

Zárójelentés

OTKA TO 37861

Az ACC-szintáz gén expressziójának vizsgálata a szamóca hazai fajtáiban és azok antiszensz ACC-szintáz génnel transzformált vonalaiban

Témavezető

**Kiss Erzsébet
egyetemi tanár**

Gödöllő
2006

Tartalomjegyzék

1. Érés-specifikus gének azonosítása cDNS-AFLP-vel	3
1.1. Az aszmagban expresszáldó gének funkcionális csoportosítása	5
1.2. A zöld gyümölcsben expresszáldó gének funkcionális csoportosítása	8
1.3. Az érés során expresszáldó gének funkcionális csoportosítása.....	10
2. Az etilén bioszintézisében szerepet játszó gének izolálása szamócaból	12
2.1. A szamóca ACC-szintáz izolálása és expressziós mintázata	12
2.1.1. A <i>FaACS</i> promoterének izolálása, bioinformatikai elemzése	14
2.2. A szamóca ACC-oxidáz izolálása és expressziós mintázata.....	16
2.3. A szamóca CTR1 izolálása és jellemzése	18
2.3.1. A <i>FaCTR1</i> promoter izolálása, bioinformatikai elemzése	19
3. Az izolált gének funkcionális elemzése.....	20
3.1. Új konstrukciók előállítása, és <i>Agrobacterium tumefaciens</i> transzformációja a szamóca géneket hordozó rekombináns vektorokkal	21
3.2. Szamócalevelek hajtásregenerációja	21
3.3. Transzformáció <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -szel	22
4. Összefoglalás	23
5. Irodalomjegyzék	24

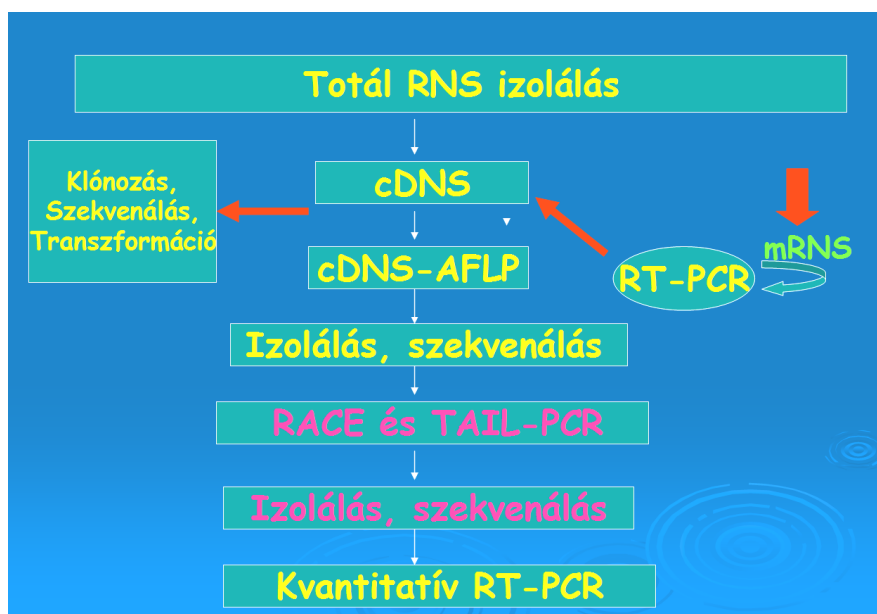
Az ACC-szintáz gén expressziójának vizsgálata a szamóca hazai fajtáiban és azok antiszensz ACC-szintáz génnel transzformált vonalaiban

A gyümölcsök utóérő vagy nem-utóérő kategóriákba való besorolása az etilénnek az érésben betöltött szerepe alapján történik. Míg a klimaktérikus érés mechanizmusáról sok adat áll rendelkezésre a nem-klimaktérikus érés molekuláris alapjait illetően még sok a tisztázatlan kérdés. A nem-klimaktérikus gyümölcsök - így az e csoportba tartozó szamóca esetében is - az etilénnek az érésben betöltött szerepét vagy elhanyagolhatónak tartják vagy vitatják. Ugyanakkor több faj esetében - grapefruit (Mullins et al., 2000), zöld citrom (Kluge et al., 2003), narancs (Porat et al., 1999), ananász (Selvarajah et al., 2001) - kísérletesen *indirekte* bizonyították az etilén hatását, azaz etilén-gátlókkal sikerült az érést késleltetni, a gyümölcsök eltarthatóságát meghosszabbítani. Ananászból érés indukálta ACC-szintáz géneket is sikerült izolálni (Cazzonelli et al., 1998). Az OTKA pályázat - címében - elsősorban az ACC-szintáz gén expressziójának vizsgálatára koncentrált, 2003-ban azonban a kísérleteket a szamóca érésében szerepet játszó gének azonosítására és jellemzésére is kiterjesztettük. Így az elvégzett kutatások három csoportba foglalhatóak:

1. Érés-specifikus gének azonosítása a szamócában cDNS-AFLP módszerrel
2. Az etilénbioszintézisben szerepet játszó gének izolálása szamócából
3. Az izolált gének funkciójának elemzése genetikai transzformációval

1. Érés-specifikus gének azonosítása cDNS-AFLP-vel

A szamóca érése során expresszálandó gének azonosítására a cDNS-AFLP, RT-PCR, RACE és TAIL-PCR módszereket alkalmaztunk (1. ábra).



1. ábra: A szamóca gyümölcs fejlődése során expresszálandó gének izolálásának sémája.

A cDNS-AFLP technikát (Breyne et al., 2003) a kutatási programban résztvevő Balogh Andrea, Ph.D. hallgató Belgiumban sajátította el és alkalmazta féléves Marie Curie ösztöndíjas tanulmányútja során. A fragmentumok felszaporítását és szekvenálását itthon végeztük az OTKA T 037861 pályázat támogatásával.

A cDNS-AFLP érzékeny, reprodukálható és kvantifikálható módszer, amely előzetes szekvencia információ nélkül teszi lehetővé új gének detektálását, homológ gének megkülönböztetését. Hátránya, hogy viszonylag rövid fragmentum méretet szaporít fel, a teljes genom analíziséhez sok primerkombinációra van szükség, és az új gének azonosítása szekvenálást igényel.

A kísérletekhez kontroll és 1-MCP-vel (1-metilciklopropén: etilén inhibitor) kezelt szamóca gyümölcsöket használtunk, amelyek a 2. ábrán bemutatott négyféle érési stádiumban voltak. A gyümölcshúsból és az aszmagból össz-RNS-t izoláltunk (Salzman et al., 1999), majd cDNS-t szintetizáltunk. A cDNS-AFLP-t 48 primer kombinációval végeztük el (^{33}P jelölt BstT / C + NN / Mse + NN). A transzkriptumok kvantitatív értékelését AFLP-Quantar™ (Keygene), a klaszter analíziseket Cluster és TreeView programmal hajtottuk végre (de Smet et al., 2002).

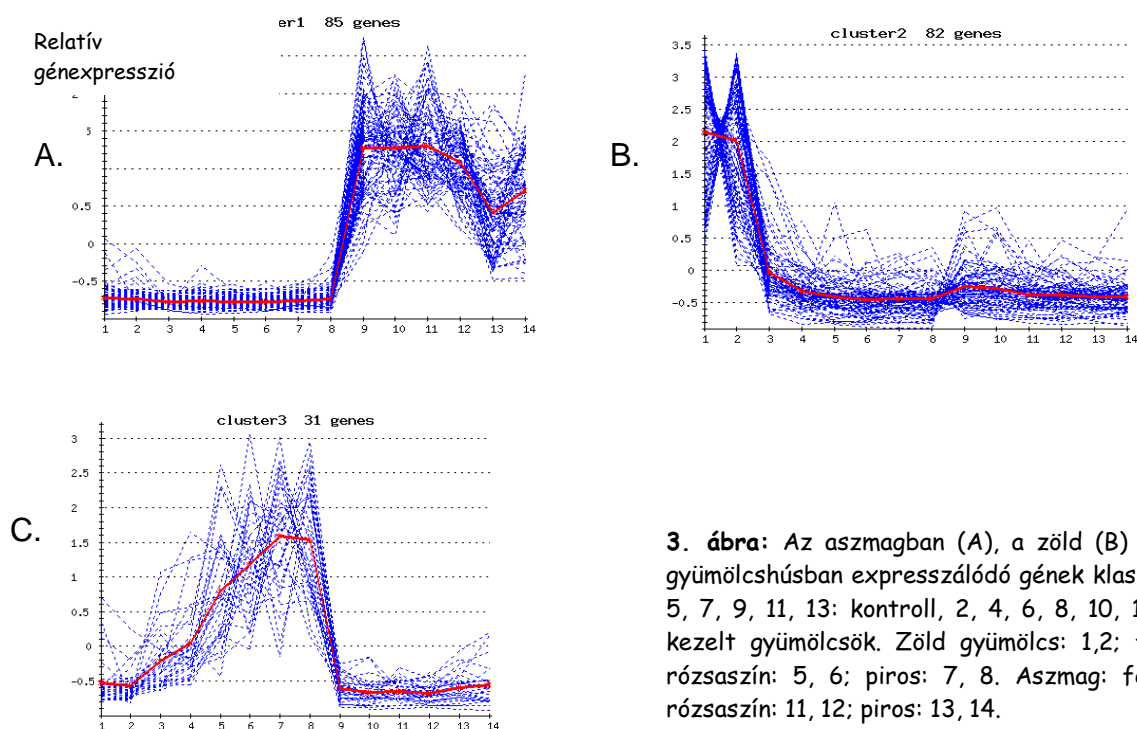


2. ábra: A szamóca négy érési stádiuma: zöld, fehér, rózsaszín és piros gyümölcs

A cDNS-AFLP géleken 1403 fragmentumot összegeztünk. Az AFLP-QuantarPro adatok normalizálása után 290 olyan differenciáltan expresszázó TDF-t (TDF: Transcript Derived Fragment) találtunk, amelyek CV értéke >1 . A hierarchikus klaszterelemzés után (Eisen et al., 1998), a differenciáltan expresszázó gének három nagy csoportot alkottak: az aszmagban, a zöld gyümölcshúsból, a gyümölcshús érése során expresszázó gének csoportja (3. ábra).

A legnagyobb csoportba a 120 aszmag specifikus fragmentum tömörül, a többi transzkriptum a zöld gyümölcshúsból (86 TDF) valamint az érés során akumulálódott (84 TDF). Az expressziós mintázatuk, valamint a sávok izolálásra való alkalmasságuk alapján (méret, élesség) 130 TDF-et izoláltunk majd szekvenáltunk. Ezeknek a szekvenciáknak 36%-a gyümölcshús és érés specifikus, 30%-uk a zöld gyümölcsre jellemző, tehát expressziójuk az érés előrehaladtával gátlódik, és a TDF-ek 34%-a aszmag specifikus. A BLAST keresés eredménye alapján valamennyi TDF-et funkcionális kategóriákba soroltuk. A szekvenált TDF-ek többsége (34% az érett gyümölcsben, 47% a zöld gyümölcsben és 50% az aszmagban expresszázó gének közül) nem mutatott ismert szekvenciákkal homológiát, vagy a homológia értéke kisebb volt a megszabott küszöbértéknél ($E < e-0,002$).

