukinio tipo dvieilio miežio varpa pavaizduota 4 pav. (P), o laukinio tipo žiedas, turintis mūsų tyrimuose analizuotus žiedo organus (lodikules, kuokelius ir

piestelę), pavaizduotas 3 pav. (A). Pažymėtina, jog fenotipo variacijos buvo būdingos ne tik skirtingoms dvigubų mutantų linijoms, bet ir skirtingoms to paties augalo varpoms ir netgi skirtingoms to paties žiedyno (varpos) sritims (4 pav., A–O). Pastaroji fenotipo variacija ryškiausiai pasireiškė, kai vietoje akuotų arba ant jų susidarė žiedo pavidalo struktūros, kurios net ir toje pačioje varpoje įvairavo nuo nežymių sustorėjimų ant akuotų iki visiškai išsivysčiusių, tačiau sterilių ektopinių žiedų (4 pav., A–E ir I–K). Be to, atlikus miežio dvigubų mutantų fenotipo analizę paaiškėjo, kad šių mutantų fenotipo variacijų spektras yra toks platus, kad gerokai viršija tėvinių viengubų mutantų fenotipinę variaciją bei apima didelę dalį kitų aprašytų miglinių augalų mutantų fenotipų. Šių variacijų kiekybinis įvertinimas ir statistinė analizė pateikti 3.3. ir 3.4. skyriuose, kuriuose analizuojamas auksino inhibitorių PCIB ir HFCA poveikis pagrindinio ir ektopinio žiedo struktūrai bei sintetinio auksino 2,4-D poveikis žiedo/žiedyno struktūrai.

Dvi unikalios daugelio tirtų miežio dvigubų mutantų ypatybės, į kurias atkreiptas dėmesys tiriant varpos morfologijos pokyčius, buvo (1) įvairaus išsivystymo laipsnio ektopinių į pažiedes (varpažvynius), lapus ir stiebus panašių struktūrų susidarymas bei (2) ilgų ašies segmentų, neturinčių varpučių („trūkių“), atsiradimas varpose. Šie pokyčiai nėra būdingi nei vienam tėviniam (*Hv-tw₂* ir *Hv-Hd*) mutantui (4 pav.). Tiek miežiuose, tiek kituose migliniuose augaluose, pažiedės vytymasis dažniausiai yra nuslopintas, pažiedės yra būdingos kai kuriems miglinių augalų mutantams ir transgeniniams augalams (Pozzi ir kt., 2000; Forster ir kt., 2007; Whipple ir kt., 2010; Houston ir kt., 2012; Lee ir An, 2012; Gallavotti, 2013).

Kaip minėta, dalis mūsų tyrimuose naudotų miežio dvigubų mutantų linijų turėjo naujų, tėviniams viengubiems mutantams nebūdingų ir nestabiliai paveldimų požymių (7 lentelė). Pagal du iš jų, gebėjimą formuoti ektopines į pažiedes/lapus/stiebus panašias struktūras bei pagal ilgus varpučių neturinčius

„trūkius“ varpose (4 pav.), varpos suskirstytos į atskiras fenotipines grupes, sudarančias konkrečios dvigubo mutanto linijos varpų fenotipinį spektrą.

Dažniausiai sutinkamą fenotipo grupę sudarė varpos, formuojančios į lapus panašias struktūras ir „trūkius“ (7 lentelė, A grupė; 4 pav., A–F) bei varpos, formuojančios į stiebus panašias struktūras (7 lentelė, B grupė; 4 pav., H, I, K ir L). Kai kuriais atvejais ektofiniai varpose išsivystę stiebai gali suformuoti papildomas varpas (4 pav., M), be to, nustatyta ir retesnių varpos pokyčių, tokių, kaip „svogūnėliai“, susiformuojantys varpose iš perteklinių į varpažvynius/žiedažvynius panašių struktūrų (2 pav., O), primenančių miežio *SUPERNUMERARY BRACT (SNB)* (angl. papildomos pažiedės) mutantą (Lee ir An, 2012).

7 lentelė. Miežio dvigubų mutantų ektofinių naujadarų (į lapus/stiebus panašių struktūrų ir ilgų, varpučių neturinčių, sričių) dažnio palyginimas dvejose kartose lauko sąlygomis

Kryžminimo kombinacija ¹	F ₇					F ₈	
	n	Varpų fenotipai ² , % ± SE				n	Pokyčių suma, % ± SE
		A	B	Kt.	Suma (A+B+Kt.)		
<i>Hv-tw₂ × Hv-Lh</i>	178	16,8	9,5	33,2	59,5 ± 3,6	962	34,3 ± 1,5
<i>Hv-tw₂ × Hv-Mf</i>	504	22,0	0,4	41,5	63,9 ± 2,1	307	48,2 ± 2,9
<i>Hv-tw₂ × Hv-Hcs</i>	112	0	17,0	1,8	18,8 ± 3,7	210	31,9 ± 3,2
<i>Hv-tw₂ × Hv-H</i>	391	4,1	6,4	15,4	25,9 ± 2,3	785	20,5 ± 1,4
<i>Hv-tw₂ × Hv-Dwh</i>	66	0	4,5	1,5	6,0 ± 2,9	512	7,6 ± 1,2
<i>Hv-tw₂ × Hv-Br</i>	89	2,2	48,3	13,5	64,0 ± 5,1	722	18,8 ± 1,5

¹*Hv-tw₂ – Hv-tweaky spike 2*, *Hv-Mf – Hv-Multiflorous*, *Hv-Hcs – Hv-Hooded on center spikelet*, *Hv-H – Hv-Hooded/Kap1.a* (Colsess II), *Hv-Dwh – Hv-Dense wing hood*, *Hv-Br – Hv-Brittle rachis*.

²Pokyčių tipai: A – varpos su į lapus panašiomis struktūromis ir ilgomis varpučių neturinčiomis sritimis („trūkiškas“) (žr. 4 pav., A–F); B – varpos su į stiebus panašiomis struktūromis (žr. 4 pav., H, I, K, L); Kt. – varpos su ilgais (žr. 4 pav., F) arba trumpais (žr. 4 pav., G.) „trūkiškais“, bet neturinčios į lapus/stiebus panašių struktūrų arba „svogūnėlių“ formuojančios varpos (žr. 2 pav., O); n – ištirtų varpų skaičius

Toks ektofinis į lapus/stiebus panašių struktūrų susidarymas varpose būdingas ir kai kuriems kitiems miežio mutantams ir hibridams (Babb ir Muehlbauer, 2003; Forster ir kt., 2007; Trevaskis ir kt., 2007; Curaba ir kt., 2013), o ilgos varpos sritys be varpučių primena žiedų neformuojančias, nešakotas, plikas, smeigtuko pavidalo (angl. *pin-formed*) struktūras, būdingas miglinių augalų auksino biosintezėje, transporte ar atsakuose dalyvaujančių genų mutantams (McSteen ir kt., 2007; Morita ir Kyojuka, 2007; Gallavotti, 2013).

Varpučių neformuojanti varpos ašies sritis gali būti labai sustorėjusi (4 pav., C, N ir O) arba įgyti zigzago pavidalą (4 pav., K ir N), panašų į ryžio *leafy head* (Duan ir kt., 2003) ar *aberrant panicle organization 1* (Ikeda ir kt., 2007) mutantų, o taip į miežio linijos OxBM10 su sustiprinta MADS superšeimos geno BM10 raiška, fenotipą, pavadintą ‘concertina’ (Trevaskis ir kt., 2007) bei miežio OE171 linijos su sustiprinta *Hvu pri-miR171a* raiška žiedyno ašį (Curaba ir kt., 2013). Dvigubų *Hv-tw2;Hd* mutantų varpos morfologijos tyrimų rezultatai rodo, kad ilgas „trūkis“ varpoje gali susidaryti skirtingais būdais: gali stipriai pailgėti ir sustorėti vienas varpos tarpubamblis (4 pav., F) arba „trūkis“ susidaro iš kelių varpos bamblių ir pailgėjusių tarpubamblių. Tuo pačiu gali susiformuoti jau minėtos zigzago pavidalo struktūros (4 pav., K ir N). Pastarasis reiškinys taip pat parodo galimą egzistavimą genetinių veiksnių, kontroliuojančių žiedyno ilgį ir ribojančių varpos tęsimą susidarant zigzagui.

Nepaisant skirtingose dvigubų mutantų kartose nustatytų fenotipų dažnių skirtumų, kurie gali būti nulemti įvairių ekologinių veiksnių, išskirtinai tik dvigubiems mutantams būdingas nestabilus ektopinių į lapus/stiebus panašių struktūrų ir ilgų „trūkių“ susidarymas palikuonių kartose tęsiasi iki šiol (F_{11}) (F_7 ir F_8 individų ektopinių į lapus/stiebus panašių struktūrų susidarymo dažnis pateiktas 7 lentelėje). Mūsų bandymuose ektopinių struktūrų variacija buvo nustatyta tiek lauko, tiek šiltnamio sąlygomis, nors lauko sąlygomis tokios variacijos buvo daug ryškesnės.

Kaip minėta, didelio masto fenotipo variacija buvo nustatyta pagal apatinio žiedažvynio/akuoto pereinamojoje zonoje ir ant akuoto susiformavusius ektopinius žiedus bei jų išsivystymo laipsnį (t.y. akuoto transformaciją) (2 ir 4 pav.), ektopinių žiedų skaičių ant to paties akuoto (3 pav., E ir F), įvairaus išsivystymo laipsnio invertuotas „kepurės“ pavidalo struktūras (3 pav., G ir H) bei „vamzdelio“ pavidalo struktūras ant akuotų. Pastarojo tipo struktūros gali būti tiek invertuotos, tiek neinvertuotos (3 pav., I ir J), nors invertuota ektopinių žiedų padėtis yra daugelio *Hv-Hooded/Kap1* tipo mutantų ypatybė. Šis reiškinys iki šiol

yra nepakankamai ištirtas, todėl reikalauja išsamesnių tyrimų (Williams-Carrier ir kt., 1997; Zanotti ir kt., 2010). Be to, nustatyta ir „sparnų“, esančių apatinio žiedažvynio/akuoto pereinamojoje zonoje, bei akuotėlių (ektopinio žiedo formuojamų į akuotus panašių struktūrų), morfologijos variacija: kai kuriais atvejais buvo aptikti netgi sudvigubę ar į akuotėlius transformuoti sparnai (3 pav., K ir L), o kai kurie ektopinių akuotėlių variantai priminė kukurūzo *Zm-silky1* mutantų fenotipą (Ambrose ir kt., 2000). Šie fenotipai rodo galimai egzistuojant specifinius genetinius veiksnius, kontroliuojančius sparnų ir akuotų vystymąsi. Vienas iš dažnesnių tik dvigubiems mutantams nustatytų pokyčių tipų buvo įvairaus laipsnio apatinio žiedažvynio pailgėjimai, kurie gali būti traktuojami kaip silpnai išreikšta žiedažvynių transformacija į ektopines į lapus panašias struktūras. Miežio pažiedės (varpažvynių, angl. *bract*) raida įprastai yra blokuota, todėl tokių struktūrų atsiradimas irgi yra ektopinis reiškinys.

Apibendrinant didelio masto įvairių ektopinių į žiedą panašių struktūrų pokyčių dėsningumus, galima išskirti tam tikras raidos kryptis (trendus), pradedant nežymiomis ektopinėmis išaugomis ant akuotų → pereinančiomis į vamzdelio pavidalo struktūras (neinvertuotoje/invertuotoje padėtyje) → baigiant žiedais su steriliais reprodukciniais organais. Tuo pačiu, apatinio žiedažvynio ir sparnų variacijos galimai rodo egzistuojant kitą vystymosi kryptį (trendą).

Viengubų ir ypač dvigubų miežio mutantų fenotipo įvairovė gali turėti ir praktinių, netgi labai netikėtų, pritaikymų – stabilūs dvigubi miežio mutantai ir kai kurie viengubi homozigotiniai *Hv-Hd* tipo mutantai gali būti tiesiogiai panaudoti kaip želdynų dekoratyvieji augalai, taip pat sausoms puokštėms ir verboms, ypač turint omenyje ribotą floristikoje naudojamų varpinių augalų asortimentą (Siuksta ir kt., 2012). Tačiau būtina pataikyti reikiamą dekoratyvią raidos fazę, kai augalai jau išplaukėję, bet varpos dar nepradėjusios bręsti, o norint turėti visą varpos spalvų gamą – kai varpos visiškai subręsta (5 pav.).



5 pav. Dvigubų *Hv-tw₂;Brittle rachis* mutantų įvairovė ir varpos bei grūdų spalvos kitimas skirtingose brandos stadijose

3.2. Viengubų ir dvigubų miežio mutantų kaliaus augimo palyginimas ir HC toksino poveikis

3.1. skyriuje pateikta informacija leidžia daryti prielaidą, kad dvigubų *Hv-tw₂;Hd* mutantų fenotipo nestabilumas gali būti susijęs ne tik su ektopine žiedo organų tapatumo genų raiška, bet ir su genais, reguliuojančiais meristeminių ląstelių dalinimąsi. Ši prielaida buvo patikrinta palyginus viengubų ir dvigubų mutantų kaliaus augimo intensyvumą. Taip pat buvo atsižvelgta į mutantų gebėjimą žiedynuose (varpose) formuoti į lapus/stiebus panašias ektopines išaugas (8 lentelė).

Labai dideli skirtumai nustatyti tarp dviejų *Hv-tweaky spike* tipo alelių. *Hv-tw* alelį turinčių augalų kaliaus augimo intensyvumas buvo labai silpnas lyginant su *Hv-tw₂* alelį turinčiais augalais ($P < 0,001$), naudotais kaip motininis genotipas dvigubiems mutantams gauti. Pastarojo mutanto kaliaus augimo intensyvumas beveik nesiskyrė nuo *WT* (‘Auksiniai II’ veislės). Kita vertus, visiems tirtiems viengubiems *Hv-Hd* tipo mutantams bei dvigubiems *Hv-tw₂;Hd* mutantams buvo būdingas santykinai mažesnis nei *wt* kaliaus augimo intensyvumas, be to, kai

kurių dvigubų mutantų kaliaus augimo intensyvumas buvo nežymiai didesnis nei atitinkamų tėvinių *Hv-Hd* tipo mutantų.

8 lentelė. Miežio viengubų ir dvigubų mutantų kaliaus augimo intensyvumas (GI ± SE) terpėje su DMSO ir HC toksinu, arba be jų

Viengubas/dvigubas mutantas	Kontrolė (H ₂ O)	Kontrolė (DMSO)	DMSO + HC	Augalų aukštis (cm)
<i>WT/wt</i> ('Auksiniai II') (-)	4,18 ± 0,57	3,18 ± 0,50	4,26 ± 0,66	75,2 ± 1,2
<i>Hv-tw</i> (-)	0,35 ± 0,08 ^{c3}	0,70 ± 0,16 ^{c3}	1,30 ± 0,24 ^{c3}	71,7 ± 0,9
<i>Hv-tw₂</i> (-)	3,90 ± 0,58	3,97 ± 0,54	2,82 ± 0,30 ^a	66,4 ± 1,3 ³
<i>Hv-Lh</i> (-)	1,46 ± 0,24 ^{c3}	1,91 ± 0,35 ^{a2}	1,61 ± 0,30 ^{c2}	50,3 ± 1,0 ³
<i>Hv-tw₂ × Hv-Lh</i> N13 (-)	2,00 ± 0,33 ^{c2}	1,84 ± 0,32 ^{a3}	1,30 ± 0,22 ^{c3}	49,3 ± 0,8
<i>Hv-tw₂ × Hv-Lh</i> N17 (+-)	2,61 ± 0,52 ^a	2,08 ± 0,34 ²	1,48 ± 0,19 ^{c3}	57,9 ± 1,0 ³
<i>Hv-tw₂ × Hv-Lh</i> N11-18 (+)	2,17 ± 0,40 ^{b1}	2,41 ± 0,22 ²	2,86 ± 0,35	67,4 ± 1,3 ³
<i>Hv-tw₂ × Hv-Lh</i> N19 (+)	1,11 ± 0,18 ^{c3}	1,65 ± 0,27 ^{b3}	2,39 ± 0,48 ^a	70,6 ± 1,3 ³
<i>Hv-H</i> (-)	2,03 ± 0,28 ^{c2}	2,17 ± 0,25 ²	2,00 ± 0,31 ^b	71,4 ± 1,2
<i>Hv-tw₂ × Hv-H</i> N8 (-)	2,14 ± 0,25 ^{b2}	1,51 ± 0,18 ^{b3}	1,63 ± 0,19 ^{c3}	75,2 ± 0,8
<i>Hv-Dwh</i> (-) ²	2,08 ± 0,42 ^{b1}	2,35 ± 0,26 ²	3,85 ± 0,39 ¹	30,4 ± 0,8 ³
<i>Hv-tw₂ × Hv-Dwh</i> N25 (+)	2,38 ± 0,30 ^{b1}	2,55 ± 0,33 ¹	3,15 ± 0,50	80,8 ± 1,0 ³
<i>Hv-Hcs</i> (-)	1,59 ± 0,28 ^{c3}	0,68 ± 0,11 ^{c3}	2,82 ± 0,29 ^a	91,8 ± 1,1 ³
<i>Hv-H × Hv-Hcs</i> N9 (+)	2,10 ± 0,20 ^{c2}	2,07 ± 0,25 ²	3,57 ± 0,45	89,8 ± 1,1
<i>Hv-Mf</i> (-)	2,01 ± 0,51 ^{b1}	2,23 ± 0,77	1,41 ± 0,38 ^{c2}	44,2 ± 0,9 ³
<i>Hv-tw₂ × Hv-Mf</i> N14 (+)	2,45 ± 0,25 ^{b1}	2,13 ± 0,25 ²	2,77 ± 0,79	66,6 ± 0,9 ³

GI – kaliaus augimo indeksas (angl. *Growth Index*); (+,-) – į lapus/stiebus panašių struktūrų susidarymas varpose: (+) – susidaro, (-) – nesidaro, (+-) – susidaro lauko sąlygomis, nesidaro šiltnamio sąlygomis; a – $P < 0,05$, b – $P < 0,01$, c – $P < 0,001$, lyginant su *WT (wt)* ('Auksiniai II' veisle); 1 – $P < 0,05$, 2 – $P < 0,01$, 3 – $P < 0,001$, lyginant su motininiu *Hv-tw₂* mutantu; augalų aukštis lyginamas taip pat – atitinkamo mutanto su *WT (wt)* arba konkretaus dvigubo mutanto su atitinkamu tėviniu *Hv-Hd* mutantu

Tačiau lauko sąlygomis pagal augalų aukštį įvertinus intaktinių augalų augimo intensyvumą, panašumų su kaliaus augimo tendencijomis nenustatyta (8 lentelė). *Hv-Hcs* mutanto bei dvigubų mutantų linijų *Hv-H;Hcs* N9 ir *Hv-tw₂;Dwh* N25 aukštis buvo didesnis už *wt* ('Auksiniai II') (visais atvejais $P < 0,001$), nors šių genotipų kaliaus augimo intensyvumas kontrolinėje terpėje (be DMSO ir HC toksino) buvo mažesnis už *WT* (8 lentelė). Be to, nors šiame tyrime DMSO buvo naudotas tik kaip polinis tirpiklis HC toksinui ištirpinti, ši medžiaga netikėtai skatino *Hv-tw* mutantų kaliaus augimą – terpėje su DMSO šio genotipo kaliaus augimo intensyvumas buvo dvigubai intensyvesnis nei terpėje be DMSO ($P <$

0,05). Daugelio kitų tirtų genotipų kaliaus augimui DMSO reikšmingos įtakos neturėjo, o pavieniais atvejais (*Hv-Hcs* ir *Hv-tw₂;H N8*) DMSO kaliaus augimą slopino (atitinkamai, $P < 0,05$ ir $P < 0,01$).

Ištyrus HC toksino poveikį *Hv-tw* mutanto kaliaus augimui, nustatytas dar stipresnis kaliaus augimą stimuliuojantis efektas, kuris buvo beveik du kartus stipresnis nei terpėje tik su DMSO (8 lentelė). HC toksinas taip pat skatino *Hv-Dwh* bei *Hv-H;Hcs N9* genotipų (jų kaliaus augimui DMSO reikšmingos įtakos neturėjo) bei *Hv-Hcs* mutanto (jo kaliaus augimą, atvirkščiai, DMSO patikimai slopino) kaliaus augimą. HC toksinas yra histonų deacetilazių inhibitorius, o, kaip įsitikinta iš diferencinio vazdinimo metodu gautų rezultatų, *WT* ir *Hv-tw₂* mutantas galimai skiriasi ir pagal genų, susijusių su histonų modifikacijomis, raišką (žr. 3.7.2 skyrių).

Taigi, HC toksino poveikis kaliaus augimui akivaizdžiai priklausė nuo augalo genotipo: HC toksinas stimuliuo dviejų viengubų *Hv-Hd* mutantų, *Hv-Dwh* ir *Hv-Hcs*, bei kelių skirtingos kilmės dvigubų mutantų linijų – *Hv-tw₂;Dwh N25*, *Hv-H;Hcs N9*, *Hv-tw₂;Lh N11* ir *N19*, kaliaus augimą. Pažymėtina, jog visi šie dvigubi mutantai varpose sudaro ektopines į lapus/stiebus panašias struktūras (8 lentelė).

3.3. Auksino inhibitorių atranka kaliaus kultūrose bei jų poveikis miežio mutantų pagrindinio ir ektopinio žiedo struktūrai

Kaliaus kultūros šiame darbe buvo panaudotos ne tik meristeminių ląstelių proliferacijos intensyvumui įvertinti, bet ir preliminariai parinkti efektyviai veikiančius auksino inhibitorius, tinkamus šių medžiagų poveikiui *in vivo* tirti. Trys iš kaliaus kultūrose tirtų medžiagų (HFCA, N-(1-naftil)ftalamo rūgštis (NPA) ir 2,3,5-trijodbenzenkarboksirūgštis (TIBA)) yra auksino polinio transporto inhibitoriai, o dvi medžiagos (PCIB ir *trans*-cinamo rūgštis (TCA)) yra auksino antagonistai (antiauxinai), nors antagonistinis TCA poveikis nėra visuotinai

pripažintas (Oono ir kt., 2003). Kadangi visos šios medžiagos yra auksino inhibitoriai, buvo tikimasi, kad sintetinio auksino 2,4-D koncentracijos padidėjimas (padvigubėjimas) mitybinėje terpėje galėtų sukelti kompensacinį efektą įvairiems joje esantiems auksino inhibitoriams. Tačiau toks kompensacinis efektas buvo būdingas tik terpėje su TIBA, kuri terpėje su standartinė sintetinio auksino 2,4-D koncentracija ($3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) stipriai slopino tiek *WT*, tiek *Hv-tw₂* mutanto kaliaus augimą, tačiau terpėje su dviguba 2,4-D koncentracija ($6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) kaliaus augimą slopinantis TIBA poveikis arba visai išnyko, arba buvo nereikšmingas (9 lentelė).

9 lentelė. Auksino inhibitorių poveikis *WT* (‘Auksiniai II’ veislės) ir *Hv-tw₂* mutanto kaliaus kultūrų augimo intensyvumui (GI) esant skirtingam sintetinio auksino 2,4-D fonui

Geno- tipas	2,4-D ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Auksino inhibitorius					
		0	PCIB	HFCA	NPA	TIBA	TCA
<i>WT</i>	3	$1,61 \pm 0,13$	$1,18 \pm 0,17^a$	$0,92 \pm 0,07^c$	$1,49 \pm 0,11$	$0,35 \pm 0,05^c$	$1,66 \pm 0,18$
<i>Hv-tw₂</i>		$1,21 \pm 0,14^1$	$0,96 \pm 0,13$	$0,77 \pm 0,11^a$	$1,11 \pm 0,18$	$0,32 \pm 0,05^c$	$1,31 \pm 0,14$
<i>WT</i>	6	$1,34 \pm 0,13$	$0,96 \pm 0,09^a$	$0,74 \pm 0,11^c$	$1,15 \pm 0,13$	$1,24 \pm 0,17$	$0,63 \pm 0,11^c$
<i>Hv-tw₂</i>		$1,37 \pm 0,26$	$0,74 \pm 0,16^a$	$0,70 \pm 0,10^a$	$1,12 \pm 0,17$	$0,99 \pm 0,14$	$0,63 \pm 0,14^a$

a – $P < 0,05$, b – $P < 0,01$, c – $P < 0,001$, lyginant su atitinkama kontroline grupe be inhibitorių (0); 1 – $P < 0,05$, lyginant mutantinį *Hv-tw₂* genotipą su *WT* (pradine veisle ‘Auksiniai II’)

Priešingą poveikį kaliaus augimui sukėlė TCA: MS terpėje su standartinė ($3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 2,4-D koncentracija šios medžiagos poveikis kaliaus augimui buvo nereikšmingas, bet esant dvigubai 2,4-D koncentracijai, TCA statistiškai patikimai slopino kaliaus augimą. Kaliaus augimo slopinimas, kurį sukėlė auksino transporto inhibitorius HFCA, nepriklausė nuo 2,4-D koncentracijos terpėje, o antiauksino PCIB poveikis tirtiems genotipams esant standartinė 2,4-D koncentracijai ($3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) buvo skirtingas – PCIB slopino *WT* kaliaus augimą ($P < 0,05$), o *Hv-tw₂* mutanto kaliaus augimui reikšmingo poveikio neturėjo. Remiantis šiais duomenimis, tyrimams *in vivo* buvo pasirinktas auksino polinio transporto inhibitorius HFCA bei antiauksinas PCIB.

WT ir *Hv-tw₂* mutanto kaliaus augimo intensyvumo skirtumai ($P < 0,05$) terpėje su standartinė kaliaus indukcijai 2,4-D koncentracija, lyginant su dviguba

2,4-D koncentracija, bei skirtingas auksino antagonisto PCIB poveikis šių genotipų kaliaus augimui rodo galimas *Hv-tw₂* mutacijos sąsajas su auksino biosintezės ir/arba pasiskirstymo defektais *Hv-tw* tipo mutantuose.

Galimas *Hv-tw₂* mutacijos sąsajas su auksino funkcijos sutrikimais patvirtina ir tai, kad paveikus augalus egzogeniniais PCIB bei HFCA, *Hv-tw₂* mutante padidėjo normalios struktūros pagrindinių žiedų dažnis (10 lentelė). Dėl šių abiejų auksino inhibitorių poveikio akivaizdžiai padidėjo žiedų, turinčių dvi lodikules, tris kuokelius ir vieną piestelę (2L+3K+1P), dalis bendrame spektre ($P < 0,001$; 10 lentelė) ir sumažėjo *Hv-tw* tipo mutantams būdingų žiedų, kurių viena ar abi lodikulės yra transformuotos į kuokelius ir/arba piesteles (LT frakcija), tačiau bendras žiedo organų skaičius yra nepakitęs, dalis bendrame spektre ($P < 0,001$). Be to, po poveikio abiem inhibitoriais (ypač HFCA) *Hv-tw₂* mutanto žiedų spektre padaugėjo žiedų, kuriuose pakitęs žiedo organų skaičius (ŽOS ir LT+ŽOS; $P < 0,001$; 10 lentelė).

HFCA ir PCIB poveikis dvigubų *Hv-tw₂;Hd* mutantų pagrindinio žiedo struktūrai, priešingai nei *Hv-tw₂*, buvo nevienareikšmis net lyginant bendros kilmės dvigubų mutantų linijas, tokias, kaip *Hv-tw₂;Lh* N11 ir N13 (10 lentelė): kaip ir *Hv-tw₂*, abu auksino inhibitoriai reikšmingai padidino normalios struktūros žiedų dalį bendrame spektre ir tai stebima abiejose dvigubų mutantų linijose N11 (+) ir N13 (-), tačiau priešingai nei *Hv-tw₂*, abu inhibitoriai reikšmingai sumažino LT frakcijos dalį tik N13 (-) linijoje, o N11 (+) linijoje, kuriai būdingos ektopinės į lapus/stiebus panašios išaugos, šis efektas buvo nežymus. PCIB ir HFCA poveikis žiedo organų skaičiaus kitimui šiose linijose taip pat buvo nevienareikšmis: po poveikio abiem inhibitoriais N11 linijoje sumažėjo žiedų su pakitusiu žiedo organų skaičiumi (ŽOS ir LT+ŽOS) dalis, tačiau N13 linijoje tokį efektą sukėlė tik PCIB (10 lentelė).

Visai kitoks auksino inhibitorių poveikis buvo N19 (+) linijos pagrindinio žiedo struktūrai: šiai linijai, kaip ir N11 (+) linijai, būdingas ektopinių į lapus/stiebus panašių išaugų susidarymas, tačiau skirtingai nei N11 (+), N19 (+)

linija ir be inhibitorių poveikio turėjo daug normalios struktūros žiedų. Abu auksino inhibitoriai tokių žiedų dalį spektre sumažino ($P < 0,001$), tačiau tuo pačiu padidėjo ($P < 0,001$) pagrindinių žiedų su pakitusiu žiedo organų skaičiumi (ŽOS ir LT+ŽOS) dalis (10 lentelė).

