AZ ALMA ETILÉN BIOSZINTÉZISÉNEK GÁTLÁSA ÉS KÜLÖNBÖZŐ *FESTUCA* FAJOK TAXONÓMIAI ÖSSZEHASONLÍTÁSA MOLEKULÁRIS GENETIKAI MÓDSZEREKKEL

Doktori értekezés

Galli Zsolt

Gödöllő

2004

Doktori iskola: Növénytudományi Doktori Iskola

Vezetője: Dr. Virányi Ferenc
egyetemi tanár, MTA doktora
SZIE Növényvédelem Tanszék

Tudományos titkár: Dr. Gyulai Gábor
egyetemi docens, a biológiai tudományok doktora
SZIE Genetika és Növénynemesítés Tanszék

Tudományterület: 4. Agrártudományok

Tudományága: 4.1. Növénytermesztési és kertészeti tudományok

Program: Növénynemesítés Genetikai és Biotechnológiai módszerekkel

Program vezető: Dr. Heszky László
tanszékvezető egyetemi tanár, az MTA levelező tagja
SZIE Genetika és Növénynemesítés Tanszék

Témavezetők: Dr Kiss Erzsébet
egyetemi tanár, a mezőgazdaságtudomány kandidátusa
SZIE Genetika és Növénynemesítés Tanszék

Dr. Heszky László
tanszékvezető egyetemi tanár, az MTA levelező tagja
SZIE Genetika és Növénynemesítés Tanszék

……
Dr. Kiss Erzsébet
témavezető

……
Dr. Heszky László
program- és témavezető

…….
Dr. Virányi Ferenc
doktori iskola vezetője

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 5
1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS 7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 9
2.1 AZ ETILÉN BIOSZINTÉZIS MOLEKULÁRIS GÁTLÁSA 9
2.1.1. Az etilén több mint érési hormon 9
2.1.2. Az etilén bioszintézise 10
2.1.3. Az ACC-szintáz (ACS) géncsalád 12
2.1.4. Az ACC-oxidáz (ACO) géncsalád 13
2.1.5. A gyümölcsök érése 13
2.1.6. Az ACS és ACO gének szabályozása a gyümölcsérés során (paradicsom modell) 15
2.1.7. Az érést befolyásoló egyéb külső tényezők 17
2.1.8. Az etilén termelés gátlása 18
2.1.9. A génexpresszió molekuláris gátlása növényekben 19
2.2. AZ ALMA TRANSZFORMÁCIÓJA 22
2.3. FESTUCA FAJOK MOLEKULÁRIS TAXONÓMIÁJA 25
2.3.1. A Festuca fajok jellemzése 25
2.3.2. PCR technikán alapuló vizsgálatok 27
2.3.2.1. RAPD és AP-PCR analízis 27
2.3.3. Összehasonlító szekvencia elemzés 28
2.3.3.1. Az ITS (Internal Transcribed Spacer) szekvenciák jellemzői 28
2.3.3.2. A *Festuca* fajok ITS szekvenciáinak összehasonlítása 29
3. ANYAG ÉS MÓDSZER 35
3.1. NÖVÉNYANYAG 35
3.1.1. Almaminták 35
3.1.2. Festuca minták 35
3.2. SEJTGENETIKAI ÉS SZÖVETTENYÉSZTÉSI MÓDSZEREK 36
3.2.1. Merisztéma izolálás 36
3.2.2. A hajtások szaporítása 37
3.2.3. A levelek megnyújtása (elongáció) 37
3.2.4. Regeneráció 38
3.2.5. Ploidszint meghatározás (Festuca) 38
3.3. MIKROBIÁLIS MÓDSZEREK 38
3.3.1. Baktérium törzsek, szubklónozás, bakteriális transzformáció 38
3.3.2. Agrobacterium törzsek és transzformáció 40
3.4. AZ ALMA TRANSZFORMÁCIÓJA *AGROBACTERIUM*-MAL 40
3.4.1. Az Agrobacterium előkészítése 40
3.4.2. Transzformáció 40
3.4.3. Növényregeneráció és szelekció 41
3.4.4. Gyökereztetés 41
3.5. DNS ÉS RNS IZOLÁLÁS 42
3.5.1. DNS izolálás almából 42
3.5.2. RNS izolálás almából 42
3.5.3. DNS izolálás Festuca fajokból 42
3.6. PCR TECHNIKÁN ALAPULÓ MÓDSZEREK 43
3.6.1. RAPD és AP-PCR analízis 43
3.6.2. Az ITS régió felszaporítása (Festuca) 44