Valamennyi $E < e-0,002$ -vel rendelkező szekvenciát elküldtünk az NCBI GenBank adatbázisába, azonosító számuk az 1., 2., és 3. táblázatban van feltüntetve. A táblázatokban feltüntetett homológiák csak öt esetben azonosak a GenBankba már leadott szamóca génekkel, és másik hét szekvencia hasonló a *Rosaceae* családba tartozó fajok génjeivel, ami azt mutatja, hogy az adatbázisokban kevés a szamóca génekre vonatkozó információ.

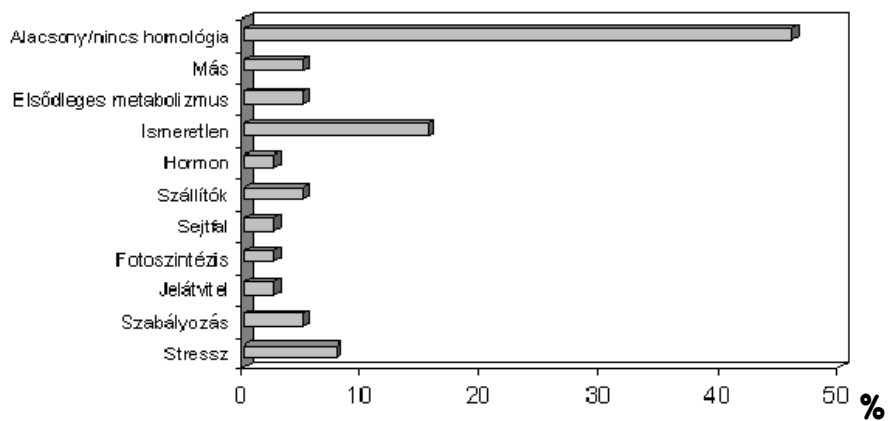


3. ábra: Az aszmagban (A), a zöld (B) és piros (C) gyümölcshúsban expresszáldó gének klasztere; : 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13: kontroll, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14: MCP-kezelt gyümölcsök. Zöld gyümölcs: 1,2; fehér: 3, 4; rózsaszín: 5, 6; piros: 7, 8. Aszmag: fehér: 9, 10; rózsaszín: 11, 12; piros: 13, 14.

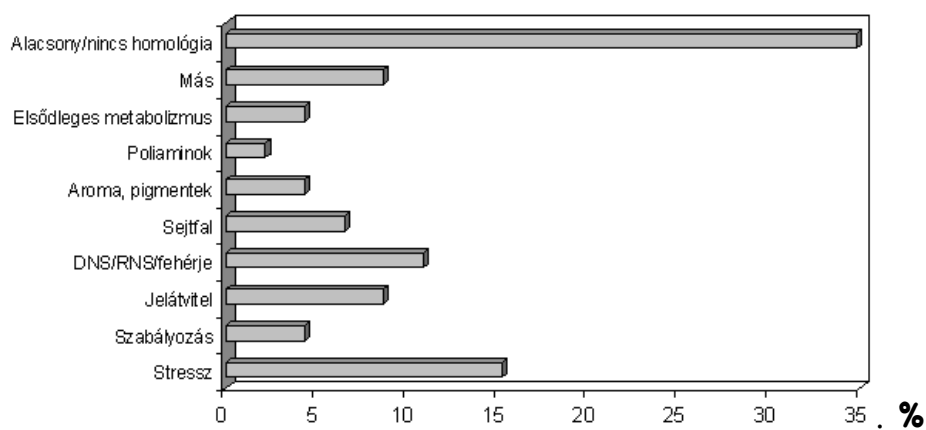
1.1. Az aszmagban expresszáldó gének funkcionális csoportosítása

Az aszmag transzkriptumainak vizsgálata két megfontolásból történt: egyrészt gyümölcshús és aszmagban közös szabályozóelemek azonosítása volt a cél, másrészt a gyümölcshús-specifikus gének elkülönítése a mindkét szövettípusban működő génektől. Az, hogy a gyümölcshústól élesen elkülönülő aszmag-specifikus TDF-ek (3. ábra) egy klaszterbe csoportosultak azt mutatja, hogy az aszmag érése során nincs szignifikáns változás a génexpressziós mintázatban. Hasonló eredményekről számol be Aharoni és O'Connell (2002), microarray módszerrel a gyümölcsben megfigyelt génexpressziós változásokhoz képest az aszmagban szintén nem tapasztaltak szignifikáns mintázatbeli eltérést. A 120 aszmag-specifikus TDF közül 40-et szekvenáltunk meg. Ezeknek 50%-a vagy csak kismértékű hasonlóságot ad vagy egyáltalán nem mutat homológiát génbanki szekvenciákkal (4. ábra: C). A következő nagyobb csoportot a 7 (12,5%), ismeretlen funkciójú fehérjét kódoló klónok reprezentálják. A TDF-ek 10%-a (4 klón) stressz és védekezési reakciókban résztvevő transzkriptumokat foglal magába. Ez a géncsoport az aszmag érése során stressz és kiszáradás toleranciát biztosít.

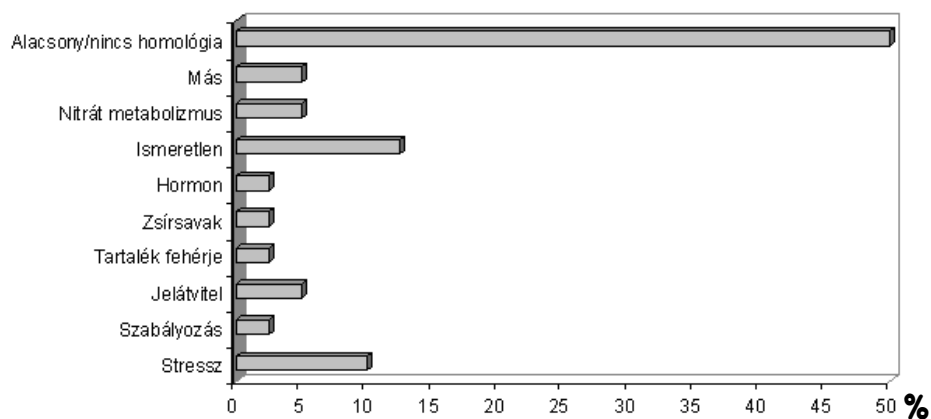
A.



B.



C



4. ábra: A cDNA-AFLP fragmentumok funkcionális csoportosítása. A: zöld gyümölcsben expresszáldó TDF-ek, B: az érés során expresszáldó TDF-ek, C: aszmag specifikus TDF-ek.

1. táblázat: Az aszmagból izolált transzkriptumok és homológiájuk

cDNS-AFLP fragmentum	GenBank azonosítási szám	Feltételezett azonosság	Feltételezett funkció	Azonosító szám; a faj neve, amellyel homológiát mutat	E érték
C11M31M014	DQ074726	ACP5 (5-ös típusú sav foszfatáz)	Ismeretlen	NP_566587 <i>Arabidopsis</i>	5e-10
C11M31M015	AAT46620	Citokróom P450	Ismeretlen	BAD06417 <i>Asparagus officinalis</i>	2e-14
C11M32M003	AY695666	Nitrilázszerű fehérje	Hormon metabolizmus	AAG52493 <i>Arabidopsis</i>	1e-17
C11M34M001	AY912491	Nitrit redukáz	Nitrát metabolizmus	AB061671 <i>Prunus persica</i>	2e-75
C11M34M002	DQ022747	Kálium csatorna	Ismeretlen	CAB62555 <i>Daucus carota</i>	5e-14
C13M13M002	AJ315844*	Lipid transzfer fehérje gén lpt46	Zsírsavak	AJ315844 <i>Fragaria ananassa</i>	3e-06
C14M12M004	AY679585	Hősokk fehérje	Stressz	AAN74634 <i>Pisum sativum</i>	7e-17
C14M13M001	AY679586	48-kDa glikoprotein prekursor	Ismeretlen	AAL86739 <i>Corylus avellana</i>	1e-30
C14M13M002	AY679613	RING cink-ujj	Szabályozás	NP_178507 <i>Arabidopsis</i>	1e-25
C14M21M003	DQ022746	Kalmodulin-kötő fehérje	Jelátvitel	NP_565379 <i>Arabidopsis</i>	8e-06
C14M31M001	AY679587	Feltételezett foszfatáz 2C (PP2C)	Jelátvitel	At2g29380 <i>Arabidopsis</i>	1e-10
C14M33M002	AY679588	Feltételezett nitrát transzporter	Nitrát metabolizmus	BAB56042 <i>Oryza sativa</i>	5e-25
C14M33M003	AY679589	Kis hősokk fehérje	Stressz	P30222 <i>Petunia x hybrida</i>	1e-40
C23M12M004	AY633995	β -amirin szintáz	Triterpén metabolizmus	BAB83088 <i>Betula platyphylla</i>	2e-37
C23M21M002	AY679590	Tartalékfehérje	Tartalékfehérje	1905429A <i>Theobroma cacao</i>	4e-23
C23M21M004	AY679591	1-cisz peroxiredoxin	Stressz	AAF12782 <i>Fagopyrum esculentum</i>	4e-25
C23M31M002	AY679592	UDP-glükuronoziltranszferáz	Szénhidrát anyagcsere	AAB99950 <i>Pisum sativum</i>	1e-04
C23M31M009	AY633994	Citokróom P450	Ismeretlen	CAA70575 <i>Nepeta racemosa</i>	2e-16
C23M33M006	X15590*	18S riboszmális rRNS	Ismeretlen	X15590 <i>Fragaria ananassa</i>	3e-08
C24M43M002	AY912490	Feltételezett auxin-független növekedés serkentő	Ismeretlen	BAD69015 <i>Oryza sativa</i>	6e-23

(* Az NCBI adatbankjába már leadott szamóca gének)

1.2. A zöld gyümölcsben expresszáldó gének funkcionális csoportosítása

A 86 zöld gyümölcshúsban jelen levő TDF közül 39-et szekvenáltunk. A szekvenciák 46%-ával nem találtunk homológiát, míg 6 fragmentum (18%) valószínűleg ismeretlen funkciójú fehérjéket kódol (4. ábra: A). Expressziós mintázatuk alapján a zöld gyümölcsben jelen levő TDF-ek élesen elkülönülnek az érés indukálta gének csoportjától, ami összhangban van a zöld és érett gyümölcsökben lezajló, eltérő élettani és biokémiai folyamatokkal. Ebben a stádiumban (közepes méretű zöld gyümölcs), az egyik meghatározó folyamat az auxin hatására történő sejt- és gyümölcsnövekedés.

Két, sejtnövekedésben kulcsszerepet betöltő, gént azonosítottunk. Az egyik, (C13M214M008), a szamóca β -galaktozidázal homológ (Fa β gal3), sejtfal hidroláz, ami reverzibilis sejtfallazulást okoz, más sejtfalmódosító fehérjékkel közösen. Trainotti et al., (2001) már bizonyította hogy a β -galaktozidáz gén expressziója intenzív a virágban és a fiatal gyümölcsben, majd fokozatosan csökken a gyümölcs fejlődése és érése során, és szinte detektálhatatlanná válik a piros gyümölcsben. Trainotti et al. (2001) arról is beszámol, hogy a Fa β gal3 expressziós mintázatával ellentétben a β -galaktozidáz két másik izoformáját (Fa β gal1 és Fa β gal2) az érés indukálja, amelyek a sejtfal szétesésében játszanak szerepet.

A sejtnövekedésért felelős másik gén a (C24M43M007) a transzport funkciót ellátó gének csoportjába tartozik és egy, az almából izolált MdPIP1 (BAD14371) plazma membrán fehérjét (aquaporin) kódoló génnel homológ. A Fa β gal3-al együtt a gyümölcs növekedése során a sejt expanzióért a víz homeosztázisának fenntartása révén lehet felelős (Hu et al., 2003).