10 lentelė. Auksino inhibitorių PCIB ir HFCA poveikis miežio viengubų ir dvigubų mutantų pagrindinio žiedo struktūrai šiltnamio sąlygomis

Viengubas/ dvigubas mutantas	Poveikis	n	Pagrindinio žiedo frakcijos, % ± SE				Suma (1+2)
			Norma	LT	ŽOS (1)	LT+ŽOS (2)	
<i>Hv-tw₂</i> (-)	0	80	37,5 ± 5,4	62,5 ± 5,4	0	0	0
	PCIB	210	66,2 ± 3,3 ^c	25,7 ± 3,0 ^c	3,3 ± 1,2	4,8 ± 1,5	8,1 ± 1,9
	HFCA	120	65,8 ± 4,3 ^c	10,8 ± 2,8 ^c	0	23,3 ± 3,9 ^c	23,3 ± 3,9 ^c
<i>Hv-Lh</i> (-)	0	46	97,8 ± 2,2 ³	0	2,2 ± 2,2	0	2,2 ± 2,2
	PCIB	76	97,4 ± 1,8 ³	0	2,6 ± 1,8	0	1,6 ± 1,6 ²
	HFCA	64	98,4 ± 1,6 ³	0	1,6 ± 1,6	0	2,6 ± 1,8 ³
<i>Hv-tw₂ × Hv-Lh</i> N13 (-)	0	65	60,0 ± 6,1 ²	16,9 ± 4,7 ³	18,5 ± 4,9 ³	4,6 ± 2,6	23,1 ± 5,3 ³
	PCIB	92	78,3 ± 4,3 ^{a1}	3,3 ± 1,9 ^{b3}	12,0 ± 3,4 ¹	6,5 ± 2,6	4,0 ± 2,0 ^c
	HFCA	101	96,0 ± 2,0 ^{c3}	0	4,0 ± 2,0 ^{b1}	0	18,5 ± 4,1
<i>Hv-tw₂ × Hv-Lh</i> N11 (+)	0	64	26,6 ± 5,6	18,8 ± 4,9 ³	18,8 ± 4,9 ³	35,9 ± 6,0 ³	54,7 ± 6,3 ³
	PCIB	96	59,4 ± 5,0 ^c	24,0 ± 4,4	8,3 ± 2,8	8,3 ± 2,8 ^c	16,7 ± 3,8 ^{c1}
	HFCA	91	82,4 ± 4,0 ^{c2}	11,0 ± 3,3	5,5 ± 2,4 ¹	1,1 ± 1,1 ^{c3}	6,6 ± 2,6 ^{c3}
<i>Hv-tw₂ × Hv-Lh</i> N19 (+)	0	111	96,4 ± 1,8 ³	0	2,7 ± 1,5	0,9 ± 0,9	3,6 ± 1,8
	PCIB	109	78,9 ± 3,9 ^{c1}	2,8 ± 1,6 ³	13,8 ± 3,3 ^{b2}	4,6 ± 2,0	18,3 ± 3,7 ^{c1}
	HFCA	111	82,0 ± 3,7 ^{c2}	0,9 ± 0,9 ³	9,9 ± 2,8 ^{a3}	7,2 ± 2,5 ^{a3}	17,1 ± 3,6 ^c
<i>Hv-tw₂ × Hv-H</i> N6 (+)	0	74	93,2 ± 2,9 ³	0	5,4 ± 2,6 ¹	1,4 ± 1,4	6,8 ± 2,9 ¹
	PCIB	139	91,4 ± 2,4 ³	1,4 ± 1,0 ³	5,0 ± 1,9	2,2 ± 1,2	7,2 ± 2,2
	HFCA	100	95,0 ± 2,2 ³	0	5,0 ± 2,2 ¹	0	5,0 ± 2,2 ³

Pagrindinio žiedo frakcijos: norma –2 lodikulės+3 kuokeliai+1 piestelė (2L+3K+1P), LT – žiedai, kuriuose lodikulės transformuotos į kuokelius ir/arba piesteles, ŽOS – žiedai, kuriuose pakitęs bendras žiedo organų (L, K ar P) skaičius, LT+ŽOS – žiedai, kuriuose lodikulės transformuotos į reprodukcinis organus bei pakitęs bendras žiedo organų skaičius; (+,-) – kaip 8 lentelėje; n – ištirtų žiedų skaičius; WT (‘Auksiniai II’ veislės), viengubo *Hv-Hooded* ir dvigubo *Hv-tw₂ × Hv-Hooded* N21 (+) mutantų pagrindinio žiedo struktūra yra normali, šių genotipų n (atitinkamai 0, PCIB ir HFCA poveikio grupėse) buvo: 78-88-126; 86-138-146; 71-119-85; a – $P < 0,05$, b – $P < 0,01$, c – $P < 0,001$, lyginant su atitinkama kontroline grupe (0); 1 – $P < 0,05$, 2 – $P < 0,01$, 3 – $P < 0,001$, lyginant su atitinkama *Hv-tw₂* mutanto poveikio grupe

Kitų tirtų genotipų, kurių pagrindiniuose žieduose nepasireiškia lodikulių transformacija (LT) (*WT*, *Hv-Lh*, *Hv-H* ir *Hv-tw₂;H* N6 (+)), žiedo struktūrai inhibitoriai PCIB ir HFCA įtakos neturėjo arba ji buvo silpna.

Auksino inhibitorių poveikiui ektopiniams žiedams tirti naudoti tik tie dvigubi miežio mutantai, kurie dėl *Hv-Hd* tipo mutacijos miežio *BKn3* gene

vietoje akuotų arba ant jų formuoja įvairaus išsivystymo laipsnio ektopines į žiedus panašias struktūras. Kadangi egzistuoja didelė pačių *Hv-Hd* tipo mutantų fenotipinė įvairovė, pradedant ektopinių žiedų išsivystymo laipsniu, baigiant jų lokalizacija ir morfologija, tyrimams buvo parinktos dvigubų mutantų linijos, gautos sukryžminus *Hv-tw₂* mutantą su dviem alternatyvaus fenotipo *Hv-Hd* mutantais – *Hv-Hooded (Hv-H)* ir *Hv-Lemma hooded (Hv-Lh)*. *Hv-H* mutantas vietoje akuotų turi ektopinius žiedus su gerai išreikštais, tačiau steriliais reprodukciniais organais (4 pav., T), o *Hv-Lh* mutanto ektopinės struktūros susidaro distalinėje akuotų dalyje ir reprodukinių organų dažniausiai apskritai neturi (4 pav., S).

Ištyrus auksino inhibitorių poveikį ektopinėms akuoto transformacijoms į žiedus, buvo nustatyta didelė fenotipo įvairovė net lyginant iš tos pačios kryžminimo kombinacijos gautas dvigubų *Hv-tw₂;Hd* mutantų linijas (11 lentelė). Pagal ektopinių struktūrų susidarymo pobūdį ir dažnį, tirtus genotipus galima suskirstyti į dvi alternatyvias grupes: pirmai grupei galima priskirti *Hv-Lh* mutantą, kuriam būdingos mažesnio dažnio ektopinės akuoto transformacijos, antrai grupei priklauso mutantai, dideliu dažniu sudarantys į žiedus panašias ektopines rudimentines struktūras. Pastarajai grupei priklauso ne tik dvigubi mutantai, kilę iš *Hv-Hooded/Kap1.a* mutanto, bet ir kai kurios dvigubų mutantų linijos, kilusios sukryžminus *Hv-tw₂ × Hv-Lh*, būtent N19 (+) linija.

Pirmai grupei priskirto *Hv-Lh* mutanto ektopinių akuoto struktūrų spektrui PCIB ir HFCA apčiuopiamo poveikio neturėjo, nors abu inhibitoriai padidino pačių ektopinių struktūrų dažnį ($P < 0,001$; 11 lentelė), tačiau antros grupės genotipams, ypač *Hv-H*, *Hv-tw₂;H* N6 (+) ir *Hv-tw₂;Lh* N19 (+), abiejų auksino inhibitorių poveikis buvo akivaizdus (11 lentelė).

11 lentelė. Auksino inhibitorių HFCA ir PCIB poveikis miežio viengubų ir dvigubų mutantų ektopinio žiedo struktūrai šiltnamio sąlygomis

Viengubas/ dvigubas mutantas	Povei- kis	Akuoto transfor- macijų dažnis, %	n	Ektopinio žiedo frakcijos, % ± SE							Be reproduk- cinių organų, %
				L+K+P	K+P	L+K	L+P	K	P	Kt.	
<i>Hv-H</i> (-)	0	100	103	39,8 ± 4,8	28,2 ± 4,5	8,7 ± 2,8	0	6,8 ± 2,5	0	12,6 ± 3,3	3,9 ± 1,9
	PCIB	100	180	3,9 ± 1,4 ^c	1,1 ± 0,8 ^c	70,0 ± 3,4 ^c	0	9,4 ± 2,2	0	5,6 ± 1,7	10,0 ± 2,2 ^a
	HFCA	100	155	21,3 ± 3,3 ^b	8,4 ± 2,2 ^c	53,5 ± 4,0 ^c	1,3 ± 0,9	10,3 ± 2,4	0	2,6 ± 1,3 ^b	2,6 ± 1,3
<i>Hv-tw₂</i> × <i>Hv-H</i> N6 (+)	0	100	83	55,4 ± 5,5	13,3 ± 3,7	10,8 ± 3,4	0	6,0 ± 2,6	0	0	14,5 ± 3,9
	PCIB	98,6 ± 1,0	141	14,2 ± 3,0 ^c	39,0 ± 4,1 ^c	1,4 ± 1,0 ^b	0,7 ± 0,7	9,2 ± 2,4	1,4 ± 1,0	2,1 ± 1,2	31,9 ± 3,9 ^b
	HFCA	96,3 ± 1,8 ^a	103	37,9 ± 4,8 ^a	30,1 ± 4,5 ^c	4,9 ± 2,1	2,9 ± 1,7	1,9 ± 1,4	1,0 ± 1,0	0	21,4 ± 4,1
<i>Hv-Lh</i> (-)	0	48,6 ± 4,3	67	0	0	0	0	0	0	0	100
	PCIB	69,7 ± 3,1 ^c	159	0	0	0	0	0,6 ± 0,6	0	0	99,4 ± 0,6
	HFCA	71,9 ± 3,3 ^c	138	0	0	0	0	0	0	0	100
<i>Hv-tw₂</i> × <i>Hv-Lh</i> N13 (-)	0	95,7 ± 1,6	155	0	0	0	0	0	0	0	100
	PCIB	98,1 ± 1,0	202	0	0	0	0	0	0	0	100
	HFCA	98,6 ± 0,7	273	0	0	0	0	0	0,4 ± 0,4	0	99,6 ± 0,4
<i>Hv-tw₂</i> × <i>Hv-Lh</i> N11 (+)	0	87,1 ± 3,5	81	0	0	0	0	1,2 ± 1,2	0	0	98,8 ± 1,2
	PCIB	77,1 ± 4,3	74	0	1,4 ± 1,4	0	0	0	0	0	98,6 ± 1,4
	HFCA	93,6 ± 2,4	102	0	0	0	0	0	0	0	100
<i>Hv-tw₂</i> × <i>Hv-Lh</i> N19 (+)	0	96,6 ± 1,7	112	26,8 ± 4,2	19,6 ± 3,8	5,4 ± 2,1	0	3,6 ± 1,8	0,9 ± 0,9	0	43,8 ± 4,7
	PCIB	100	111	7,2 ± 2,5 ^c	12,6 ± 3,2	0,9 ± 0,9 ^a	1,8 ± 1,3	3,6 ± 1,8	1,8 ± 1,3	4,5 ± 2,0 ^a	67,6 ± 4,5 ^c
	HFCA	82,5 ± 3,5 ^c	99	6,1 ± 2,4 ^c	5,1 ± 2,2 ^c	4,0 ± 2,0	4,0 ± 2,0 ^a	3,0 ± 1,7	1,0 ± 1,0	3,0 ± 1,7	73,7 ± 4,4 ^c

Žiedo organai: L – lodikulės, K – kuokeliai, P – piestelės; kt. – žiedai su chimeriniais ir/arba sunkiai identifikuojamais organais; n – ištirtų žiedų skaičius; (+,-) – kaip 8 lentelėje; a – $P < 0,05$, b – $P < 0,01$, c – $P < 0,001$, lyginant su atitinkama kontroline grupe (0)

Šių genotipų ektopinio žiedo struktūrų fenotipiniame spektre vyrauja žiedai su abiejų lyčių reprodukciniais organais (L+K+P ir K+P frakcijos). Abi šios ektopinių žiedų frakcijos savo raidos laipsniu yra labiausiai pažengusios normalaus žiedo struktūros link, nes, remiantis ABC(DE) žiedo raidos modeliu, jose turi vykti šiam fenotipui (trečiajam ir ketvirtajam žiedo ratams – kuokeliams ir piestelei) susiformuoti reikalinga C klasės genų raiška (Šiukšta ir kt., 2015). Būtent šioms dviem ektopinio žiedo frakcijoms PCIB ir HFCA poveikis buvo stipriausias (11 lentelė): abu auksino inhibitoriai sumažino visų antros grupės atstovų L+K+P žiedų dalį ektopinių struktūrų spektre, tačiau šių medžiagų poveikis K+P žiedų frakcijai priklausė nuo genotipo $-Hv-H$ mutanto ir $Hv-tw_2;Lh$ N19 (+) linijos K+P žiedų frakciją abu inhibitoriai mažino ($P < 0,001$), o $Hv-tw_2;H$ N6 (+) linijai jų poveikis buvo priešingas (11 lentelė).

Suprantama, jog vienos fenotipinio spektro dalies sumažėjimas yra susijęs su kitos(-ų) spektro dalies(-ių) padidėjimu. Šiuo atžvilgiu inhibitorių poveikis tirtų viengubų mutantų ir iš jų kilusių dvigubų mutantų linijų ektopinio žiedo fenotipiniams spektrams labai skyrėsi, pavyzdžiui, PCIB ir HFCA padidino viengubo $Hv-H$ mutanto L+K žiedų frakciją (atitinkamai 8,0 ir 6,1 karto; abiem atvejais $P < 0,001$), o iš šio mutanto gautos linijos $Hv-tw_2;H$ N6 (+) ektopinių žiedų L+K frakcijai abi medžiagos tokio apčiuopiamo poveikio nedarė. Gali būti, kad toks varijuojantis inhibitorių poveikis piestelę (P) turinčių ektopinių žiedo frakcijoms susijęs su tuo, jog migliniai augalai, priešingai, nei magnolijainiai, turi daugiau negu vieną C klasės geną (Yoshida ir Nagato, 2011).

Tiriant dvigubus mutantus nustatyta, kad auksino inhibitoriai taip pat padidino žiedų, neturinčių reprodukcinų organų, dažnį (11 lentelė), nors $Hv-H$ mutantui ir iš jo kilusiai linijai N6 (+) tokį poveikį sukėlė tik antiauksinas PCIB. Įdomu, jog linijoje N19 (+) ir be poveikio antiauksiniais vyravo ektopiniai žiedai be reprodukcinų organų, tačiau po poveikio abiem inhibitoriais ši žiedų frakcija dar labiau pagausėjo ($P < 0,001$).

WT (veislė ‘Auksiniai II’) ir *Hv-tw₂* mutantas vietoje akuotų ektopinių struktūrų neformuoja, o PCIB ir HFCA poveikio šių genotipų akuoto vystymuisi taip pat nenustatyta.

3.4. Sintetinio auksino 2,4-D poveikis miežio mutantų žiedo/žiedyno struktūrai

Jeigu kai kurie dvigubų *Hv-tw₂;Hd* mutantų, kuriems būdingas fenotipo nestabilumas, naujai atsiradę požymiai yra nulemti auksino koncentracijos stokos, augalų purškimas egzogeniniu auksinu turėtų sukelti fenotipo nestabilumui priešingus efektus. Ši prielaida buvo patikrinta ištyrus 2,4-D poveikį dviems su fenotipo nestabilumu susijusiems dvigubų mutantų požymiams – į lapus/stiebus panašių ektopinių struktūrų susidarymui (12 lentelė) ir pagrindinio bei ektopinio žiedo struktūros kitimui (13 lentelė).

Ištyrus egzogeninio 2,4-D poveikį ektopinių į lapus/stiebus panašių struktūrų susidarymui nustatyta, kad daugeliui tirtų genotipų 2,4-D specifiskai sumažino varpų su ilgais varpučių neturinčiais segmentais („trūkais“) dažnį (12 lentelė, I fenotipinė grupė), nors statistiskai reikšmingas šis efektas buvo tik keturiems iš septynių tirtų dvigubų mutantų linijų. Kaip minėta aptariant dvigubų *Hv-tw₂;Hd* mutantų fenotipo nestabilumą, šis požymis yra charakteringa auksino stokos augaluose išraiška, nes panašus fenotipas būdingas tiek įvairiems auksino kelio mutantams, tiek auksino inhibitorių indukuotoms tokių mutacijų fenokopijoms (Šiukšta ir kt., 2015).

Kitiems varpos morfologiniams variantams, tokiems, kaip varpos su trumpais „trūkais“ (12 lentelė, II fenotipinė grupė) ar varpos, sudarančios ektopines į lapus/stiebus panašias struktūras (III fenotipinė grupė), 2,4-D poveikis skirtingose dvigubų mutantų linijose nebuvo toks vienareikšmis, tačiau aptiktas įdomus reiškinys – egzogeninis 2,4-D visiškai nuslopino *Hv-tw₂* mutanto būdingų varpų su trumpais „trūkais“ vystymąsi (12 lentelė). Šis faktas dar kartą patvirtina

prielaidą, kad trumpų varpos „trūkių“, būdingų visiems *Hv-tw* tipo mutantams, atsiradimas taip pat yra susijęs su auksino biosintezės ir/arba pasiskirstymo sutrikimu. Dvigubuose mutantuose 2,4-D poveikis šiam požymiui buvo prieštaringas: *Hv-tw₂;H* linijose N21 (+) ir N6 (+) varpų su trumpais „trūkais“ dažnis po poveikio 2,4-D sumažėjo (atitinkamai, $P < 0,001$ ir $P < 0,05$), tačiau priešingas efektas buvo nustatytas *Hv-tw₂;Lh* N19 (+) linijai. Kitoms dvigubų mutantų linijoms 2,4-D poveikis II fenotipinės grupės varpų dažniui buvo arba nereikšmingas, arba šis varpų morfologinis tipas jose apskritai buvo retas (12 lentelė, II fenotipinė grupė).

12 lentelė. 2,4-D poveikis miežio dvigubų mutantų (F_{10}) varpos struktūrai lauko sąlygomis

Viengubas/dvigubas mutantas	Poveikis	n	Fnotipinės grupės			
			I	II	III	Kt.
<i>Hv-tw₂</i> (-)	0	282	0	17,7 ± 2,3	0	0
	2,4-D	288	0	0 ^c	0	0
<i>Hv-tw₂ × Hv-Lh</i> N1 (-)	0	420	13,3 ± 1,7	0,7 ± 0,4	0	0
	2,4-D	215	1,4 ± 0,8 ^c	0	0,5 ± 0,5	0
<i>Hv-tw₂ × Hv-Lh</i> N2 (+)	0	326	3,1 ± 1,0	2,8 ± 0,9	12,0 ± 1,8	1,5 ± 0,7
	2,4-D	322	0,6 ± 0,4 ^a	1,6 ± 0,7	11,2 ± 1,8	1,2 ± 0,6
<i>Hv-tw₂ × Hv-Lh</i> N11 (+)	0	262	20,2 ± 2,5	10,3 ± 1,9	15,3 ± 2,2	0
	2,4-D	210	16,7 ± 2,6	7,1 ± 1,8	5,2 ± 1,5 ^c	0
<i>Hv-tw₂ × Hv-Lh</i> N17 (+-)	0	324	9,3 ± 1,6	9,9 ± 1,7	18,5 ± 2,2	4,0 ± 1,1
	2,4-D	200	6,5 ± 1,7	15,5 ± 2,6	15,0 ± 2,5	9,0 ± 2,0 ^a
<i>Hv-tw₂ × Hv-Lh</i> N19 (+)	0	533	9,4 ± 1,3	12,4 ± 1,4	11,6 ± 1,4	0,4 ± 0,3
	2,4-D	435	3,4 ± 0,9 ^c	17,2 ± 1,8 ^a	2,5 ± 0,7 ^c	0
<i>Hv-tw₂ × Hv-H</i> N21 (+)	0	437	3,7 ± 0,9	14,9 ± 1,7	5,9 ± 1,1	0
	2,4-D	352	2,3 ± 0,8	2,0 ± 0,7 ^c	9,7 ± 1,6	0
<i>Hv-tw₂ × Hv-H</i> N6 (+)	0	147	3,4 ± 1,5	10,2 ± 2,5	2,7 ± 1,3	0,7 ± 0,7
	2,4-D	75	0 ^a	2,7 ± 1,9 ^a	1,3 ± 1,3	0

Varpų fenotipinės grupės: I – varpos su ilgais varpučių neturinčiais segmentais („trūkais“) (žr. 4 pav., A–F), II – varpos su trumpais „trūkais“ (žr. 4 pav., G), III – varpos, sudarančios į lapus/stiebus panašias struktūras (žr. 4 pav., H, I, K, L); (+,-) – kaip 8 lentelėje; n – ištirtų varpų skaičius; *wt*, *Hv-Lh* ir *Hv-H* aukščiau aprašytos varpos struktūros variacijos nebūdingos, todėl lentelėje šie genotipai nepateikti; šių genotipų ištirtų varpų skaičius (n): *wt* (veislės ‘Auksiniai II’) 0 – 201, 2,4-D – 215; *Hv-Lemma hooded* (*Hv-Lh*) n: 0 – 155, 2,4-D – 147; *Hv-Hooded* (*Hv-H*) n: 0 – 193, 2,4-D – 173; a – $P < 0,05$, b – $P < 0,01$, c – $P < 0,001$, lyginant su atitinkama kontroline grupe (0)

Akivaizdus atsako į 2,4-D polimorfiškumas buvo nustatytas ir ektopinių į lapus/stiebus panašių struktūrų susidarymui varpose (III fenotipinė grupė). Dveiose dvigubų mutantų linijose, *Hv-tw₂;Lh* N11 (+) ir N19 (+), po poveikio 2,4-D šios fenotipinės grupės varpų dažnis sumažėjo (abiem atvejais $P < 0,001$), o kitų tirtų linijų III fenotipinės grupės varpų dažniui 2,4-D reikšmingos įtakos nedarė (12 lentelė, III fenotipinė grupė).

Kaip minėta, siekiant nustatyti galimas dvigubų mutantų fenotipo nestabilumo sąsajas su auksino biosintezės ir/arba pasiskirstymo sutrikimais, taip pat buvo ištirtas ir egzogeninio 2,4-D poveikis dvigubų mutantų linijų pagrindinio bei ektopinio žiedo struktūrai, tačiau šis poveikis žiedo raidai buvo stipriai varijuojantis ir nevienareikšmis (13 lentelė). Purškimas 2,4-D tirpalu sumažino *Hv-tw₂* mutanto pagrindinių žiedų, turinčių tik transformuotas lodikules (LT), dažnį, tačiau tuo pačiu spektre padidėjo žiedų su pakitusiu žiedo organų skaičiumi (LT+ŽOS) dažnis (abiem atvejais $P < 0,001$; 13 lentelė). 2,4-D taip pat nežymiai mažino LT frakcijos žiedų dažnį ir dvigubų mutantų linijose *Hv-tw₂;H* N6 (+) ir *Hv-tw₂;Lh* N17 (+-), tačiau priešingą efektą sukėlė *Hv-tw₂;H* N21 (+) linijai, kurioje po poveikio 2,4-D LT žiedų skaičius labai padidėjo ($P < 0,001$; 13 lentelė).

Pažymėtina, kad po poveikio 2,4-D net keturiuose kituose tirtuose genotipuose, įskaitant ir *Hv-Lh* (-) mutantą, įvairiu laipsniu sumažėjo normalios struktūros pagrindinių žiedų. Šį efektą galima laikyti priešingu tam, kuris buvo stebėtas augalus nupurškus auksino inhibitoriais (palyginimui žr. 9 lentelę). Paradoksalu, kad *Hv-tw₂* mutantui pagrindinio žiedo dalinė struktūros normalizacija pasireiškė tiek po poveikio sintetiniu auksinu 2,4-D, tiek auksino inhibitoriais PCIB bei HFCA.

13 lentelė. 2,4-D poveikis miežio viengubų ir dvigubų mutantų (F₁₀) linijų pagrindinio ir ektopinio žiedo struktūrai lauko sąlygomis

Viengubas/ dvigubas mutantas	Povei- kis	n	Pagrindinio žiedo frakcijos, % ± SE				Ektopinio žiedo frakcijos ¹ , % ± SE				
			Norma	LT	LT+ŽOS	KT	L+K+P	K+P	L+K	L+P	Be reproduk- cinių organų
<i>Hv-tw₂</i> (-)	0	101	22,8 ± 4,2	68,3 ± 4,7	8,9 ± 2,8	0	0	0	0	0	
	2,4-D	100	33,0 ± 4,7	33,0 ± 4,7 ^c	34,0 ± 4,8 ^c	0	0	0	0	0	
<i>Hv-H</i> (-)	0	102	100	0	0	0	15,7 ± 3,6	23,5 ± 4,2	9,8 ± 3,0	0	15,7 ± 3,6
	2,4-D	128	100	0	0	0	25,0 ± 3,8	35,9 ± 4,3 ^a	13,3 ± 3,0	0	21,9 ± 3,7
<i>Hv-tw₂</i> × <i>Hv-H</i> N6 (+)	0	51	68,6 ± 6,6	21,6 ± 5,8	9,8 ± 4,2	0	19,6 ± 5,6	0	0	9,8 ± 4,2	52,9 ± 7,1
	2,4-D	60	71,7 ± 5,9	8,3 ± 3,6	16,7 ± 4,9	3,3 ± 2,3	41,5 ± 6,8 ^a	0	0	15,1 ± 5,0	39,6 ± 6,8
<i>Hv-tw₂</i> × <i>Hv-H</i> N21 (+)	0	96	88,5 ± 3,3	3,1 ± 1,8	8,3 ± 2,8	0	0	0	0	0	0
	2,4-D	100	65,0 ± 4,8 ^c	18,0 ± 3,9 ^c	17,0 ± 3,8	0	0	0	0	0	0
<i>Hv-Lh</i> (-)	0	65	100	0	0	0	0	0	0	0	100
	2,4-D	100	93,0 ± 2,6 ^b	1,0 ± 1,0	6,0 ± 2,4 ^a	0	0	0	0	0	100
<i>Hv-tw₂</i> × <i>Hv-Lh</i> N1 (-)	0	97	48,5 ± 5,1	44,3 ± 5,1	7,2 ± 2,6	0	5,5 ± 2,4	12,1 ± 3,4	0	0	80,2 ± 4,2
	2,4-D	100	39,0 ± 4,9	44,0 ± 5,0	15,0 ± 3,6	2,0 ± 1,4	35,6 ± 5,1 ^c	0 ^c	0	10,0 ± 3,2 ^b	54,4 ± 5,3 ^c
<i>Hv-tw₂</i> × <i>Hv-Lh</i> N2 (+)	0	98	58,2 ± 5,0	16,3 ± 3,8	25,5 ± 4,4	0	0	7,1 ± 2,8	0	0	92,9 ± 2,8
	2,4-D	91	34,1 ± 5,0 ^c	23,1 ± 4,4	39,6 ± 5,2 ^a	3,3 ± 1,9	1,2 ± 1,2	0 ^a	0	22,2 ± 4,6 ^c	76,5 ± 4,7 ^b
<i>Hv-tw₂</i> × <i>Hv-Lh</i> N11 (+)	0	185	23,2 ± 3,1	8,6 ± 2,1	64,3 ± 3,5	3,8 ± 1,4	0	0	0	0	100
	2,4-D	102	21,6 ± 4,1	3,9 ± 1,9	59,8 ± 4,9	14,7 ± 3,5 ^b	0	0	0	0	100
<i>Hv-tw₂</i> × <i>Hv-Lh</i> N17 (+ -)	0	113	38,1 ± 4,6	22,1 ± 3,9	39,8 ± 4,6	0	0	0	0	0	88,3 ± 3,7
	2,4-D	104	38,5 ± 4,8	12,5 ± 3,3	43,3 ± 4,9	5,8 ± 2,3 ^a	0	0	0	0	98,8 ± 1,2 ^b
<i>Hv-tw₂</i> × <i>Hv-Lh</i> N19 (+)	0	127	66,1 ± 4,2	3,1 ± 1,5	30,7 ± 4,1	0	6,0 ± 2,2	30,2 ± 4,3	0	0	48,3 ± 4,7
	2,4-D	100	65,0 ± 4,8	4,0 ± 2,0	28,0 ± 4,5	3,0 ± 1,7	22,4 ± 4,2 ^c	0 ^c	0	21,4 ± 4,2 ^c	53,1 ± 5,1

¹Pateikta tik dalis variacijos spektro; (+,-) – kaip 8 lentelėje; n – ištirtų žiedų skaičius; žiedo organai: L – lodikulės, K – kuokeliai, P – piestelės; pagrindinio žiedo frakcijos: norma – 2 lodikulės + 3kuokeliai + 1 piestelė (2L+3K+1P), LT – žiedai, kuriuose lodikulės transformuotos į kuokelius ir/arba piestelės, LT+ŽOS – žiedai, kuriuose lodikulės transformuotos į reprodukinius organus bei pakitęs bendras žiedo organų (L, K ar P) skaičius, KT – chimeriniai kuokeliai, turintys piestelės elementų; a – P < 0,05, b – P < 0,01, c – P < 0,001, lyginant su atitinkama kontroline grupe (0)

Įdomu, kad kai kurių tirtų genotipų pagrindiniame žiede 2,4-D sukėlė nedidelio dažnio specifinį kuokelių raidos sutrikimą – kuokelio transformaciją (KT) į chimerinį organą, turintį rudimentinės piestelės elementų (6 pav.), tačiau linijoje *Hv-tw₂;Lh* N11 (+) šis kuokelio transformacijos tipas pasitaikė ir kontroliniuose augaluose (13 lentelė)



6 pav. 2,4-D sukelta specifinė pagrindinio žiedo kuokelio transformacija (pažymėta rodykle) į chimerinę struktūrą su piestelės elementais (mastelio atkarpa atitinka 1 mm)

Ištyrus egzogeninio 2,4-D poveikį dvigubų mutantų ektopinio žiedo struktūrai, skirtingų dvigubų *Hv-tw₂;Hd* mutantų linijų atsakas į šį sintetinį auksiną buvo vienodesnis. Pirma, purškimas 2,4-D tirpalu didino L+K+P frakcijos žiedų dažnį visuose genotipuose, kurie apskritai formavo šios frakcijos ektopinius žiedus (13 lentelė). Toks 2,4-D efektas gali būti traktuojamas kaip žiedo raidos poslinkis pilnos žiedo struktūros link (dalinė ektopinio žiedo struktūros normalizacija), ir iš dalies yra priešingas auksino inhibitorių sukeliama poveikiui (palyginimui žr. 13 ir 10 lenteles). Be to, 2,4-D taip pat sukėlė reikšmingų K+P ir L+P žiedo frakcijų dažnio svyravimų: dvigubuose mutantuose, kurie gauti tėviniu mutantu naudojant *Hv-Lh*, po poveikio 2,4-D buvo nustatytas K+P žiedų frakcijos sumažėjimas. Ypač įdomu, kad visose trijose dvigubų mutantų *Hv-tw₂;Lh* linijose po poveikio 2,4-D atsirado L+P tipo žiedų, nors be 2,4-D poveikio šio tipo žiedų abejuose linijose apskritai nebuvo. Tai dar kartą

patvirtina hipotezę, kad egzogeninis auksinas skatina žiedo raidą reprodukcinų organų susidarymo kryptimi ir egzistuoja mūsų pastebėta raidos kryptis (tendas): nuo silpnai išreikštų žiedo meristemos darinių iki pilno žiedo susidarymo, kurią galima aptikti tik tiriant ektopinius žiedus, susidarančius apatinio žiedažvynio/akuoto pereinamojoje zonoje.

Taigi, nors skirtingų dvigubų mutantų linijų atsakas į 2,4-D poveikį stipriai skyrėsi ir pasireiškė didelėmis pagrindinio ir ektopinio žiedo struktūros variacijomis, ryškiausias šio sintetinio auksino poveikis buvo ektopinio žiedo reprodukcinų organų vystymuisi bei ilgų „trūkių“ varpose susidarymui. Be to, 2,4-D taip pat savitai slopino trumpų „trūkių“ formavimąsi *Hv-tw₂* mutanto varpose. Kadangi auksino inhibitorių poveikis miežio dvigubų mutantų varpos raidai nebuvo tiriamas, egzogeninio auksino 2,4-D panaudojimas leido nustatyti galimus fenotipo nestabilumo atsiradimo mechanizmus ir auksino reikšmę miežio reprodukcinų organų raidai.

3.5. Etileno poveikis dvigubų mutantų pagrindinio ir ektopinio žiedo struktūrai

Sėkmingi Osnato ir kt. (2010) miežio *Hv-Hooded* fenotipo dalinės normalizacijos etilenu eksperimentai paskatino ištirti etileno poveikį skirtingą genetinį foną turintiems viengubiems ir dvigubiems miežio žiedo/žiedyno raidos mutantams bei nustatyti etileno poveikį atskiriems žiedo organams, kuris minėtų autorių nebuvo ištirtas. Kaip ir Osnato ir kt. (2010) tyrimuose, etileno šaltiniu buvo naudotas etefonas (2-chloretilfosfono rūgštis) – medžiaga, hidrolizės metu išskirianti etileną, o jo poveikis žiedo meristemos raidai buvo ištirtas augalus paveikiant žiedo/žiedyno meristemų raidai kritiniu metu, 4-5 lapų stadijoje. Tikėtasi, jog dvigubų mutantų linijose lygiagrečiai vykstanti dviejų mutantinių genų (*Hv-tw₂* ir *Hv-Hd*) raiška, sutrikdanti skirtinguose lygmenyse funkcionuojančių meristemų veiklą ir taip sukelianti didelę žiedo/žiedyno

struktūros variaciją, leis išsamiau įvertinti etileno poveikį atskirų žiedo organų vystymuisi.