3.7. SOUTHERN ANALÍZIS 44
3.7.1. Digoxigeninnel jelölt próbával 44
3.7.2. Izotóppal jelölt próbával 45
3.8. NORTHERN ANALÍZIS (ALMA) 45
3.9. SZEKVENÁLÁS 46
3.10. GYÜMÖLCS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK 46
3.10.1. Az etilén termelés mérése 46
3.10.2. Az oldható anyagok (Brix) és gyümölcs keménység mérése 46
3.10.3. Az ACS tisztítása és enzimaktivitás mérés 47
3.11. STATISZTIKAI ANALÍZIS 47
3.11. A mintázatok kiértékelése 47
3.1.2. A szekvenciák kiértékelése 48

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK 51

4.1. MIKROSZAPORÍTÁS ÉS NÖVÉNYREGENERÁLÁS 51
4.2. AZ ALMA (MOLEKULÁRIS) TRANSZFORMÁCIÓJA 54
4.3. A TRANSZGÉN JELENLÉTÉNEK BIZONYÍTÁSA TERMŐREFORDULT FÁKBAN 55
4.4 A TRANSZGÉNIKUS GYÜMÖLCSÖK VIZSGÁLATA 57
4.4.1. A gyümölcsök etiléntermelése szobahőmérsékleten tárolva 58
4.4.2. Az MDACS2 gén expressziója 59
4.4.3. Az integrálódott transzgén kópiaszáma 60
4.4.4. A gyümölcsök etilén termelése hidegen (5°C) tárolva 60
4.4.5. A gyümölcsök keménységének és cukortartalmának változása az érés során 61
4.4.6. „Knock out" transzgénikus vonal 62
4.5. FESTUCA FAJOK RAPD ÉS AP-PCR VIZSGÁLATA 65
4.6. *FESTUCA* FAJOK ITS VIZSGÁLATA 70
4.6.1. Filogenetikai analízis 74
4.7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK 79

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK 81

6. ÖSSZEFOGLALÁS 83

SUMMARY 87

MELLÉKLETEK 91

M1. IRODALOMJEGYZÉK 91
M2. ALAPADATOK ÉS A SZÁMÍTÁSOK MENETE 104

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 111

Rövidítések jegyzéke

ACC:	1-aminociklopropán-1-karboxil sav
ACS:	ACC-szintáz
AFLP:	(Amplified Fragment Length Polymorphism) felszaporított fragmentum hossz polimorfizmus
AOA:	Aminooxiecetsav
AP-PCR	(Arbitrarily Primed PCR) véletlenszerűen kapcsolt PCR
AVG:	Aminoetoxivinilglicin
BA:	benziladenin
bp:	bázispár
CaMV35S:	Karfiol mozaik vírus 35S promoter
cDNS:	(copy) kópia DNS
CHS:	(chalcone) csalkon-szintáz
cM:	centi Morgan
CP:	ciklopropén
DAPI:	4,6-Diamidino-2-phenylindole
DEPC:	Dietil-pirokarbonát
dsRNS	(double-stranded) kettősszálú RNS
3,3-DMCP:	3,3 dimetil ciklopropén
EDTA:	Etilén-diamin-tetraecetsav
EST:	Expressed Sequence Tags
EtBr:	Etídium-bromid
ETS:	(External Transcribed Spacer) külső átíródó rDNS spacer
GA_3:	gibberellinsav
GMO:	(Genetically Modified Organism) genetikailag módosított szervezet
GUS:	*E. coli* β-D-glükuronidáz gén
HCN:	Hidrogén-cianid
IBA:	indolvajsav
ITS:	(Internal Transcribed Spacer) belső átíródó rDNS spacer
KMB:	2-keto-4-metiltiobutirát
MACC:	Malonil-ACC
1-MCP:	1-metilciklopropén
*MdACS*2:	*Malus domestica* (Borkh.) ACC-szintáz 2
MDS:	(Multidimensional) többdimenziós analízis
MP:	Maximum parsimony
MTA:	5-metiltioadenozin
MTR:	5-metiltioribóz
MTR-1-P:	5-metiltioribóz-1-foszfát
NAA:	naftilecetsav
NaOCl:	Nátrium-hipoklorit
Nr:	„Never ripe”
nptII:	Neomicin-foszfotranszferáz II
NTS:	(Non Transcribed Spacer) nem átíródó rDNS spacer
PCR:	(Polimerase Chain Reaction) Polimeráz láncreakció