A hormon metabolizmus csoportját egy TDF, a feltételezett nitriláz-rokon fehérjét kódoló klón (C11M32M003) képviseli, a zöld gyümölcsben és aszmagban egyaránt jelen van, és a transzkriptum akkumulációja az érés során csökken.

A zöld gyümölcsben jelenlevő, stressz indukálta transzkriptumok csoportja kisebb hányadot (7,7%) tesz ki, ide tartozik egy peroxidázt (C24M32M014), poligalakturonázt gátló fehérjét (C14M21M010) és egy ubiquitin specifikus proteáz 26-ot (C24M24M013) kódoló transzkriptum.

A szabályozásban szerepet játszó gének csoportját két klón képviseli: a C14M13M002 fragmentum egy RING-finger fehérjét, a C12M11M006 pedig egy BEL1-rokon homeotikus fehérjét kódol. *Arabidopsis*-ban a BEL1 a magkezdemény fejlődéséért felelős az AGAMOUS gén gátlása révén (Ray et al., 1994).

1. táblázat: A zöld gyümölcsből izolált transzkriptumpok és homológiájuk

cDNS-AFLP fragmentum	GenBank azonosító szám	Feltételezett azonosság	Feltételezett funkció	Azonosító szám, a faj neve, amellyel homolog	E érték
C11M32M003	AY695666	Nitriláz szerű fehérje	Hormon metabolizmus	AAG52493 <i>Arabidopsis</i>	1e-17
C11M32M009	AY679616	Feltételezett citokróm P450	Ismeretlen	NP_192969 <i>Arabidopsis</i>	2e-14
C11M32M010	AY642688	Feltételezett mitokondriális szállító fehérje	Szállítók és hordozók	T00435 <i>Arabidopsis</i>	1e-07
C11M33M010	AY946036	Feltételezett AAA-típusú ATPáz	Elsődleges anyagcsere	AAO72381 <i>Oryza sativa</i>	5e-17
C11M34M012	AY679606	Kalretikulin 3	Jelátvitel	AY336743 <i>Brassica rapa</i>	8e-20
C12M11M005	AY679601	Mal d1 homológ (pruar1gc1)	Ismeretlen	AF020784 <i>Prunus armeniaca</i>	8e-16
C12M11M006	AY946035	BEL1-szerű homeotikus fehérje 30	Szabályozás	AAN03627 <i>Solanum tuberosum</i>	0.002
C12M12M008	AY679600	3-hidroxivajsav-dehidrogenáz-szerű fehérje	DNS/RNS/fehérje	AAM63893 <i>Arabidopsis</i>	1e-28
C13M214M003	AAX23999	Klorofill a/b-kötő CP24 prekursor	Fotoszintézis	AAD27882 <i>Vigna radiata</i>	7e-75
C13M214M008	AJ278705*	Béta-galaktozidáz (beta-gal3)	Sejtfal	AJ278705 <i>Fragaria ananassa</i>	2e-77
C14M12M015	AY679599	Riboszomális fehérje S12 (rps12)	Ismeretlen	AF238068 <i>Gunnera chilensis</i>	1e-05
C14M13M002	AY679613	RING finger fehérje	Szabályozás	NP_178507 <i>Arabidopsis</i>	2e-26
C14M13M006	AY961594	Ismeretlen fehérje	Ismeretlen	BAB02057 <i>Arabidopsis</i>	2e-07
C14M21M010	AY679598	Poligalakturonáz gátló fehérje	Stressz	CAD56505 <i>Cicer arietinum</i>	7e-08
C14M33M016	AY961595	NADH-ubiquinon oxidoreduktáz rokon fehérje	Elsődleges metabolizmus	At5g52840 <i>Arabidopsis</i>	4e-04
C23M13M005	AY679607	Citokróm P450	Ismeretlen	AF386512 <i>Pyrus communis</i>	4e-06
C23M32M007	DQ074727	Feltételezett fehérje	Ismeretlen	BAD38514 <i>Oryza sativa</i>	1e-04
C24M14M002	AY873806	S-adenozil-L-metionin:carboxil	Prosztetikus csoport	NP_683307 <i>Arabidopsis</i>	4e-08

		metiltranszferáz			
C24M24M013	AY679610	Ubiquitin specifikus proteáz 26 (UBP26)	Stressz	NP_566922 <i>Arabidopsis</i>	1e-13
C24M32M014	AY679597	Peroxidáz (Prx2b)	Stressz	AF145348 <i>Glycine max</i>	6e-13
C24M43M007	DQ022749	Plazma membrán fehérje	Szállítók és hordozók	No hit	No hit

* Az NCBI adatbankjába már leadott számóca gének
Az aláhúzott és színes háttérű TDF-ek teljes hosszúságú cDNS-ét azonosítottuk.

1.3. Az érés során expresszáldó gének funkcionális csoportosítása

Az érés által indukált transzkriptumok csoportját a fehér, rózsaszín és piros érési stádiumra jellemző gének alkotják, élesen elkülönülve a zöld gyümölcsben akkumulálódó gének átirataitól, expressziójuk tehát nő az érés során. 47 TDF-et szekvenáltunk meg, ezek 34%-a egyáltalán nem vagy megbízhatatlan homológiát mutatott az adtabázisban szereplő génekkel, így ezekhez a szekvenciákhoz nem tudtunk funkciót hozzárendelni (4. ábra: B). A legnagyobb funkcionális csoportot a stressz válaszban résztvevő gének képviselik. A szabadgyökök hatására bekövetkező peroxidatív károsodás és a membrán integritásának elvesztése jellemzőek az öregedő növényi szövetekre. A szeneszcenciához hasonlóan, a gyümölcsérést is a sejtmembránok károsodása kíséri (Ferrie et al., 1994). A növekvő oxidatív stressz lehet azoknak a fizikai-kémiai változásoknak a háttere, amelyek elősegítik a fanyarka (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) gyümölcsérését (Rogiers et al., 1998). A szintén nem klimatérikus szőlő esetében a stressz-válaszban szerepet játszó fehérjék akkumulációját mutatta ki Davis és Robinson (2000) az érés során. Aharoni et al., (2002) szerint a számóca érésének transzkripció programja oxidatív stressz-indukálta folyamat. Több, valószínűleg oxidatív stressz hatására indukálódó gént is azonosítottunk. A rézvirág *TED2* génjével (quinon oxidoreduktáz) homológ (C24M13M007) számóca génről már bizonyították, hogy az érés és oxidatív stressz hatására aktiválódik (Aharoni et al., 2002), eredményeink szerint a transzkriptum akkumulálódása a rózsaszín stádiumban a legnagyobb és csökken az érett gyümölcsben. A C23M11M001 és C23M43M008 jelzésű TDF-ek egy fitokelatin szintetázal, illetve egy feltételezhetően glutation S-transzferázzal mutatnak homológiát, mindkét génről ismert, hogy éréskor indukálódik. A növények szintetizálnak olyan Cys-gazdag peptideket mint a glutation, fitokelatinok vagy metallotioneinek, a nehézfémek detoxifikációja vagy homeosztázisa céljából (Cobbett, 2000). Ennek a peptid csoportnak számos tagját gyümölcsérés során is kimutatták, például az almában (Reid és Ross, 1997), banánban (Clendennen és May, 1997), számócában (Aharoni és O'Connell, 2002) és ananászban (Moyle et al., 2005).

3. táblázat: Az érés során expresszáldó transzkriptumok és homológiájuk

cDNS-AFLP fragmentum	GenBank azonosító szám	Feltételezett azonosság	Feltételezett funkció	Azonosító szám, a faj neve, amellyel homológ	E érték
C11M33M001	AY679582	Aminosav transzport fehérje AAP1	Szállítók és hordozók	T10100 <i>Ricinus communis</i>	5e-64
C11M33M011	AY679605	Feltételezett GTP-kötő fehérje (DRG)	Jelátvitel	BAC79856 <i>Oryza sativa</i>	7e-13
C11M33M013	AY679583	Glikozil transzferáz család 47	Prosztetikus csoport	NP_565236 <i>Arabidopsis</i>	3e-05
C11M33M014	AY679584	Foszfoplipáz PLDb2	Stressz	AAG45488 <i>Lycopersicon esculentum</i>	7e-30
C11M34M005	AY679581	Transzláció iniciáló faktor	DNS/RNS/fehérje	AF499740 <i>Pisum sativum</i>	3e-40
C12M11M011	DQ011163	LEA4-25	Stressz	AAC49862 <i>Phaseolus vulgaris</i>	3e-12
C12M12M024	AY961593	U3 snoRNP-szerű fehérje	DNS/RNS/fehérje	At4g05410 <i>Arabidopsis</i>	3e-13
C13M214M007	DQ011162	Alkohol dehidrogenáz homológ, érés specifikus	Íz-illatanyag	S39508 <i>Lycopersicon esculentum</i>	5e-13
<u>C14M21M006</u>	AY940166	Receptorszerű fehérje kináz	Jelátvitel	AAM62629 <i>Arabidopsis</i>	1e-12
C14M31M010	AF339024*	Pektát liáz B	Sejtfal bomlás	AF339024 <i>Fragaria ananassa</i>	
C14M33M006	AY679611	Szedoheptulóz-1,7-bifoszfátáz prekursor	Elsődleges metabolizmus	AY188797 <i>Oryza sativa</i>	2e-49
C23M11M001	AY642687	Fitokelatin szintetáz	Stressz	BAB10641 <i>Arabidopsis</i>	7e-65
C23M12M001	DQ012968	Feltételezett stressz-válasz fehérje	Stressz	AAT01418 <i>Tamarix androssowii</i>	4e-34
C23M21M001	AY679609	Kináz 2	Jelátvitel	AAA34017 <i>Glycine max</i>	7e-15
C23M21M011	DQ022748	Feltételezett endo-1,3;1,4- β -D-glükánáz	Sejtfal	AAU10802 <i>Oryza sativa</i>	1e-15
C23M24M006	AY679593	18S riboszomális RNS gén	DNS/RNS/fehérje	AF321262 <i>Vitis riparia</i>	1e-27
C23M31M001	AY679594	Feltételezett integráz	DNS/RNS/fehérje	AAD04177 <i>Oryza sativa</i>	1e-38
C23M33M002	AY679608	Flavonon-3-hidroxiláz	Flavonoid út	AB074486 <i>Malus x domestica</i>	3e-43

C23M33M014	AY642689	Feltételezett 3b splicing faktor	DNS/RNS/fehérje	BAD10377 <i>Oryza sativa</i>	7e-11
<u>C23M42M006</u>	AY679604	AAA-típusú ATPáz	Elsődleges metabolizmus	NP_849842 <i>Arabidopsis</i>	e-119
C23M43M001	AY679602	Sebzés indukálta P450 hidroxiláz	Stressz	AAG09208 <i>Pisum sativum</i>	2e-19
C23M43M008	AAW82451	Glutation S-transzferáz	Stressz	Q03666 <i>Nicotiana tabacum</i>	2e-30
C24M13M007	AY679595	Quinon oxidoreduktáz homológ	Stressz	T11672 <i>Vigna sinensis</i>	4e-07
C24M14M001	AY679596	Feltételezett beta-coat fehérje	Szállítók és hordozók	NP_913038 <i>Oryza sativa</i>	2e-46
<u>C24M14M007</u>	DQ074728	Spermidin szintáz	Poliamin metabolizmus	AB072915 <i>Malus x domestica</i>	0.015
C24M31M004	AAX09335	Feltételezett foszfatidilinozitol glikán	Sejtfal	NP_187374 <i>Arabidopsis</i>	2e-45
<u>C24M33M004</u>	AY679615	bHLH fehérje (SPATULA)	Szabályozás	NP_568010 <i>Arabidopsis</i>	2e-40
C24M33M008	AY171598*	UDP-glükózil transzferáz	Szénhidrát anyagcsere	AY171598 <i>Fragaria ananassa</i>	
<u>C24M33M010</u>	AY679612	Kináz	Jelátvitel	NP_177209 <i>Arabidopsis</i>	5e-04
C24M44M001	AY679603	Glikozil transzferáz	Prosztetikus csoport	NP_178963 <i>Arabidopsis</i>	4e-42
<u>C24M44M003</u>	AY679614	Feltételezett HD-zip fehérje	Szabályozás	AAT39931 <i>Solanum demissum</i>	0.016