7 pav. Etileno sukelta dalinė miežio dvigubo *Hv-tw₂;Lh* mutanto linijos N11 (+) varpos architektūros normalizacija. Kairėje – trys kontrolinės grupės varpos, dešinėje – etefono indukuotas akuotų vystymasis vietoje ektopinių žiedų. Paveiksle pateiktos į lapus/stiebus panašių išaugų nesudariusios N11 (+) linijos augalų varpos

Siekiant nustatyti etileno poveikį žiedo organų vystymuisi, eksperimento metu buvo tiriamos varpos, nesudarančios ektopinių į lapus/stiebus panašių struktūrų arba varpų segmentai, turintys išsivysčiusių pagrindinių žiedų, tačiau šio tyrimo metu daugiausiai dėmesio buvo skiriama etileno poveikiui pagrindinio ir ektopinio žiedo struktūrai, o ne varpos architektūrai, nors, kaip ir Osnato ir kt. (2010) tyrimuose, buvo stebima etileno sukelta dalinė varpos architektūros normalizacija (7 pav.). Etefono poveikis tiek pagrindinio, tiek ektopinio žiedo struktūrai buvo tiriamas atskirai, nes miežio dvigubų *Hv-tw₂;Hd* mutantų pagrindinio ir ektopinio žiedo mutantiniai fenotipai susiformuoja dėl dviejų skirtingų mutantinių *Hv-tw₂* ir *Hv-Hooded/Kap1* genų, veikiančių skirtingose vystymosi stadijose bei skirtinguose žiedo/žiedyno organuose, fenotipinės raiškos: *Hv-tw₂* veikia anksčiau, formuojantis žiedyno (varpos) bei pagrindinio žiedo meristemoms, o *Hv-Hd* pradeda veikti vėliau, prasidėjus pagrindinio žiedo akuoto morfogenezei.

14 lentelė. Etefono poveikis miežio viengubų ir dvigubų mutantų pagrindinio žiedo struktūrai

Viengubas/ dvigubas mutantas	Povei- kis	n	Pagrindinio žiedo frakcijos, % ± SE				Suma (1+2)
			Norma	LT	ŽOS (1)	LT+ŽOS (2)	
WT ('Auksiniai II')	0	91	100	0	0	0	0
(-)	E	94	98,9 ± 1,1	0	1,1 ± 1,1	0	1,1 ± 1,1
<i>Hv-tw₂</i> (-)	0	107	87,9 ± 3,2	10,3 ± 3,0	0,9 ± 0,9	0,9 ± 0,9	1,9 ± 1,3
	E	116	89,7 ± 2,8	8,6 ± 2,6	0,9 ± 0,9	0,9 ± 0,9	1,7 ± 1,2
<i>Hv-Lh</i> (-)	0	108	68,5 ± 4,5	1,9 ± 1,3	28,7 ± 4,4	0,9 ± 0,9	29,6 ± 4,4
	E	95	64,2 ± 4,9	5,3 ± 2,3	30,5 ± 4,7	0	30,5 ± 4,7
<i>Hv-tw₂</i> × <i>Hv-Lh</i> N11 (+)	0	96	62,5 ± 5,0	13,5 ± 3,5	21,9 ± 4,2	2,1 ± 1,5	24,0 ± 4,4
	E	109	62,4 ± 4,7	9,2 ± 2,8	21,1 ± 3,9	7,3 ± 2,5	28,4 ± 4,3
<i>Hv-tw₂</i> × <i>Hv-Lh</i> N13 (-)	0	96	58,3 ± 5,1	0	41,7 ± 5,1	0	41,7 ± 5,1
	E	101	76,2 ± 4,3 ^b	3,0 ± 1,7	19,8 ± 4,0 ^c	1,0 ± 1,0	20,8 ± 4,1 ^b
<i>Hv-tw₂</i> × <i>Hv-Lh</i> N19 (+)	0	109	68,8 ± 4,5	0	31,2 ± 4,5	0	31,2 ± 4,5
	E	209	84,7 ± 2,5 ^b	0	14,4 ± 2,4 ^c	1,0 ± 0,7	15,3 ± 2,5 ^b
<i>Hv-H</i> (-)	0	108	98,1 ± 1,3	0	1,9 ± 1,3	0	1,9 ± 1,3
	E	132	92,4 ± 2,3 ^a	1,5 ± 1,1	6,1 ± 2,1	0	6,1 ± 2,1
<i>Hv-tw₂</i> × <i>Hv-H</i> N6 (+)	0	105	78,1 ± 4,1	1,0 ± 1,0	20,0 ± 3,9	1,0 ± 1,0	21,0 ± 4,0
	E	94	78,7 ± 4,2	4,3 ± 2,1	17,0 ± 3,9	0	17,0 ± 3,9
<i>Hv-tw₂</i> × <i>Hv-H</i> N21 (+)	0	96	95,8 ± 2,1	0	4,2 ± 2,1	0	4,2 ± 2,1
	E	104	93,3 ± 2,5	1,0 ± 1,0	5,8 ± 2,3	0	5,8 ± 2,3

Pagrindinio žiedo frakcijos: norma – 2 lodikulės + 3 kuokeliai + 1 piestelė (2L+3K+1P), LT – žiedai, kuriuose lodikulės transformuotos į reprodukcinis organus, ŽOS – žiedai, kuriuose pakitęs bendras žiedo organų skaičius, LT+ŽOS – žiedai, kuriuose lodikulės transformuotos į reprodukcinis organus bei pakitęs bendras žiedo organų skaičius; (+,-) – kaip 8 lentelėje; n – ištirtų žiedų skaičius; a – $P < 0,05$, b – $P < 0,01$, c – $P < 0,001$, lyginant su atitinkama kontroline grupe (0)

Dvigubų mutantų pagrindinio žiedo struktūros variaciją sukelia hibridizacijai naudotas *Hv-tw₂* alelis. Palyginti su kitais kolekcijoje saugomais *Hv-tw* tipo aleliais, šis alelis yra gana silpnas, nes vienas iš pagrindinių *Hv-tw* tipo alelių požymių – nefiksuota lodikulių transformacija į reprodukcinis organus (LT), lydima nedidelio dažnio žiedo organų skaičiaus (ŽOS) variacijos – dažniausiai pasireiškia tik santykinai nedidelėje *Hv-tw₂* mutantų žiedų dalyje (14 lentelė), nors šis požymis labai priklauso nuo ekologinių sąlygų, dėl kurių įtakos minėtų žiedo pokyčių dažnis gana stipriai svyruoja lyginant įvairias augalų kartas, augusias skirtingomis sąlygomis, kurios neišvengiamai kinta net šiltnamyje. Dėl šios priežasties po poveikio etilenu tikėtasi nustatyti tiek kokybinių, tiek kiekybinių lodikulių transformacijos pokyčių.

Ištirus etefonu veiktų augalų pagrindinio žiedo struktūrą, apčiuopiamo šios medžiagos poveikio lodikulių transformacijos į reprodukinius organus (LT) dažniui nei vienam tirtam genotipui nenustatyta (14 lentelė), tačiau etefonas kai kuriais atvejais turėjo įtakos žiedo organų skaičiaus pokyčiams: etefonas sumažino *Hv-tw₂;Lh* linijų N13 (-) ir N19 (+) pagrindinių žiedų su pakitusiu žiedo organų skaičiumi (ŽOS ir LT+ŽOS) frakcijų dalį spektre, tuo pačiu padidindamas pilnos struktūros (2L+3K+1P) žiedų frakciją (visais atvejais $P < 0,01$) (14 lentelė).

Kaip minėta, viena iš pagrindinių *Hv-Hooded* tipo mutantų savybių yra įvairaus laipsnio akuoto transformacijos į sterilius ektopinius žiedus ar rudimentines išaugas, kurių formavimąsi lemia *BKn3* geno IV introne įvykusi 305 bp duplikacija, todėl tiriant etileno poveikį *Hv-Hooded* mutacijos pasireiškimui, pirmiausiai analizuotas šios medžiagos poveikis akuoto vystymuisi (15 lentelė).

15 lentelė. Etefono poveikis miežio viengubų ir dvigubų mutantų akuoto bei ektopinio žiedo vystymuisi

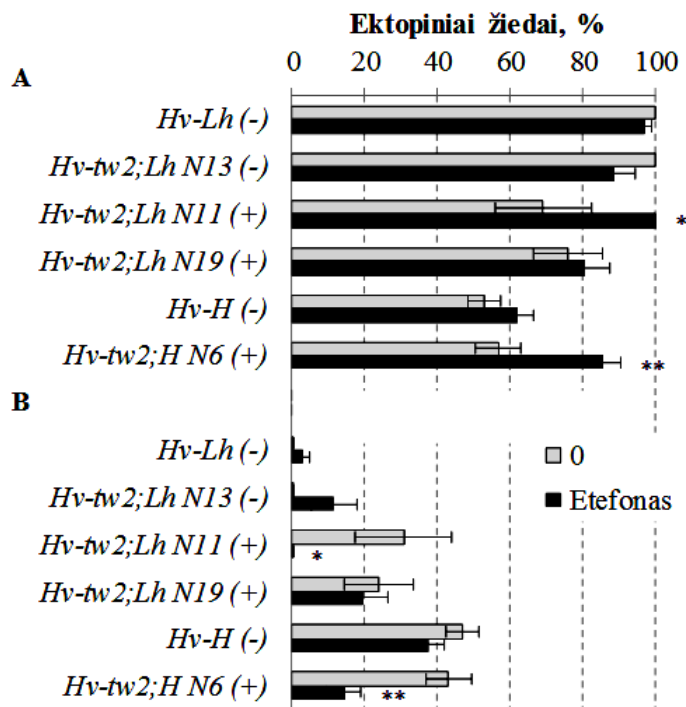
Viengubas/ dvigubas mutantas	Povei- kis	Normalus akuotas (1)	Ektopinės struktūros ant apatinio žiedažvynio, % ± SE				Suma (1+2)
			Žiedas su akuotėliu (2)	Tik sparnai	Rudimen- tinis žiedas	Visiškai išsivystęs ektopinis žiedas	
<i>Hv-Lh</i> (-)	0	33,3 ± 2,7	25,0 ± 2,5	2,3 ± 0,9	5,7 ± 1,3	33,7 ± 2,7	58,3 ± 2,9
	E	53,5 ± 4,0 ^c	0 ^c	0 ^a	0 ^c	46,5 ± 4,0 ^b	53,5 ± 4,0
<i>Hv-tw₂ × Hv-Lh</i> N11 (+)	0	62,8 ± 5,2	12,8 ± 3,6	4,7 ± 2,3	4,7 ± 2,3	15,1 ± 3,9	75,6 ± 4,7
	E	89,4 ± 3,4 ^c	3,5 ± 2,0 ^a	1,2 ± 1,2	4,7 ± 2,3	1,2 ± 1,2 ^c	92,9 ± 2,8 ^b
<i>Hv-tw₂ × Hv-Lh</i> N13 (-)	0	11,2 ± 2,0	56,0 ± 3,1	3,2 ± 1,1	20,4 ± 2,6	9,2 ± 1,8	67,2 ± 3,0
	E	17,8 ± 2,4 ^a	50,2 ± 3,1	3,6 ± 1,2	18,2 ± 2,4	10,3 ± 1,9	68,0 ± 2,9
<i>Hv-tw₂ × Hv-Lh</i> N19 (+)	0	38,7 ± 4,6	27,0 ± 4,2	7,2 ± 2,5	8,1 ± 2,6	18,9 ± 3,7	65,8 ± 4,5
	E	68,3 ± 4,2 ^c	11,1 ± 2,8 ^b	0,8 ± 0,8 ^a	4,8 ± 1,9	15,1 ± 3,2	79,4 ± 3,6 ^a
<i>Hv-Hooded</i> (-)	0	0	3,9 ± 1,7	0,8 ± 0,8	0,8 ± 0,8	94,5 ± 2,0	3,9 ± 1,7
	E	2,7 ± 1,3 ^a	6,8 ± 2,1	4,7 ± 1,7 ^a	3,4 ± 1,5	82,4 ± 3,1 ^b	9,5 ± 2,4
<i>Hv-tw₂ × Hv-H</i> N6 (+)	0	10,1 ± 2,9	23,9 ± 4,1	4,6 ± 2,0	1,8 ± 1,3	59,6 ± 4,7	33,9 ± 4,6
	E	11,2 ± 3,1	25,2 ± 4,2	4,7 ± 2,1	6,5 ± 2,4	52,3 ± 4,9	36,4 ± 4,7

‘Aukšiniai II’ veislė (*wt*), *Hv-tw₂* mutantas ir dvigubo *Hv-tw₂;H* mutanto linija N21 (+) ektopinių žiedų panašių struktūrų nesudaro, todėl šie genotipai į lentelę neįtraukti; (+,-) – kaip 8 lentelėje; E – etefonas; a – $P < 0,05$, b – $P < 0,01$, c – $P < 0,001$, lyginant su atitinkama kontroline grupe (0)

Poveikis etefonu akuotus turinčių genotipų – *WT*, *Hv-tw₂* mutanto ir specialiai parinktos linijos *Hv-tw₂;H N21 (+)*, formuojančios ektopines išaugas ant akuotų tik ypač retais atvejais, tačiau pasižyminčios ektopinių į lapus/stiebus panašių išaugų susidarymu – akuotų vystymuisi reikšmingos įtakos neturėjo, o kitų tirtų viengubų ir dvigubų mutantų atsakas į egzogeninį etileną buvo nevienodas (15 lentelė). *Hv-H* mutantui, kurio akuotai tipiniu atveju yra visiškai transformuoti į gerai išvysčiusį ektopinį žiedą, etefonas sumažino bendrą ektopinių žiedų dažnį ($P < 0,01$) bei nežymiai paskatino akuotus turinčių žiedų vystymąsi ($P < 0,05$), tačiau tuo pačiu po poveikio etefonu padidėjo ir specifinių ektopinio žiedo struktūrų – sparnų (3 pav., K ir L.) dažnis. Iš šio mutanto kilusioje linijoje *Hv-tw₂;H N6 (+)* etefonas analogiškų pokyčių nesukėlė (15 lentelė).

Didžiausią poveikį akuoto vystymuisi etefonas turėjo *Hv-Lemma hooded* (*Hv-Lh*) mutantui ir iš jo kilusioms dvigubų *Hv-tw₂;Lh* mutantų linijoms (15 lentelė): visų tirtų šios grupės genotipų žiedų su akuotais dažnis po poveikio etefonu padidėjo, tačiau tokį vienodą etefono poveikį akuoto formavimuisi lydėjo įvairių ektopinių struktūrų dažnio pokyčiai. *Hv-Lh* mutanto varpose etefonas visiškai slopino daugelio ektopinių struktūrų (ektopinio žiedo su akuotėliu, sparnų, rudimentinio žiedo) formavimąsi, o dvigubo *Hv-tw₂;Lh* mutanto linijoje N11 (+) etefonas slopino tik dviejų tipų ektopinių struktūrų – ektopinio žiedo su akuotėliu ir be akuotėlio,– formavimąsi. Dvigubo *Hv-tw₂;Lh* mutanto linijoje N19 (+) po poveikio etefonu akuotų dažnio padidėjimą lydėjo nedidelis ektopinių struktūrų su akuotėliais ir rudimentinių į žiedą panašių išaugų dažnio sumažėjimas (15 lentelė).

Ektopinių žiedų su reprodukciniais organais dažnio sumažėjimas po poveikio etefonu gali būti traktuojamas kaip tam tikra ektopinių į žiedą panašių išaugų vystymosi kelio normalizacija, tačiau toks etefono sukeltas efektas buvo būdingas tik kai kurioms tirtoms dvigubų mutantų linijoms (8 pav.).



8 pav. Etefono poveikis miežio dvigubų mutantų linijų ektopinių žiedų be reprodukcinė organų (A) ir su reprodukciniais organais (B) susidarymui. Pateikti tik genotipai, vietoje akuotų formuojantys ektopines išaugas. *Hv-Lh* – *Hv-Lemma hooded*; *Hv-tw2* – *Hv-tweaky spike 2*; *Hv-H* – *Hv-Hooded/Kap1.a* (Colsess II); (+,-) – kaip 8 lentelėje; * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$, lyginant etefonu veiktus (E) ir neveiktus (0) augalus

Šiuo aspektu iš visų tirtų dvigubų mutantų ypač išsiskyrė dvi linijos – *Hv-tw2;Lh N11* (+) ir *N19* (+): šių linijų ektopinių žiedų fenotipiniame spektre didelę dalį sudaro žiedai, turintys vienos arba abiejų lyčių reprodukcinis organus (atitinkamai $30,8 \pm 13,3$ % ir $23,8 \pm 9,5$ %) (8 pav. ir 16 lentelė), tačiau abiejų linijų atsakas į etefono poveikį buvo skirtingas – po poveikio etefonu tik linijos *N11* (+) ektopinių žiedų fenotipiniame spektre žiedai su reprodukciniais organais visiškai išnyko, o linijoje *N19* (+) po poveikio etefonu šio tipo žiedų sumažėjo nereikšmingai (8 pav.).

16 lentelė. Etefono poveikis miežio viengubų ir dvigubų mutantų ektopinių žiedų struktūrų spektrui

Viengubas/ dvigubas mutantas ¹	Povei- kis	Ektopiniai žiedai su reprodukciniais organais, % ± SE							Ektopiniai žiedai be reprodukinių organų, % ± SE	
		L+K+P (1)	K+P (2)	L+K	L+P	K	P	Suma (1+2)	Į žv. panašios struktūros	Kt. ²
<i>Hv-Lh</i> (-)	0	0	0	0	0	0	0	0	38,6 ± 4,9	61,4 ± 4,9
	E	0	0	0	2,8 ± 2,2	0	0	0	29,2 ± 5,4	68,1 ± 5,5
<i>Hv-tw₂</i> × <i>Hv-Lh</i> N11 (+)	0	7,7 ± 7,7	0	0	0	0	23,1 ± 12,2	7,7 ± 7,7	61,5 ± 14,0	7,7 ± 7,7
	E	0	0	0	0	0	0	0	100 ^b	0
<i>Hv-tw₂</i> × <i>Hv-Lh</i> N13 (-)	0	0	0	0	0	0	0	0	52,2 ± 10,6	47,8 ± 10,6
	E	11,5 ± 6,4	0	0	0	0	0	11,5 ± 6,4	46,2 ± 10,0	42,3 ± 9,9
<i>Hv-tw₂</i> × <i>Hv-Lh</i> N19 (+)	0	4,8 ± 4,8	9,5 ± 6,6	0	0	9,5 ± 6,6	0	14,3 ± 7,8	61,9 ± 10,9	14,3 ± 7,8
	E	6,5 ± 4,5	9,7 ± 5,4	0	0	0	3,2 ± 3,2	16,1 ± 6,7	77,4 ± 7,6	3,2 ± 3,2
<i>Hv-Hooded</i> (<i>H</i>) (-)	0	5,8 ± 2,1	7,4 ± 2,4	5,0 ± 2	0,8 ± 0,8	26,4 ± 4,0	1,7 ± 1,2	13,2 ± 3,1	52,9 ± 4,6	0
	E	1,6 ± 1,1	0 ^b	8,2 ± 2,5	0	27,9 ± 4,1	0	1,6 ± 1,1 ^c	62,3 ± 4,4	0
<i>Hv-tw₂</i> × <i>Hv-H</i> N6 (+)	0	21,5 ± 5,1	6,2 ± 3,0	6,2 ± 3,0	3,1 ± 2,2	4,6 ± 2,6	1,5 ± 1,5	27,7 ± 5,6	56,9 ± 6,2	0
	E	10,7 ± 4,2	1,8 ± 1,8	0 ^a	0	0	1,8 ± 1,8	12,5 ± 4,5 ^a	85,7 ± 4,7 ^c	0

¹Veislė ‘Auksiniai II’ (*wt*), *Hv-tw₂* mutantas ir linija *Hv-tw₂;H* N21 (+) ektopinių struktūrų neformuoja, todėl šie genotipai į lentelę neįtraukti. ²Kt. – vamzdelio arba “kepurės” pavidalo ektopinės struktūros, neturinčios reprodukinių organų. Žiedo organai: L – lodikulės, K – kuokeliai, P – piestelės, žv. – žiedažvyniai; (+,-) – kaip 8 lentelėje; E – etefonas; a – $P < 0,05$, b – $P < 0,01$, c – $P < 0,001$, lyginant su atitinkama kontroline grupe (0)

Ektopinių žiedų su reprodukciniiais organais dažnis po poveikio etefonu taip pat sumažėjo ir viengubame *Hv-H* (Colsess II) mutante bei iš jo kilusioje dvigubo *Hv-tw₂;H* mutanto linijoje N6 (+). Šių abiejų genotipų kontrolinių grupių augalams taip pat būdingas santykinai didelis ektopinių žiedų su reprodukciniiais organais dažnis, ektopinių žiedų fenotipiniame spektre sudarantis apie 40–50 %. Tačiau dviems mutantams, viengubam *Hv-Lh* mutantui ir dvigubo *Hv-tw₂;Lh* mutanto linijai N13 (-), etefonas sukėlė priešingą efektą, indukuodamas ektopinių žiedų su reprodukciniiais organais, nebūdingų kontrolinės grupės augalams, susidarymą (8 pav.).

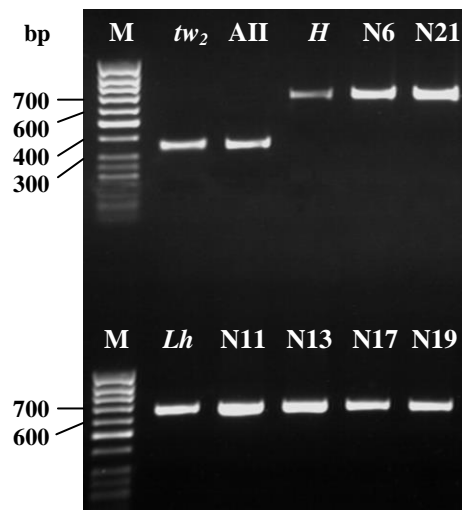
3.6. Viengubų ir dvigubų mutantų *BKn3* geno alelizmo nustatymas

Mūsų tyrimų metu nustatyti viengubų ir dvigubų mutantų atsako į kai kuriuos fitohormonus skirtumai bei dideli viengubų *Hv-Hd* tipo mutantų (tarp kurių ir mūsų tyrimuose naudoti *Hv-Hooded/Kap1.a* (Colsess II) bei *Hv-Lemma hooded* (4 pav., T ir S)) mutantų fenotipo skirtumai galėtų būti nulemti mutantinio *BKn3* geno sekos variacijų. Ypač abejonių kėlė dvigubi mutantai: (1) ar visi jie paveldėjo tą patį *BKn3* alelį ir (2) ar naudotos dvigubų mutantų linijos šio alelio atžvilgiu yra homozigotinės.

Remiantis Müller ir kt. (1995), visi *Hv-Hooded/Kap1* tipo mutantai turi 305 bp duplikaciją *BKn3* geno IV-ajame (didžiausiame) introne, tačiau smulkesnė šio mutantinio geno diferenciacija į alelius I, II, III(a, b ir c) yra paremta dviejų insercijų – 20 bp ilgio (promotoriuje) bei 33 bp ilgio (IV introne) – buvimu (Badr ir kt., 2000). Dviejų reguliacinių *BKn3* regionų promotoriaus ir IV introno srityse sekos analizė buvo būtina siekiant nustatyti, ar šiame tyrime naudojami viengubi ir dvigubi mutantai turi tuos pačius *BKn3* geno diagnostinius žymeklius, leidžiančius identifikuoti konkrečius šio geno alelius. *BKn3* alelių II ir IIIa, b, c promotoriaus srityje yra savita 20 bp ilgio insercija, kurios neturi *BKn3* alelis I (*k*), aptinkamas Europoje auginamuose *Hordeum vulgare* genotipuose, o 33 bp

insercija *BKn3* geno IV introne yra aptinkama visuose *BKn3* aleliuose, išskyrus alelį IIIc (*K*), taigi šios insercijos nebuvimas *BKn3* geno IV introne yra savitas IIIc alelio žymuo (Badr ir kt., 2000).

Abu minėtus *BKn3* geno diagnostinius žymenis apimančių fragmentų sekos analizė parodė, jog *Hv-tw₂* mutantas ir jo pradinė veislė ‘Auksiniai II’ (*WT*) turi europinio tipo *BKn3* alelį (*I*), o visi mūsų tyrimuose naudoti viengubi bei dvigubi *Hv-Hooded/Kap1* tipo mutantai turi diagnostinius žymenis (turi 20 bp inserciją promotoriuje ir neturi 33 bp insercijos IV introne), būdingus *BKn3* IIIc (*K*) tipo aleliui (17 lentelė) bei visiems *BKn3* mutantiniams aleliams būdingą 305 bp duplikaciją IV introne (9 pav.). Ištyrus dar 12 VU Botanikos sodo kolekcijoje saugomų viengubų *Hv-Hd* tipo mutantų *BKn3* aleliams savitus žymenis, visuose juose, nepaisant didelių morfologijos skirtumų, taip pat nustatytas IIIc alelis, tačiau šie rezultatai neatmeta galimybės, kad skirtumai tarp įvairių *Hv-Hd* tipo mutantų egzistuoja kituose *BKn3* geno saituose.



9 pav. PGR produktai, turintys 305 bp ilgio duplikaciją (viengubi *Hv-Hooded/Kap1.a* (*H*) ir *Hv-Lemma hooded* (*Lh*) mutantai bei visos tirtos dvigubų mutantų linijos) ir jos neturintys (*Hv-tw₂* ir *WT* (veislė ‘Auksiniai II’) (atitinkamai, 649 bp ir 335 bp ilgio fragmentai). M – DNR fragmentų dydžio standartas

Ypač netikėti buvo *Hv-Lh* mutanto ir iš jo kilusių dvigubų mutantų linijų *BKn3* geno sekvenavimo rezultatai. Visuose šiuose mutantuose nustatyti

diagnostiniai žymekliai, saviti *BKn3* aleliui IIIc, nors savo išskirtiniu fenotipu *Hv-Lh* mutantas (4 pav., S) yra panašesnis į *Hv-Elevated hood* mutantą (jam būdingas IIIb alelis), kadangi *Hv-Lh* mutanto ektopiniai žiedai vystosi akuoto distalinėje dalyje, t.y. ženkliai toliau nuo pagrindinio žiedo apatinio žiedažvynio nei *Hv-Hooded/Kap1.a* (Colsess II) mutanto. Skirtingai nei IIIc (*K*) alelis, mutantinis IIIb tipo alelis (*Elevated hood*, K^e) turi savitą 33 bp ilgio inserciją *BKn3* geno IV introne (Badr ir kt., 2000), tačiau ši insercija nebuvo nustatyta nei *Hv-Lh* mutante, nei visose keturiose tirtose dvigubų *Hv-tw₂;Lh* mutantų linijose.

Dar labiau intriguoja faktas, jog dvigubo *Hv-tw₂;H* mutanto linija N21 (+) taip pat turi diagnostinius žymeklius, būdingus aleliui IIIc. Kaip minėta, šiai linijai būdingas labai silpnai išreikštas *Hv-Hooded* fenotipas, pasireiškiantis mažo dažnio nežymių ektopinių išaugų susidarymu akuoto distalinėje dalyje. Be to, šiai linijai, kaip ir tėviniam *Hv-tw₂* mutantui, būdingos dveilės varpos, priešingai nei *Hv-Hooded/Kap1.a* (Colsess II) mutantui, kurio varpos yra šešiaeilės. Taigi, dvigubo *Hv-tw₂;H* mutanto linija N21 (+) aiškiai rodo genetinio fono reikšmę *Hv-Hooded/Kap1* mutacijos fenotipinei raiškai, o DNR sekvenavimo rezultatai patvirtina šią išvadą.

17 lentelė. Dviejų *BKn3* geno reguliacinių sričių sekvenavimo rezultatai

Pozicija, nt Genotipas	Promotorius										IV intronas					<i>BKn3</i> alelis ⁴		
	877	930	20 bp ins. ¹			1080	1085	1230	1265	1315	1425	1499	5059	33 bp ins. ²			5342	5491
<i>Hv-tw₂, WT</i>	T	C	-	C	C	C	A	C	C	C	C	G	+	A	T	C	-	I
<i>Hv-Hd</i> mutantai ir dvigubų <i>Hv-tw₂;Hd</i> mutantų linijos ⁵	-	T	+	T	T	T	G	G	T	T	T	C	-	G	G	T	+	IIIc (<i>K</i>)

^{1,2,3}ins. ir dup. – insercijos ir duplikacija: (+) – yra, (-) – nėra; ⁴*BKn3* aleliai, nustatyti pagal Badr ir kt. (2000); ⁵Iš viso ištirti visi tyrimuose naudoti dvigubi mutantai bei 14 VU Botanikos sodo kolekcijoje saugomų *Hooded* tipo mutantų: *Hv-2-row hooded* (a.1441 ir a.1445), *Hv-Brittle rachis*, *Hv-Hooded lemma*, *Hv-Hood awn*, *Hv-Hooded 2-row*, *Hv-Elevated hood*, *Hv-Hooded/Kap1.a* (Colsess II), *Hv-Dense wing hood*, *Hv-Hooded*, *Hv-Hoods on center spikelet*, *Hv-Sessile hood*, *Hv-Lemma hooded* ir *Hv-Multiflorous*

Taip pat nustatyta, jog abu tyrime naudoti viengubi *Hv-Hd* mutantai (*Hv-H* ir *Hv-Lh*), visi iš jų kilę dvigubi *Hv-tw₂;Hd* mutantai bei kiti VU Botanikos sodo kolekcijoje saugomi *Hv-Hd* tipo mutantai *BKn3* IV introne turi 305 bp duplikaciją, kuri neaptinkama *Hv-tw₂* mutanto ir *WT* (pradinės veislės ‘Aukšiniai II’) turimame laukinio tipo *bkn3* (*k*) alelyje (9 pav.). Be to, visų tirtų viengubų ir dvigubų mutantų, turinčių *BKn3* geną, 305 bp duplikacijos sekvenavimo rezultatai parodė, kad visų jų turima minėtos duplikacijos seka taip pat yra identiška.

Šiuo tyrimo etapu taip pat įsitikinta, kad visi mūsų tyrimuose naudoti *Hv-Hd* tipo mutantai ir iš jų kilusios dvigubų *Hv-tw₂;Hd* mutantų linijos yra homozigotinės pagal *BKn3* geną. Kitu atveju heterozigotose būtų stebimi du PGR produktai – vienas veislės ‘Aukšiniai II’ padėtyje, kitas (dvigubai didesnis dėl turimos 305 bp duplikacijos – būdingas *Hv-Hooded/Kap1* tipo mutantams (9 pav.).

3.7. Miežio *Hv-tweaky spike 2* mutacijos kaip paveldimo dvigubų mutantų fenotipo nestabilumo paleidiklio (trigerio) tyrimai

3.7.1. *Hv-tweaky* fenokopijų indukcija 2,4-D

Kaip minėta 1.6.1. skyriuje, *Hv-tw* tipo mutacijų, sukeliančių miežio „apipešiotų“ varpų fenotipą, molekulinė prigimtis yra nežinoma, tačiau ilgamečiai VU Botanikos ir genetikos katedroje atliekami miežio dvigubų mutantų tyrimai parodė, jog į bendrą dvigubų mutantų genomą įvedus mutantinį *Hv-tw₂* arba *Hv-tw* alelį, sukiamas paveldimas fenotipo nestabilumas, kuris pasireiškia plataus masto ektopinių į žiedą panašių darinių struktūros ir lokalizacijos variacijomis, be to, atsiranda naujų, viengubiems tėviniams mutantams nebūdingų pokyčių (tokių, kaip į lapus/stiebus panašių ektopinių išaugų, ilgų varpos „trūkių“ susidarymas) varpose.