PE:		Pektinészteráz
PG:		Poligalakturonáz
PTGS:		(Post-transcriptional gene silencing) poszt-transzkripciós géncsendesítés
PVP:		Polyvinylpirrolidon
QTL:		(Quantitative Trait Loci) kvantitatív tulajdonság lókusza
RAPD:		(Randomly Amplified Polymorphic DNA): véletlenszerűen felszaporított polimorf DNS
RFLP:		(Restriction Fragment Length Polymorphism) restrikciós fragmenthossz polimorfizmus
rin:		„ripening inhibitor” (érésgátló)
RNAi:		(RNA interference) RNS interferencia
rRNS		riboszómális RNS
SAM:		S-adenozil metionin
SDS:		Nátrium-dedocil-szulfát
siRNA:		(small interfering RNA) kis interferáló RNS-ek
SSR:		(Simple Sequence Repeat) egyszerű szekvencia ismétlődés
SSC:		3M konyhasó és 0.3M nátrium-citrát oldat (20X)
TDZ:		thidiazuron
Tris:		Tris(hidroximetil) aminometán
BamHI:	GGATCC	restrikciós endonukleázok (felismerőhellyel)
SacI:	GAGCTC	
EcoRI:	GAATTC	
XhoI:	CTCGAG	

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A biotechnológia már ma is a XXI. századi tudásalapú társadalom fejlődésének egyik meghatározó területe és várhatóan ez a jövőben csak fokozódni fog. Az egyre kifinomultabb molekuláris technikák rutinszerű alkalmazása lehetővé teszi haszonnövényeink célirányos javítását úgy, hogy a hagyományos nemesítéssel kialakított kedvező jellegek változatlanul maradjanak. Emellett az alapkutatás szolgálatába állítva ezeket a molekuláris módszereket, a bennünket körülvevő élővilág fenotípusos megnyilvánulásánál mélyebb megismerésében nyújthat segítséget. A disszertáció témája is e két nagy területhez kapcsolódóan foglalja össze mind az alap-, mind az alkalmazott kutatásokban elért eredményeket.

Az alma etilén bioszintézisének molekuláris gátlása

Az ismert bioszintetikus utak gátlásával a növények életfolyamatai tudatosan blokkolhatók, vagy új alternatív utakra terelhetők. Az etilén bioszintézis lépéseinek tisztázása, valamint a génexpresszió molekuláris gátlásának lehetősége megteremtették az utat az érési folyamatokba történő géntechnológiai beavatkozáshoz is. Az ú.n. utóérő gyümölcsöknél, amelyek közé az alma is tartozik, az érés közvetlen kiváltó oka a jelentősen emelkedő (több százszorosra) etilén szint. Az autokatalitikus etiléntermelés beindítását először paradicsomban sikerült megakadályozni géntechnológiai módszerekkel az 1990-es évek elején. Ennek eredményeként elsők között került a piacra szobahőmérsékleten is hosszú ideig tárolható transzgénikus paradicsom. Ezekre az eredményekre alapozva kezdtük el kísérleteinket almával, melyek elsődleges *célja tehát olyan etiléntermelésükben gátolt almavonalak előállítása volt, melyek gyümölcsei hosszabb ideig tárolhatóak minőségi romlás nélkül*. Ezáltal a tárolási költségek is csökkenthetők, mivel a gyümölcsök betakarítását követő ú.n. post-harvest érés késleltetésével nincs szükség szabályozható hűtőtárolókra. Ezen a területen elért eredményeink az első adatokat jelentik az etilén bioszintézist antiszensz gén bevitelével gátolt transzgénikus almák post-harvest viselkedésére vonatkozóan. Gazdasági jelentőségük mellett, az érési folyamat biokémiájának és fiziológiájának jobb megismeréséhez, tanulmányozásához és megértéséhez is segítségül szolgálhatnak.