* Az NCBI adtabankjába már leadott számóca gének

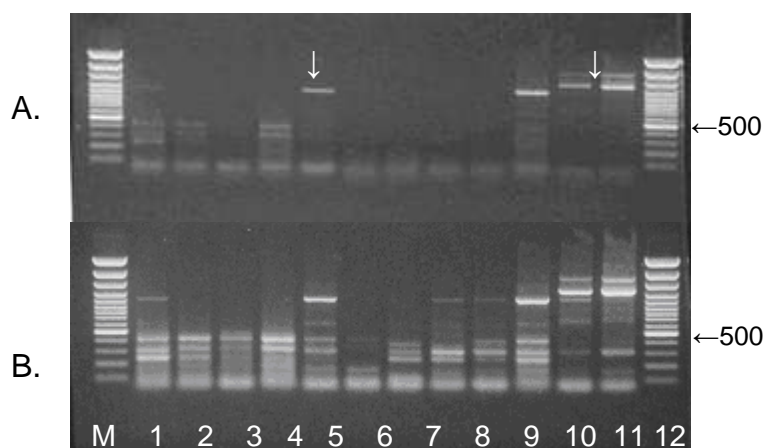
Az aláhúzott és színes háttérű TDF-ek teljes hosszúságú cDNS-ét már azonosítottuk.

2. Az etilén bioszintézisében szerepet játszó gének izolálása számócaból

Az etilén bioszintézisében szerepet játszó gének számócaból történő izolálása során Cazzonelli et al., (1998) közleményéből indultunk ki, amely arról számolt be, hogy a nem-klimaktérikus gyümölcsök kategóriájába tartozó ananászból érés indukálta ACC-szintáz és ACC-oxidáz cDNS-eket izoláltak. A cDNS izolálásához RNS izolálást RT-PCR technikát alkalmaztunk.

2.1. A számóca ACC-szintáz izolálása és expressziós mintázata

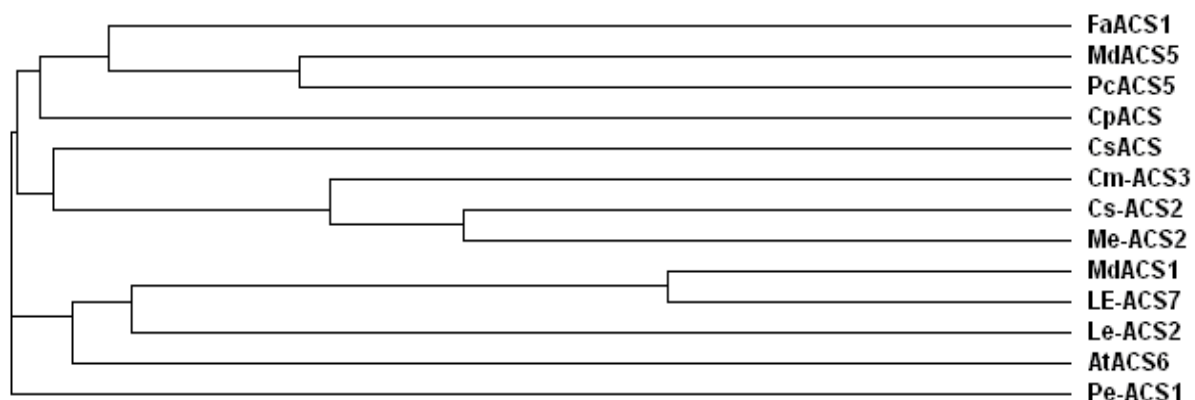
A Cazzonelli et al., (1998) által leírt degenerált ACS-F és ACS-R primerekkel 1200 bp-nyi fragmentumot amplifikáltunk cDNS templárról és 1300 bp-nyit genomi DNS-ről (5. ábra). Szemi-kvantitatív RT-PCR-el, 25 PCR ciklus után a transzkriptum zöld, *Botrytis cinerea*-val fertőzött érett gyümölcsben és az inda csúcsi részében volt detektálható (5. ábra: A.). 35 PCR ciklus után a transzkriptum detektálható volt az öreg levélben és indában is (5. ábra: B.).



5. ábra: Az ACS-F és ACS-R primerpárral RT-PCR-ben felszaporított ampliconok. **A.**: 25 PCR ciklus, **B.**: 35 ciklus. 1., 2., 3., 4. minták: zöld, fehér, rózsaszín és érett érési stádiumban levő gyümölcshús, 5. és 6. *Botrytis cinerea*-val fertőzött érett és túlérlett gyümölcs. 7. fiatal levél, 8. öreg levél, 9. inda, 10. inda csúcsa, 11., 12. genomi DNS. M: DNS molekulatömeg marker (Fermentas, GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus: 3.0, 2.0, 1.5, 1.2, 1.031, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 kb). Az 1200 bp és 1300 bp fragmentumokat nyilak jelölik.

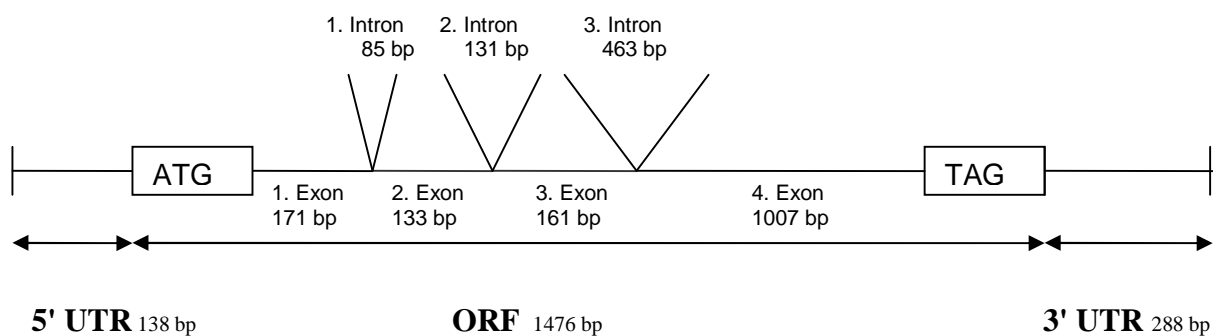
A teljes hosszúságú cDNS-t zöld gyümölcsből izoláltuk 5' és 3' RACE. A 1902 bp-nyi cDNS 138 bp 5' és 288 bp 3' UTR által határolt 1476 bp ORF-ből áll. Az izolált ACS gén elnevezése *FaACS*, hivatkozási száma a GenBankban: AY661301. Nukleotid szinten a legnagyobb homológiát (84%) az alma (*Malus domestica* L.) *MdACS-5B* (AB034993) génjével valamint a körte (*Pyrus communis* L.) *PcACS5* (AF386523) (84%) génjével mutatta. Fehérje szinten szintén az alma *MdACS5* (BAA92351) és körte *PcACS* génjével (AAL66205) mutatta a legnagyobb azonosságot (71%, illetve 70%). Nagyfokú hasonlóságot (65% , illetve 66%) mutat továbbá a szintén nem klimaktérikus gyümölcsök csoportjába tartozó narancs (*Citrus sinensis* L.) *ACS* génjével (CAB60721), valamint a papaja (*Carica papaya* L.) *ACC* szintázzsal (AAC98809).

A kladogram alapján (6. ábra) a *FaACS* egy klaszterben van a *Rosaceae* család többi ACS génjeivel (*MdACS5*, *PcACS5*), bár ezek a fajok gyümölcserést tekintve klimaktérikusak, és távolabb helyezkedik el a nem-klimaktérikus fajok ACS génjétől. A szamóca *FaACS* génnel mind nukleotid mind fehérje szinten legnagyobb homológiát mutató alma *ACS-5B* és *ACS-5B* géneket (Sunako et al., 2000) levélből izolálták és expressziójuk sebzés hatására indukálódik. A *FaACS*-el szintén nagy homológiát mutató körte *PcACS5* gént gyümölcsből izolálták, de expressziójának szabályozásáról nincs adat (El-Sharkawy et al., 2004). A kladogramban a szamóca génhez közelebb helyezkedik el a citrom ACS génje, és távolabb az aktív centrumban is különbséget mutató szintén *Rosaceae* családba tartozó *MdACS* valamint a paradicsom *LeACS2* génje, amelyek a gyümölcserés során etilén hatására indukálódnak (Lay-Yee és Knighton, 1995, Barry et al., 2000). A kladogram tehát viszonylag jól tükrözi a fajok rokonsági viszonya mellett, a különböző ACS izoformák fiziológiai szerepe közti hasonlóságot is (6. ábra).



6. ábra: A különböző fajok ACS- génjeinek rokonsági viszonyát ábrázoló kladogram.

A *FaACS* teljes hosszúságú **genomi klón** 2581 bp, 4 exonból és 3 intronból áll (7. ábra), más *ACS* génekhez hasonlóan, mint például az *Le-ACS2* (paradicsom, X59139; Rottmann et al., 1991), *AtACS1* (*Arabidopsis*; Liang et al., 1992) és *MdACS1* (alma, AAA73941; Harada et al., 1997). Az intronok mérete a paradicsom *ACS2* génjében is a szamócééhoz hasonló, az első két intron 91, illetve 84 bp, míg az utolsó 880 bp (Rottmann et al., 1991).



7. ábra: A *FaACS* genomi klón szerkezete.