Apibendrinant dviejų fitohormonų, auksino ir etileno, tyrimų rezultatus galima daryti dvi svarbias išvadas: (1) pats *Hv-tw* fenotipas atsiranda galimai dėl auksino biosintezės ir/arba pasiskirstymo sutrikimų; (2) paveldimas fenotipo nestabilumas indukuojamas dėl pleiotropinio *Hv-tw* tipo mutacijų poveikio, kuris pakeičia ir fitohormonų biosintezę ir/arba pasiskirstymą. Svarbu nustatyti, kokie *Hv-tw* tipo mutantų genų raiškos pokyčiai gali lemti paveldimą dvigubų mutantų, genome turinčių kurį nors *Hv-tw* tipo alelį, fenotipo nestabilumą. Analogiškų požymių turintys dvigubi mutantai yra gauti ir kryžminant kitą, stipresnį, *Hv-tw* alelį su įvairiais *Hv-laxatum-a* geno aleliais, o taip pat ir su panašaus į *Hv-tw* fenotipo (bet nealeliniais) *Hv-tweaky and missing kernel* ir *Hv-tweaky* No.18 mutantais – visiems tokiems dvigubiams mutantams, genome turintiems kurį nors *Hv-tw* tipo alelį, būdingas paveldimas fenotipo nestabilumas.

Be to, 'Auksiniai II' veislėje naujai indukuotai miežio *Hv-tweaky spike* mutacijai (*Hv-tw*, *Hv-tw₁* ir *Hv-tw₂* aleliams) pirmosiose augalų kartose buvo būdingas genetinis nestabilumas, kuris pasireiškė reversijomis į laukinį tipą. Revertantai išsaugojo kai kurias ūkiniu atžvilgiu svarbias *Hv-tw* tipo mutantams būdingas savybes, iš kurių svarbiausios yra padidėjęs baltymų kiekis grūduose, pakitusi aminorūgščių sudėtis, didesnis atsparumas kai kuriems mutagenams, kurios galėtų būti panaudotos dėl revertantuose atsikūrusio normalaus, prilygstančiam *WT*, produktyvumo, nes *Hv-tw* tipo mutantai yra apie du kartus mažiau produktyvūs (Rančelis ir kt., 2004; Vaitkūnienė ir kt., 2006; Šiukšta ir kt., 2008; Žvingila ir kt., 2012).

Išanalizavus literatūros šaltinius buvo surasta, kad sintetinis auksinas 2,4-dichlorfenoksiacto rūgštis (2,4-D), ilgą laiką žemės ūkyje naudotas kaip herbicidas plačialapėms piktžolėms naikinti, migliniams augalams sukelia įvairių derlių mažinančių žiedyno raidos nukrypimų, jei pasėliai purškiami kritiniais žiedyno raidos etapais (Derscheid, 1952; Derscheid ir kt., 1952; Staniforth, 1952; Kumar ir Singh, 2010). Tarp 2,4-D sukeliamų žiedyno raidos anomalijų aprašytas ir „apipešiotų“ (angl. *tweaked*) varpų fenotipas, kuris yra vienas iš būdingiausių

Hv-tw tipo mutantų požymių. Pastarasis faktas paskatino ištirti 2,4-D poveikį ne tik miežio veislės ‘Auksiniai II’, naudotos kaip *WT*, bet ir originalios kilmės *Hv-tw₂* mutanto, naudoto gauti dvigubus *Hv-tw₂;Hd* mutantus bei dar dviejų VU Botanikos sodo kolekcijoje saugomų *Hv-tweaky No.18* (*Hv-tw No.18*) ir *Hv-tweaky and missing kernel* (*Hv-twmk*) mutantų žiedo/žiedyno raidai ir kaliaus indukcijai bei augimui sistemoje *in vitro*. *Hv-tw₂*, *Hv-tw No.18* ir *Hv-twmk* mutantus vienija panaši varpos morfologija („trūkiai“, „karūnos“, varpučių išsidėstymo sutrikimai) bei žiedo organų skaičiaus variabilumas, tačiau lodikulių transformacija (LT) yra būdinga tik originalios kilmės *Hv-tw* tipo mutantams.

Kaip ir *Hv-tw₂* mutantui, *Hv-tw No.18* ir *Hv-twmk* mutantams būdingas įvairios lokalizacijos „trūkių“ ir „karūnų“ susidarymas varpose bei žiedo organų skaičiaus variacija, tačiau šie du mutantai taip pat pasižymi ir savitu nereguliariu priešiniu varpučių išsidėstymu vietoje įprasto pražangaus, kuris nebūdingas nei vienam *Hv-tweaky spike* tipo mutantui (10 pav.).



10 pav. Miežio *Hv-tweaky* tipo mutantų varpų morfologijos įvairovė. (A–C) *Hv-twmk* mutanto varpos: (A) varpa su redukuotomis viršutinėmis varputėmis, (B) varpa su „trūkiu“ ir „karūna“, (C) paprasta dveilė varpa; (D) *Hv-tw No.18* mutanto varpa su „trūkiu“; (E) *Hv-tw₂* mutanto varpa; (F) *Hv-tw No.18* mutanto varpos „trūkio“ morfologija: keli varpučių neturintys bambliai, žemiau jų esantis priešinis varpučių išsidėstymas ir virš „trūkio“ išsidėsčiusi „karūna“. Rodyklėmis pažymėtas priešinis varpučių išsidėstymas, trikampaiais – varpučių neformuojantys varpos bambliai

Kaip ir tikėtasi, 4-5 lapų stadijos augalų purškimas sintetinio auksino 2,4-D $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ tirpalu sukėlė tiek žiedyno, tiek vegetatyvinių organų vystymosi anomalijų visiems keturiems tirtiems genotipams (11 pav. ir 18 lentelė). Viena iš charakteringiausių 2,4-D sukeltų morfozių buvo nereguliarus priešinis varpučių išsidėstymas, kai prie vieno varpos bamblio tvirtinasi ne viena, o dvi arba trys varputės, bei dėl šio pokyčio varpose susiformuojantys „trūkiai“ (11 pav., A, F, G, H). Tokios morfozės buvo nustatytos *WT* (veislės ‘Auksiniai II’) bei *Hv-tw₂* mutanto augaluose, o jų dažnis siekė atitinkamai 54,5 % ir 69 % (18 lentelė). 2,4-D sukulto šio tipo morfozių dažnio *Hv-tw No.18* ir *Hv-tw_{mk}* mutantų varpose įvertinti buvo neįmanoma, nes toks varpučių išsidėstymas yra būdingas šių dviejų mutantų požymis (10 pav.).



11 pav. Sintetinio auksino 2,4-D indukuotų morfozių įvairovė: (A) šakotos varpos ir priešinis varpučių išsidėstymas *WT* (‘Auksiniai II’ veislės) varpose (pažymėta rodyklėmis); (B) 2,4-D sukelta *Hv-tw_{mk}* mutanto stiebo deformacija; (C–E) *Hv-tw No.18* mutanto varpos su skirtingos lokalizacijos „trūkiais“; (F–H) 2,4-D sukeltos *Hv-tw No.18* mutacijos fenokopijos *WT* augalų varpose; (I) 2,4-D indukuotas varpučių praradimas *WT* augalų varpose; (J) 2,4-D sukeltas ypač ilgas „trūkis“ *WT* varpoje, turintis septynis varpučių neformuojančius bamblius (pažymėti trikampaiais)

Minėtasis 2,4-D sukeltas priešinis varpučių išsidėstymas *WT* ir *Hv-tw₂* mutanto varpose dažnai buvo lydymas „trūkių“, atsiradusių dėl varpučių neformuojančių varpos bamblių. Kai kuriais atvejais tokie „trūkiai“ apėmė

didžiąją dalį varpos ašies (11 pav., J). Retesniais atvejais *WT* ir *Hv-tw₂* augaluose auksinas 2,4-D sukėlė mažesnio masto varpučių praradimą, primenantį *Hv-twmk* mutantui būdingą varpų morfologiją (palyginimui, 10 pav., A ir 11 pav., D). Taigi, 2,4-D sukelti saviti varpos architektūros pokyčiai *WT* ir *Hv-tw₂* augaluose – varpučių išsidėstymas bei „trūkių“ atsiradimas ir jų prigimtis – yra *Hv-tw No.18* ir *Hv-twmk* mutacijų fenokopijos, rodančios galimą *Hv-tw* mutacijų sąsają su auksino pernašos ir/arba metabolizmo sutrikimais – su auksino pertekliumi arba nepritekliumi atskiruose varpos regionuose, ektopiniais auksino pasiskirstymo varpoje sutrikimais bei naujų lokalių auksino koncentracijos maksimumų ir nepritekliaus zonų susidarymu išilgai varpos (McSteen ir Leyser, 2005; Scarpella ir kt., 2010; Tabata ir kt., 2012; Šiukšta ir kt., 2015).

18 lentelė. Sintetinio auksino 2,4-D šiltnamio sąlygomis sukeltų morfozių spektras

Genotipas	Poveikis	Sterilūs augalai	Augalai tipinėmis genotipui varpomis ¹	Morfozių spektras, % ± SE			n
				Augalai pakitusios struktūros varpomis ²	Augalai šakotomis varpomis	Augalai deformuotais stiebais	
<i>WT</i>	0	0	100	0	0	0	40
	2,4-D	27,3 ± 7,9 ^c	3,0 ± 3,0 ^c	54,5 ± 8,8 ^c	15,2 ± 6,3 ^a	0	33
<i>Hv-tw₂</i>	0	0	100	0	0	0	13
	2,4-D	10,3 ± 5,7	20,7 ± 7,7 ^c	69,0 ± 8,7 ^c	0	0	29
<i>Hv-twmk</i>	0	4,5 ± 2,6	94,0 ± 2,9	0	1,5 ± 1,5	0	67
	2,4-D	14,1 ± 4,2	78,9 ± 4,9 ^b	0	0	7,0 ± 3,0 ^a	71
<i>Hv-tw No.18</i>	0	7,7 ± 4,3	64,1 ± 7,8	0	28,2 ± 7,3	0	39
	2,4-D	23,4 ± 5,3 ^a	67,2 ± 5,9	0	9,4 ± 3,7 ^a	0	64

¹Tipinės *WT* varpos yra dvieilės; *Hv-tw₂* mutanto varpos pamatinėje dalyje yra sterilios bei turi „karūną“ (kelios prie vieno bamblio prisitvirtinusios varputės varpos viršūnėje); *Hv-twmk* ir *Hv-tw No.18* mutantų varpos turi „karūnas“ ir įvairiuose varpos regionuose susidariusius „trūkius“, be to, pasitaiko nereguliarus priešinis kai kurių varpučių išsidėstymas. ²*WT* ir *Hv-tw₂* augalai, kurių kai kurioms varputėms būdingas priešinis išsidėstymas; *Hv-twmk* ir *Hv-tw No.18* mutantams toks varpučių išsidėstymas yra būdingas požymis. n – ištirtų augalų skaičius; a – $P < 0,05$, b – $P < 0,01$, c – $P < 0,001$, lyginant su atitinkama kontroline grupe (0)

Be jau minėtų savitų didelio dažnio varpos architektūros pokyčių, 2,4-D taip pat indukavo *WT* augalų varpos ašies šakojimąsi (18 lentelė). Taip pat vertas dėmesio faktas, kad skirtingiems *Hv-tweaky* tipo mutantams 2,4-D sukėlė priešingą poveikį: *Hv-tw No.18* mutantui 2,4-D sumažino natūraliai būdingą varpų

šakojimosi dažnį ($P < 0,05$), o *Hv-tw₂* ir *Hv-twmk* mutantų varpų šakojimuisi 2,4-D reikšmingos įtakos nedarė. Apskritai, skirtingų *Hv-tweaky* tipo mutantų reakcija į 2,4-D buvo nevienoda ir savita, pvz., 2,4-D sukeltos stiebo deformacijos buvo būdingos tik *Hv-twmk* mutantui (18 lentelė).

Pažymėtina, jog morfozių dažnis buvo vertinamas pagal augalų pirmosios varpos, kurios pradmuo raidos metu turėjo tiesioginį kontaktą su egzogeniniu 2,4-D, fenotipą, nors vėlesni tyrimų etapai parodė, kad krūmijimosi metu atsiradę nauji stiebai, kurių meristemos tiesioginio kontakto su 2,4-D tirpalu neturėjo, taip pat formuoja varpas, turinčias pirmosios augalo varpos architektūrai būdingų nukrypimų, o tai rodo, kad egzogeninio auksino sukelti raidos pokyčiai meristemose įvyksta labai anksti, dar prieš krūmijimosi iniciaciją, arba kad sintetinis auksinas 2,4-D augalų audiniuose ilgai išlieka fiziologiškai aktyvios formos ir yra lėtai metabolizuojamas ir/arba pašalinamas. Taip pat nustatyta, kad purškimas 2,4-D tirpalu visiems tirtiems genotipams sukelia įvairaus laipsnio augalų sterilumą, tačiau šiuo aspektu tirtų genotipų jautrumas 2,4-D buvo nevienodas: įdomu, kad mažiausias sterilių augalų dažnis (10,3 %) buvo būdingas *Hv-tw₂* mutantui, o didžiausias – *WT* (veislei ‘Auksiniai II’). Didesnė *Hv-tw₂* mutanto tolerancija auksinui 2,4-D, palyginti su *WT*, irgi galimai rodo šios mutacijos sąsajas su auksino balanso sutrikimais. Po poveikio 2,4-D padaugėjo ir *Hv-tw No.18* ir *Hv-twmk* mutantų sterilių augalų, tačiau tokių augalų pasitaikė ir šių mutantų kontrolinėje grupėje, o reikšmingas sterilių augalų pagausėjimas po poveikio 2,4-D buvo nustatytas tik *Hv-tw No.18* ($P < 0,05$; 18 lentelė).

Kaip minėta, aleliniams *Hv-tweaky spike* mutantams (tarp jų ir *Hv-tw₂*) būdinga savita nereguliari lodikulių transformacija į reprodukcinis organus, lydima žiedo organų skaičiaus nestabilumo. Pastarasis reiškinys būdingas visiems *Hv-tw* tipo mutantams, todėl atskirai buvo iširtas ir 2,4-D poveikis skirtingų *Hv-tweaky* tipo mutantų žiedo struktūrai (19 lentelė). Be to, tikėtasi nustatyti galimą žiedo struktūros variavimo priklausomybę nuo varpos morfologijos, todėl atskirai

buvo tiriama žiedo struktūra pakitusiose ir nepakitusiose tos pačios poveikio grupės varpose.

19 lentelė. Egzogeninio 2,4-D poveikis *WT* (veislės ‘Auksiniai II’) ir skirtingų *Hv-tweaky* tipo mutantų žiedo struktūrai

Geno- tipas	Povei- kis	Varpos morfotipas	n	Pagrindinio žiedo frakcijos, % ± SE				
				Norma	LT	ŽOS (1)	LT+ŽOS (2)	Suma (1+2)
<i>WT</i>	0	N	300	100	0	0	0	0
	2,4-D	N	20	100	0	0	0	0
		P.v.i.	236	100	0	0	0	0
		Šakota	129	95,3 ± 1,9 ^a	0	4,7 ± 1,9 ^a	0	4,7 ± 1,9 ^a
		Suma	385	98,4 ± 0,6 ^b	0	1,6 ± 0,6 ^b	0	1,6 ± 0,6 ^b
<i>Hv-tw₂</i>	0	<i>tw</i>	126	68,3 ± 4,2	30,2 ± 4,1	1,6 ± 1,1	0	1,6 ± 1,1
	2,4-D	<i>tw</i>	100	59,0 ± 4,9	39,0 ± 4,9	0	2,0 ± 1,4	2,0 ± 1,4
		<i>tw</i> su p.v.i.	223	74,0 ± 2,9	23,3 ± 2,8	2,2 ± 1,0	0,4 ± 0,4	2,6 ± 1,0
		Suma	323	69,3 ± 2,6	28,2 ± 2,5	1,5 ± 0,7	0,9 ± 0,5	2,5 ± 0,9
		<i>Hv- twmk</i>	0	Be „trūkių“	116	100	0	0
2,4-D	Su „trūkių“		135	97,8 ± 1,3	0	2,2 ± 1,3	0	2,2 ± 1,3
	Suma		251	98,8 ± 0,7	0	1,2 ± 0,7	0	1,2 ± 0,7
	Be „trūkių“		103	82,5 ± 3,8 ^c	0	17,5 ± 3,8 ^c	0	17,5 ± 3,8
	Su „trūkių“		100	94,0 ± 2,4 ³	0	5,0 ± 2,2 ²	1,0 ± 1,0	6,0 ± 2,4 ¹
<i>Hv-tw No.18</i>	0	Be „trūkių“	102	99,0 ± 1,0	0	1,0 ± 1,0	0	1,0 ± 1,0
	2,4-D	Su „trūkių“	122	84,4 ± 3,3 ³	0,8 ± 0,8	13,9 ± 3,1 ³	0,8 ± 0,8	14,7 ± 3,2 ^c
		Suma	224	91,1 ± 1,9	0,4 ± 0,4	8,0 ± 1,8	0,4 ± 0,4	8,5 ± 1,9
		Be „trūkių“	53	98,1 ± 1,9	1,9 ± 1,9	0	0	0
		Su „trūkių“	113	79,6 ± 3,8 ³	0	19,5 ± 3,7 ³	0,9 ± 0,9	20,4 ± 3,8
Suma	166	85,5 ± 2,7	0,6 ± 0,6	13,3 ± 2,6	0,6 ± 0,6	13,9 ± 2,7		

Varpos morfotipai: N – normalios struktūros (dvielės) varpos, p.v.i. – varpos, turinčios pakitusį varpučių išsidėstymą, *tw* – varpos, turinčios *Hv-tw* tipo mutantams būdingą raidos gradientą, „trūkių“ ir/arba „karūną“; pagrindinio žiedo tipai: norma – 2 lodikulės + 3 kuokeliai + 1 piestelė (2L+3K+1P), LT – žiedai, kuriuose lodikulės transformuotos į kuokelius ir/arba piesteles; ŽOS – žiedai, kuriuose pakitęs bendras žiedo organų (L, K ar P) skaičius; n – ištirtų žiedų skaičius; a – $P < 0,05$, b – $P < 0,01$, c – $P < 0,001$, lyginant su atitinkamu kontrolinės grupės (0) varpų morfotipu; 1 – $P < 0,05$, 2 – $P < 0,01$, 3 – $P < 0,001$, lyginant „trūkių“ turinčias ir jo neturinčias varpų morfotipus tarpusavyje

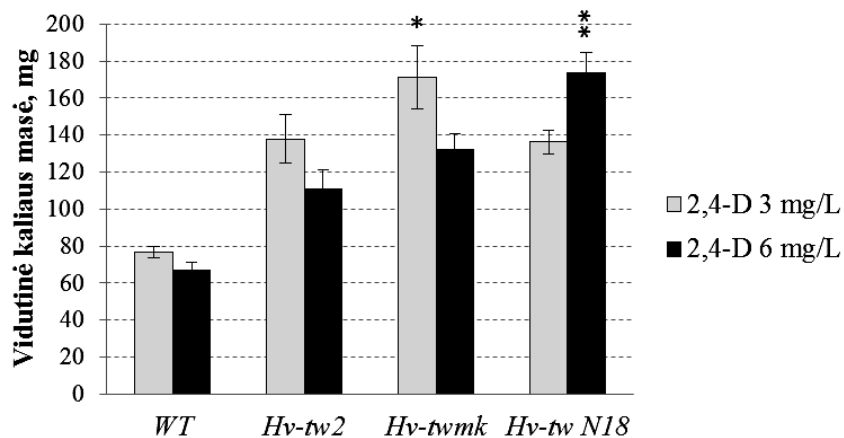
Ištirus *WT* (veislės ‘Auksiniai II’) žiedo struktūrą nustatyta, kad po 2,4-D poveikio atsiradusių šakotų varpų (11 pav., A) žieduose retai ($4,7 \pm 1,9$ %) atsiranda žiedo organų skaičiaus (ŽOS) pokyčių ($P < 0,05$; 19 lentelė). Pažymėtina, jog įprastomis sąlygomis ‘Auksiniai II’ veislės augalai pasižymi dideliu žiedo struktūros stabilumu – šiai veislei būdingi griežtai normalios struktūros žiedai, turintys 2 lodikules, 3 kuokelius ir 1 piestelę, o tokie žiedo

organų skaičiaus pakitimai yra būdingi iš šios veislės kilusiam *Hv-tw₂* mutantui bei abiem kitiems *Hv-tweaky* tipo mutantams – *Hv-tw No.18* ir *Hv-twmk*. Be to, įprastos morfologijos (dvieilėse) *WT* varpose tiek kontroliniuose augaluose, tiek ir po poveikio 2,4-D, jokių žiedo struktūros pokyčių nebuvo nustatyta, todėl galima daryti išvadą, jog žiedo struktūros pokyčiai specifiškai atsiranda varpų morfotipe, kurio raida po 2,4-D poveikio yra labiausiai sutrikusi.

Ištyrus *Hv-tw₂* mutanto skirtingų varpos morfotipų žiedo struktūrą, statistiškai patikimų 2,4-D indukuotų žiedo struktūros skirtumų tarp jų nerasta, tačiau *Hv-tw₂* mutanto varpose, turinčiose sutrikusį varpučių išsidėstymą, nustatyta silpna šio mutanto žiedo struktūros normalizacija, pasireiškusį nežymiu tipinės struktūros (2L+3K+1P) žiedų frakcijos padidėjimu ir sumažėjusia žiedų su transformuotomis lodikulėmis (LT) frakcija (19 lentelė).

Akivaizdi varpos morfologijos reikšmė žiedo struktūrai buvo nustatyta tiriant *Hv-tw No.18* ir *Hv-twmk* mutantus: šių genotipų kontrolinės grupės varpų, neturinčių išreikšto *Hv-tweaky* fenotipo („trūkių“ ir „karūnų“), žiedo struktūra buvo tipinė *WT*, tačiau „trūkių“ turinčiose varpose nustatytas žiedų su pakitusiu organų skaičiumi (ŽOS) dažnio pasikeitimas, kuris ypač ryškus buvo *Hv-tw No.18* mutanto *tw* tipo varpose (19 lentelė). 2,4-D įtaka šių abiejų mutantų žiedo struktūrai buvo nevienoda: 2,4-D padidino ($P < 0,001$) *Hv-twmk* mutanto ŽOS žiedų frakciją varpose be „trūkio“, o varpų su „trūkiu“ žiedo struktūros pokyčių dažnis nesiskyrė nuo kontrolinės grupės analogiškos struktūros varpų žiedų. *Hv-tw No.18* mutanto žiedo struktūrai 2,4-D reikšmingos įtakos neturėjo (19 lentelė): kaip ir kontrolinėje grupėje, reikšmingi žiedo struktūros skirtumai buvo nustatyti tik tarp skirtingų tos pačios poveikio grupės varpos morfotipų, o ne tarp 2,4-D veikėtų ir neveiktų augalų.

Siekiant nustatyti galimą *Hv-tweaky* tipo mutacijų sąsają su sutrikusiu auksino metabolizmu ir/arba pasiskirstymu, taip pat buvo ištirta 2,4-D įtaka šio tipo mutantų kaliaus augimui *in vitro*, esant įprastai ($3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) ir padidintai ($6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) šio sintetinio auksino koncentracijai terpėje (12 pav.).



12 pav. *Hv-tweaky* tipo mutantų kaliaus augimo priklausomybė nuo sintetinio auksino 2,4-D koncentracijos. *WT* – veislė ‘Auksiniai II’; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, lyginant kaliaus, augusio terpėje su $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ir $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D, masę

Tyrimas parodė, kad padidinta 2,4-D koncentracija tiek *WT* (veislės ‘Auksiniai II’), tiek iš jos kilusio *Hv-tw₂* mutanto kaliaus augimą silpnai slopino, tačiau šis poveikis abiem atvejais buvo statistiškai nereikšmingas. Padidintos 2,4-D koncentracijos įtaka *Hv-tw No.18* ir *Hv-twmk* mutantų kaliaus augimui buvo nevienareikšmė: aukštesnis 2,4-D lygis terpėje slopino ($P < 0,05$) *Hv-twmk* mutanto kaliaus augimą, tačiau *Hv-tw No.18* mutanto kaliaus augimą skatino ($P < 0,01$) (12 pav.). Įdomu, jog visų trijų tirtų *Hv-tweaky* tipo mutantų vidutinė kaliaus masė tiek kontrolinėje terpėje, tiek ir terpėje su padidinta 2,4-D koncentracija, buvo didesnė nei *WT* (visais atvejais $P < 0,001$), o tokie šio tipo mutantų jautrumo egzogeniniam 2,4-D skirtumai, palyginti su *WT*, rodo pakitusį šių mutantų atsaką į egzogeninį auksiną bei dar kartą patvirtina galimą *Hv-tweaky* tipo mutacijų ryšį su auksino metabolizmo ir/arba pasiskirstymo sutrikimais.

3.7.2. *Hv-tw₂* mutanto pakitusios raiškos genų paieška ir genų charakterizavimas

Nors paveldimas fenotipo nestabilumas yra būdingas tik miežio dvigubų mutantų linijoms ir nėra sutinkamas viengubuose tėviniuose *Hv-Hd*, nei *Hv-tw₂* mutantuose, būtent pastarasis (*Hv-tw₂*) alelis yra fenotipo nestabilumo paleidiklis (trigeris) dvigubuose mutantuose. Prie šios išvados buvo prieita į tyrimus įtraukus didesnę skaičių VU Botanikos sodo kolekcijoje saugomų miežių dvigubų mutantų, gautų sukryžminus *Hv-tw* mutantą (šis alelis yra stipresnis nei *Hv-tw₂*) su įvairiais *Hv-laxatum-a* (*Hv-lax-a*) tipo mutantais, turintiems ilgą sumažėjusio tankio varpas bei reguliariai į kuokelius transformuotas lodikules (Larsson, 1985; Laurie ir kt., 1996; Vaitkūnienė ir kt., 2004b) bei su *Hv-tw No.18* ir *Hv-twmk* mutantais. Visiems šiems papildomai į tyrimus įtrauktiems dvigubiams *Hv-tw;lax-a*, *Hv-tw;tw No.18* ir *Hv-tw;twmk* mutantams būdingas paveldimas žiedo/žiedyno fenotipo nestabilumas, pasireiškiantis netgi didesne nei *Hv-tw₂;Hd* mutantų ektopinių į lapus/stiebus panašių išaugų morfologijos įvairove (20 lentelė).

20 lentelė. Dvigubų *Hv-tw;lax-a* (skirtingų alelių), *Hv-tw;tw No.18* bei reciprokinių *Hv-tw;twmk* ir *Hv-twmk;tw* mutantų (F₈) varpos morfologijos variacija lauko sąlygomis

Dvigubas mutantas	n	Fenotipinės grupės*					
		I	II	III	IV	V	Np/tw
<i>Hv-tw;lax-a.434</i>	169	21,3 ± 3,2	32,0 ± 3,6	5,9 ± 1,8	0	0	40,2 ± 3,8
<i>Hv-tw;lax-ab</i>	1119	0,6 ± 0,2	14,1 ± 1,0	26,1 ± 1,3	0	0	52,1 ± 1,5
<i>Hv-tw;lax-ac</i>	289	0,4 ± 0,4	21,8 ± 2,4	9,3 ± 1,7	0	0	54,7 ± 2,9
<i>Hv-tw;lax-ae</i>	815	0,6 ± 0,3	12,3 ± 1,2	12,0 ± 1,1	0	0	55,8 ± 1,7
<i>Hv-tw;tw No.18</i>	132	0,9 ± 0,8	11,9 ± 2,8	14,2 ± 3,0	0	0	63,6 ± 1,0
<i>Hv-tw;twmk</i>	1860	12,7 ± 0,8 ¹	10,5 ± 0,7	16,2 ± 0,9	13,2 ± 0,8 ¹	5,0 ± 0,5 ¹	31,2 ± 1,0 ¹
<i>Hv-twmk;tw</i>	1039	9,2 ± 0,9	20,0 ± 1,2 ^a	5,7 ± 0,7 ^a	1,3 ± 0,3 ^a	0,1 ± 0,1 ^a	37,2 ± 1,0 ^a

*Parodyta tik dalis fenotipo variacijų; varpų fenotipinės grupės: I, II ir III – kaip 12 lentelėje, IV – varpos su pailgėjusiais ir (V) ypač pailgėjusiais varpažvyniais ir žiedažvyniais. Np/tw – nepakitusios struktūros arba *Hv-tw* mutantui būdingos varpos; n – ištirtų varpų skaičius; a – $P < 0,001$, lyginant su reciprokine *Hv-tw;twmk* kombinacija. 1 – $P < 0,001$, lyginant su *Hv-tw;tw No.18*

Siekiant nustatyti *Hv-tw* tipo mutacijos kaip fenotipo nestabilumo paleidiklio (trigerio) galimus veikimo kelius, diferencinio vaizdinimo metodu buvo atlikta nedidelės apimties *Hv-tw₂* mutanto pakitusios raiškos genų paieška.

Nors šiuo metodu gauti rezultatai yra tik preliminarūs, tyrimo metu pavyko nustatyti kai kurių genų raiškos skirtumų tarp *Hv-tw₂* mutanto ir jo pradinės veislės ‘Auksiniai II’ (*WT*), kurie gali būti susiję su paveldimu fenotipo nestabilumu, būdingu dvigubiems mutantams, genome turintiems *Hv-tw* tipo mutaciją.

Atlikus dd-PGR su 24 pradmenų kombinacijomis, iš PAA gelio buvo išpjauti ir išskirti 49 diferencinės raiškos cDNR fragmentai. 43 fragmentai buvo sėkmingai reamplifikuoti ir 34 iš jų sėkmingai sekvenuoti. Šių diferencinės raiškos fragmentų homologų paieškos rezultatai pateikti 21 lentelėje.