Különböző *Festuca* fajok molekuláris taxonómiája

A földi élővilág rendszerezése kezdetben morfológiai, majd szövettani és citológiai alapon történt. Sok faj meghatározása és besorolása napjainkig is vitatott, melynek legfontosabb oka a fenotípusos taxonómiai bélyegek környezetfüggősége. Mivel molekuláris

genetikai módszerek alkalmazásával a környezeti tényezők hatása eliminálható, ezért a fajok elkülönítésére alkalmas megbízható módszert a genomiális eltéréseik alapján működő DNS alapú markerek jelenthetik. Ezek a markerek reprezentálhatják a genom véletlen szakaszát (pl. RFLP, RAPD, AFLP …) vagy specifikus részét (SSR, EST, ITS …). A legértékesebb információt természetesen a szekvencia- majd funkcionális szintű összehasonlítás jelenti, azonban a teljes genomszekvencia napjainkig csak néhány faj esetében készült el. A molekuláris markerek azonban sok esetben nem támasztják alá a morfológiai bélyegek alapján kialakított faji határokat. A génregulációs különbségek, melyek a DNS metiláltsági mintázatának az eredményei, a legtöbb esetben nagyobb fenotípusos eltéréseket eredményezhetnek, mint magának a genetikai anyagnak a megváltozása. Ezért azonos genetikai háttér mellett is elképzelhetők nagy fenotípusos különbségek. A *Festuca* nemzetség néhány fajának besorolása napjainkban is vitatott. *Kísérleteink célja ezért az volt, hogy a legvitatottabb fajok molekuláris összehasonlításával új adatokat szolgáltassunk a hagyományos taxonómia eddigi eredményeihez.* A kísérleteinkben szereplő fajok molekuáris analízisével eddig még nem foglalkoztak.

Vizsgálatainkat molekuláris marker- valamint szekvencia szinteken is elvégeztük.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Az etilén bioszintézis molekuláris gátlása

2.1.1. Az etilén több mint érési hormon

Az etilén (C_2H_4) az egyik legkisebb szerves molekula, amely biológiai aktivitással rendelkezik. A növények fejlődése és növekedése során számos szabályozó funkciót lát el. Bár a legtöbben, mint „érési" hormont ismerik, különböző élettani folyamatokban játszik szerepet pl. a csírázásban, magoncok fejlődésében, a gyökerek kialakulásában, a virágzásban, a virágszirmok, levelek és gyümölcsök leválásában (abszcisszió), biotikus- és abiotikus stresszválaszban, gyümölcsök érésében, növényi szervek öregedésében és elhalásában (Matto és Suttle 1991, Johnson és Ecker 1998, Bleecker és Kende 2000). A levegőben már 0.1 ppm (1μl/l) koncentrációja is jelentős hatást képes kifejteni a növényekben (Abeles et al. 1992). (Egy érett almában az etilénkoncentráció elérheti a 2500 μl/l értéket!) Mindezek mellett a *Bromeliaceae* család fajaiban indukálja a virágzást, a *Cucurbitaceae* család fajaiban pedig a nemi jellegek kifejeződését serkenti.

A XIX. században és a XX. század elején a főutcák világítására világítógázt használtak. Feltűnő volt, hogy a világítótestek környékén a vegetáció sokszor súlyosan sérült, korai öregedés és levélhullás volt megfigyelhető. Elsőként Dimitry Neljubov (1901) azonosította az etilént mint aktív komponenst a világítógázban. Megfigyelte, hogy a sötétben csíráztatott borsó csíranövények hipokotilja etilén hatására rövidebb maradt és vastagabbá vált, a gyökerük megnyúlását gátolta és túlzott apikális hurok alakult ki. Ezeket a fenotípusban bekövetkező feltűnő változásokat később „hármas válasz"-nak nevezték el (Knight et al. 1910), és a mai napig használják is pl. etilén-receptor vagy szignáltranszdukciós mutáns egyedek gyors szelekciójához. Az etilént, a növényi metabolizmus természetes termékeként Gane-nek (1934) sikerült azonosítania és a növényre kifejtett hatásai alapján a hormonok közé sorolták. A következő 25 évben jelentéktelen növényi hormonnak tartották, majd a gázkromatográfiás vizsgálatok bevezetésével ismét felfedezték a növényi növekedés és fejlődés szabályozásában betöltött jelentőségét (Burg és Thimann, 1959).