2.1.1. A *FaACS* promoterének izolálása, bioinformatikai elemzése

A TAIL-PCR-el felszaporított *FaACS* promoter régió hossza 889 bp (8. ábra). A PLANTCARE és PLACE adatbázisok (Rombauts et al., 1999, Higo et al., 1999) segítségével azonosított szabályozó elemek közül említésre méltó a cirkadián ritmus szabályozásában szerepet játszó elem (*CAANNNNATC*) két formája (*CAAATCCATC* és *CAATTGCATC*), amelyet először a paradicsom klorofill a/b-kötő fehérjék promoterében azonosítottak, és a cirkadián szabályozásában vesz részt (Piechulla et al., 1998). *Arabidopsis*-ban több *ACC* szintáz gén működése, illetve az etilén emisszióknak fény-függő, cirkadián szabályozása ismert (Thain et al., 2004), bár a folyamat biológiai jelentősége még nincs feltárva. Jelen vannak különböző stresszválaszért felelős szabályozó elemek, a *CAACTG* motívum két példánya például szárazság indukálhatóságért felelős MYB transzkripció faktor kötőhely (Abe et al., 2003). A *TTTGACT* szekvencia elicitor válaszreakcióért felelős, a *WRKY* gének promoterében azonosították, ezek a transzkripció faktorok a korai védekezési válaszban résztvevő gének működését szabályozzák

(Eulgem et al., 1999). A TGTCTC motívum auxinválaszért felelős, a korai auxinválasz génjeinek promoterében ARF1 (auxin response factor) kötő helyként azonosították (Ulmasov et al., 1999). Az ACGT szekvencia etioláláskor indukálja a génexpressziót, az *Arabidopsis erd1* (early responsive to dehydration) gén promoterében mutatták ki (Simpson et al., 2003). Az ACCGAGA és ACCGAC abszcizinsav és szárazságstressz válaszáért felelősek (Busk et al., 1997).

cactagtgattatcgagtatggagttaaaaaaaaaagtatattatgTTTTCTTTTTgatatatgtTTTTgttcaa
tcaagcccaccgactccctgaccaattctgcatcttTTTTgtttatacatgattacgtctttattcttcagttcctcagt
tcatattccgctcttctcctagtttctcctccttaaatctcaaaaaatccaaatTTTTggggaaaatTTTTgttgggtttc
aTTTTgtctcTaTTTTcagaatTTTTcttctactttcattgatgcctactttgTTTTgaacttattaacgtctacttgag
ctcttacatTTTTgtatggttgtatctgaaatTTTTgtcctccggctaaatTTgaagcccaccccatatcgaaatctaaga
tccgccactggtgctatTTgagatcgTTggTTcaaatccatcgaagactctcgatgatgtccgcatTTTTcattcatcatta
gagaattgtccgtgtaatTTgtgagTTgtgaccgtgtacctagctaactcgTTTTggttacaaacttcacttggtggtttg
actgaattgagactattatgacagTTaaggTTacctcaataatgcctTggcctTgcatgaagggaaagagaccatgaaac
agcgaatccccaaactggcTTagaatTTacttagTTaaactgattgaaatcaaggcacaacccaactgccaccgagatt
ttcaaatcaaatgTgcaacaattgcatcttcatggaacttccccagaaatcaagaacaaaaagtcttacgcttatttt
aattatcagagccatctgaacagaacctcatccctaactctataaataaacattcaggaagTTgtattctcatccaactac
aaaactattcagTgcatcatcaacaagttcccaaaagca

ACS PRO3

cttgaccatttagctagctcctcttcccccttcttTgtagaattctcattgcactaaaggttagatctttgaggca
cattacaagaacaATGGGATTCACTTTGAGCAACCAACAGCAACTGTTGTCTAAGATAGCAACCGGTA
CCGGAGACAGCGAAAACACTCCATATTTTTGATGGCTGGAAGGCCTTTGATAGTGATCCTTACCATCC
CACCACCAACCCTCAAGGGGTTATTCAGATGGGTCTTGCAGAAAATCAAgtaagaaatTTgaaccagaaacc
ttgtattacaagcaacatatcatctcttggcttttcaactaattggtttctctgtatgcagCTTTCTTTTGTATTTGATCCAAG
AATGGGTTCTGAAAAACCCAGAAGCCT

CCATTTGCACAGCACAAGGAGCAAAAGAATTCAAGGACACAGCCATCTTTCAAGACTATCATG

ACS

PRO2

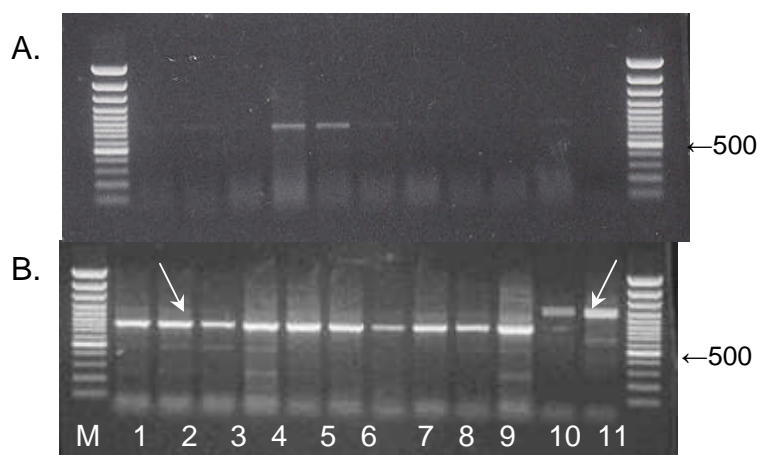
ACS PRO1

GCTTGCCAGAGTTCAGAAATGtatgcattgatcaacatccataaaactttcttagcatcacttgtttaactcactacacaatc
ttaacgaaataacttttagtccaatattaatTTaacaatTTaattattttctttgaaacttccacaggCTGTTGCAAATTTTCAT
GGGAAAAGTGAGAGGAAATCGAGTCAATTCAACCCTGACCGCATTGTTATGAGCGGAGGGCGCAAC
CGGAGTTCATGAGATGATTGCCTTTTGCTTGGCTGATCCCGGAGAGGGATTTCTGGTGCCAGTTCC
TTATTATCCAGGgctaagctagctgattaagtttatcttctaagattgactttgatccaactaagacagggaaaaactaaactaat
tgaggccagttgctaaatTatagaaatTgcaaatTgaaagagactgagttgaccttagtttaagccatccctatgtgtcctt
ggaccagcttgaattattgacgggggaatgaaaacgatctttgtataactaattgccatcatctacctctttgacaaagatgaaagatg
cctcaggaatTtaggaccatttTgacttTtcatctaaaacgacattacgtacgtaacttcatatagtagctagctaacTgcacaaa
tacgtccctagttctcgacgaaggattccatgcttagtagtagaataagaatTTaataaccgTTgatataTTTTccatgggtTgcttt
gctaaataagTTTTgtacttTcattgcaaaATTCGATAGAGATTTGAGATGGCGAACTGGGGTACAGCTTCTT
CCAGTAGCTTGTGAAAGCTCAAACAATTTCAAGATCACGAGAGCAGCCTTGGAAAGATGCCTATGAG
AAAGCACAAAAGGCCAACATCAGAGTTAAAGGCTTGTATTACCAACCCCTCAAACCCACTAGGC
ACAATCTAGACAGAGAGACTCTTAAGAGCTTAGtGaCTTTTCATCaATGAGAAGAACATCCACCTAG
TCTGTGATGAGATCTATGCTGCCACTGTGTTCACTCAGCCTAGGTTTCATCAGCATTGCTGAAATACT
GGAGGAAGAAGATGTAGTATGCAACCGCGACCTGGTTCACATTGTCTAC

AGTCTTTCAAAGACATGGGGTTCCCTGGCTTTAG

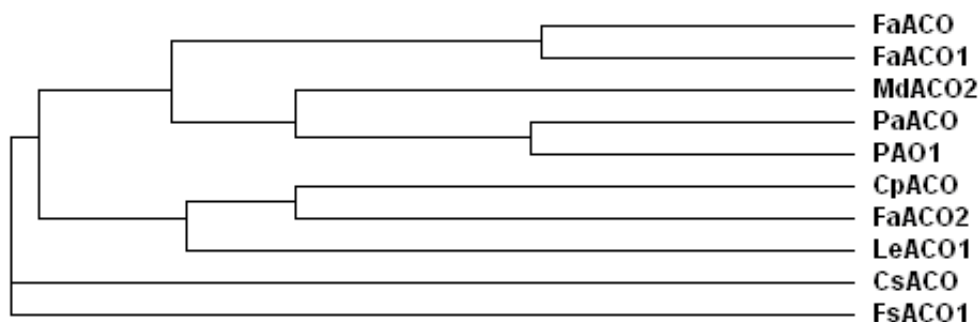
S L S K D M G F P G F R

GGTAAGGAATACGCGCACTCATTACAATGATGCCGTAAGTGGACTGCGCGCGAAAAGATGTCCGAG
GTCTTCGGGTTGGGTTTCTACGCAAACTCAGTGTCTAATTGCATCCATGCTATCAGACAATGAGTTT
GTGGATAGATTCAATTGTAGAAAGTGCTAAGAGGTTGGAAAGCAAGGCACACAAAATTCCTGAGGG



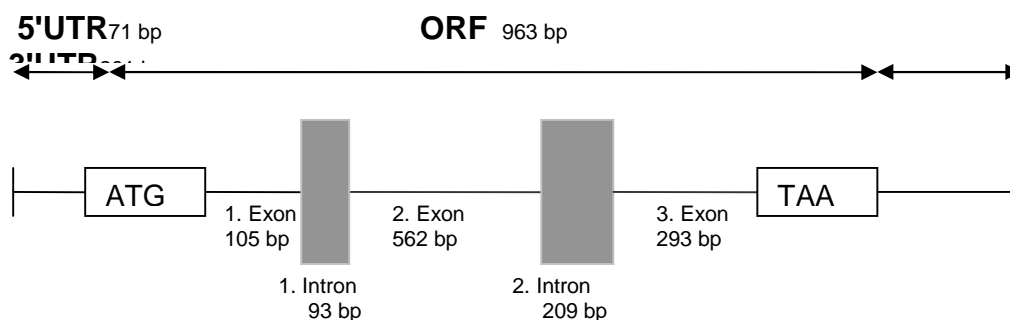
9. ábra: Az *ACO-F* és *ACO-R* primerpárral RT-PCR-el felszaporított fragmentumok. **A.** : 25 PCR ciklus, **B.** : 35 PCR ciklus 1., 2., 3., 4. minták: zöld, fehér, rózsaszín, piros érési stádiumban levő gyümölcs, 5. és 6. *Botrytis cinerea*-val fertőzött érett és túlérett gyümölcs, 7. fiatal levél, 8. öreg levél, 9. inda, 10. inda csúcsa, 11., 12. genomi DNS, M: DNS molekulásúly marker (Fermentas, GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus: 3.0, 2.0, 1.5, 1.2, 1.031, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 kb). A 830 bp és 1200 bp méretű fragmentumokat nyilak jelölik.

A kladogram alapján (10. ábra) a *FaACO* a Trainotti et al., (2005) által leírt *FaACO1*-hez áll a legközelebb, és egy csoportban van a szintén *Rosaceae* családba tartozó alma, kajszli és őszibarack *ACO* fehérjékkel, és távolabb helyezkedik el a szintén Trainotti et al., (2005) által leírt *FaACO2*-től, amely a paradicsom, papaya, citrom *ACO* fehérjékkel van egy klaszterben, legtávolabbi rokonságot a bükk *ACO*-val mutatja (*FsACO1*) (12. ábra B.). A *FaACO1* és *FaACO2* gének részleges cDNS-ek. Elképzelhető, hogy a *FaACO*-val legközelebbi rokonságot mutató *FaACO1* azonos az általunk leközölt génnel, ugyanis az adatbankban meglévő parciális szekvencia aminosavszinten csak 3 aminosavban különbözik az általunk leközölt *ACO* szekvenciától, ami könnyen adódhat szekvenálási hibákból is.



10. ábra: A különböző fajok *ACO*-génjeinek rokonsági viszonyát ábrázoló kladogram.

Bár fehérjeszinten a szamóca és más fajok *ACC* oxidáza közti homológia nagy, a gének szerkezete különböző. A két intronból és három exonból álló szamóca genomi klón (11. ábra) szerkezete eltér az adatbázisokban talált teljes hosszúságú *ACO* genomi klónokétól. A paradicsom *LeACO1* (X58273), a lóhere *TrACO1* (DQ112347), petúnia *PETACO3* (L21978), gének például három hasonló pozíciójú, de méretben eltérő intront tartalmaznak.