21 lentelė. *Hv-tw₂* mutanto ir jo pradinės veislės ‘Auksiniai II’ (*WT*) diferencinės raiškos fragmentų palyginimas su NCBI registruotomis sekomis

cDNR frag-mento kodas	Ilgis, bp	Raiškos statusas ₁	Artimiausi homologai augaluose	Sekos homolo-gija (%)	E reikšmė	Pasiekimo kodas
N1/N17	150	↓	<i>Populus trichocarpa</i> hypothetical protein, mRNA	100/100	0,51/0,46	XM_002325891.2
			<i>Arabidopsis thaliana embryonic flower 1 (EMF1) gene</i>	85/85	0,15/0,13	AF319968.1
N2	110	↑	<i>Oryza sativa</i> genomic DNA, chromosome 4, BAC clone: OSJNBa0013K16	96	4,2	AL662957.2
			<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> cDNA clone: FLbaf172109, mRNA	91	0,34	AK252775.1
N3/N4	150/ 110	↑	<i>Hordeum vulgare</i> partial mRNA for putative protein (<i>bci-5</i> gene)	99/97	4e-26/7e-22	AJ250661.1
			<i>Deschampsia antarctica</i> plastid-specific ribosomal protein 2 precursor, mRNA	88/88	3e-14/2e-10	AY090534.1
			PREDICTED: <i>Brachypodium distachyon</i> 30S ribosomal protein 2, chloroplastic-like, mRNA	83/84	2e-10/1e-06	XM_003577869.1
N5	220	↓	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> mRNA for predicted protein, clone: NIASHv1048J09	99	1e-25	AK357227.1
			<i>Triticum aestivum</i> cDNA, clone: WT012_D22, cv.Chinese Spring	92	1e-38	AK335171.1
			PREDICTED: <i>Zea mays</i> zinc transporter ZTP29, transcript variants X1, X2, mRNA	86	3,5	XM_008681663.1, XM_008681664.1
N6/N7	130/ 150	↑	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> mRNA for predicted protein, clone: NIASHv2086L14	100/100	2e-52/3e-43	AK369215.1
			<i>Triticum aestivum</i> cDNA, clone: SET1_K09, cv. Chinese Spring	84/88	3e-24/2e-20	AK331725.1

21 lentelės tęsinys

N10	390	↓	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> mRNA for predicted protein, clone: NIASHv2002C18	99	3e-151	AK362072.1
			PREDICTED: <i>Setaria italica</i> 50S ribosomal protein L6, chloroplastic-like, mRNA	87	7e-77	XM_004984284.1
			<i>Oryza sativa</i> (indica group) cDNA clone: OSIGCSA057J06	85	6e-65	CT829171.1
			<i>Brachypodium distachyon</i> mRNA, clone: PL016C01-A-102_O17	84	8e-89	AK440012.1
N11	200	↑	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> mRNA for predicted protein, clone: NIASHv1060L05	98	1e-48	AK357734.1
N12	200	↑	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> mRNA for predicted protein, clone: NIASHv2056K09	95	2e-39	AK367410.1
			<i>Zea mays</i> clone 11019 mRNA	90	2e-31	DQ244822.1
			<i>Brachypodium distachyon</i> mRNA, clone: PL016C01-A-010_N24	80	3e-05	AK425858.1
N14	260	↑	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> mRNA for predicted protein, clone: NIASHv1071A07	99	7e-73	AK358199.1
			<i>Triticum aestivum</i> chromosome 3B, cv. Chinese Spring	80	4e-31	HG670306.1
N15	250	↑	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> mRNA for predicted protein, clone: NIASHv3022F18	99	1e-68	AK373145.1
			PREDICTED: <i>Brachypodium distachyon</i> uncharacterized mRNA	84	8e-21	XM_003558777.1
N15	250	↑	<i>Sorghum bicolor</i> hypothetical protein, mRNA	83	2e-15	XM_002465817.1
			<i>Oryza sativa</i> (japonica group) chromosome 3, clone OJ1172F09	81	1e-17	AC119796.2
			PREDICTED: <i>Zea mays</i> putative protein TPRXL, mRNA	79	3e-14	XM_008662296.1
N19	280	↑	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> genes for putative iron-deficiency specific 4 protein and putative ethylene-responsive transcription factor	99	4e-69	AP009567.1
			<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> mRNA for predicted protein, clone: NIASHv1144I09	99	1e-68	AK361595.1
			<i>Triticum aestivum</i> cDNA, clone: WT003_K10, cv. Chinese Spring	97	9e-65	AK332300.1
			PREDICTED: <i>Brachypodium distachyon</i> SPX domain-containing protein 1-like, mRNA	83	5e-30	XM_003563615.1
			<i>Oryza sativa</i> (indica group) cDNA clone: OSIGCEA016F18	80	4e-25	CT829841.1

21 lentelės tęsinys

N20	230	↑	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> mRNA for predicted protein, clone: NIASHv1113I24	100	2e-73	AK360234.1
			<i>Triticum aestivum</i> clone wdk9n1.pk001.m5:fis, mRNA	94	1e-30	BT009050.1
			PREDICTED: <i>Brachypodium distachyon</i> PHD finger protein ALFIN-LIKE 8-like, transcript variants 1, 2	79	4e-19	XM_003577600.1, XM_003577601.1
N21	400	↓	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> mRNA for predicted protein, clone: NIASHv3023B16	98	2e-14	AK373178.1
			PREDICTED: <i>Zea mays</i> (cl15598_1c), transcript variant X1, mRNA	95	6e-07	XM_008673922.1
			<i>Triticum aestivum</i> chromosome 3B, cv. Chinese Spring	94	8e-12	HG670306.1
			PREDICTED: <i>Setaria italica</i> lysophospholipid acyltransferase LPEAT1-like	91	2e-07	XM_004971457.1
N22	240	↓	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> mRNA for predicted protein, clone: NIASHv2009K02	100	6e-68	AK362710.1
			<i>Triticum aestivum</i> cDNA, clone: WT004_C02, cv. Chinese Spring	76	2e-23	AK332499.1
N23	260	↓	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> cDNA clone: FLbaf7c05, mRNA	99	1e-41	AK248920.1
			<i>Triticum aestivum</i> cDNA, clone: WT009_D18, cv. Chinese Spring	91	5e-27	AK334381.1
			PREDICTED: <i>Brachypodium distachyon</i> 10 kDa chaperonin-like, mRNA	80	1e-10	XM_003562531.1
			<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> cDNA clone: FLbaf5k17, mRNA	100	2e-16	AK248798.1
			<i>Populus sieboldii</i> × <i>Populus grandidentata</i> HPOX14 gene for peroxidase	84	7,0	D13683.1
N25	170	↑	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> chloroplast genome	100	7e-32	KC912687.1
			<i>Aegilops tauschii</i> cv. AL8/78 chloroplast genome	100	5e-32	KJ614412.1
			<i>Triticum urartu</i> cv. PI428335 chloroplast genome	100	5e-32	KJ614411.1
N26	160	↑	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> mRNA for predicted protein, clone: NIASHv1001F24	91	1e-20	AK353600.1
			<i>Aegilops tauschii</i> chromosome 1Ds prolamin gene locus	82	5e-07	JX295577.2
N28	380	↓	<i>Hordeum vulgare</i> glucan synthase-like 7 (GSL7), mRNA	99	3e-126	FJ853605.1
			<i>Triticum aestivum</i> chromosome 3B, genomic scaffold, cv. Chinese Spring	92	1e-111	HG670306.1

21 lentelės tęsinys

N29	370	↑	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> mRNA for predicted protein, clone: NIASHv1001D09	99	3e-151	AK353580.1
			PREDICTED: <i>Oryza brachyantha</i> cystathionine gamma-synthase, chloroplastic-like, misc_RNA	93	4e-80	XR_423359.1
			PREDICTED: <i>Brachypodium distachyon</i> chloroplastic-like cystathionine gamma-synthase, mRNA	85	1e-93	XM_003557784.1
N30	290	↑	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> mRNA for predicted protein, clone: NIASHv1014O02	99	1e-82	AK355026.1
			<i>Triticum aestivum</i> cDNA, clone: SET1_P17, cv. Chinese Spring	86	4e-45	AK333080.1
N31	290	↑	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> mRNA for predicted protein, clone: NIASHv2141I06	99	2e-87	AK371791.1
			<i>Triticum aestivum</i> clone wr1.pk0079.d1: fis, mRNA	89	3e-59	BT009497.1
N32	260	↑	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> mRNA for predicted protein, clone: NIASHv1014O02	100	5e-88	AK355026.1
			PREDICTED: <i>Cucumis sativus</i> calcium-dependent protein kinase 7-like	87	4,5	XM_004163242.1
			<i>Triticum aestivum</i> cDNA, clone: SET1_P17, cv. Chinese Spring	86	4e-51	AK333080.1
N34	160	↑	<i>Hordeum vulgare</i> mRNA for germin-like protein 1	100	0,010	Y15962.1
			<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>durum</i> Pm3 locus	88	8e-04	AY146587.2
N35	160	↑	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> mRNA for predicted protein, clone: NIASHv2107J18	96	2e-24	AK370252.1
			<i>Saccharum hybrid</i> cv. ROC22 ubiquitin-conjugating enzyme (UBc E2) mRNA	89	4e-07	KJ577594.1
			<i>Zea mays</i> clone 9808, mRNA	88	1e-13	DQ244636.1
			PREDICTED: <i>Brachypodium distachyon</i> ubiquitin-conjugating enzyme E2 28-like, mRNA	88	2e-05	XM_003580724.1
			<i>Sorghum bicolor</i> hypothetical protein, mRNA	87	2e-05	XM_002448680.1
N36	340	↓	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> mRNA for predicted protein, clone: NIASHv2111F15	100	8e-99	AK370475.1
			PREDICTED: <i>Cucumis sativus</i> probable serine/threonine-protein kinase WNK2-like, mRNA	100	1,5	XM_004152522.1
			<i>Triticum aestivum</i> chromosome 3B, genomic scaffold, cv. Chinese Spring	97	1e-39	HG670306.1

21 lentelės tęsinys

N38	290	↓	<i>Trichophyton rubrum</i> CBS 118892 imidazole glycerol phosphate synthase, mRNA	86	0,34	XM_003235554.1
			PREDICTED: <i>Brachypodium distachyon</i> serine/threonine-protein kinase EDR1-like, mRNA	91	4e-06	XM_003563992.2
N39	350	↑	<i>Triticum aestivum</i> cv. Diamant2 <i>Vrn-B1-a</i> allele	97	5e-07	HQ130483.2
			<i>Triticum carthlicum</i> genotype PI 94749 retrotransposon <i>VRN</i> ; and <i>VRN-B1</i> gene	97	5e-07	JN817430.1
			<i>Triticum aestivum</i> 5-methylcytosine DNA glycosylase (<i>DME-5A</i>) gene	97	5e-07	JF683316.1
			<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> mRNA for predicted protein, clone: NIASHv2040H08	97	5e-07	AK366118.1
			<i>Triticum aestivum</i> ABI3-interacting protein 2-1 protein (<i>AIP2-2</i>) gene	97	5e-07	FJ643533.1
			<i>Aegilops tauschii</i> clone 10 retroposon <i>Au</i> element	97	3e-04	AY674984.1
			<i>Triticum aestivum</i> strain CRB-INRA-CFD-13471 malate dehydrogenase (<i>Mdh4B</i>) gene	92	3e-04	EF109232.1
			<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> mRNA for predicted protein, clone: NIASHv3134B06	100	7e-67	AK376730.1
N40	300	↑	<i>Brachypodium distachyon</i> mRNA, clone: PL016C01-A-089_I09	86	0,002	AK437941.1
			PREDICTED: <i>Brachypodium distachyon</i> 60S ribosomal protein L13a-4-like, transcript variant 2, mRNA	86	0,002	XM_003557639.1
			<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> <i>Lks2</i> gene for putative short internodes family transcription factor	94	1e-78	AB678347.1
N41	320	↑	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> <i>eIF4E</i> gene locus	86	5e-57	AY661558.1
			<i>Hordeum vulgare</i> <i>vrs1</i> locus; and <i>Hox1</i> gene	85	2e-55	EF067844.1
			<i>Solanum lycopersicum</i> chromosome 7	91	0,54	HG975519.1
N42	150	↑	<i>Trifolium pratense</i> genome assembly redclover, chromosome 2	93	0,84	LN846350.1

¹Fragmento raiškos statusas: ↑ – raiška padidėjusi, ↓ – raiška sumažėjusi (lyginant su WT)

Atlikus diferencinės raiškos cDNR fragmentų sekos analizę nustatyta, jog kelios panašaus dydžio cDNR fragmentų poros (N1 ir N17, N3 ir N4, N6 ir N7), gautos naudojant tą pačią pradmenų kombinaciją, yra beveik identiškos sekos nuo

tos pačios mRNR matricos susintetinti atvirkštinės transkripcijos produktai, kurie dėl denatūruojančių sąlygų didelės skyros (6 %) PAA gelyje yra matomi kaip greta vienas kito esančių fragmentų populiacija. Tokie nepriklausomai sekvenuoti, bet tai pačiai mRNR atstovaujantys cDNR fragmentai 21 lentelėje pateikiami kartu. Kai kuriems cDNR fragmentams surastų homologų E reikšmės, rodančios tikimybę, jog paieškos rezultatai yra gauti dėl atsitiktinio sekos sutapimo ir leidžiančios įvertinti foninį „triukšmą“, yra santykinai didelės (didesnės nei 0,01), tačiau santykinai dideli E reikšmės įverčiai yra būdingi neilgoms sekoms, o būtent tokios yra kai kurios diferencinio vaizdinimo metodu mūsų gautos sekos.

Didelė dalis diferencinio vaizdinimo metodu nustatytų diferencinės raiškos cDNR fragmentų buvo homologiški įvairioms *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* sekoms, daugelis kurių yra neanototos funkcijos mRNR, cDNR ar DNR sekos. Kita dalis diferencinės raiškos cDNR fragmentų (iš viso dešimt) buvo homologiški įvairių miežiams filogenetiškai artimų miglinių augalų sekoms (*Aegilops*, *Brachypodium*, *Oryza*, *Triticum*, *Zea*). Tik keturi diferencinės raiškos cDNR fragmentai buvo homologiški anototos funkcijos baltymus koduojantiems miežio genams: tai fragmentai N3/N4 (homologiškas *BCI-5* (angl. *Barley chemically-induced 5*) genui), N19 (homologiškas *IDS4/ERF* (angl. *putative iron-deficiency specific 4/putative ethylene responsive factor*) genui), N28 (homologiškas *GSL7* (angl. *glucan synthase-like 7*) genui) ir N34 (homologiškas *GLP1* (angl. *germin-like protein 1*) genui). N41 fragmentas buvo homologiškas net trimis anototos funkcijos miežio genams – *Lks2* (angl. *Short awn 2*), *Vrs1* (angl. *Six-rowed spike 1*) ir *eIF4E* (angl. *Translation initiation factor 4E*). Taip pat buvo identifikuoti keturi cDNR fragmentai (du fragmentai, kurių raiška, palyginti su *WT*, *Hv-tw2* mutante yra padidėjusi (N24, N42) ir du fragmentai, kurių raiška šiame šiame mutante sumažėjusi (N1/17, N38)), kurie DDBJ, EMBL ir GenBank duomenų bazėse nebuvo homologiški nei vienai užregistruotai miežio sekai. Šie keturi cDNR fragmentai bus užregistruoti GenBank duomenų bazėje kaip naujos miežio genomui atstovaujančios sekos.

Dėl pleiotropinės *Hv-tw₂* mutanto prigimties bei dėl šio tipo mutacijų indukuojamo paveldimos formos fenotipo nestabilumo dvigubuose mutantuose, labiausiai domino tie pakitusios raiškos (palyginti su *WT*) *Hv-tw₂* mutanto genai, kurie gali būti susiję su kitų genų raiškos/veiklos reguliacija – tai įvairūs transkripcijos veiksniai, chromatino fizinių būvį keičiančius baltymus koduojantys genai, įvairūs raidos genai, fitohormonų (ypač etileno ir auksino) signalinių kelių ir/arba atsako genai.

Analizė parodė, jog keletas diferencinės raiškos cDNR fragmentų yra homologiški genams, dalyvaujantiems chromatino pertvarkoje. Vienas iš tokių cDNR fragmentų yra N1/17, iš dalies homologiškas vairo *EMF1* (angl. *Embryonic flower 1*) genui. *EMF1* baltymas yra transkripcijos reguliatorius, reguliuojantis vegetatyvinio augimo trukmę, ir yra vienas iš svarbiausių vairo žydėjimo represorių. *EMF1* yra gyvūnų *PRC1* (angl. *Polycomb repressive complex 1*) funkcinis atitikmuo (Derkacheva ir Henning, 2014; Wang ir kt., 2014) ir, nors šis vairo baltymas nėra homologiškas jokiems žinomiems Polycomb grupės (PcG) baltymams, augaluose jis dalyvauja nuo PcG priklausančiame genų raiškos slopinime (Calonje ir kt., 2008). Vairo *EMF1* baltymas slopina žydėjimą tiesiogiai sąveikaudamas su tokiais žiedo organų tapatumo genais, kaip *AG*, *AP3* ir *PI* (Calonje ir kt., 2008; Kim ir kt., 2010; Pu ir kt., 2013), tačiau nustatyta, kad *EMF1* dalyvauja ir daugelio kitų vairo genų, tarp kurių yra ir kai kurių fitohormonų biosintezės bei atsako genai, slopinime (Moon ir kt., 2003; Kim ir kt., 2010; Pu ir kt., 2013). Vairo *emf1* mutantams būdingas sutrikęs vegetatyvinio/generatyvinio vystymosi balansas – *emf1* mutacija lemia ankstyvą vairo daigo vegetatyvinės fazės perėjimą į generatyvinę bei gemalo meristemos transformaciją iš nedeterminuotos būklės į determinuotą. Dėl to *emf1* mutantų žiedynuose susidaro vos vienas ar keli vainiklapių neturintys žiedai, o šis mutantinis fenotipas gali būti „gelbėjamas“ sumažinus žiedo organų tapatumo *AGAMOUS* (*AG*) geno aktyvumą (Sánchez ir kt., 2009). Parodyta, jog *emf1* mutantuose yra padidėjusi *KNOX* šeimos genų *KNAT1,3,4,7* raiška (Kim ir kt.,

2010). Neseniai vairo *EMF1* geno ortologas *DFO1* (angl. *DEFORMED FLORAL ORGAN 1*) buvo nustatytas ir ryžiuose (Zheng ir kt., 2015).

cDNR fragmentas N3/N4 yra homologiškas miežio *BCI-5* genui, kurį indukuoja cheminiai imuniteto induktoriai, bet jo funkcija neišaiškinta (Beßer ir kt., 2000).

Fragmentas N19 yra homologiškas miežio *IDS4/ERF* (*Iron-Deficiency Specific protein 4*) genui, dalyvaujančiam tiek raidos (dėl sąsajos su etilenu), tiek metaboliniuose procesuose (geležies įsisavinime). *IDS4* geno koduojamas baltymas turi SPX domeną (akronimas iš SYG1, Pho81 ir XPR1 baltymų), o ši domeną turintys vairo bei ryžio baltymai dalyvauja neorganinio fosforo homeostazėje (Duan ir kt., 2008)

N20 cDNR fragmentas yra homologiškas anotuotos funkcijos *Brachypodium distachyon* PHD (angl. *Plant homeodomain*) domeną turinčiam ALFIN-LIKE8-LIKE baltymui (21 lentelė). PHD motyvas sutinkamas daugelyje su chromatinu sąveikaujančių augalų reguliacinių baltymų, užtikrinančių genų raiškos reguliaciją transkripcijos lygmenyje (Sanchez ir Zhou, 2011).

Diferencinės raiškos N28 ir N34 cDNR fragmentai yra homologiški atitinkamai *GSL7* (*Glucan Synthase-like 7*) ir *GLP1* (*Germin-like protein 1*) miežio genams. *GSL* grupės baltymai dalyvauja kaliozės sintezėje, kuri vyksta tiek įvairiais augalo raidos momentais, tiek ir atsako į biotinį ir abiotinį stresą metu (Chen ir Kim, 2009). Ryžio *OsGLP1* baltymas pasižymi superoksido dismutazės (SOD) aktyvumu, todėl dalyvauja atsake į oksidacinį stresą, kuris yra viena iš svarbiausių biotinio ir abiotinio streso pasekmių (Banerjee ir Maiti, 2010).

Fragmentas N39 yra homologiškas net kelioms anotuotos funkcijos *Triticum* ir šiai genčiai filogenetiškai artimos rūšies *Aegilops tauschii* sekoms: *Vrn-B1* genui, *Vrn-B1* retrotranspozoniui, 5mC DNR glikozilazei (DEMETER-5A), *AIP2-2* (*ABI3-interacting protein 2-2*) ir *Mdh4B* (*Malate dehydrogenase 4B*) genams bei retropozoniui *Au* elementui. Visi šie genai dalyvauja labai skirtinguose augalo procesuose, tačiau visus juos vienija didesnis ar mažesnis

homologiškumas *Au* judriajam genomo elementui, kurio sekos į minėtus genus įsiterpė vykstant genomo evoliucijai. *Au* elementas pirmą kartą buvo nustatytas *Aegilops umbellulata* rūšyje, nuo kurios ir kilo šio retrotranspozono pavadinimas (Yasui ir kt., 2001). Šio SINE (angl. *Short interspersed nuclear element*) tipo retrotranspozono variantai yra plačiai paplitę įvairiose Solanaceae, Fabaceae ir Poaceae šeimos rūšyse, nors ryžio genome šio tipo retrotranspozonų nerasta (Fawcett ir kt., 2006; Ben-David ir kt., 2013).

N41 cDNR fragmentas yra homologiškas net trimis skirtingoms anuotos funkcijos miežio baltymus koduojančioms sekoms – *Lks2* (*Short awn 2*), eIF4E (*Translation initiation factor 4E*) ir *vrs1/Hox1* (*Six-rowed spike 1*) genams. Miežio *Lks2* genas koduoja transkripcijos veiksnį, kurio raiška yra intensyviausia akuotuose ir piestelėse. Manoma, jog besivystančiuose *lks2* mutantų akuotuose atsiranda ausrinio koncentracijos pokyčių, sukeliančių ląstelių dalinimosi greičio sumažėjimą, dėl kurio vystosi trumpi akuotai (Yuo et al., 2012). Kitas fragmentui N41 homologiškas genas koduoja eIF4E transliacijos iniciacijos veiksnį, dalyvaujantį ir su transliacija nesusijuose procesuose (Rhoads, 2009), pavyzdžiui, kai kurių šio geno alelių koduojami produktai svarbūs miežio bei kitų rūšių augalų atsparumui prieš kai kuriuos virusus atsirasti (Stein ir kt., 2005; Perovic ir kt., 2014). Trečiasis cDNR fragmentui homologiškas *Vrs1/Hox1* genas koduoja homeodomeną turintį transkripcijos veiksnį, atsakingą už miežio šoninės varpučių eilės vystymąsi. Dominuojančiojo *Vrs1* alelio raiška vyksta besivystančio žiedyno (sudėtinės varpos) šoninių varpučių užuomagoje, stabdydama pastarųjų vystymąsi ir taip sukeldama dvieilių varpų susidarymą. Recessyvosios *vrs1* mutacijos sukelia šešiaeilų varpų vystymąsi (Komatsuda ir kt., 2007).

IV. REZULTATŲ APTARIMAS

4.1. Dvigubų *Hv-tw₂;Hd* mutantų fenotipo nestabilumo sąsajos su auksino funkcijos sutrikimais

Paveldimas fenotipo nestabilumas, daugelyje *Hv-tw₂;Hd* ir kitų miežio dvigubų mutantų kartų pasireiškęs žiedo/žiedyno raidos variacijomis bei naujų, tėviniams viengubiems mutantams nebūdingų požymių atsiradimu, buvo netikėtas ir intriguojantis reiškinys. Miežio *BKn3* geno dviejų reguliacinių regionų, apimančių savitas 20 bp ir 33 bp ilgio insercijas ir leidžiančių diferencijuoti atskirus šio geno alelius (I-IIIa, b ir c) (Badr ir kt., 2000), sekvenavimo rezultatai parodė, jog visi tirti *Hv-Hooded/Kap1* tipo viengubi ir dvigubi mutantai turi vienodus molekulinis žymenis, būdingus IIIc (*K*) aleliui, o *WT* ir *Hv-tw₂* mutantui būdingas europinis I tipo *BKn3* alelis. Tai rodo, kad nepaisant radikalių fenotipo skirtumų, visi ektopines žiedo pavidalo išaugas formuojantys *Hv-Hd* tipo viengubi ir dvigubi mutantai turi identišką *BKn3* IIIc alelį, o jų paveldima žiedo/žiedyno fenotipo variacija nesusijusi su dviejų pagrindinių *BKn3* geno reguliacinių sričių – šerdinio promotoriaus ir IV (reguliacinio) introno – sekos variacija.

Fenotipo nestabilumo modifikavimo sintetiniu auksinu 2,4-D ir auksino inhibitoriais PCIB bei HFCA tyrimai yra aktualūs ir nauji, nes auksino disbalansas kaip fenotipo nestabilumo priežastis iki šiol nebuvo aprašytas. Auksinų transporto ir akumuliacijos pokyčiai dažniausiai tiriami pasinaudojant cheminiais auksinų inhibitoriais (tiek polinio auksinų transporto blokatoriais, tiek auksino antimetabolitais) arba specifinėmis genų mutacijomis, tačiau duomenų apie vienaskilčių augalų auksinų signalinės sistemos genų funkcinę analizę praktiškai nėra (Gallavotti, 2013). Todėl savo tyrimuose nagrinėjame auksinų inhibitorių ir sintetinio auksino 2,4-D poveikį miežio pagrindinio/ektopinio žiedo ir žiedyno

struktūros variacijai bei šių medžiagų sukeltą dalinį žiedo/žiedyno fenotipo atsistatymo reiškinių.

Mūsų prielaida, kad dvigubų mutantų linijų fenotipo nestabilumas gali būti susijęs su sutrikusiu auksino metabolizmu ir/arba pasiskirstymu, remiasi dvigubų mutantų ilgų, varpučių neformuojančių varpos segmentų panašumu į vairenio ir kukurūzo auksino transporto mutantų smeigtuko (angl. *pin*) pavidalo žiedynų fenotipą (McSteen ir kt., 2007; Morita ir Kyojuka, 2007; Gallavotti, 2013). Be to, žinoma, kad vairenio *LEAFY* genas, kurio mutantų fenotipas primena miežio dvigubų *Hv-tw₂;Hd* mutantų į lapus/stiebus panašias ektopines struktūras varpose, promotoriaus regione turi auksino atsako *cis*-elementus ARF (angl. *Auxin Response Factor*) (Bai ir DeMason, 2008). Šią prielaidą patvirtina (1) po poveikio 2,4-D reikšmingai sumažėjęs ilgus ir trumpus „trūkius“ turinčių varpų dažnis, (2) 2,4-D sukelta dalinė pagrindinio žiedo struktūros normalizacija ir (3) auksino inhibitorių HFCA ir PCIB poveikis dvigubų mutantų ektopinio žiedo struktūrai. Be to, 2,4-D, HFCA ir PCIB poveikis buvo didesnis ektopinio žiedo spektro frakcijoms, kuriose išsivystę abiejų tipų reprodukciniai organai (kuokeliai ir piestelės).

Nustatyta, kad *KNOX* I klasės *BKn3* geno, kurio mutacijos sukelia *Hv-Hd* fenotipą (Müller ir kt., 1995), koduojamas baltymas sąveikauja su auksinu (Woodward ir Bartel, 2005; Tabata ir kt., 2010; Rast ir Simon, 2012) ir kartu su auksino signalinio kelio genų produktais žiedo meristemoje formuoja raidos kompleksus (modulius) (Hay ir Tsiantis, 2010). Mes iškėlėme prielaidą, kad tokių raidos modulių sutrikdymas, kaip ir ektopinių auksino koncentracijos maksimumų (Krizek, 2011) ir auksino koncentracijos gradiento (Benková ir kt., 2003; Tanaka ir kt., 2006) atsiradimas, gali lemti paveldimą miežio dvigubų mutantų žiedo/žiedyno fenotipo nestabilumą. Šią prielaidą taip pat paremia ir transgeniniuose miežiuose, ekspresuojančiuose kukurūzo *Zm-Kn1* geną (Williams-Carrier ir kt., 1997) bei kukurūzo *Zm-semaphore1* mutantuose, kuriems būdinga sutrikusi auksino ir *Kn1* geno sąveika (Scanlon ir kt., 2002), aprašyti

pleiotropinio pobūdžio reiškiniai. Be to, akuotų transformacija į ektopinius žiedo darinius pati savaime gali turėti įtakos fenotipo nestabilumui, nes akuotas yra pagrindinis varpos fotosintezės organas (Abebe ir kt., 2009), o fotosintezė yra vienas iš svarbiausių įvairiuose augalo gyvybiniuose procesuose dalyvaujančių genų reguliatorių.

Auksino inhibitorių HFCA ir PCIB sukeliama įvairaus pobūdžio fenotipo normalizacijos reiškiniai rodo, jog dvigubų mutantų fenotipo nestabilumas yra susijęs su lokalia ektopine auksino hiperakumuliacija ir naujų ektopinių auksino koncentracijos maksimumų spontaniniu susidarymu. Šią išvadą paremia ir priešingas 2,4-D poveikis normalios struktūros pagrindinio žiedo dažniui. Yra žinoma, kad auksino inhibitoriai augalams dažniausiai sukelia auksino kelio mutacijų fenokopijas (Morita ir Kyojuka, 2007; Krizek, 2011; Gallavotti, 2013), o priešingas efektas – auksino inhibitorių sukeltas mutantinio fenotipo „gelbėjimas“ (postūmis normalios raidos link) – yra gana retas reiškinys (Morita ir Kyojuka, 2007; Staldal ir kt., 2008). Dėl šios priežasties miežio homeozinių dvigubų *Hv-tw₂;Hd* mutantų fenotipo nestabilumas yra išskirtinis ir patogus modelis tolimesniems ektopinių auksino koncentracijos maksimumų susidarymo pasekmių ir galimų jo veikimo mechanizmų tyrimams plėtoti. Nustatyti auksino koncentraciją besivystančiuose žiedo organuose yra sudėtinga (Krizek, 2011), todėl miežio dvigubų *Hv-tw₂;Hd* mutantų fenotipo nestabilumo reiškinys gali pasitarnauti siekiant atskleisti žiedo organų iniciacijos zonose vykstančių procesų mechanizmus.

Specifinis 2,4-D poveikis varpos architektūrai (*Hv-tw₂* mutanto trumpiems „trūkiams“ bei dvigubų *Hv-tw₂;Hd* mutantų ilgiems „trūkiams“) ir auksino inhibitorių HFCA bei PCIB poveikis žiedams su abiejų lyčių reprodukciniais organais rodo, kad žiedo/žiedyno raidos procesų reguliavime galimai dalyvauja įvairūs raidos moduliai, kurių veikimą įtakoja konkrečiose žiedyno/žiedyno ląstelėse esantis skirtingas auksino balansas. Šie rezultatai taip pat gali paaiškinti,

kodėl skirtinguose dvigubuose mutantuose stebima didelė atskirtų fenotipiškai nestabilių požymių variacija.

Fenotipo nestabilumo sukelta variacija ypač ryškiai pasireiškė ektopiniuose žieduose. Reprodukcinį organų vystymuisi trečiajame ir ketvirtajame žiedo ratuose būtina B ir C klasių žiedo organų identiteto genų ekspresija, taigi tikėtina, jog dvigubuose miežio mutantuose vyksta B/C klasių žiedo raidos genų hiperekspresija, o toks sutrikdymas gali būti nulemtas lokalių ektopinių auksino sancaupų atsiradimo. Galiausiai, visos šios aplinkybės organų iniciacijos metu gali sukelti įvairias fenotipo variacijas. Tai, kad nestabiliai fenotipo variacijai atsirasti yra svarbios skirtingų reguliacinių modulių ir auksino atsako kelių sąveikos, rodo ir šiame darbe aprašyti auksino inhibitorių poveikio meristeminiams kaliaus ląstelėms bei žiedo struktūrai skirtumai, nustatyti tarp *WT* augalų (‘Auksiniai II’ veislės) ir *Hv-tw₂* mutanto.

Taip pat pažymėtinas ir didelis dvigubų mutantų linijų atsako į 2,4-D ir auksino inhibitorius polimorfiškumas, kuris, kaip ir 2,4-D poveikis *Hv-tw₂* mutanto ir kai kurių dvigubų mutantų trumpiems varpų „trūkiams“, reikalauja detalesnių tyrimų. Gali būti, kad minėti skirtumai tarp miežio dvigubų mutantų linijų (ypač tarp tų, kurias vienija bendra kilmė) yra nulemti dėl segregacijos atsiradusio skirtingo genetinio konteksto (fono), kadangi panaši situacija buvo aprašyta ir tiriant kukurūzo įvaisines linijas, kuriose *kn1* geno penetrantiškumas esmingai priklausė nuo genetinio fono (Vollbrecht ir kt., 2000). Daugeliu tyrimų parodyta, jog auksino veikimas augale yra pleiotropinis ir pasireiškia daugelyje augalo augimo bei vystymosi procesų (Woodward ir Bartel, 2005; Vanneste ir Friml, 2009; Sauer ir kt., 2013). Viengubų ir dvigubų mutantų turimas skirtingas genetinis fonas gali turėti įtakos pleiotropiniam auksino veikimui dėl atsitiktinai atsirandančių auksino koncentracijos nukrypimų – lokalaus ektopinio auksino nepritekliaus ar pertekliaus. Be to, parodyta, kad egzistuoja ir natūrali auksino atsako variacija tarp skirtingų tos pačios rūšies acesijų augalų (Delker ir kt., 2010; Laskowski, 2013). Genetinio fono reikšmė įrodyta ir ištyrus etileno šaltinio

etefono poveikį toms pačioms dvigubų mutantų linijoms, kaip ir auksino inhibitorių ir 2,4-D tyrimuose.