Az 1980-as évek közepére bizonyították az etilén hatásait és tisztázták a bioszintézis lépéseit. Keveset sikerült kideríteni azonban a pontos hatásmechanizmusról és a szignál transzdukciós (jelátviteli) útvonalról. Radioaktív izotóppal jelölt etilénnel bizonyították az etilén-kötő helyek létét növényekben (Sisler 1991), de a megkötésben szerepet játszó komponensek tisztítása és jellemzése, valamint az útvonal tisztázása és pontos megértése mind a mai napig még várat magára. A jelátvitel néhány komponensét sikerült azonosítani

Arabidopsis-ban, beleértve az etilén receptorokat és transzkripciós faktorok két családját is (Bleecker et al. 1988, Guzmán és Ecker 1990, Kieber et al. 1993, Roman et al. 1995, Alonso et al. 1999). Az *Arabidopsis* genom teljes szekvenálása lehetővé tette az etilén bioszintézisben és a jelátvitelben szerepet játszó géncsaládok számának és méretének pontos meghatározását.

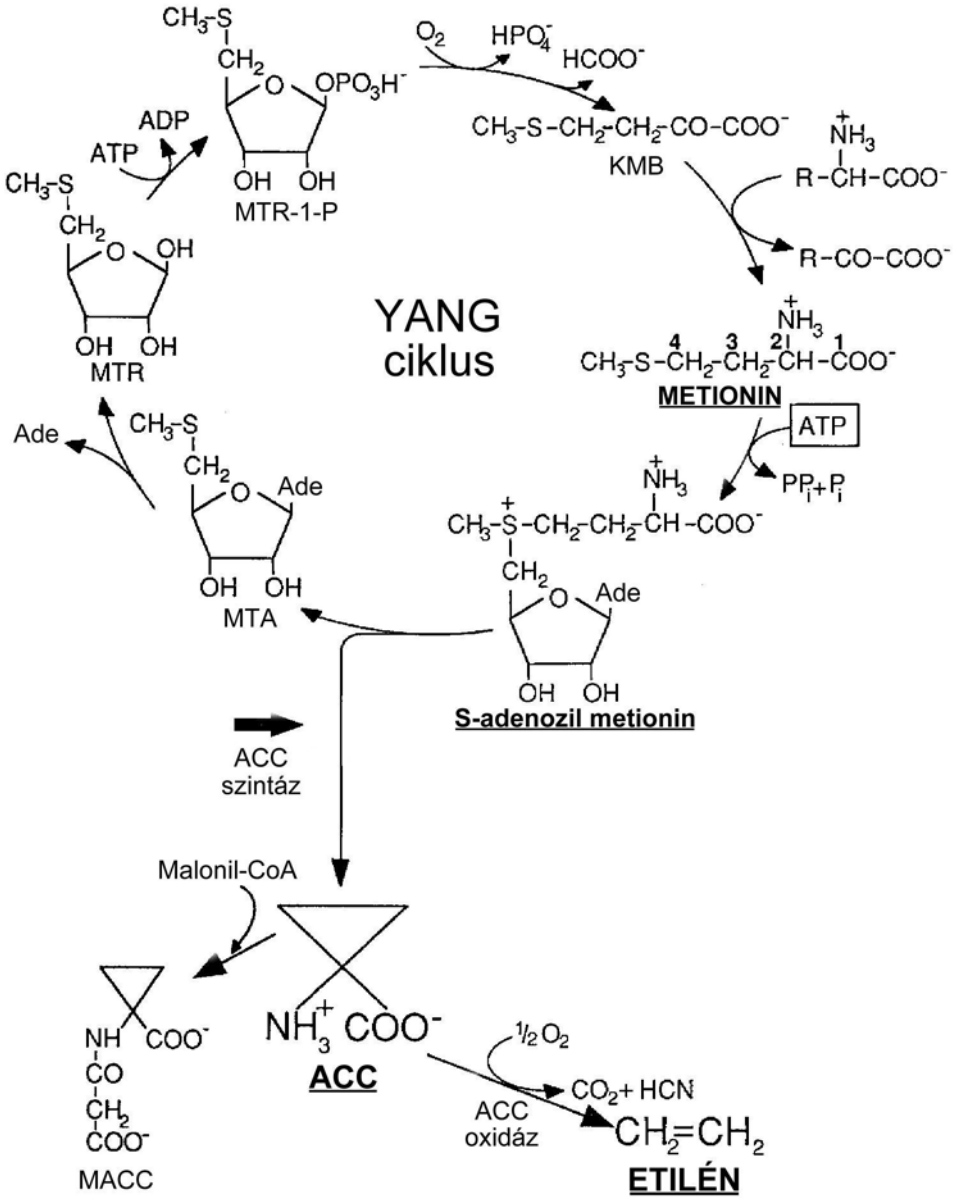
A legújabb kutatási eredmények szerint az etilén nemcsak a növényekben, hanem állatokban is szabályozó szerepet tölthet be, amely még általánosabb szerepére utal az élővilágban, mint azt eddig sejtettük (Stepanova és Ecker 2000). Az első példát erre Krasko et al. (1999) szolgáltatták, akik egy szivacs fajban (*Suberites domuncula*) kimutatták az etilén közvetlen hatását az éhezés során bekövetkező sejthalál (apoptózis) mérséklésére, és az intracelluláris kálcium koncentráció emelkedésére. Az etilén kezelés hatására két gén (*SDERR* és *CaM kináz II*) expressziójának fokozódását tapasztalták (Krasko et al. 1999). Még érdekesebb viszont, hogy az etilén bioszintézisben kulcsszerepet játszó ACC-szintáz (ACS) gén humán megfelelőjét is megtalálták, bár a fehérje ACS aktivitással nem rendelkezik (Koch et al. 2001). Az alma ACS géntermékekre jellemző $_{L}$-vinilglicin deaminációját azonban képes katalizálni.