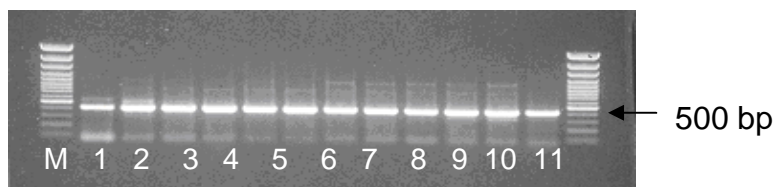
11. ábra. A *FaACO* genomi klón szerkezete.

Expressziós mintázatukat tekintve a *FaACO1* és *FaACO2* az általunk leírt *FaACO* gén mintázatához hasonló, az érés során indukálódik (Trainotti et al., 2005).

2.3. A szamóca *CTR1* izolálása és jellemzése

Az etilén jelátviteli útban az etilén receptorok (*ETR1*, *ERS1*) egy szerin/treonin protein kinázzal, a *CTR1*-el lépnek kölcsönhatásba, amely az etilén jelátviteli út negatív regulátoraként működik (Kieber et al., 1993). Etilén hiányában az etilén receptorok közvetlenül aktiválják a *CTR1* kináz aktivitását, ami foszforilálja a *downstream* célfehérjéket, leállítva az etilén jelátviteli utat. Szamócaban, más növényfajokhoz hasonlóan, az *ETR* géncsalád több tagját is azonosították, a *CTR1*-ről mi számolunk be elsőként.

A *CTR1* degenerált primerpárral (El-Sharkawy et al., 2003) RT-PCR-ben egy 423 bp méretű, fragmentumot szaporítottunk fel (12. ábra).



12. ábra. Az *CTR1-F* és *CTR1-R* primerpárral RT-PCR-el felszaporított fragmentumok. 1., 2., 3., 4. minták: zöld, fehér, rózsaszín, piros érési stádiumban levő gyümölcsbőr, 5. és 6. *Botrytis cinerea*-val fertőzött érett és túlérett gyümölcsbőr, 7. fiatal levél, 8. öreg levél, 9. inda, 10. inda csúcsa, 11., 12. genomi DNS, M: DNS molekulatömeg marker (Fermentas, GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus: 3.0, 2.0, 1.5, 1.2, 1.031, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 kb).

Az RT-PCR-ből származó fragmentum szekvencia információjából kiindulva 5' és 3' RACE-el egy 3073 bp-nyi szekvenciát izoláltunk zöld gyümölcsbőről származó templáton. Ebből 2535 bp kódolja az ORF-et, 538 bp pedig a 3' UTR-t képviseli. A teljes hosszúságú gén nukleotid szinten az alma (*Malus domestica* L.) *CTR1*-el (AY670703) 90%-os, valamint a körte (*Pyrus communis* L.) *CTR1* génnel (AF386508) pedig 88%-os homológiát mutat. A *FaCTR1* (AY538771) fehérje szinten a legnagyobb homológiát (90%) a rózsza (*Rosa hybrida*) *CTR1*-el (AAK40361), valamint egy paradicsom *CTR1*-szerű fehérjével (*LeCTR3*) (AAR89823) (67%) mutatja. A filogenetikai analízisből kitűnik, hogy a *FaCTR1* (a *FaACS* és *FaACO*-hoz hasonlóan) ismét egy *Rosaceae* családba tartozó *CTR1*-szerű fehérjével (AAK40361) mutatja a legközelebbi rokonságot. A körte *CTR1* valószínűleg a részleges szekvencia miatt nem került ebbe a csoportba, hanem jóval távolabb, egy rizs *CTR1*-el (XP_466052) közösen alkotnak egy klasztert (13. ábra).



13. ábra: A különböző fajok *CTR1*-génjeinek rokonsági viszonyát ábrázoló kladogram.

2.3.1. A *FaCTR1* promoter izolálása, bioinformatikai elemzése

A TAIL-PCR-el felszaporított *CTR1* promoter régió hossza 1590 bp. A PLANTCARE és PLACE adatbázisok segítségével azonosított szabályozó elemek közül említésre méltó motívumokat a 11. táblázat tartalmazza.

A szamóca és *Arabidopsis CTR1* (AT5G03730) promotereinek szekvenciaszintű összehasonlításakor sok, azonos felépítésű és feltételezhetően hasonló funkciót ellátó motívumot azonosítottunk a *FaCTR1* promoterében egyszer, az *AtCTR1* promoterben, közvetlenül egymás mellett kétszer fordul elő a $(GA)_8$ ismétlődés (-189 pozícióban), és jelen van egy $(GA)_4$ elem is (-120 pozícióban). A $(GA)_8$ ismétlődés gyakori a növényi genomokban, különösképp jellemző a növényi promoterekre (Santi et al., 2003). GA/TC - ismétlődés - kötő proteinek *Drosophila*-ban *GAGA* vagy *GAF* fehérjékként ismertek (Soeller et al., 1993). A *Drosophila* *GAF* néhány homeotikus gén expressziójáért felelős, kölcsönhatásba lép hősokk és hiszton gének promoterével (Soeller et al., 1993).

2. táblázat: A *FaCTR1* promoterében azonosított szabályozó régiók szekvenciája, szerepük, előfordulásuk száma és helye

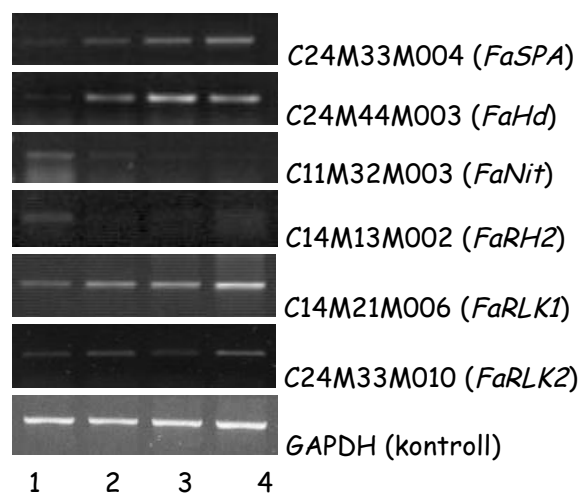
Motívum szekvenciája	Szerepe	Előfordulásának száma és helye	Szerzők
GAAAAA	Patogén és só indukálta stresszválasz	3, -104, -207, -278	Park et al., 2004
TCTCTCTC	Enhancer, nukleáris fehérjékkel történő interakció	2, -140, -130	Pauli et al., 2004
CCAAT	Hőstressz	4, -232, -341, -384, -649	Haralampidis et al., 2002
TTGACC	Elicitor	1, -298	Eulgem et al., 1999
$(GA/TC)_8$	Homeodomén gének szabályozó eleme	1, -524	Santi et al., 2003
CCGAAA	Hidegstressz	2, -240, -322	Dunn et al., 1998
AGCAGC	Anaerob stressz	1, -479	Mohanty et al., 2005
TGTCACA	Enhancer	1, -721	Yamagata et al., 2002
CAANNNNATC	Cirkadián ritmus	1, -1234	Piechulla et al., 1998

ACGTG	Dehidratáció és sötétség indukálta szenezscencia	1, -1523	Simpson et al., 2003
TAACAA	Giberellin válasz	1, -410	Ogawa et al., 2003
CTCTT	Feltételezeten a nodulációban van szerepe	2, -1225,-997	Stougaard et al., 1990

A homeotikus gének elcsendesítésében szerepet játszó *polycomb* válasz elemei szintén tartalmaznak GAF kötő GA ismétlődéseket (Busturia et al., 2001). Növényekben a $(GA/TC)_8$ ismétlődések funkciójáról kevés adat van. *Arabidopsis*-ban az ismétlődés több homeodomén gén promoterében is jelen van. Árpában, a *BKn3* gén expressziójának szabályozása a BBR (barley b recombinant) fehérjének a gén promoterében és intronjában levő $(GA/TC)_8$ ismétlődésekhez való kötődése által történik (Santi et al., 2003). A *BKn3* a homeobox gének csoportjába tartozik és a merisztémák fenntartásában és levélkezdemények kialakulásában játszik szerepet (Santi et al., 2003). Mindkét promoterben jelen vannak a különböző stresszválaszban szerepet játszó szabályozó motívumok, ilyenek például a patogén, só, hő, dehidratáció és sötétség indukálta szenezscenciában, valamint anaerobiózis során fellépő stresszválaszokban résztvevő elemek.

3. Az izolált gének funkcionális elemzése

A leírt gének egy részének funkcionális elemzése már folyamatban van, szensz és antiszensz konstrukciókkal szamócat, paradicsomot (Minitom) és dohányt transzformálunk. Az etilén bioszintézisben résztvevő géneken kívül (*FaACS*, *FaACO* és *FaCTR1*) a 14. ábrán érés-specifikus expressziót mutató és az 5. táblázatban 3-jellel és színes háttérrel kiemelt gének elemzése van már folyamatban, illetve szerepel a terveinkben (jelenleg két Ph.D. hallgató: Koncz Tímea és Tisza Viktória dolgozik a témán).



14. ábra: Az érés indukálta gének expressziója szemikvantitatív RT-PCR-rel. Minták: gyümölcshús 1: zöld, 2: fehér, 3: rózsaszín 4: piros érési stádiumban

5. táblázat: Az etilénbioszintézisben résztvevő és a gyümölcs érése során expressziós változást mutató gének izolálásának pillanatnyi helyzete (A + jelek és a színes cellák a funkcionális elemzésre kész géneket jelölik; a fehér foltok esetében csak részleges szekvenciákat határoztunk meg eddig)

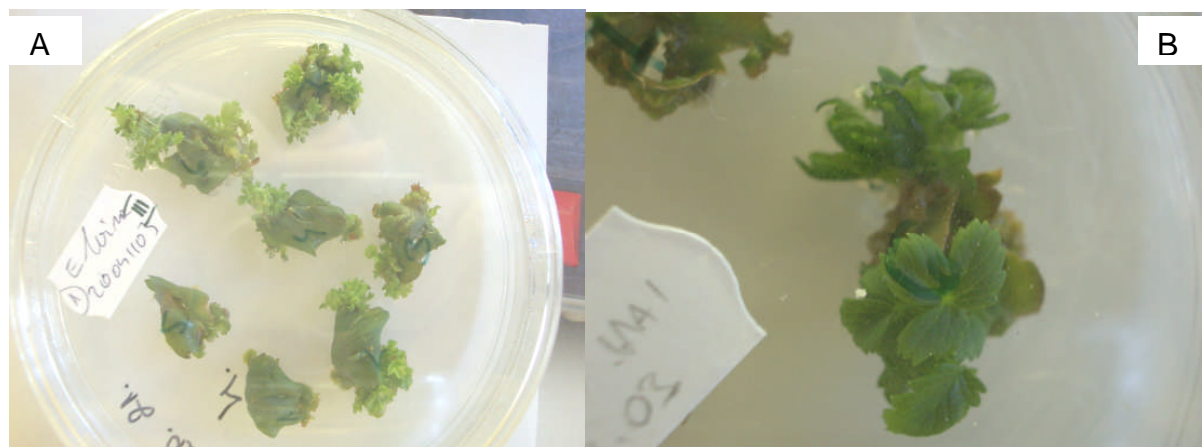
Gén	Teljes hosszúságú cDNS	Genomi klón	Promoter
<i>FaACS</i> (etilén)	+	+	+
<i>FaACO</i> (etilén)	+	+	+
<i>FaCTR1</i> (etilén)	+		+
<i>FaHd</i> (érés)	+		
<i>FaNit</i> (érés)	+	+	+
<i>FaRingH2</i> (érés)	+		+
<i>FaRLK</i> (érés)			
<i>FaSpa</i> (érés)		+	+

3.1. Új konstrukciók előállítása, és *Agrobacterium tumefaciens* transzformációja a szamóca géneket hordozó rekombináns vektorokkal

A transzformációhoz az izolált cDNS-eket és promotereket pBI121-es plazmidba klónoztuk, és a rekombináns plazmidokkal *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105-ös törzset transzformáltunk. Ezeknek a kísérleteknek a részleteit ez a zárójelentés nem tartalmazza.