Hv-tweaky tipo mutacijų sąsają su auksino biosintezės ir/arba pasiskirstymo sutrikimu akivaizdžiai rodo ir 2,4-D indukuojamos specifinės varpų morfozės laukinio tipo augaluose, kurios yra *Hv-tweaky* tipo mutacijų fenokopijos. Kadangi nei vienas tirtas auksino inhibitorius (auksino polinio transporto inhibitorius HFCA ir auksino antagonistas PCIB) analogiško tipo morfozių *WT* augalams neindukavo, galima manyti, jog *Hv-tweaky* tipo mutacijos yra susijusios ne su auksino polinio transporto sutrikimais, o su lokalia auksino hiperakumuliacija (t.y. su intensyvesne šio fitohormono biosinteze) atskiruose varpos segmentuose. Kita vertus, tokią prielaidą iš dalies pagrindžia ir vairo auksino fiziologijos mutantų žiedo/žiedyno struktūros nukrypimai, primenantys *Hv-tweaky* tipo mutantų žiedo struktūros: viengubiems, dvigubiems ir trigubiems vairo auksino biosintezės, transporto ir signalinio kelio mutantams būdingi įvairūs žydėjimo sutrikimai, iš kurių charakteringiausi yra žiedo organų skaičiaus, išsidėstymo ir piestelės morfologijos nukrypimai (Krizek, 2011). Kai kuriuose vairo dvigubuose mutantuose buvo nustatyta ne tik žiedo organų skaičiaus/pozicijos variacija, bet ir homeozinės prigimties pokyčių (organų transformacijų), kurie rodo auksino svarbą žiedo organų identiteto genų pasireiškimui (Krizek, 2009; Krizek, 2011). Tokie žiedo organų skaičiaus pokyčiai taip pat būdingi ir visiems tirtiems *Hv-tweaky* tipo mutantams, o daliai jų (originaliems VU Botanikos ir genetikos katedroje gautiems *Hv-tweaky spike* tipo aleliniams mutantams) būdingos ir nefiksuotos lodikulių homeozės.

Dvigubų mutantų ektopinių išaugų, išsivysčiusių apatinio žiedažvynio/akuoto pereinamojoje zonoje bei ant akuotų, tyrimai leido padaryti keletą išvalgų: (1) miežio viengubų ir dvigubų mutantų varpose bei žiedo meristemose vyksta auksino persiskirstymas, kai ektopinio auksino koncentracijos maksimumo susidarymas vienoje ląstelėje-pradininkėje sukelia auksino nepriteklių gretimoje ląstelėje-pradininkėje; (2) dėl auksino persiskirstymo

skirtingose ląstelėse susidaro skirtingi genų, atsakingų už žiedo organų vystymąsi, produktų kiekiai, nulemiantys įvairios struktūros ir išsivystymo laipsnio ektopinių išaugų vystymąsi. Remiantis tyrimų metu stebėtų ektopinių išaugų morfologine įvairove, galima išskirti tokias žiedo raidos kryptis (trendus): nežymios ektopinės išaugos ant akuotų → vamzdelio pavidalo struktūros (neinvertuotoje/invertuotoje padėtyje) → įvairios į žiedus panašios struktūros → žiedai su steriliais reprodukciniais organais. Tikėtina, jog tuo pačiu metu būsimų „sparnų“ vietoje atsiranda kiti organizuojantieji centrai, lemiantys kitus raidos sutrikimus: „sparnų“ pailgėjimą → „sparnų“ transformaciją į akuotus primenančias struktūras. Įvairūs varpos vystymosi sutrikimai, įskaitant į lapus/pažiedes panašias struktūras, leidžia išskirti ir kitas raidos kryptis (trendus), taigi fenotipiškai nestabilūs miežio dvigubi mutantai yra patogi genetinė sistema genų reguliaciniams moduliams ir žiedo/žiedyno raidos dėsninumams tirti.

4.2. Galimas epigenetinių procesų vaidmuo dvigubų mutantų fenotipo nestabilumui atsirasti

Padidėjęs kai kurių mutantų kaliaus augimas po poveikio histonų deacetilazių inhibitoriumi HC toksinu bei skirtingas viengubų ir dvigubų mutantų atsakas į šį toksiną rodo, jog nestabilios fenotipo variacijos taip pat gali būti susijusios ir su epigenetiniais veiksniais. Be to, galimą epigenetinių procesų svarbą žiedo/žiedyno fenotipo variacijų atsiradimui rodo ir kai kurių diferencinio vaizdinimo metodu nustatytų cDNR fragmentų, homologiškų chromatinio pertvarkos baltymams, pakitusi raiška *Hv-tw₂* mutante, kuris yra fenotipo nestabilumo, dvigubų mutantų varpose pasireiškiančio ektopinių darinių susidarymu, paleidiklis (trigeris). Panašaus pobūdžio, tik siauresnio spektro žiedo/žiedyno fenotipo pokytis, vadinamoji žiedo/žiedyno reversija (grįžimas į ankstesnę vystymosi fazę), būdinga ir vairo dvigubiems mutantams, kuriuose iš dalies arba visiškai nuslopintas PRC2 (angl. *Polycomb repressive complex 2*)

komplekso, dalyvaujančio epigenetiniame žiedyno ir žiedo meristemų tapatumo palaikyme po žydėjimo indukcijos, funkcionavimas. Be ektopinio pažiedžių vystymosi, vairo PRC2 baltymų mutantams taip pat buvo būdingos ir kitokios vystymosi anomalijos, įskaitant įvairias žiedo organų homeozines transformacijas ir žiedo organų skaičiaus padidėjimą (Müller-Xing ir kt., 2014). Panašios raidos anomalijos (tiek žiedo/žiedyno reversijos, tiek homeozinės lodikulių transformacijos į reprodukcinis organus) yra būdingos ir mūsų tirtiems dvigubiems miežio mutantams, kurių minėtus fenotipo nukrypimus indukuoja būtent *Hv-tw₂* mutacija. Preliminarūs genų raiškos pokyčių tyrimų rezultatai parodė galimai sumažėjusią vairo *EMF1* genui homologiško N1/17 fragmento raišką *Hv-tw₂* mutante, taigi gali būti, jog *Hv-tweaky* tipo mutaciją turinčių dvigubų mutantų linijų fenotipo nestabilumas bent jau iš dalies gali būti susijęs su epigenetinių procesų sutrikimais.

Nepaisant neabejotinos Pc-G baltymų reikšmės žiedo/žiedyno reversijoms atsirasti, daugeliu atvejų reversijas sukelia mutacijos genuose, koduojančiuose MADS superšeimai priklausančius transkripcijos veiksnius (Yu ir kt., 2004; Tooke ir kt., 2005; Fornara ir kt., 2008; Liu ir kt., 2009; Wang ir kt., 2010b). Mūsų atliktos preliminarios skirtingo raiškos statuso genų paieškos metu buvo nustatytas cDNR fragmentas N39, kuris buvo homologiškas keliems anotuotos funkcijos kviečio baltymams, iš kurių labiausiai su MADS grupės transkripcijos veiksniais yra susijęs *VRN-B1* genas. Šis kviečio vernalizacijos genas yra vairo *API* ir *FUL* genų ortologas, kartu dalyvaujantis ir žiedo organų identiteto nustatyme (Distelfeld ir kt., 2009; Trevaskis, 2010; Kobayashi ir kt., 2012), o jo raiška vyksta visuose besivystančiuose žiedo organuose (Kinjo ir kt., 2012). Šio geno koduojamas baltymas jungiasi su daugiau nei puse tūkstančio genomo reguliacinių sekų, dalis kurių yra susijusios su žydėjimo indukcija, atsparumu šalčiui, varpos architektūra ir įvairių fitohormonų metabolizmu (Deng ir kt., 2015).

Pažymėtina ir stipri įvairių augalų rūšių žiedo/žiedyno reversijos priklausomybė nuo aplinkos sąlygų – temperatūros, fotoperiodizmo, drėgmės režimo (Tooke ir kt., 2005), dėl kurios natūraliomis sąlygomis gali atsirasti žiedo/žiedyno reversijų penetrantiškumo variacija (Asbe ir kt., 2015). Didelę miežio mutantų ektopinių žiedo/žiedyno struktūrų raidos priklausomybę nuo aplinkos veiksnių patvirtina ir mūsų ilgamečiai tyrimai – skirtingais metais ir netgi tais pačiais metais šiltnamio ir lauko sąlygomis atliktų tyrimų rezultatai neretai yra sunkiai sulyginami.

4.3. Etileno reikšmė *Hv-Hooded/Kap1* tipo mutacijos pasireiškimui

Nors etileno vaidmuo įvairiems augalų fiziologiniams procesams ir vystymuisi žinomas ir tiriamas jau pusantro šimto metų (Chaves ir Mello-Farias, 2006), šio fitohormono vaidmuo žiedo organogenezėje, ypač varpinių augalų, iki šiol nėra visiškai išaiškintas (Ogawa ir kt., 2007; Lin ir kt., 2009; Chandler, 2011). Šiame darbe buvo iširtas etileno poveikis skirtingais žiedo/žiedyno raidos sutrikimais pasižyminčių *Hv-Hooded/Kap1* tipo ir *Hv-tweaky spike* tipo mutantų bei hibridizacijos keliu iš jų gautų dvigubų mutantų žiedyno ir žiedo raidai.

Etileno poveikis tirtiems genotipams buvo specifiškas keliais aspektais. Visų pirma, etileno poveikis pasireiškė tik *Hv-Hooded/Kap1* fenotipo (įvairių ektopinių darinių, susidarantių apatinio žiedažvynio/akuoto pereinamojoje zonoje) modifikacijomis, nors tyrimuose naudoti viengubi ir dvigubi mutantai buvo skirtingos kilmės (turėjo skirtingą genetinį foną) ir labai skyrėsi savo fenotipu. Šiuo atžvilgiu mūsų gauti rezultatai, parodę dalinį akuoto raidos atsistatymą *Hv-Hooded/Kap1* tipo mutaciją turinčių genotipų varpose, sutampa su Osnato ir kt. (2010) gautais etileno poveikio *Hooded/Kap1.a* mutantui tyrimo rezultatais. Reikšmingo etileno poveikio lodikulių transformacijai, kuri yra būdinga *Hv-tweaky spike* tipo mutaciją turintiems genotipams, mūsų tyrimuose nebuvo nustatyta, nors kai kuriems genotipams po poveikio etileno pirmtaku

etefonu sumažėjo žiedų su pakitusiu žiedo reprodukcinių organų skaičiumi (ŽOS frakcija) dažnis.

Miežio *Hv-Hooded/Kap1 (K)* mutacijos fenotipą nulemia tandeminė 305 bp duplikacija miežio *BKn3* geno IV introne, sukelianti ektočinę šio geno hiperekspresiją, dėl kurios miežio apatinio žiedažvynio distalinėje dalyje susidaro naujos ektočinės meristemos, inicijuojančios ektočinio žiedo vystymąsi (Müller ir kt., 1995). Parodyta, jog transgeniniame tabake miežio 305 bp monomero įterpimas į geno žymeklio reguliacinius regionus indukavo šio geno raišką žiedo pamatinėje dalyje, priešingai nei geno žymeklio ir *BKn3* geno promotoriaus konstruktas, kurio raiška apsiribojo stiebo apikaline meristema (Santi ir kt., 2003). Be to, nustatyta, kad kukurūzo *Kn1* geno įterpimas į tabaką ir ryžius padidina citokinino, kuris yra etileno antagonistas, biosintezę (Kusaba ir kt., 1998; Sakamoto ir kt., 2006). Nors etileno vaidmuo tokiuose transgeniniuose augaluose nėra išaiškintas, tačiau jis yra visiškai tikėtinas, nes tokia sąsaja buvo parodyta kitose heterologinėse sistemose (tarp jų ir vairyje), kuriose *KNOX/KNAT* genų hiperekspresijos sukeltas įvairias raidos anomalijas pavyko iš dalies nuslopinti egzogeniniu etilenu (Oh ir kt., 1997; Hamant ir kt., 2002; Chow ir McCourt 2004; Souček ir kt., 2007). Be to, miežio *BKn3* geno IV intronas yra tiesiogiai susijęs su etileno atsaku, nes jame yra trys *cis*-elementai, sąveikaujantys su etileno valdomais baltymais (Osnato ir kt., 2010). Dar vieno IV introne esančio *cis*-elemento, turinčio (GA)₈ pasikartojimą, su kuriuo sąveikauja BBR (angl. *Barley B Recombinant*) baltymas, hiperekspresija heterologinėje tabako sistemoje sukelia lapų morfologijos pakitimus (Santi ir kt., 2003). Neseniai parodyta, kad vairo GBP (angl. *GAGA Binding Protein*) baltymai, atpažįstantys GA pasikartojimų turinčius *cis*-elementus, tiesiogiai sąveikauja su *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* genu, kuris yra miežio *BKn3* geno ortologas ir dalyvauja vairo apikalinės meristemos palaikyme bei skatina citokininų biosintezę (Simonini ir Kater, 2014). Šių procesų reguliacijoje etilenas taip pat gali vaidinti svarbų vaidmenį, kadangi

KNOX/KNAT genams būdinga sinergistinė sąveika su citokininiu bei antagonistinė sąveika su etilenu (Hamant ir kt., 2002).

Be to, daugelis miglinių šeimos augalų *KNOX* I klasės genų turi didelį kelių kilobazių ilgio introną, kuris yra miežio *BKn3* geno IV introno ortologas ir turi reguliacinių *cis*-elementų, užtikrinančių audiniams specifinę šių genų raišką, tačiau parodyta, kad mutacijos kviečio *WKnox1* geno didžiajame introne nesukelia tokių ryškių fenotipo pokyčių, kaip miežio *BKn3* geno IV introne įvykusi duplikacija (Takumi ir kt., 2000; Morimoto ir kt., 2005). Be to, miežio *BKn3* geno ortologų hiperekspresija transgeniniuose kukurūzuose, ryžiuose ir kviečiuose taip pat lemia kitokį nei miežio *Hv-Hooded/Kap1* mutantinį fenotipą (Sinha ir kt., 1993; Sentoku ir kt., 2000). *Hv-Hd* tipo mutacija buvo nustatyta ir kvietyje, o geno, lemiančio šį kviečio fenotipą, homologija su miežio *BKn3* genu siekia 96% (Takumi ir kt., 2000), nors šio požymio ekspresyvumas kviečiuose yra ženkliai mažesnis nei miežiuose, ir primena transgeniniuose miežiuose ekspresuojamo kukurūzo *Kn1* geno sukiamą *Hv-Hooded/Kap1* fenotipą (Williams-Carrier ir kt., 1997). Be to, parodyta, kad transgeninio tabako, transformuoto *35S::bkn3* konstruktu, lapų paviršiuje susidaro į ūglius ir žiedynus panašūs dariniai (Lin ir Müller, 2002; Müller ir kt., 2006), primenantys ektopines į lapus/stiebus panašias struktūras, susidarančias miežio dvigubų *Hv-tw2;Hd* mutantų varpose.

Nustatyta, kad *KNOX/KNAT* genų, įskaitant ir *BKn3* geną, hiperekspresija sukelia naujų audinius formuojančių organizacinių centrų atsiradimą, kuriuose gali vykti ląstelių dalinimosi ir augimo pokyčių, atspindinčių *KNOX* raidos modulių persiskirstymą priklausomai nuo naujo konteksto (Hay ir Tsiantis, 2010). Nevienodos *KNOX/KNAT* genų hiperekspresijos arba nuslopavimo pasekmės skirtingose augalų rūšyse ir netgi skirtinguose genotipuose, gali būti siejamos su skirtingais įvairių *KNOX/KNAT* genų taikiniai, skirtingu *KNOX* genų raiškos pobūdžiu ir skirtingais „pasroviui“ veikiančiais genais (Scanlon ir kt., 2002). Pastarasis faktas gali paaiškinti skirtingą etefono poveikį viengubiems *Hv-*

Hooded/Kap1.a (Colsess II) (*Hv-H*), *Hv-Lemma hooded* (*Hv-Lh*) mutantams ir bendros kilmės dvigubų *Hv-tw₂;Hd* mutantų linijoms.

Nors dviejų reguliacinių *BKn3* geno regionų sekvenavimo rezultatai parodė, jog visi tyrimuose naudoti viengubi ir dvigubi mutantai turi *BKn3* IIIc (*K*) tipo alelį, tyrimų metu buvo nustatyti akivaizdūs *Hv-Hooded/Kap1* mutacijos pasireiškimo skirtumai tarp etefonu neveiktų skirtingų *Hv-Hd* tipo mutantų bei tarp skirtingų tos pačios kilmės (iš tos pačios kryžminimo kombinacijos kilusių) dvigubų mutantų linijų. Vienodesnis egzogeninio etileno poveikis buvo nustatytas tik *Hv-Lh* mutantui ir iš jo kilusioms dvigubų *Hv-tw₂;Lh* mutantų linijoms, kurioms etilenas sukėlė reikšmingą akuotą turinčių žiedų dažnio padidėjimą. Kitų tirtų genotipų – *Hv-H* mutanto ir iš jo kilusios dvigubo *Hv-tw₂;H* mutanto linijos N6 akuoto raidai etefono poveikis buvo nežymus. Radikalius skirtingų *Hv-Hd* tipo *Hv-H* ir *Hv-Lh* mutantų fenotipo skirtumus galima paaiškinti ne tik skirtingu šių genotipų genetiniu fonu, bet ir galimais *BKn3* geno sekos polimorfizmais mūsų netirtose šio geno srityse.

Dideli *Hv-Hd* mutaciją turinčių viengubų ir dvigubų mutantų fenotipo skirtumai taip pat gali atsirasti ir dėl genų modifikatorių veikimo. Nustatyta, kad miežio *BKn3* genas gali sąveikauti su kitais TALE superšeimos genais (Müller ir kt., 2001), be to, mutagenezės būdu buvo indukuoti ir identifikuoti bent penki genų supresorių lokusai, galintys slopinti *Hv-Hooded/Kap1* mutacijos pasireiškimą (Roig ir kt., 2004). Įdomu, kad bent du iš šių genų supresorių sąveikauja su *BKn3* genui nealeliniu mutantiniu *lks2* genu, lemiančiu miežio trumpų akuotų vystymąsi, o šios sąveikos rezultatas yra silpnas arba itin silpnas *Hv-Hooded/Kap1* fenotipai, labai panašūs į dvigubo *Hv-tw₂;H* mutanto linijos N21 fenotipą. Be to, diferencinio vaizdinimo metodu *Hv-tw₂* mutante mums pavyko nustatyti padidėjusią *Lks2* genui homologiško cDNR fragmento N41 raišką. Galiausiai, Roig ir kt. (2004) atlikti tyrimai atskleidė, jog kai kuriems *Hv-Hooded/Kap1* genų supresorių *suK* mutantams taip pat buvo būdingas fenotipo

nestabilumas, primenantis miežio dvigubiems *Hv-tw₂;Hd* mutantams būdingą fenotipo variaciją.

Epigenetiniai ir potranskripciniame lygmenyje veikiantys veiksniai taip pat gali būti susiję su skirtingu etileno poveikiu tirtiems genotipams. Neseniai buvo nustatyta, kad etileno biosintezės kontrolėje dalyvauja savita miRNR (Kruszka ir kt., 2014).

Etileno poveikis miežio viengubiems ir dvigubiems mutantams pasireiškė keliais lygmenimis: egzogeninis etilenas padidino kai kurių genotipų akuotus turinčių žiedų dažnį, kita vertus, etilenas darė poveikį kai kurių genotipų reprodukcinį organų vystymuisi ektopiniuose žieduose. Pastarąjį etileno poveikį pavyko aptikti tik į tyrimą įtraukus skirtingus viengubus ir dvigubus *Hv-Hooded/Kap1* tipo mutantus. Kaip minėta, etileno sukeltas dalinis akuotų raidos atsistatymas buvo nustatytas tik *Hv-Lh* mutantui ir iš jo kilusioms dvigubų mutantų linijoms, tačiau nebuvo nustatytas *Hv-H* mutantui, kurį etileno poveikio tyrimams naudojo ir Osnato ir kt. (2010). Priešingai nei *Hv-Lh* mutanto ir iš jo kilusių dvigubų *Hv-tw₂;Lh* mutantų akuotų raidai, etileno poveikis ektopinių žiedų reprodukcinį organų vystymuisi buvo akivaizdus ne tik *Hv-H* mutantui ir iš jo kilusiai dvigubo *Hv-tw₂;H* mutanto linijai N6, kuriai būdingas reprodukcinį organų vystymasis ir be etileno poveikio, bet ir dvigubo *Hv-tw₂;Lh* mutanto linijai N11 (+), kurioje ektopiniai žiedai su reprodukciniais organais yra reti arba, priklausomai nuo ekologinių sąlygų, iš viso nesusidaro.

Apibendrinant, *Hv-Hooded/Kap1* tipo mutacijos pasireiškimas yra tiesiogiai susijęs su etileno atsaku, tačiau šios sąveikos mechanizmas nėra visiškai išaiškintas ir gali būti susijęs su (1) *BKn3* geno ir kitų *KNOX* šeimos bei jai nepriklausančių genų sąveikomis, susidarant naujiems reguliaciniams raidos moduliams (Hay ir Tsiantis, 2010), (2) etileno ir citokinino bei kitų fitohormonų sąveikomis (Hay ir Tsiantis, 2010; Bolduc ir kt., 2012; Guan ir kt., 2013), (3) autoreguliaciniais, dažniausiai intronuose esančiais *cis*-elementais (Tsuda ir kt., 2011) arba (4) epigenetiniais veiksniais (Kruszka ir kt., 2014). Lyginant dviejų

Hv-Hd mutantų, kurių fenotipui *Hv-Hooded/Kap1* mutacijos pasekmės labai skiriasi, tyrimų rezultatus galima daryti prielaidą, kad šių mutantų etileno atsake galimai dalyvauja genai, reguliuojantys mutantinio *BKn3* geno raišką. Šiuo metu yra nustatyta keletas *BKn3* geno raišką reguliuojančių genų (Müller ir kt., 2001; Santi ir kt., 2003; Roig ir kt., 2004; Kuijt ir kt., 2014). Dalinė etileno sukelta fenotipo normalizacija ir labai skirtingas tirtų genotipų jautrumas egzogeninio etileno poveikiui bent jau iš dalies galėtų būti aiškinami modifikuojančių veiksnių ir susidarančių reguliacinių raidos modulių skirtumais mūsų tirtuose viengubuose ir dvigubuose miežio mutantuose.

IŠVADOS

1. Ištyrus vasarinio miežio (*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* L.) mutantų ektopinių į žiedą panašių darinių pokyčius, galima išskirti tokią žiedo raidos kryptį (trendą): nežymios ektopinės išaugos ant akuotų → vamzdelio pavidalo struktūros (neinvertuotos/invertuotos padėties) → žiedai su steriliais reprodukciniiais organais.
2. Nustatyta didelė viengubų ir dvigubų mutantų įvairovė pagal kaliaus augimo indeksą (GI). Viengubų mutantų GI buvo mažesnis nei *wt*, o kai kurių dvigubų mutantų GI lenkė jų tėvinių mutantų GI. Dideli kaliaus augimo skirtumai nustatyti ir pagal reakciją į 2,4-D, auksino inhibitorius ir HC toksiną.
3. Visi VU Botanikos sodo kolekcijoje saugomi *Hv-Hooded/Kap1* tipo mutantai (iš viso 14) ir visos dvigubų *Hv-tw₂;Hd* mutantų linijos pagal tirtus žymenis turi vienodą *BKn3* geno IIIc tipo alelį.
4. Sintetinis auksinas 2,4-dichlorfenoksiacto rūgštis (2,4-D) laukinio tipo augalams sukėlė nedidelius žiedo organų skaičiaus pokyčius ir varpos morfozes, kurios yra *Hv-tweaky* mutacijų fenokopijos. Be to, po poveikio 2,4-D sumažėjo trumpų varpos trūkių *Hv-tw₂* mutanto varpose. Tai leidžia susieti *Hv-tweaky* tipo mutantams būdingą fenotipą su auksino kelio pokyčiais.
5. 2,4-D sumažino kai kurių dvigubų mutantų linijų normalios struktūros pagrindinių žiedų dažnį ir indukavo pagrindinio žiedo kuokelių transformaciją į chimerinius organus. Auksino inhibitorių HFCA ir PCIB poveikis buvo priešingas, abu inhibitoriai padidino dvigubo *Hv-tw₂;Lh* mutanto linijų normalios struktūros pagrindinio žiedo dažnį.
6. Kai kurių dvigubų mutantų linijose 2,4-D paskatino pilnos struktūros ektopinio žiedo raidą, o auksino inhibitoriai PCIB ir HFCA, atvirkščiai, kai kurių genotipų pilnos struktūros ektopinių žiedų dažnį sumažino.
7. Dvigubų mutantų fenotipo nestabilumas irgi iš dalies susijęs su auksino funkcijos sutrikimais, nes 2,4-D ir auksino inhibitoriai HFCA ir PCIB

pastebimai modifikavo dvigubų *Hv-tw₂;Hd* mutantų pagrindinių bei ektopinių žiedų sandarą.

8. Etefono poveikis daugiau pasireiškė ektopinėms žiedo struktūroms: beveik visiems tirtiems viengubiems ir dvigubiems mutantams etefonas padidino žiedų, kuriems išsivysto akuotas/akuotėlis, dažnį, tačiau lodikulių transformacijai įtakos neturėjo. Kai kurioms dvigubų mutantų linijoms (dažniausiai *Hv-tw₂;Lh*) etefonas padidino žiedų su reprodukcinių organų skaičiaus variacijomis dažnį.
9. Ištyrus didesnę skaičių dvigubų mutantų, gautų kryžminant ne tik *Hv-tw₂* su *Hv-Hd*, bet ir *Hv-tw* su kitais mutantais (*Hv-lax-a*, *Hv-tw No.18* ir *Hv-twmk*) nustatyta, kad paveldimo nestabilumo paleidikliai (trigeriai) yra mutantiniai *Hv-tw* arba *Hv-tw₂* aleliai.
10. Diferencinio vaizdinimo metodu *Hv-tw₂* mutante preliminariai nustatyti keli pakitusios raiškos cDNR fragmentai, galimai susiję su *Hv-tw₂;Hd* dvigubų mutantų žiedo/žiedyno reversija ir fenotipo nestabilumu. Tai fragmentas N1/17, homologiškas vairo chromatinio pertvarkos *EMF1* genui ir fragmentai, homologiški genams, koduojantiems transkripcijos veiksnius: fragmentas N39, homologiškas kviečio *VRN-B1* genui bei fragmentas N41, homologiškas miežio *Lks2* genui ir *Vrs1;Hox1* lokusui.

MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

Moksliniai straipsniai leidiniuose, turinčiuose citavimo indeksą ir referuojamuose Mokslinės informacijos instituto duomenų bazėje *ISI Web of Science*:

1. **Šiukšta R**, V, Kaselytė G, Okockytė V, Žukauskaitė J, Žvingila D, Rančelis V. 2015. Inherited phenotype instability of inflorescence and floral organ development in homeotic barley double mutants and its specific modification by auxin inhibitors and 2,4-D. *Annals of Botany* 115(4): 651–663.
2. Žvingila D, Vaitkūnienė V, Patamsytė J, Leistrumaitė A, Staniūtė M, Balčiūnienė L, Čėsniienė T, Kleizaitė V, **Šiukšta R**, Rančelis V. 2012. DNA polymorphism and agronomic traits of revertants from barley (*Hordeum vulgare* L.) mutant *tw*. *Žemdirbystė=Agriculture* 99(2): 139–148.

Moksliniai straipsniai ISI aplinkos žurnaluose:

1. **Siuksta R**, Vaitkuniene V, Rancelis V, Zvingila D, Cesniene T, Kleizaite V, Zukauskaite J, Balciuniene L. 2012. Barley homeotic mutants and their hybrids for ornamental purposes. *Acta Horticulturae* 953: 337–343.

Moksliniai straipsniai kituose recenzuojamuose periodiniuose užsienio ir Lietuvos žurnaluose:

1. **Šiukšta R**, Balčiūnienė L, Vaitkūnienė V, Čėsniienė T, Žvingila D, Rančelis V. 2008. Attempts to create the genetic diversity of barley by reversions. *Biotechnology, Bucharest, Romania. Special volume*, p. 13–19.

2. Vaitkūnienė V, Drumstienė A, Balčiūnienė L, Šiukšta R, Mačkinitė R, Leistrumaitė A, Rančelis V. 2008. Attempts to improve the resistance of plant material by treatment with salicylic and *trans*-cinnamic acids using barley *tw* mutants as a model. Modern Variety Breeding for Present and Future Needs: Proceedings of 18th EUCARPIA General Congress, Eds. J. Prohens & M. L. Badenes, Editorial Universidad politecnica de Valencia, Spain, p. 485–489.
3. Šiukšta R, Okockytė V, Žukauskaitė J, Vaitkūnienė V, Rančelis V. 2014. Homeozinių miežių dihibridų žiedo ir žiedyno fenotipinio nestabilumo ir jo modifikacijos epigenetinių procesų inhibitoriais tyrimai. Mokslas Gamtos mokslų fakultete. Vilnius: Vilniaus universiteto leidykla, p. 62–73.

Konferencijų pranešimų tezės:

1. Kaselytė G, Okockytė V, Šiukšta R, Vaitkūnienė V. 2014. The impact of auxin and auxin inhibitors on barley homeotic mutants and their hybrids. 8th International scientific conference “The Vital Nature Sign”, Kaunas, Lithuania. Abstract book, p. 53.
2. Šiukšta R, Vaitkūnienė V, Žukauskaitė J, Fiodorovas I, Rančelis V. 2012. Flower structure of barley hybrids between *tweaky spike* and *Hooded*-type mutants depends on the peculiarities of spike morphology. 5th Baltic Congress of Genetics, October 19–22, Kaunas, Lithuania. Abstract book, p. 61–62.
3. Šiukšta R, Vaitkūnienė V, Rančelis V, Žvingila D, Čėsniienė T, Kleizaitė V, Žukauskaitė J. 2012. Barley homeotic mutants and their hybrids for ornamental purposes. 24th International EUCARPIA Symposium – Section Ornamentals “Ornamental Breeding Worldwide”. Abstract book, p. 128.

4. **Siuksta R**, Vaitkuniene V, Patamsyte J, Cesniene T, Zvingila D, Rancelis V. 2011. DNA demethylating agent 5-azacytosine affects spike and flower development in barley. 3rd Workshop on TritiGen COST Action FA0604: Triticeae Genomics for The Advancement of Essential european Crops, Istanbul, Turkey. Abstract book, p. 30.
5. Žvingila D, Vaitkūnienė V, Denkovskij J, Patamsytė J, Čėsniėnė T, Kleizaitė V, Balčiūnienė L, **Šiukšta R**, Rančelis V. 2011. Genotyping of barley genetic lines by RAPD and ISSR methods. Advances in plant biotechnology in Baltic sea region: international scientific conference, Kaunas, Lithuania. Abstract book, p. 76–77.

Dalyvavimas tarptautinėse mokslo konferencijose:

8th International scientific conference “The Vital Nature Sign”. 2014. May 15–17, Kaunas, Lithuania.

5th Baltic Congress of Genetics. 2012. October 19–22, Kaunas, Lithuania

24th International EUCARPIA Symposium, Section Ornamentals “Ornamental Breeding Worldwide”. 2012. September 2–5, Warsaw, Poland.

3rd Workshop on TritiGen COST Action FA0604: Triticeae Genomics for The Advancement of Essential european Crops. 2011. May 3–7, Istanbul, Turkey.

Advances in Plant Biotechnology in Baltic Sea Region. 2011. March 30–31, Kaunas, Lithuania.

PADĖKA

Wir haben die Kunst, damit wir nicht an der Wahrheit zugrunde gehen
Friedrich Nietzsche

Prie šios disertacijos atsiradimo, kaip ir prie visų didelių darbų, paliekančių pėdsaką gyvenime, tiesiogiai ar netiesiogiai yra prisidėjęs didelis būrys žmonių, be kurių šis kūrinys iš viso nebūtų atsiradęs arba jo gimimas būtų buvęs gerokai sudėtingesnis.

Pirmiausiai norėčiau labai padėkoti savo moksliniam vadovui prof. habil. dr. Vytautui Rančeliui už tai, kad suteikė man galimybę savarankiškai plėtoti eksperimentus, laisvai keliauti savo paties klaidų ir bandymų keliu bei visą laiką buvo aukščiausio moralumo mokslu pavyzdys. Ačiū už Jūsų išmintį ir ilgas diskusijas bei taiklias įžvalgas, suteikusias daug peno pamąstymams. Taip pat dėkoju savo moksliniam konsultantui prof. dr. (HP) Donatui Žvingilai už vertingus patarimus, diskusijas, pastabas ir paskatinimą nebijoti keliauti dar nepramintais keliais. Esu dėkingas ir dr. Virginijai Vaitkūnienei, sukūrusiai ir kasmet Vilniaus universiteto Botanikos sode kantriai puoselėjančiai šios disertacijos darbo objektą – unikalią miežio mutantų kolekciją.

Taip pat noriu padėkoti savo kolegei ir gerai draugei dr. Eglei Čėsnienei už puikius šeštadienių vakarus, praleistus klausantis Vagnerio, Pučinio ir kitų Didžiųjų kūrėjų operų bei parodžiusiai, kad Mokslas ir Menas gali subtiliai papildyti vienas kitą, sudarydami komplikuoatą, tačiau darnią sąjungą. Dėkoju ir kolegei dr. Violetai Kleizaitei, savo humoro jausmu visą laiką kūrusiai ir tebekuriančiai nepakartojamą atmosferą darbe. Ačiū Jums už paskatinančius žodžius, išklausymą ir supratimą tada, kai to labiausiai reikėjo.

Esu dėkingas savo kolegoms dr. Jolantai Patamsytei ir dr. Donatui Naugžemiui už vertingus metodinius patarimus ir pagalbą sprendžiant laboratorijoje išskylančias problemas. Taip pat dėkoju savo kolegei Nijolei

Gudavičienei, doktorantėms Virginijai Tunaitienei ir Jurgitai Butkuvienei, o taip pat visam Botanikos ir genetikos katedros kolektyvui bei VU Botanikos sodo kolegoms už palaikymą ir visokeriopą pagalbą doktorantūros studijų metu. Taip pat esu dėkingas disertacijos recenzentėms prof. habil. dr. Izoldai Pašakinskienei ir dr. Sigitai Jurkonienei už atliktą išsamią šio darbo analizę, konstruktyvią kritiką ir vertingus patarimus.

Noriu padėkoti ir savo ilgamečiams draugams Mildai, Tomui, Ingridai U, Ingridai D ir Mariui, kurie buvo rafinuotas ir nepamainomas daugiau nei dešimtį metų tebesitęsiančio akademinio kelio prieskonis. Ačiū, kad buvote ir esate.

Galiausiai, esu labai dėkingas savo mamai ir sesei, kurios tikėjo, palaikė ir džiaugėsi mano pasiekimais net ir tada, kai pats nebūdavau dėl jų tikras.

Ačiū Jums visiems.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abebe T, Wise RP, Skadsen SW. 2009. Comparative transcriptional profiling established the awn as the major photosynthetic organ of the barley spike while the lemma and the palea primarily protect the seed. *Plant Genome* 2: 247–259.
2. Achard P, Baghour M, Chapple A, Hedden P, Van Der Straeten D, Genschik P, Moritz T, Harberd NP. 2007. The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem-identity genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 104(15): 6484–6489.
3. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3): 403–410.
4. Ambrose BA, Lerner DR, Ciceri P, Padilla CM, Yanofsky MF, Schmidt RJ. 2000. Molecular and genetic analyses of the *Silky1* gene reveal conservation in floral organ specification between eudicots and monocots. *Molecular Cell* 5: 569–579.
5. Anzola JM, Sieberer T, Ortbauer M, Butt H, Korbei B, Weinhofer I, Müllner AE, Luschnig C. 2010. Putative *Arabidopsis* transcriptional adaptor protein (PROPORZ1) is required to modulate histone acetylation in response to auxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 10308–10313.
6. Arnholdt-Schmitt B. 1993. Rapid changes in amplification and methylation pattern of genomic DNA in cultured carrot root explants (*Daucus carota* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 85: 793–800.
7. Asbe A, Matsushita SC, Gordon S, Kirkpatrick HE, Madlung A. 2015. Floral reversion in *Arabidopsis suecica* is correlated with the onset of flowering and meristem transitioning. *PLoS One* 10(5):e0127897. doi: 10.1371/journal.pone.0127897.
8. Babb S, Muehlbauer GJ. 2003. Genetic and morphological characterization of the barley *uniculm2* (*cul2*) mutant. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 846–857.
9. Badr A, Müller K, Schäfer-Pregl R, El Rabey H, Effgen S, Ibrahim HH, Pozzi C, Rohde W, Salamini F. 2000. On the origin and domestication history of barley (*Hordeum vulgare*). *Molecular Biology and Evolution* 17(4): 499–510.
10. Bai F, DeMason DA. 2008. Hormone interactions and regulation of PsPK2::GUS compared with DR5::GUS and PID::GUS in *Arabidopsis thaliana*. *American Journal of Botany* 95: 133–145.
11. Bainbridge K, Guyomarc'h S, Bayer E, Swarup R, Bennet M, Mandel T, Kuhlemeier C. 2008. Auxin influx carriers stabilize phyllotactic patterning. *Genes and Development* 22: 810–823.
12. Balčiūnienė L, Bieliūnienė A, Kazlauskaitė D, Vaitkūnienė V, Žvingila D, Popendikytė V, Rančelis V. 2000. Quantitative of induced barley mutants. 3. Differences in DNA polymorphism and ear structure gradient. *Biologija* 4: 16–21.
13. Balčiūnienė L. 1987. Osobennosti izmenčivosti količestvennykh i morfobiologičeskykh mutantov ječmenia [Biologijos mokslų kandidato disertacija]. Minsk: Institut genet. i citol.
14. Balčiūnienė L. 2001. Įvairių miežių grupių kiekybiniai požymiai. Vilniaus universiteto Botanikos sodas amžių sandūroje: 19–22.

15. Banerjee J, Maiti MK. 2010. Functional role of rice germin-like protein1 in regulation of plant height and disease resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 394(1): 178–183.
16. Banowitz GM. 1993. The effects of ethephon seed treatment on leaf development and head initiation in wheat. *Field Crops Research* 34(1): 113–120.
17. Barkoulas M, Hay A, Kougioumoutzi E, Tsiantis M. 2008. A developmental framework for dissected leaf formation in the *Arabidopsis* relative *Cardamine hirsuta*. *Nature genetics* 40: 1136–1141.
18. Bateson W. 1894. *Materials for the Study of Variation*. Macmillan, New York.
19. Ben-David S, Yaakov B, Kashkush K. 2013. Genome-wide analysis of short interspersed nuclear elements SINES revealed high sequence conservation, gene association and retrotranspositional activity in wheat. *The Plant Journal* 76(2): 201–210.
20. Benbouza H, Jacquemin JM, Baudoin JP and Mergeai G. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 10: 77–81.
21. Benkova E, Ivanchenko MG, Friml J, Shishkova S, Dubrovsky JG. 2009. A morphogenetic trigger: is there an emerging concept in plant developmental biology? *Trends in Plant Sciences* 14: 189–193.
22. Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens G, Friml J. 2003. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115: 591–602.
23. Bennett SRM, Alvarez J, Bossinger G, Smyth DR. 1995. Morphogenesis in pinoid mutants of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 8: 505–520.
24. Bertolino E, Reimund B, Wildt-Perinic D, Clerc RG. 1995. A novel homeobox protein which recognizes a TGT core and functionally interferes with a retinoid-responsive motif. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 31178–31188.
25. Beßer K, Jarosch B, Langen G, Kogel KH. 2000. Expression analysis of genes induced in barley after chemical activation reveals distinct disease resistance pathways. *Molecular Plant Pathology* 1(5): 277–286.
26. Biddle E, Douglas G. S. Kerfoot DGS, Kho YH, Russell KE. 1976. Kinetic studies of the thermal decomposition of 2-chloroethylphosphonic acid in aqueous solution. *Plant Physiology* 58(5): 700–702.
27. Bieliūnienė A, Rančelis V. 1996. Distribution of SCA in chromosomes of genetically unstable barley mutant *tw* and its revertants. *Biologija* 3: 27–30.
28. Bieliūnienė A, Švėgždienė D, Rančelis V. 2003. A peculiar structure of the flower in the homeotic barley mutant *tweaky spike*. *Biologija* 1: 25–28.
29. Bieliūnienė A. 2001. Pecularity development of ear in barley mutant *tweaky spike*. *Biologija* 1: 47–49.
30. Bieliūnienė A. 1993. Genetiškai nestabilaus miežių mutanto *tw* ir jo revertantų chromosomų stabilumo tyrimai [Biologijos mokslų kandidato disertacija]. Vilnius: Vilniaus universitetas.
31. Bivilienė A. Lietuvos augalų nacionaliniai genetiniai išteklių. Lietuvoje sukurtos javų veislės, jų genetinis potencialas. Vilnius: Akademija; 2011.

32. Boyko A, Kathiria P, Zemp FJ, Yao Y, Pogribny I, Kovalchuk I. 2007. Transgenerational changes in the genome stability and methylation in pathogen-infected plants. *Nucleic Acids Research* 35(5): 1714–1725.
33. Boyko A, Kovalchuk I. 2011. Genome instability and epigenetic modification – heritable responses to environmental stress? *Current Opinion in Plant Biology* 14(3): 260–266.
34. Bolduc N, Yilmaz A, Mejia-Guerra MK, Morohashi K, O'Connor D, Grotewold E, Hake S. 2012. Unraveling the KNOTTED1 regulatory network in maize meristems. *Genes & Development* 26(15): 1685–1690.
35. Bonnett OT. 1966. Inflorescences of maize, wheat, rye, barley, and oats: their initiation and development. University of Illinois, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station. Bulletin 721.
36. Bürglin TR. 1997. Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Research* 25: 4173–4180.
37. Bürglin TR. 1998. The PBC domain contains a MEINOX domain: coevolution of Hox and TALE homeobox genes? *Development Genes and Evolution* 208: 113–116.
38. Calonje M, Sanchez R, Chen L, Sung RZ. 2008. *EMBRYONIC FLOWER1* participates in polycomb group-mediated *AG* gene silencing in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20: 277–291.
39. Chandler JW. 2011. The hormonal regulation of flower development. *Journal of Plant Growth Regulation* 30: 242–254.
40. Chaves ALS, Mello-Farias PC. 2006. Ethylene and fruit ripening: from illumination gas to the control of gene expression, more than a century of discoveries. *Genetics and Molecular Biology* 29(3): 508–515.
41. Chen XY, Kim JY. 2009. Callose synthesis in higher plants. *Plant Signaling & Behavior* 4(6): 489–492.
42. Cheng Y, Dai X, Zhao Y. 2006. Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenase controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes and Development* 20: 1790–1799.
43. Cheng Y, Zhao Y. 2007. A role for auxin in flower development. *Journal of Integrative Plant Biology* 49: 99–104.
44. Chow B, McCourt P. 2004. Hormone signalling from a developmental context. *Journal of Experimental Botany* 55(395): 247–251.
45. Christensen AR, Malcomber ST. 2012. Duplication and diversification of the LEAFY HULL STERILE1 and *Oryza sativa* MADS5 SEPALLATA lineages in graminoid Poales. *EvoDevo* 3: 4.
46. Chung YY, Kim SR, Kang HG, Noh YS, Park MC, Finkel D, An G. 1995. Characterization of two rice MADS box genes homologous to *GLOBOSA*. *Plant Science* 109: 45–56.
47. Ciaffi M, Paolacci AR, Tanzarella OA, Porceddu E. 2011. Molecular aspects of flower development in grasses. *Sexual Plant Reproduction* 24: 247–282.
48. Crisosto CH, Lombard PB, Fuchigami LH. 1989. Fall ethephon delays bloom in 'Redhaven' peach by delaying flower differentiation and development during dormancy. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 114(6): 881–884.

49. Curaba J, Talbot M, Li Z, Helliwell Ch. 2013. Over-expression of microRNA171 affects phase transitions and floral meristem determinacy in barley. *BMC Plant Biology* 13: 6.
50. Delker C, Pöschl Y, Raschke A, Ullrich K, Ettingshausen S, Hauptmann V, Quint M. 2010. Natural variation of transcriptional auxin response networks in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 22: 2184–2200.
51. Deng W, Casao CM, Wang P, Sato K, Hayes PM, Finnegan EJ, Trevaskis B. 2015. Direct links between the vernalization response and other key traits of cereal crops. *Nature Communications* 6. doi: 10.1038/ncomms6882.
52. Derkacheva M, Hennig L. 2014. Variations on a theme: Polycomb group proteins in plants. *Journal of Experimental Botany* 65(10): 2769–2784.
53. Derscheid LA, Stahler LM, Kratochvil DE. 1952. Differential responses of barley varieties to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Agronomy Journal* 44: 182–188.
54. Derscheid LA. 1952. Physiological and morphological responses of barley to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant Physiology* 27(1): 121–134.
55. Distelfeld A, Li C, Dubcovsky J. 2009. Regulation of flowering in temperate cereals. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 178–184.
56. Dreni L, Pilatone A, Yun D, Erreni S, Pajoro A, Caporali E, Zhang D, Kater MM. 2011. Functional analysis of all AGAMOUS subfamily members in rice reveals their roles in reproductive organ identity determination and meristem determinacy. *The Plant Cell* 23: 2850–2863.
57. Duan Y, Wu W, Liu H, Zhang D, Zhou Y, Pan R. 2003. Genetic analysis and gene mapping of *leafy head* (*lhd*), a mutant blocking the differentiation of rachis branches in rice (*Oryza sativa* L.). *Chinese Science Bulletin* 48: 2201–2205.
58. Duan K, Yi K, Dang L, Huang H, Wu W, Wu P. 2008. Characterization of a subfamily of *Arabidopsis* genes with the SPX domain reveals their diverse functions in plant tolerance to phosphorus starvation. *The Plant Journal* 54: 965–997.
59. Fawcett JA, Kawahara T, Watanabe H, Yasui Y. 2006. A SINE family widely distributed in the plant kingdom and its evolutionary history. *Plant Molecular Biology* 61(3):505–514.
60. Fernández-Otero C, Matilla AJ, Rasori A, Ramina A, Bonghi C. 2006. Regulation of ethylene biosynthesis in reproductive organs of damson plum (*Prunus domestica* L. subsp. *Syriaca*). *Plant Science* 171(1): 74–83.
61. Ferrandiz C, Gu Q, Martienssen R, Yanofsky MF. 2000. Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by *FRUITFULL*, *APETALA1* and *CAULIFLOWER*. *Development* 127: 725–734.
62. Ferrario S, Immink RGH, Shchennikova A, Busscher-Lange J, Angenent GC. 2003. The MADS box gene *FBP2* is required for *SEPALLATA* function in *Petunia*. *The Plant Cell* 15: 914–925.
63. Fornara F, Gregis V, Pelucchi N, Colombo L, Kater M. 2008. The rice *StMADS11-like* genes *OsMADS22* and *OsMADS47* cause floral reversions in *Arabidopsis* without complementing the *svp* and *agl24* mutants. *Journal of Experimental Botany* 59: 2181–2190.
64. Forster BP, Franckowiak JD, Lundqvist U, Lyon J, Pitkethly I, Thomas WTB. 2007. The barley phytomer. *Annals of Botany* 100(4): 725–733.

65. Fukaki H, Taniguchi N, Tasaka M. 2006. PICKLE is required for SOLITARY-ROOT/IAA14-mediated repression of ARF7 and ARF19 activity during *Arabidopsis* lateral root initiation. *The Plant Journal* 48: 380–389.
66. Gallavotti A. 2013. The role of auxin in shaping shoot architecture. *Journal of Experimental Botany* 64: 2593–2608.
67. Garrod A. 1902. The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality. *Lancet* 160(4137): 1616–1620.
68. Gehring WJ, Hiromi Y. 1986. Homeotic genes and the homeobox. *Annual Review of Genetics* 20: 147–173.
69. Gehring WJ. 1998. Master control genes in the development and evolution: the homeobox story. Yale University press, New Haven, London.
70. Ghareeb H, Becker A, Iven T, Feussner I, Schirawski J. 2011. *Sporisorium reilianum* infection changes inflorescence and branching architectures of maize. *Plant Physiology* 156: 2037–2052.
71. Ghazvini H, Tekauz A. 2012. Molecular diversity in the barley pathogen *Bipolaris sorokiniana* (*Cochliobolus sativus*). *Australasian Plant Pathology* 41: 283–293.
72. Goethe JW. 1790. *The Metamorphosis of Plants*. The MIT Press, Cambridge, London.
73. Grant-Downton RT, Dickinson HG. 2006. Epigenetics and its implications for plant biology 2. The ‘Epigenetic Epiphany’: Epigenetics, evolution and beyond. *Annals of Botany* 97: 11–27.
74. Guan X, Xu T, Gao S, Qi M, Wang Y, Liu X, Li T. 2013. Temporal and spatial distribution of auxin response factor genes during tomato flower abscission. *Journal of Plant Growth Regulation*. doi: 10.1007/s00344-013-9377-x.
75. Hay A, Craft J, Tsiantis M. 2004. Plant hormones and homeoboxes: bridging the gap? *Bioessays* 26(4): 395–404.
76. Hay A, Tsiantis M. 2010. *KNOX* genes: versatile regulators of plant development and diversity. *Development* 137(19): 3153–3165.
77. Halgren A, Banowetz GM. 2012. Life cycle expression analysis of three cell wall degradation-related genes in ethylene-treated grass. *Plant Growth Regulation* 66: 167–177.
78. Hama E, Takumi S, Ogihara Y, Murai K. 2004. Pistillody is caused by alterations to the class-B MADS-box gene expression pattern in alloplasmic wheats. *Planta* 218: 712–720.
79. Hamant O, Nogué F, Belles-Boix E, Jublot D, Grandjean O, Traas J, Pautot V. 2002. The KNAT2 homeodomain protein interacts with ethylene and cytokinin signalling. *Plant Physiology* 130(2): 657–665.
80. Heisler MG, Ohno C, Das P, Sieber P, Reddy GV, Long JA, Meyerowitz EM. 2005. Patterns of auxin transport and gene expression during primodium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *Current Biology* 15: 1899–1911.
81. Hettiarachchi N, Kryukov K, Sumiyama K, Saitou N. 2014. Lineage-specific conserved noncoding sequences of plant genomes: Their possible role in nucleosome positioning. *Genome Biology and Evolution* 6: 2527–2542.
82. Hirabayashi C, Murai K. 2009. Class C MADS-box gene *AGAMOUS* was duplicated in the wheat genome. *Wheat Information Service* 107: 13–16.

83. Honma T, Goto K. 2001. Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* 409: 525–529.
84. Houston K, Druka A, Bonar N, Macaulay M, Lundqvist U, Franckowiak J, Morgante M, Stein N, Waugh R. 2012. Analysis of the barley bract suppression gene *Trdl*. *Theoretical and Applied Genetics* 125: 33–45.
85. Ichimura K, Niki T. 2014. Ethylene production associated with petal senescence in carnation flowers is induced irrespective of the gynoeceium. *J Plant Physiology* 171: 1679–1684.
86. Ikeda K, Ito M, Nagasawa N, Kyojuka J, Nagato Y. 2007. Rice *ABERRANT PANICLE ORGANIZATION1*, encoding an F-box protein, regulates meristem fate. *The Plant Journal* 51: 1030–1040.
87. Inada DC, Bashir A, Lee C, Thomas BC, Ko C, Goff SA, Freeling M. 2003. Conserved noncoding sequences in the grasses. *Genome Research* 13(9): 2030–2041.
88. Indriūnaitė A, Buzaitė O, Rančelis V, Kayushin LP, Lvov KM, Sheksheyev EM. 1994. Free radicals content in grains of barley mutant *tweaky spike* and normal type. *Biologija* 1: 17–20.
89. Iwasaki M, Takahashi H, Iwakawa H, Nakagawa A, Ishikawa T, Tanaka H, Matsumura Y, Pekker I, Eshed Y, Vial-Pradel S, Ito T, Watanabe Y, Ueno Y, Fukazawa H, Kojima S, Machida Y, Machida C. 2013. Dual regulation of *ETTIN* (*ARF3*) gene expression by AS1-AS2, which maintains the DNA methylation level, is involved in stabilization of leaf adaxial-abaxial partitioning in *Arabidopsis*. *Development* 140: 1958–1969.
90. Yagil E, Stebbins GL. 1969. The morphogenetic effects of the *Hooded* gene in barley. II. Cytological and environmental factors affecting gene expression. *Genetics* 62(2): 307–319.
91. Yamada K, Saraike T, Shitsukawa N, Hirabayashi C, Takumi S, Murai K. 2009. Class D and Bsister MADS-box genes are associated with ectopic ovule formation in the pistil-like stamens of alloplasmic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Genetics and Genomics* 71: 1–14.
92. Yamaguchi T, Lee DY, Miyao A, Hirochika H, An G, Hirano HY. 2006. Functional diversification of the two C-class MADS box genes OSMADS3 and OSMADS58 in *Oryza sativa*. *Plant Cell* 18: 15–28.
93. Yang J, Zhang J, Wang Z, Liu K, Wang P. 2006. Post-anthesis development of inferior and superior spikelets in rice in relation to abscisic acid and ethylene. *Journal of Experimental Botany* 57(1): 149–160.
94. Yao Y, Danna CH, Zemp FJ, Titov V, Ciftci ON, Przybylski R, Kovalchuk I. 2011. UV-C-irradiated *Arabidopsis* and tobacco emit volatiles that trigger genomic instability in neighboring plants. *The Plant Cell* 23(10): 3842–3852.
95. Yasui Y, Nasuda S, Matsuoka Y, Kawahara T. 2001. The *Au* family, a novel short interspersed element (SINE) from *Aegilops umbellulata*. *Theoretical and Applied Genetics* 102(4): 463–470.
96. Yoshida H, Nagato Y. 2011. Flower development in rice. *Journal of Experimental Botany* 62: 4719–4730.
97. Yoshida, H. 2012. Is the lodicule a petal: Molecular evidence? *Plant Science* 184: 121–128.

98. Yu H, Ito T, Wellmer F, Meyerowitz EM. 2004. Repression of *AGAMOUS LIKE24* is a crucial step in promoting flower development. *Nature Genetics* 36: 157–161.
99. Yuo T, Yamashita Y, Kanamori H, Matsumoto T, Lundqvist U, Sato K, Ichii M, Jobling SA, Taketa S. 2012. A *SHORT INTERNODES (SHI)* family transcription factor gene regulates awn elongation and pistil morphology in barley. *Journal of Experimental Botany* 63(14): 5223–5232.
100. Jetha K, Theißen G, Melzer R. 2014. *Arabidopsis* *SEPALLATA* proteins differ in cooperative DNA-binding during the formation of floral quartet-like complexes. *Nucleic Acid Research* 42(17): 10927–10942.
101. Jofuku KD, den Boer BG, Van Montagu M, Okamoto JK. 1994. Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell* 6(9): 1211–1225.
102. Kaufmann K, Melzer R, Theißen G. 2005. MIKC-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. *Gene* 347: 183–198.
103. Kellogg EA. 2001. Evolutionary history of the grasses. *Plant Physiology* 125: 1198–1205.
104. Kerstetter R, Vollbrecht E, Lowe B, Veit B, Yamaguchi J, Hake S. 1994. Sequence analysis and expression patterns divide the maize *knotted1-like* homeobox genes into two classes. *Plant Cell* 6: 1877–1887.
105. Kęsy J, Maciejewska B, Sowa M, Szumilak M, Kawałowski K, Borzuchowska M, Kopcewicz J. 2008. Ethylene and IAA interactions in the inhibition of photoperiodic flower induction of *Pharbitis nil*. *Plant Growth Regulation* 55: 43–50.
106. Kim SY, Zhu T, Sung ZR. 2010. Epigenetic regulation of gene programs by *EMF1* and *EMF2* in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 152: 516–528.
107. Kinjo H, Shitsukawa N, Takumi S, Murai K. 2012. Diversification of three *APETALA1/FRUITFULL*-like genes in wheat. *Molecular Genetics and Genomics* 287: 283–294.
108. Kinouchi T, Endo R, Yamashita A, Satoh S. 2006. Transformation of carnation with genes related to ethylene production and perception: towards generation of potted carnations with a longer display time. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86: 27–35.
109. Kobayashi K, Yasuno N, Sato Y, Yoda M, Yamazaki R, Kimizu M, Yoshida H, Nagamura Y, Kyojuka J. 2012. Inflorescence meristem identity in rice is specified by overlapping functions of three *API/FUL*-Like MADS box genes and *PAP2*, a *SEPALLATA* MADS box gene. *The Plant Cell* 24: 1848–1859.
110. Koenig D, Bayer E, Kang J, Kuhlemeier C, Sinha N. 2009. Auxin patterns *Solanum lycopersicum* leaf morphogenesis. *Development* 136: 2997–3006.
111. Komatsuda T, Pourkheirandish M, He C, Azhaguvel P, Kanamori H, Perovic D, Stein N, Graner A, Wicker T, Tagiri A, Lundqvist U, Fujimura T, Matsuoka M, Matsumoto T, Yano M. 2007. Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper I-class homeobox gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 104(4): 1424–1429.
112. Krizek A. 2011. Auxin regulation of *Arabidopsis* flower development involves members of the *AINTEGUMENTA-LIKE/PLETHORA (AIL/PLT)* family. *Journal of Experimental Botany* 62: 3311–3319.

113. Krizek BA. 2009. *AINTEGUMENTA* and *AINTEGUMENTA-LIKE6* act redundantly to regulate *Arabidopsis* floral growth and patterning. *Plant Physiology* 150: 1916–1929.
114. Krogan NT, Hogan K, Long JA. 2012. *APETALA2* negatively regulates multiple floral organ identity genes in *Arabidopsis* by recruiting the co-repressor *TOPLESS* and the histone deacetylase *HDA19*. *Development* 139(22): 4180–4190.
115. Kruszka K, Pacak A, Swida-Barteczka A, Nuc P, Alaba S, Wroblewska Z, Karlowski W, Jarmolowski A, Szweykowska-Kulinska Z. 2014. Transcriptionally and post-transcriptionally regulated microRNAs in heat stress response in barley. *Journal of Experimental Botany* 65(20): 6123–6135. doi: 10.1093/jxb/eru353.
116. Kuijt SJ, Greco R, Agalou A, Shao J, 't Hoen CC, Overnäs E, Osnato M, Curiale S, Meynard D, van Gulik R, Maraschin S de F, Atallah M, de Kam RJ, Lamers GE, Guiderdoni E, Rossini L, Meijer AH, Ouwerkerk PB. 2014. Interaction between the *GROWTH-REGULATING FACTOR* and *KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN* families of transcription factors. *Plant Physiology* 164(4): 1952–1966.
117. Kumar S, Singh AK. 2010. A review on herbicide 2, 4-D damage reports in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 2(6): 118–124.
118. Kusaba S, Kano-Murakami Y, Matsuoka M, Tamaoki M, Sakamoto T, Yamaguchi I, Fukumoto M. 1998. Alteration of hormone levels in transgenic tobacco plants overexpressing a rice homeobox gene *OSHI*. *Plant Physiology* 116(2): 471–476.
119. Larsson HEB. 1985. Linkage studies with genetic markers and some *laxatum* barley mutants. 103: 230–253.
120. Laskowski M. 2013. Lateral root initiation is a probabilistic event whose frequency is set by fluctuating levels of auxin response. *Journal of Experimental Botany* 64: 2609–2617.
121. Lauer JG. 1991. Barley tiller response to plant density and ethephon. *Agronomy Journal* 83: 968–973.
122. Laurie DA, Pratchett N, Allen RL, Hantke SS. 1996. RFLP mapping of the barley homeotic mutant *lax-a*. *Theoretical and Applied Genetics* 93(1-2): 81–85.
123. Lee DY, An G. 2012. Two AP2 family genes, *SUPERNUMERARY BRACT (SNB)* and *OsINDETERMINATE SPIKELET1 (OsIDS1)*, synergistically control inflorescence architecture and floral meristem establishment in rice. *The Plant Journal* 69: 445–461.
124. Li H, Liang W, Yin C, Zhu L, Zhang D. 2011. Genetic interaction of *OsMADS3*, *DROOPING LEAF* and *OsMADS13* in specifying rice floral organ identities and meristem determinacy. *Plant Physiology* 156: 263–274.
125. Li H, Liang W, Jia R, Yin C, Zong J, Kong H, Zhang D. 2010. The *AGL6*-like gene *OsMADS6* regulates floral organ and meristem identities in rice. *Cell Research* 20: 299–313.
126. Lin J, Müller KJ. 2002. Structure and development of epiphylls in *knox* transgenic tobacco. *Planta* 214(4): 521–525.
127. Lin Z, Zhong S, Grierson D. 2009. Recent advances in ethylene research. *Journal of Experimental Botany* 60(12): 3311–3336.