3.2. Szamócalevelek hajtásregenerációja

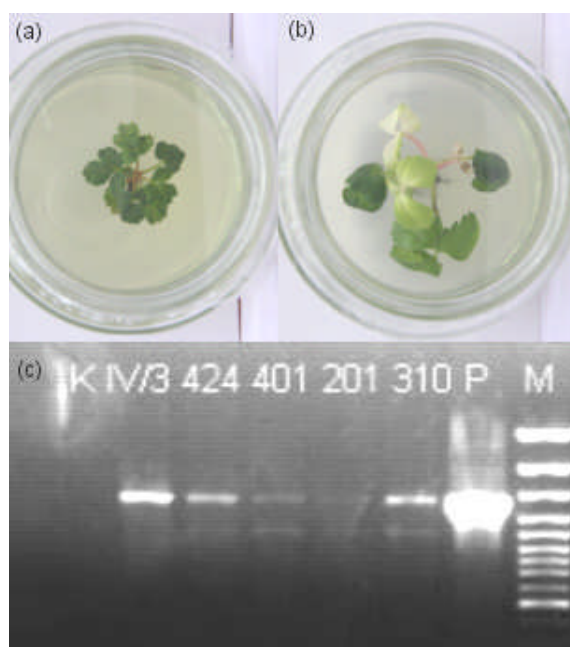
Az *Agrobacterium tumefaciens* közvetítette transzformáció céljából levél szegmentumból kiinduló hajtásregenerációs és transzformációs módszereket hasonlítottunk össze. A hajtásregenerációs kísérletekbe *Fragaria x ananassa* Duch. fajtákat (Elvira, F5, Marmalade, Rabunda, Senga sengana) és erdei szamócát (*Fragaria vesca* L.) vontunk be, MS és N6 alaptáptalajok és 10-féle hormonkombináció alkalmazásával, amelyekről részletesen egy készülőben lévő publikációban számolunk be. Példaként a 15. ábrán az Elvira fajta hajtásregenerációja látható kétféle táptalajon.



15. ábra: Az Elvira fajta hajtásregenerációja MS+0,2 mg/ml 2,4-D+2 mg/ml TDZ (A) és MS+10 mg/l BA+1 mg/l IES táptalajon (B). rövidítések: 2,4-D: 2,4 -diklórfenoxi ecetsav; TDZ: tidiazuron; BA: benziladenin; IES:indol-ecetsav).

3.3. Transzformáció *Agrobacterium tumefaciens*-szel

Az *Agrobacterium tumefaciens* közvetítette transzformációhoz James et al. (1990) publikációjából indultunk ki, de az eljárást más növényfajokkal (szegfű, alma, dohány, paradicsom és szamóca) végzett saját kísérleteink alapján módosítottuk, amelynek részleteit szintén a közeljövőben publikáljuk. A ábra szelekciót túlélő feltételezhetően transzformáns (16. ábra: a) és a nem transzformáns kifehéredő hajtásokat (16. ábra: b) mutatja be. A 16. ábra (c) részén a transzgén integrációjának PCR ellenőrzése látható.



16. ábra: Kanamicin tartalmú táptalajon regenerálódó szamóca (*Fragaria x ananassa* Duch.) növények. A fejlődő zöld hajtások (a) a kifehéredő hajtások (b) mellett a sikeres *Agrobacterium* transzformáció első jelei. A génspecifikus primerekkel végrehajtott PCR a várt méretű fragmentumot szaporította fel, amely a P jelű mintában megjelenő DNS termékkel azonos nagyságú. (M: DNS molekulatömeg marker; P: pozitív kontroll, a gént hordozó plazmid; IV/3, 424, 401, 201, 310 transzformánsok; K kontroll növény DNS-mintái).

4. Összefoglalás

A cDNS-AFLP technika alkalmazásával sikerült azonosítani a szamóca érésére jellemző új géneket, és az utóérő gyümölcsökben már leírt, érés indukálta géneket is. Ezek az érési folyamatok közös elemeit képezik. Sikerült elkülöníteni érési stádiumokra, valamint szövettípusra jellemző szamóca géneket. Az izolált klónok között találhatóak olyan potenciális szabályozó elemek, amelyek klimaktérikus és nem klimaktérikus gyümölcsökre egyaránt jellemzőek. Ezek funkcionális elemzése fényt deríthet a nem klimaktérikus érés szabályozásának ismeretlen láncszemeire.

Az etilén bioszintézis és jelátviteli útvonal kulcsgénjei a szamócában a többi növényhez hasonlóan, jelen vannak. Elsőként számolunk be szamóca ACC-szintáz gén izolálásáról. Az általunk azonosított ACS szerepe valószínűleg hasonló az almából izolált *MdACS5*-éhez, ugyanis fiatal vegetatív szövettípusokban, valamint a zöld gyümölcsben van jelen, ugyanakkor elicitorokkal is indukálható. Az ACS-el ellentétben az ACO érés indukálta mintázata arra enged következtetni, hogy az érés előrehaladtával az etiléntermelés a szamócában is fokozódik. Az etilén válasz jelátviteli útban az etilén negatív regulátoraként működő CTR1-et kódoló *FaCTR1* expressziója a más növényekből izolált CTR1-ekhez hasonlóan konstitutív. Az izolált ACS, ACO és CTR1 gének és promotereinek bioinformatikai elemzése sok új információval járul hozzá a szamóca etilén bioszintézis és jelátviteli folyamatok tisztázásához, de az etilén szamócában betöltött szerepének pontos meghatározásához szükséges az ACC szintáz és oxidáz géncsalád további tagjainak izolálása és expresziós mintázatuk és promotereik meghatározása. A zárójelentésben felsorolt gének szekvenciainformációja kiindulásként szolgál a differenciáltan szabályozott gének promotereinek izolálásához, így a zöld, valamint érés-specifikusan expresszálódó gének promotereiben közös szabályozó elemek azonosítását teszi lehetővé, és ezáltal meghatározható a szamóca érésének átfogó transzkripciós szabályozása.

jelű mintában megjelenő DNS termékkel azonos nagyságú. (M: DNS molekulatömeg marker; P: pozitív kontroll, a gént hordozó plazmid; IV/3, 424, 401, 201, 310 transzformánsok; K kontroll növény DNS-mintái.

5. Irodalomjegyzék

- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 15: 63-78
- Aharoni A, Keizer LCP, Van Den Broeck HC, Blanco-Portales R, Munoz-Blanco J, Bois G, Smit P, De Vos RCH, O'Connell AP (2002) Novel insight into vascular, stress, and auxin-dependent and independent gene expression programs in strawberry, a non-climacteric fruit. *Plant Physiol*, 129: 1019-1031
- Aharoni A, O'Connell AP (2002) Gene expression analysis of strawberry achene and receptacle maturation using DNA microarrays. *J Exp Bot*, 53: 2073-2087
- Aharoni A, O'Connell AP (2002) Gene expression analysis of strawberry achene and receptacle maturation using DNA microarrays. *J Exp Bot*, 53: 2073-2087
- Barry CS, Llop-Tous MI, Grierson D (2000) The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. *Plant Physiol*, 123: 979-986
- Breyne P, Dreesen R, Cannoot B, Rombaut D, Vandepoele K, Rombauts S, Vanderhaeghen R, Inzé D, Zabeau M (2003) Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies. *Mol Gen Genomics*, 269: 173-179
- Busk PK, Jensen AB, Pages M. (1997) Regulatory elements *in vivo* in the promoter of the abscisic acid responsive gene *rab17* from maize. *Plant J*, 11: 1285-1295
- Busturia A, Lloyd A, Bejarano F, Zavortink M, Xin H, Sakonju S (2001) The MCP silencer of the *Drosophila* Abd-B gene requires both Pleiohomeotic and GAGA factor for the maintenance of repression. *Development*, 128: 2163-2173
- Cazzonelli CI, Cavallaro AS, Botella JR (1998) Cloning and characterization of ripening-induced ethylene biosynthetic genes from non-climacteric pineapple (*Ananas comosus*) fruits. *Austr J Plant Physiol*, 25: 513-518.
- Clendennen SK, May GD (1997) Differential gene expression in ripening banana fruit. *Plant Physiol*, 115: 463-469
- Cobbett CS (2000) Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol*, 123: 825-832
- Davies C, Robinson SP (2000) Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grape berry ripening. Cloning and characterization of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins. *Plant Physiol*, 122: 803-812
- De Smet F, Mathys I, Marchal K, Thijs G, De Moor B, Moreau Y (2002) Bioinformatics: Adaptive quality-based clustering of gene expression profiles. *Bioinformatics* 18:735-746
- Dunn MA, White AJ, Vural S, Hughes MA (1998) Identification of promoter elements in a low-temperature-responsive gene (*blt4.9*) from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Mol Biol*, 38: 551-564
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 14863-14868
- El-Sharkawy I, Jones B, Gentzbittel L, Lelievre JM, Pech JC, Latche A (2004) Differential regulation of ACC synthase genes in cold-dependent and -independent ripening in pear fruit. *Plant Cell Environ*, 27: 1197-1210
- El-Sharkawy I, Jones B, Li ZG, Lelievre JM, Pech JC, Latché A (2003) Isolation and characterization of four ethylene perception elements and their expression during ripening in pears (*Pyrus communis* L.) with/without cold requirement. *J Exp Bot*, 54: 1615-1625
- Eulgem T, Rushton PJ, Schmelzer E, Hahlbrock K, Somssich IE (1999) Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO J*, 18: 4689-4699
- Ferrie BJ, Beaudoin N, Burkhardt W, Bowsher CG, Rothstein SJ (1994) The cloning of two tomato lipoxygenase genes and their differential expression during fruit ripening. *Plant Physiol*, 106: 109-118
- Harada T, Sunako T, Sakuraba W, Goto S, Akada S, Senda M, Ishikawa R, Niizeki M (1997) Genomic nucleotide sequence of a ripening-related 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (*MdACS-1*) in apple (Accession No. U89156) (PGR97-066). *Plant Physiol*, 113: 1465
- Haralampidis K, Milioni D, Rigas S, Hatzopoulos P (2002) Combinatorial interaction of cis elements specifies the expression of the Arabidopsis AtHsp90-1 gene. *Plant Physiol*, 129: 1138-1149

- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Res*, 27: 297-300
- Hu CG, Hao YJ, Honda C, Kita M, Moriguchi T (2003) Putative PIP1 genes isolated from apple: expression analyses during fruit development and under osmotic stress. *J Exp Bot*, 54: 2193-2194
- James DJ, Passey AJ, Barbara DJ (1990) Agrobacterium-mediated transformation of the cultivated strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) using disarmed Ti-vectors. *Plant Science* 69:79-94.
- Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA, Ecker JR (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of the protein kinases. *Cell*, 72: 427-441
- Kluge RA, Jomori MLL, Jacomino AP, Vitti MCD, Padula M (2003) Intermittent warning in „Tahiti“ lime treated with an ethylene inhibitor. *Postharvest Biology and Technology* 29: 195-203.
- Lay-Yee M, Knighton ML (1995) A full-length cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from apple. *Plant Physiol*, 107: 1017-1018
- Liang XS, Abel JA, Keller NF, Shen, Theologis A (1992) The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 11046-11050
- Mohanty B, Krishnan SP, Swarup S, Bajic VB (2005) Detection and preliminary analysis of motifs in promoters of anaerobically induced genes of different plant species. *Ann Bot*, 96: 669-681
- Moyle R, Fairbairn DJ, Ripi J, Crowe M, Botella JB (2005) Developing pineapple fruit has a small transcriptome dominated by metallothionein. *J Exp Bot*, 56: 101-112
- Mullins ED, McCollum TG, McDonald RE (2000) Consequences on ethylene metabolism of inactivity the ethylene receptor sites in diseased non-climacteric fruit. *Postharvest Biology and Technology* 19: 155-164
- Nakatsuka A, Murachi S, Okunishi H, Shiomi S, Nakano R, Kubo Y, Inaba A (1998) Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. *Plant Physiol*, 118: 1295-1305
- Ogawa M, Hanada A, Yamauchi Y, Kuwahara A, Kamiya Y, Yamaguchi S (2003) Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell*, 15: 1591-1604
- Park HC, Kim ML, Kang YH, Jeon JM, Yoo JH, Kim MC, Park CY, Jeong JC, Moon BC, Lee JH, Yoon HW, Lee SH, Chung WS, Lim CO, Lee SY, Hong JC, Cho MJ (2004) Pathogen- and NaCl-induced expression of the SCaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor. *Plant Physiol*, 135: 2150-2161
- Pauli S, Rothnie HM, Chen G, He X, Hohn T (2004) The cauliflower mosaic virus 35S promoter extends into the transcribed region. *J Virol*, 78: 12120-12128
- Piechulla B, Merforth N, Rudolph B (1998) Identification of tomato Lhc promoter regions necessary for circadian expression. *Plant Mol Biol*, 38: 655-662
- Porat R, Weiss B, Cohen L, Daus A, Goren R, Droby S (1999) Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene on the postharvest qualities of „Shamouti“ oranges. *Postharvest Biology and Technology* 15: 155-163
- Ray A, Robinson-Beers K, Ray S, Baker SC, Lang JD, Preuss D, Milligan SB, Gasser CS (1994) *Arabidopsis* floral homeotic gene BELL (BEL1) controls ovule development through negative regulation of AGAMOUS gene (AG). *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 5761-5765
- Reid SJ, Ross GS (1997) Up-regulation of two cDNA clones encoding metallothionein-like proteins in apple fruit during cool storage. *Physiol Plant*, 100: 183-189
- Rogiers SY, Kumar GNM, Knowles NR (1998) Maturation and ripening of fruit of *Amelanchier alnifolia* Nutt. are accompanied by increasing oxidative stress. *Ann Bot*, 81: 203-211
- Rombauts S, Dehais P, Van Montagu P, Rouze P (1999) PlantCARE. A plant cis-acting regulatory element database. *Nucleic Acids Res*, 27: 295-296
- Rottmann WH, Peter GF, Oeller PW, Keller JA, Shen NF, Nagy BP, Taylor LP, Campbell AD, Theologis A (1991) 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato is encoded by a multigene family whose transcription is induced during fruit and floral senescence. *J Mol Biol*, 222: 937-961
- Salzman RA, Fujita T, Zhu-Salzman K, Hasegawa PM, Bressan RA (1999) An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. *Plant Molecular Biology Reporter* 17:11-17

- Santi L, Wang Y, Stile MR, Berendzen K, Wanke D, Roig C, Pozzi C, Muller K, Muller J, Rohde W, Salamini F (2003) The GA octodinucleotide repeat binding factor BBR participates in the transcriptional regulation of the homeobox gene *Bkn3*. *Plant J*, 34: 813-826
- Selvarajah S, Bauchot AD, John P (2001) Internal browning in cold-stored pinapples is suppressed by a postharvest application of 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biology and Technology* 23: 167-170
- Simpson SD, Nakashima K, Narusaka Y, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) Two different novel cis-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous *Arabidopsis* gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *Plant J*, 33: 259-270
- Soeller WC, Oh CE, Kornberg TB (1993) Isolation of cDNAs encoding the *Drosophila* GAGA transcription factor. *Mol Cell Biol*, 13: 7961-7970
- Stougaard J, Jorgensen JE, Christensen T, Kuhle A, Marcker KA (1990) Interdependence and nodule specificity of cis-acting regulatory elements in the soybean leghemoglobin *lbc3* and *N23* gene promoters. *Mol Gen Genet*, 220: 353-360
- Sunako T, Ishikawa R, Senda M, Akada S, Niizeki M, Harada T (2000) MdACS-5A (Accession No. AB034992) and 5B (Accession No. AB034993), two wound-responsive genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in apple. (PGR00-030). *Plant Physiol*, 122: 620
- Thain SC, Vandebussche F, Laarhoven LJ, Dowson Day MJ, Wang ZY, Tobin EM, Harren FJ, Millar AJ, Van Der Straeten D (2004) Circadian rhythms of ethylene emission in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 136: 3751-3761
- Trainotti L, Pavanello A, Casadoro G (2005) Different ethylene receptors show an increased expression during the ripening of strawberries: does such an increment imply a role for ethylene in the ripening of these non-climacteric fruits *J Exp Bot*, 56: 2037-2046
- Trainotti L, Spinello R, Piovan A, Spolaore S, Casadoro G (2001) β -Galactosidases with a lectin-like domain are expressed in strawberry. *J Exp Bot*, 52: 1635-1645
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ (1999) Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 5844-5849
- Yamagata H, Yonesu K, Hirata A, Aizono Y (2002) TGTCACA motif is a novel cis-regulatory enhancer element involved in fruit-specific expression of the cucumisin gene. *J Biol Chem*, 277: 11582-11590

OTKA Nyilvántartási szám: TO 37861
RÉSZJELENTÉS

2/1 sz.

melléklet

PUBLIKÁCIÓS LISTA

A kutatási témában a kutatás kezdete óta az OTKA nyilvántartási szám Feltüntetésével megjelent (vagy közlésre elfogadott) publikációk listája

So r- sz.	Szerző(k) neve	Cikk címe	Kiadvány, folyóirat címe, megjelenés ideje, első-utolsó oldalszám	*Dokumen- tum típusa	Impakt faktor
1.	Galli Zs., Kiss E., Hrazdina G., Heszky L.	The effects of ACS (1- aminoocyclopropane-1- carboxylate synthase) gene down regulation on ethylene production and fruit softening in transgenic apple.	International Journal of Horticultural Science 2003. 9, 65-70	Folyóirat cikk	
2.	Balogh A., Kiss E., Koncz T., Heszky L.	Érésspecifikus gének azonosítása szamócában cDNS-AFLP technikával.	X. Növénynevelési Tudományos Napok, MTA 2004. február 18-19.	Előadás Absztrakt	
3.	Balogh A., Kiss E., Koncz T., Dénes F., Heszky L.	ISSR és SCAR markerek alkalmazhatósága szamóca fajták azonosítására.	Összefoglalók p.30. X. Növénynevelési Tudományos Napok, MTA 2004. február 18-19. Összefoglalók p.74.	Poszter Absztrakt	
4.	Balogh, A., Kiss E., Koncz T. and Heszky L	Identification of genes involved in ripening of octoploid strawberry (Fragaria x Ananassa duch.) using cDNA-AFLP.	5 th IVCHB Symposium, 12-17 September 2004, Debrecen, Book of Abstracts and Programme p.52.	Előadás Absztrakt	

5.	Balogh A., Kiss E., Koncz T., Dénes F., Heszky L.	Isolation and characterisation of genes involved in the biosynthesis of ethylene and signalling pathway for ethylene in strawberry	Symposium Booklet for the 5th International Strawberry Symposium. 5-10 September 2004. Coolum Beach, Queensland, Australia, p.45.	Poszter Absztrakt
6.	Balogh, A., Kiss E., Koncz T. and Heszky L	Identification of genes involved in ripening of octoploid strawberry (<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.) using cDNA-AFLP.	5 th IVCHB Symposium, 12-17 September 2004, Debrecen, 52 .	Előadás Absztrakt
7.	Balogh A., Kiss E., Koncz T., Dénes F., Heszky L.	Isolation and characterisation of genes involved in the biosynthesis of ethylene and signalling pathway for ethylene in strawberry	Acta Horticulturae (in press)	Konferencia kiadvány Proceedings
8.	Balogh, A., Kiss E., Koncz T. and Heszky L	Identification of genes involved in ripening of octoploid strawberry (<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.) using cDNA-AFLP.	Acta Horticulturae (in press)	Konferencia kiadvány Proceedings
9.	Balogh A., Koncz T., Tisza V., Kiss E., Heszky L	A szamóca éréséért felelős gének izolálása és jellemzőinek meghatározása	MTA Élelmiszertudományi Komplex Bizottságának Élelmiszerfehérje-kémiai Munkabizottságának ülése, Budapest BGME 2004. dec.16.	Egyéb Előadás

* Könyv, könyvfejezet, cikk, konferencia kiadvány (absztrakt)

...

Gödöllő, 2005. március 8.

aláírása

Témavezető

Irodalom

- Breyne P, Dreesen R., Cannoot B., Rombaut D., Vanderpole K., Rombauts S., Vanderhaegen R., Inzé D., Zabeau M. (2003): Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies. *Mol Gen genomics* 269:17-179.
- Cazzonelli C.I., Cavallaro A.S., Botella J.R. (1998): Cloning and characterization of ripening-induced ethylene biosynthetic genes from non-climacteric pineapple (*Ananas comosus*) fruits. *Australian Journal Plant Physiology* 25: 513-518.
- De Smet F., Mathys I., Marchal K., Thijs G., De Moor B., Moreau Y. (2002). Bioinformatics: Adaptive quality-based clustering of gene expression profiles. *Bioinformatics* 18:735-746.
- El-Sharkawy I., Jones B., Li Z.G., Lelievre J.M., Pech J.C., Latché A. (2003): Isolation characterization of four ethylene perception elements and their expression during ripening in pears (*Pyrus communis* L.) with/without cold requirement. *Journal of Experimental Botany* 54:1615-1625.
- Kluge R.A., Jomori M.L.L., Jacomino A.P., Vitti M.C.D., Padula M. (2003): Intermittent warning in „Tahiti“ lime treated with an ethylene inhibitor. *Postharvest Biology and Technology* 29: 195-203.
- Mullins E.D., McCollum T.G., McDonald R.E. (2000): Consequences on ethylene metabolism of inactivity the ethylene receptor sites in diseased non-climacteric fruit. *Postharvest Biology and Technology* 19: 155-164.
- Porat R., Weiss B., Cohen L., Daus A., Goren R., Droby S. (1999): Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene on the postharvest qualities of „Shamouti“ oranges. *Postharvest Biology and Technology* 15: 155-163.
- Salzman R.A., Fujita T., Zhu-Salzman K., Hasegawa P.M., Bressan R.A. (1999): an improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. *Plant Molecular Biology Reporter* 17:11-17.
- Selvarajah S., Bauchot AD., John P. (2001): Internal browning in cold-stored pinapples is suppressed by a postharvest application of 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biology and Technology* 23: 167-170.

Gödöllő, 2004. február 27.

Kiss Erzsébet
témavezető