128. Litt A, Irish VF. 2003. Duplication and diversification in the *APETALA1/FRUITFULL* floral homeotic gene lineage: Implications for the evolution of floral development. *Genetics* 165: 821–833.
129. Liu C, Thong Z, Yu H. 2009. Coming into bloom: the specification of floral meristems. *Development* 136: 3379–3391.
130. Liu FY, Chang YS. 2011. Ethephon treatment promotes flower formation in bougainvillea. *Botanical Studies* 52: 183–189.
131. Lombardo F, Yoshida H. 2015. Interpreting lemma and palea homologies: a point of view from rice floral mutants. *Frontiers in Plant Science*. 6:61. doi:10.3389/fpls.2015.00061.
132. Lopez-Dee ZP, Wittich P, Pé ME, Rigora D, del Buono I, Sari Gorla M, Kater MM, Colombo L. 1999. OsMADS13, a novel rice MADS-box gene expressed during ovule development. *Developmental Genetics* 25: 237–244.
133. Loschiavo F, Pitto L, Giuliano G, Torti G, Nuti-Ronchi V, Marazziti D, Vergara R, Orselli S, Terzi M. 1989. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theoretical and Applied Genetics* 77: 325–331.
134. Luo J, Ma N, Pei H, Chen J, Li J, Gao J. 2013. A *DELLA* gene, *RhGAIL*, is a direct target of EIN3 and mediates ethylene-regulated rose petal cell expansion via repressing the expression of *RhCesA2*. *Journal of Experimental Botany* 64(16): 5075–5084.
135. Ma B, He SJ, Duan KX, Yin CC, Chen H, Yang C, Xiong Q, Song QX, Lu X, Chen HW, Zhang WK, Lu TG, Chen SY, Zhang JS. 2013. Identification of rice ethylene-response mutants and characterization of *MHZ7/OsEIN2* in distinct ethylene response and yield trait regulation. *Molecular Plant* 6(6): 1830–1848.
136. Mačkinaitė R, Kačergius A, Kasparavičius J, Balčiūnienė L, Čėsniėnė T, Vaitkūnienė V, Žilinskaitė S, Rančelis V. 1996. Immunodeficiency of barley alelic mutants *tweaky spike*. Part 3 and 4. *Biologija* 4: 11–27.
137. Magnani E, Hake S. 2008. KNOX lost the OX: the *Arabidopsis* KNATM gene defines a novel class of KNOX transcriptional regulators missing the homeodomain. *The Plant Cell* 20(4): 875–87.
138. Malcomber ST, Kellogg EA. 2005. *SEPALLATA* gene diversification: brave new whorls. *Trends in Plant Science* 10: 427–435.
139. Manzano S, Martínez C, Megías Z, Garrido D, Jamilena M. 2013. Involvement of ethylene biosynthesis and signalling in the transition from male to female flowering in the monoecious *Cucurbita pepo*. *The Journal of Plant Growth Regulation* 32: 789–798.
140. McSteen P, Leyser O. 2005. Shoot branching. *Annual Review of Plant Biology* 56: 353–374.
141. McSteen P, Malcomber S, Skirpan A, Lunde C, Wu X, Kellogg E, Hake S. 2007. *barren inflorescence2* encodes a co-ortholog of the PINOID serine/threonine kinase and is required for organogenesis during inflorescence and vegetative development in maize. *Plant Physiology* 144: 1000–1011.
142. Meguro A, Takumi S, Ogihara Y, Murai K. 2003. WAG, a wheat *AGAMOUS* homolog, is associated with development of pistil-like stamens in alloplasmic wheats. *Sexual Plant Reproduction* 15: 221–230.

143. Moon YH, Chen L, Pan RL, Chang HS, Zhu T, Maffeo DM, Sung ZR. 2003. *EMF* genes maintain vegetative development by repressing the flower program in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 15(3): 681–693.
144. Morimoto R, Kosugi T, Nakamura C, Takumi S. 2005. Intragenic diversity and functional conservation of the three homoeologous loci of the *KN1*-type homeobox gene *Wknox1* in common wheat. *Plant Molecular Biology* 57(6): 907–924.
145. Morita Y, Kyojuka J. 2007. Characterisation of *OsPID*, the rice ortholog of *PINOID*, and its possible involvement in the control of polar auxin transport. *Plant and Cell Physiology* 48: 540–549.
146. Morita S, Murakoshi Y, Hojo A, Chisaka K, Harada T, Satoh S. 2012. Early flowering and increased expression of a *FLOWERING LOCUS T*-like gene in *Chrysanthemum* transformed with a mutated ethylene receptor gene *mDG-ERS1 (etr1-4)*. *The Journal of Plant Biology* 55(5): 398–405.
147. Müller D, Leyser O. 2011. Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. *Annals of Botany* 107: 1203–1212.
148. Müller J, Wang Y, Franzen R, Santi L, Salamini F, Rohde W. 2001. *In vitro* interactions between barley TALE homeodomain proteins suggest a role for protein-protein associations in the regulation of *Knox* gene function. *The Plant Journal* 27(1): 13–23.
149. Müller KJ, Lin J, Fischer R, Prüfer D. 2006. How repeated epiphyllly correlates with gene expression of resident *knox1* in the leaves of tobacco epiphyllous shoots. *Central European Journal of Biology* 1(2): 263–274.
150. Müller KJ, Romano N, Gerstner O, Garcia-Maroto F, Pozzi C, Salamini F, Rohde W. 1995. The barley *Hooded* mutation caused by a duplication in a homeobox gene intron. *Nature* 374(6524): 727–730.
151. Müller R, Owen CA, Xu ZT, Welander M, Stummann BM. 2002. Characterization of two *CTR*-like protein kinases in *Rosa hybrida* and their expression during flower senescence and in response to ethylene. *Journal of Experimental Botany* 53(371): 1223–1225.
152. Müller-Xing R, Clarenz O, Pokorny L, Goodrich J, Schubert D. 2014. Polycomb-Group Proteins and *FLOWERING LOCUS T* Maintain Commitment to Flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 26(6): 2457–2471.
153. Mukherjee K, Brocchieri L, Bürglin TR. 2009. A comprehensive classification and evolutionary analysis of plant homeobox genes. *Molecular Biology and Evolution* 26(12): 2775–2794.
154. Murai K, Murai R, Takumi S, Ogihara Y. 1998. Cloning and Characterization of cDNAs Corresponding to the Wheat MADS Box Genes. In *Proceedings of 9th International Wheat Genetics Symposium, Saskatchewan, Canada, 2–7 August 1998; Vol. 1, p. 89–94.*
155. Murai K, Takumi S, Koga H, Ogihara Y. 2002. Pistillody, homeotic transformation of stamens into pistil-like structures, caused by nuclear-cytoplasm interaction in wheat. *The Plant Journal* 29: 169–181.
156. Murai K. 2013. Homeotic Genes and the ABCDE model for floral organ formation in wheat. *Plants* 2: 379–395

157. Murfett J, Wang XJ, Hagen G, Guilfoyle TJ. 2001. Identification of *Arabidopsis* histone deacetylase HDA6 mutants that affect transgene expression. *The Plant Cell* 13: 1047–1061.
158. Nagasawa N, Miyoshi M, Sano Y, Satoh H, Hirano HY, Sakai H, Nagato Y. 2003. *SUPERWOMANI* and *DROOPING LEAF* genes control floral organ identity in rice. *Development* 130: 705–718.
159. Nguyen HN, Kim JH, Jeong CY, Hong SW, Lee H. 2013. Inhibition of histone deacetylation alters *Arabidopsis* root growth in response to auxin via PIN1 degradation. *Plant Cell Reports* 32: 1625–1636.
160. Nukui H, Kudo S, Yamashita A, Satoh S. 2004. Repressed ethylene production in the gynoecium of long-lasting flowers of the carnation 'White Candle': role of the gynoecium in carnation flower senescence. *Journal of Experimental Botany* 55(397): 641–650.
161. Ogawa T, Uchimiya H, Yamada MK. 2007. Mutual regulation of *Arabidopsis thaliana* *Ethylene-responsive Element Binding Protein* and a plant floral homeotic gene, *APETALA2*. *Annals of Botany* 99(2): 239–244.
162. Oh SA, Park JH, Lee GI, Paek KH, Park SK, Nam HG. 1997. Identification of three genetic loci controlling leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 12(3): 527–535.
163. Ohmori S, Kimizu M, Sugita M, Miyao A, Hirochika H, Uchida E, Nagato Y, Yoshida H. 2009. *MOSAIC FLORAL ORGANS1*, an AGL6-like MADS box gene, regulates floral organ identity and meristem fate in rice. *The Plant Cell* 21: 3008–3025.
164. Okada K, Ueda J, Komaki MK, Bell CJ, Shimura Y. 1991. Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *The Plant Cell* 3: 677–684.
165. Oono Y, Ooura C, Rahman A, Aspuria ET, Hayashi K, Tanaka A, Uchimiya H. 2003. p-chlorophenoxyisobutyric acid impairs auxin response in *Arabidopsis* root. *Plant Physiology* 133(3): 1135–1147.
166. Osnato M, Stile MR, Wang Y, Meynard D, Curiale S, Guiderdoni E, Liu Y, Horner DS, Ouwerkerk PB, Pozzi C, Müller KJ, Salamini F, Rossini L. 2010. Cross talk between the *KNOX* and ethylene pathways is mediated by intron-binding transcription factors in barley. *Plant Physiology* 154(4): 1616–1632.
167. Paolacci AR, Tanzarella OA, Porceddu E, Varotto S, Ciaffi M. 2007. Molecular and phylogenetic analysis of MADS-box genes of MIKC type and chromosome location of SEP-like gene in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Genetics and Genomics* 278: 689–708.
168. Pei H, Ma N, Tian J, Luo J, Chen J, Li J, Zheng Y, Chen X, Fei Z, Gao J. 2013. An NAC transcription factor controls ethylene-regulated cell expansion in flower petals. *Plant Physiology* 163(2): 775–791.
169. Perovic D, Krämer I, Habekuss A, Perner K, Pickering R, Proeseler G, Kanyuka K, Ordon F. 2014. Genetic analyses of BaMMV/BaYMV resistance in barley accession HOR4224 result in the identification of an allele of the translation initiation factor 4e (*Hv-eIF4E*) exclusively effective against Barley mild mosaic virus (BaMMV). *Theoretical and Applied Genetics* 127(5): 1061–1071.

170. Pozzi C, Faccioli P, Terzi V, Stanca AM, Cerioli S, Castiglioni P, Fink R, Capone R, Müller KJ, Bossinger G, Rohde W, Salamini F. 2000. Genetics of mutations affecting the development of a barley floral bract. *Genetics* 154: 1335–1346.
171. Pu L, Liu M-S, Kim SY, Chen LFO, Fletcher JC, Sung ZR. 2013. *EMBRYONIC FLOWER1* and *ULTRAPETALA1* act antagonistically on *Arabidopsis* development and stress response. *Plant Physiology* 162: 812–830.
172. Qi W, Sun F, Wang Q, Chen M, Huang Y, Feng YQ, Luo X, Yang J. 2011. Rice ethylene-response AP2/ERF factor OsEATB restricts internode elongation by down-regulating a gibberellin biosynthetic gene. *Plant Physiology* 157(1): 216–228.
173. Rančelis R, Vaišnienė V, Vaitkūnienė V, Balčiūnienė L. 1996. Amino acids content in barley *tw* type spike-structure mutants and their revertants. *Biologija* 1: 9–17.
174. Rančelis V, Žilinskaitė S, Girkontaitė I, Indriūnaitė. 1991. Genetically unstable pleiotropic mutant of barley with the increased generation of free radicals and frequency of chromosome aberrations. *The Journal of Experimental Biology* 1: 37–39.
175. Rančelis V, Balčiūnienė L, Bieliūnienė A, Kleizaitė V, Pependikytė V, Pozdniakovaitė N, Vaišnienė V, Vaitkūnienė V, Žvingila D. 2001. Barley genetic resources in Lithuania. I. The barley genetic collection of Vilnius University. *Biologija* 4(priedas): 32–37.
176. Rančelis V, Vaitkūnienė V, Balčiūnienė L, Mačkinaite R, Leistrumaitė A. 2004. Reversions from genetically unstable mutants as a means of expanding the genetic diversity of barley. *Genetic variation for plant breeding*, Vallmann J et al. (eds), Vienna, Austria, p. 219–222.
177. Rančelis V, Žilinskaitė S, Vaitkūnienė V, Kačergius A, Kasparavičius J. 1994. Immunodeficiency of barley allelic mutants *tweaky spike*. Part 1. *Biologija* 4: 14–23.
178. Rančelis V. 1977. Chlorofylnyje mutacii pri vzaimodeistvii etilenimina s nekotorymi detergentami i kompleksonami. *Genetica* 13: 1446–1454.
179. Rančelis V. 1982. Egzogennyje i endogennyje modifikatory v opredelenii nestabilnosti i čuvstvitelnosti rastenij k mutagenam [Biologijos mokslų daktaro disertacija]. Minsk: Institut genet. i citol.
180. Rančelis V. 1993. The problems of mutagenesis and genetic instability. *Biologija* 4: 19–26.
181. Rančelis V. 2001. Miežių *tweaky spike* mutantų ypatybės. *Mokslas Gamtos mokslų fakultete*. Vilnius: Vilniaus universiteto leidykla, p. 43–53.
182. Rast MI, Simon R. 2012. *Arabidopsis* JAGGED LATERAL ORGANS acts with ASYMMETRIC LEAVES2 to coordinate KNOX and PIN expression in shoot and root meristems. *The Plant Cell* 24: 2917–2933.
183. Reid DA, Wiebe GA. 1968. Barley: Origin, Botany, Culture, Winter Hardiness, Genetics, Utilization, Pests. *Agriculture Handbook No. 338*, U.S. Department of Agriculture.
184. Reid MS, Wu MJ. 1992. Ethylene and flower senescence. *The Journal of Plant Growth Regulation* 11: 31–43.
185. Reinhardt D, Mandel T, Kuhlemeier C. 2000. Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *The Plant Cell* 12: 507–518.

186. Reinhardt D, Eva-Rachele P, Stieger P, Mandel T, Baltensperger K, Bennett M, Traas J, Friml J, Kuhlemeier C. 2003. Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* 426: 255–260.
187. Ren D, Li Y, Zhao F, Sang X, Shi J, Wang N, Guo S, Ling Y, Zhang C, Yang Z, He G. 2013. *MULTI-FLORET SPIKELET1*, which encodes an AP2/ERF protein, determines spikelet meristem fate and sterile lemma identity in rice. *Plant Physiology* doi:10.1104/pp.113.216044.
188. Rhoads RE. 2009. eIF4E: new family members, new binding partners, new roles. *The Journal of Biological Chemistry* 284(25): 16711–16715.
189. Riechmann JL, Meyerowitz EM. 1997. MADS domain proteins in plant development. *Biological Chemistry*: 378(10): 1079–10101.
190. Roig C, Pozzi C, Santi L, Müller J, Wang Y, Stile MR, Rossini L, Stanca M, Salamini F. 2004. Genetics of barley *Hooded* suppression. *Genetics* 167(1): 439–448.
191. Ruberti I, Sessa G, Lucchetti S, Morelli G. 1991. A novel class of plant proteins containing a homeodomain with a closely linked leucine zipper motif. *The EMBO Journal* 10(7): 1787–1791.
192. Rzewuski G, Sauter M. 2008. Ethylene biosynthesis and signaling in rice. *Plant Science* 175(1-2): 32–42.
193. Sakai H, Hua J, Chen QG, Chang C, Medrano LJ, Bleecker AB, Meyerowitz EM. 1998. *ETR2* is an *ETR1*-like gene involved in ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95(10): 5812–5817.
194. Sakamoto T, Sakakibara H, Kojima M, Yamamoto Y, Nagasaki H, Inukai Y, Sato Y, Matsuoka M. 2006. Ectopic expression of *KNOTTED1*-like homeobox protein induces expression of cytokinin biosynthesis genes in rice. *Plant Physiology* 142(1): 54–62.
195. Sanchez R, Kim MY, Calonje M, Moon YH, Sung ZR. 2009. Temporal and spatial requirement of EMF1 activity for *Arabidopsis* vegetative and reproductive development. *Molecular Plant* 2: 643–653.
196. Sanchez R, Zhou MM. 2011. The PHD finger: a versatile epigenome reader. *Trends in Biochemical Sciences* 36(7): 364–372.
197. Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJG. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17: 915–919.
198. Santi L, Wang Y, Stile MR, Berendzen K, Wanke D, Roig C, Pozzi C, Müller K, Müller J, Rohde W, Salamini F. 2003. The GA octodinucleotide repeat binding factor BBR participates in the transcriptional regulation of the homeobox gene *Bkn3*. *The Plant Journal* 34(6): 813–826.
199. Sauer M, Robert S, Kleine-Vehn J. 2013. Auxin: simply complicated. *Journal of Experimental Botany* 64: 2565–2577.
200. Scanlon MJ, Henderson DC, Bernstein B. 2002. *SEMAPHORE1* functions during the regulation of ancestrally duplicated *knox* genes and polar auxin transport in maize. *Development* 129: 2663–2673.
201. Scarpella E, Barkoulas M, Tsiantis M. 2010. Control of leaf and vein development by auxin. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2: a001511.

202. Schmidt RJ, Ambrose BA. 1998. The blooming of grass flower development. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 60–67
203. Scofield S, Murray JA. 2006. *KNOX* gene function in plant stem cell niches. *Plant Molecular Biology* 60(6): 929–946.
204. Sentoku N, Sato Y, Matsuoka M. 2000. Overexpression of rice *OSH* genes induces ectopic shoots on leaf sheaths of transgenic rice plants. *Developmental Biology* 220(2): 358–364.
205. Serek M, Woltering EJ, Sisler EC, Frello S, Sriskandarajah S. 2006. Controlling ethylene responses in flowers at the receptor level. *Biotechnology Advances* 24(4): 368–381.
206. Shahri W, Tahir I. 2014. Flower senescence: some molecular aspects. *Planta* 239(2): 277–297.
207. Shakeel SN, Wang X, Binder BM, Schaller GE. 2013. Mechanisms of signal transduction by ethylene: overlapping and non-overlapping signalling roles in a receptor family. *AoB Plants (Special issue)* 5: 1–16.
208. Shitsukawa N, Tahira C, Kassai KI, Hirabayashi C, Shimizu T, Takumi S, Mochida K, Kawaura K, Ogihara Y, Murai K. 2007. Genetic and epigenetic alteration among three homoeologous genes of a class E MADS box gene in hexaploid wheat. *Plant Cell* 19: 1723–1737.
209. Shitsukawa N, Takagishi A, Ikari C, Takumi S, Murai K. 2006. *WFL*, a wheat *FLORICAULA/LEAFY* ortholog, is associated with spikelet formation as lateral branch of the inflorescence meristem. *Genes and Genetic System* 81: 13–20.
210. Simonini S, Kater MM. 2014. Class I BASIC PENTACYSTEINE factors regulate *HOMEBOX* genes involved in meristem size maintenance. *Journal of Experimental Botany* 65(6): 1455–1465.
211. Sinha NR, Williams RE, Hake S. 1993. Overexpression of the maize homeo box gene, *KNOTTED-1*, causes a switch from determinate to indeterminate cell fates. *Genes & Development* 7(5): 787–795.
212. Siuksta R, Vaitkuniene V, Rancelis V, Zvingila D, Cesniene T, Kleizaite V, Zukauskaite J, Balciuniene L. 2012. Barley homeotic mutants and their hybrids for ornamental purposes. *Acta Horticulturae* 953: 337–343.
213. Sjøgaard B, Wettstein-Knowles P. 1987. Barley: genes and chromosomes. *Carlsberg Research Communications* 52: 123–196.
214. Soltis DE, Chandrabali AS, Kimi S, Buzgo M, Soltis PS. 2007. The ABC model and its applicability to basal angiosperms. *Annals of Botany* 100: 155–163.
215. Souček P, Klíma P, Reková A, Brzobohatý B. 2007. Involvement of hormones and *KNOXI* genes in early *Arabidopsis* seedling. *Journal of Experimental Botany* 58(13): 3797–3810.
216. Staldal V, Sohlberg JJ, Eklund DM, Ljung K, Sundberg E. 2008. Auxin can act independently of CRC, LUG, SEU, SPT and STY1 in style development but not apical-basal patterning of the *Arabidopsis* gynoecium. *New Phytologist* 180: 798–808.
217. Staniforth DW. 1952. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on meristematic tissues of corn. *Plant Physiology* 27(4): 803–811.

218. Stebbins GL, Yagil E. 1966. The morphogenetic effects of the *Hooded* gene in barley. I. The course of development in *Hooded* and awned genotypes. *Genetics* 54: 727–741.
219. Stein N, Perovic D, Kumlehn J, Pellio B, Stracke S, Streng S, Ordon F, Graner A. 2005. The eukaryotic translation initiation factor 4E confers multiallelic recessive Bymovirus resistance in *Hordeum vulgare* (L.). *The Plant Journal* 42(6): 912–922.
220. Stepanova AN, Alonso JM. 2009. Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. *Current Opinion in Plant Biology* 12(5): 548–555.
221. Stepanova AN, Robertson-Hoyt J, Yun J, Benavente LM, Xie DY, Dolezal K, Schlereth A, Jurgens G, Alonso JM. 2008. *TAA1*-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* 133: 177–191.
222. Sundberg E, Ostergaard L. 2009. Distinct and dynamic auxin activities during reproductive development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1: a001628.
223. Suneson CA, Hoyle BJ. 1958. *Hooded* Atlas barley: Studies indicate development of hooded barley competitive with awned doubtful. *California Agriculture* 12(7): 11.
224. Szemenyei H, Hannon M, Long JA. 2008. *TOPLESS* mediates auxin-dependent transcriptional repression during *Arabidopsis* embryogenesis. *Science* 319: 1384–1386.
225. Šiukšta R, Balčiūnienė L, Vaitkūnienė V, Čėsniienė T, Žvingila D, Rančelis V. 2008. Attempts to create the genetic diversity of barley by reversions. *Biotechnology, Special vol.*, Bucharest, Romania, p. 13–19.
226. Šiukšta R, Okockytė V, Žukauskaitė J, Vaitkūnienė V, Rančelis V. 2014. Homeozinių miežių dihibridų žiedo ir žiedyno fenotipinio nestabilumo ir jo modifikacijos epigenetinių procesų inhibitoriais tyrimai. *Mokslas Gamtos mokslų fakultete*. Vilnius: Vilniaus universiteto leidykla, p. 62–73.
227. Šiukšta R, Vaitkūnienė V, Kaselytė G, Okockytė V, Žukauskaitė J, Žvingila D, Rančelis V. 2015. Inherited phenotype instability of inflorescence and floral organ development in homeotic barley double mutants and its specific modification by auxin inhibitors and 2,4-D. *Annals of Botany* 115(4): 651–663.
228. Tabata R, Ikezaki M, Fujibe T, Aida M, Tian CE, Ueno Y, Yamamoto KT, Machida Y, Nakamura K, Ishiguro S. 2010. *Arabidopsis* AUXIN RESPONSE FACTOR6 and 8 regulate jasmonic acid biosynthesis and floral organ development via repression of class I *KNOX* genes. *Plant and Cell Physiology* 51: 164–175.
229. Takada K, Ishimaru K, Minamisawa K, Kamada H, Ezura H. 2005. Expression of a mutated melon ethylene receptor gene *Cm-ETR1/H69A* affects stamen development in *Nicotiana tabacum*. *Plant Science* 169(5): 935–942.
230. Taketa S, Amano S, Tsujino Y, Sato T, Saisho D, Kakeda K, Nomura M, Suzuki T, Matsumoto T, Sato K, Kanamori H, Kawasaki S, Takeda K. 2008. Barley grain with adhering hulls is controlled by an ERF family transcription factor gene regulating a lipid biosynthesis pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 105(10): 4062–4067.
231. Takumi S, Kosugi T, Murai K, Mori N, Nakamura C. 2000. Molecular cloning of three homoeologous cDNAs encoding orthologs of the maize *KNOTTED1* homeobox protein from young spikes of hexaploid wheat. *Gene* 249: 171–181.

232. Tanaka H, Dhonukshe P, Brewer PB, Friml J. 2006. Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63: 2738–2754.
233. Tang X, Gomes AMR, Bhatia A, Woodson WR. 1994. Pistil-specific and ethylene-regulated expression of l-aminocyclopropane-l-carboxylate oxidase genes in *Petunia* flowers. *Plant Cell* 6(9): 1227–1239.
234. Theißen G, Becker A, Di Rosa A, Kanno A, Kim JT, Munster T, Winter KU, Saedler H. 2000. A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Molecular Biology* 42: 115–149.
235. Theißen G, Saedler H. 2001. Floral quartets. *Nature* 409: 469–471.
236. Theißen G. 2001. Development of floral organ identity: stories from the MADS house. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 75–85.
237. Thompson BE, Bartling L, Whipple C, Hall DH, Sakai H, Schmidt R, Hake S. 2009. *bearded-ear* encodes a MADS box transcription factor critical for maize floral development. *The Plant Cell* 21: 2578–2590.
238. Tobena-Santamaria R, Bliet M, Ljung K, Sandberg G, Mol JNM, Souer E, Koes R. 2002. *FLOOZY* of petunia is a flavin mono-oxygenase-like protein required for the specification of leaf and flower architecture. *Genes and Development* 16: 753–763.
239. Tooke F, Ordidge M, Chiurugwi T, Battey N. 2005. Mechanisms and function of flower and inflorescence reversion. *Journal of Experimental Botany* 56(420): 2587–2599.
240. Trevaskis B, Tadege M, Hemming MN, Peacock WJ, Dennis ES, Sheldon C. 2007. Short Vegetative phase-like MADS-box genes inhibit floral meristem identity in barley. *Plant Physiology* 143: 225–235.
241. Trevaskis B. 2010. The central role of the *VERNALIZATION1* gene in the vernalization response of cereals. *Functional Plant Biology* 37: 479–487.
242. Trivellini A, Ferrante A, Vernieri P, Mensuali-Sodi A, Serra G. 2011. Effects of promoters and inhibitors of ethylene and ABA on flower senescence of *Hibiscus rosa-sinensis* L. *Journal of Plant Growth Regulation* 30: 175–184.
243. Tsuda K, Ito Y, Sato Y, Kurata N. 2011. Positive autoregulation of a KNOX gene is essential for shoot apical meristem maintenance in rice. *Plant Cell* 23(12): 4368–4381.
244. Tvorogova VY, Osipova MA, Doduyeva IY, Lutova LA. 2013. Interactions between Transcription Factors and Phytohormones in the Regulation of Plant Meristem Activity. *Russian Journal of Genetics: Applied Research* 3: 325–337.
245. Vaitkūnienė V, Rančelis V. 1999. Complementation test of barley mutants *tweaky spike* and *branched ear* type. *Biologija* 3: 108–110.
246. Vaitkūnienė V, Varnaitė A, Balčiūnienė L, Rančelis V, Mačkinitė R, Leistrumaitė A. 2006. Two types of revertants from the same homeotic barley mutants *tweaky spike*. *Biologija* 2: 18–23.
247. Vaitkūnienė V, Varnaitė A, Rančelis V. 2004a. Interaction of barley mutants *Hooded* and *tweaky spike* in F₁ hybrids. *Biologija* 3: 13–20.
248. Vaitkūnienė V, Varnaitė V, Rančelis. 2004b. Interaction of barley *tweaky spike* and *laxatum* mutations in F₁ hybrids. *Biologija* 4: 10–15.

249. Vaitkūnienė V. 1992. Genetiškai nestabilių miežių mutantų *tw* ir *tw₂* genetinė analizė ir ypatybės [Biologijos mokslų kandidato disertacija]. Vilnius: Vilniaus universitetas.
250. Vanneste S, Friml J. 2009. Auxin: A trigger for change in plant development. *Cell* 136: 1005–1016.
251. Vollbrecht E, Reiser L, Hake S. 2000. Shoot meristem size is dependent on inbred background and presence of the maize homeobox gene, *knotted1*. *Development* 12: 3161–3172.
252. Wagstaff C, Chanasut U, Harren FJ, Laarhoven LJ, Thomas B, Rogers HJ, Stead AD. 2005. Ethylene and flower longevity in *Alstroemeria*: relationship between tepal senescence, abscission and ethylene biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 56(413): 1007–1016.
253. Walton JD. 2006. HC-toxin. *Phytochemistry* 67: 1406–1413.
254. Wang DH, Li F, Duan QH, Han T, Xu ZH, Bai SN. 2010a. Ethylene perception is involved in female cucumber flower development. *The Plant Journal* 61(5): 862–872.
255. Wang H, Stier G, Lin J, Liu G, Zhang Z, Chang Y, Reid MS, Jiang CZ. 2013. Transcriptome changes associated with delayed flower senescence on transgenic *Petunia* by inducing expression of *etr1-1*, a mutant ethylene receptor. *PLoS ONE* 8(7):e65800. doi:10.1371/journal.pone.0065800.
256. Wang Y, Gu X, Yuan W, Schmitz RJ, He Y. 2014. Photoperiodic control of the floral transition through a distinct polycomb repressive complex. *Developmental Cell* 28: 727–736.
257. Wang K, Tang D, Hong L, Xu W, Huang J, Li M, Gu M, Xue Y, Cheng Z. 2010b. *DEP* and *AFO* regulate reproductive habit in rice. *PLoS Genetics* 6(1): e1000818. doi:10.1371/journal.pgen.1000818.
258. Whipple CJ, Hall DH, DeBlasio S, Taguchi-Shiobara F, Schmidt RJ, Jackson DP. 2010. A conserved mechanism of bract suppression in the grass family. *The Plant Cell* 22: 565–578.
259. Williams-Carrier RE, Lie YS, Hake S, Lemaux PG. 1997. Ectopic expression of the maize *kn1* gene phenocopies the *Hooded* mutant of barley. *Development* 124: 3737–3745.
260. Woodward AW, Bartel B. 2005. Auxin: Regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* 95: 707–735.
261. Wuriyanghan H, Zhang B, Cao WH, Ma B, Lei G, Liu YF, Wei W, Wu HJ, Chen LJ, Chen HW, Cao YR, He SJ, Zhang WK, Wang XJ, Chen SY, Zhang JS. 2009. The ethylene receptor *ETR2* delays floral transition and affects starch accumulation in rice. *Plant Cell* 21(5): 1473–1494.
262. Zahn LM, Kong HZ, Leebens-Mack JH, Kim S, Soltis PS, Landherr LL, Soltis DE, Depamphilis CW, Ma H. 2005. The evolution of the *SEPALLATA* subfamily of MADS-box genes: a preangiosperm origin with multiple duplications throughout angiosperm history. *Genetics* 169: 2209–2223.
263. Zanotti CA, Pozner R, Morrone O. 2010. Understanding spikelet orientation in Paniceae (Poaceae). *American Journal of Botany* 97: 717–729.
264. Zhang L, Cheng Z, Qin R, Qiu Y, Wang JL, Cui X, Gu L, Zhang X, Guo X, Wang D, Jiang L, Wu CY, Wang H, Cao X, Wan J. 2012. Identification and

- characterization of an epi-allele of FIE1 reveals a regulatory linkage between two epigenetic marks in rice. *Plant Cell* 24(11): 4407–4421.
265. Zhao T, Ni Z, Dai Y, Yao Y, Nie X, Sun Q. 2006. Characterization and expression of 42 MADS-box genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Genetics and Genomics* 276: 334–350.
266. Zheng M, Wang Y, Wang Y, Wang C, Ren Y, Lv J, Peng C, Wu T, Liu K, Zhao S, Liu X, Guo X, Jiang L, Terzaghi W, Wan J. 2015. *DEFORMED FLORAL ORGAN1 (DFO1)* regulates floral organ identity by epigenetically repressing the expression of OsMADS58 in rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist*. doi: 10.1111/nph.13318.
267. Zhu L, Liu D, Li Y, Li N. 2013. Functional phosphoproteomic analysis reveals that a serine-62-phosphorylated isoform of ethylene response factor110 is involved in *Arabidopsis* bolting. *Plant Physiology* 161(2): 904–917.
268. Žilinskaitė S. 1987. Osobennosti nestabilnogo belkovovo mutanta jačmenia „oščipannyj kolos“ i jego revertantnyh sublinij [Biologijos mokslų kandidato disertacija]. Minsk: Institut genet. i citol.
269. Žukas K, Šulcaitė S, Kleizaitė V. 2000. Evaluation of genomic damage detected by SCGE assay and relation with SOD spectrum in barley. *Biologija* 4: 33–36.
270. Žvingila D, Vaitkūnienė V, Patamsytė J, Leistrumaitė A, Staniūtė M, Balčiūnienė L, Čėsniienė T, Kleizaitė V, Šiukšta R, Rančelis V. 2012. DNA polymorphism and agronomic traits of revertants from barley (*Hordeum vulgare* L.) mutant tw. *Žemdirbystė=Agriculture* 99(2): 139–148.