2.1.2. Az etilén bioszintézise

A bioszintetikus útvonal csak 1979-ben vált teljessé, mikor tisztázódott, hogy az 1-aminociklopropán-1-karboxil sav (ACC) közvetlen prekurzora az etilénnek (Adams és Yang 1979). Később több összefoglaló publikáció (Yang és Hoffman 1984, Kende 1993, Zarembinski és Theologis 1994, Fluhr és Mattoo 1996, Bleecker és Kende 2000, Wang et al. 2002.) foglalkozott az etilén bioszintézisével, de az útvonal lépéseinek a tisztázása kétségkívül Shang Fa Yang és Hoffman (1984) nevéhez fűződik (1. ábra).

Az etiléntermeléshez a növényekben legkevésbé elérhető aminosav, a metionin megfelelő mennyisége szükséges, amely a bioszintézis prekurzora (Lieberman és Mapson 1964). Annak ellenére, hogy a fehérjeszintézis elengedhetetlen építőeleme, a celluláris metionin csaknem 80%-a S-adenozil metioninná (SAM) alakul a SAM-szintetáz enzim segítségével (Ravanel et al. 1998). Egy molekula SAM szintéziséhez az energiát egy ATP molekula szolgáltatja. A növények legjelentősebb metil-csoport donorja a SAM, amely jó néhány biokémiai folyamat szubsztrátja, beleértve az etilén mellett a poliaminok bioszintézisét is (Ravanel et al. 1998). Emellett a SAM a lipidek, fehérjék és nukleinsavak metilációs folyamataiban is szerepet játszik. Az etilénig eljutó bioszintézis sebesség-meghatározó kulcslépése a SAM $\Rightarrow$ 1-amino-ciklopropán-1-karboxil sav (ACC) átalakulás, amelyet a piridoxál 5'-foszfát függő ACC-szintáz enzim katalizál. Ugyanebben a reakcióban

ACC-n kívül 5'-metiltioadenozin (MTA) is szintetizálódik az ACC-szintáz segítségével, amely új metionin molekulák kialakulásához vezet, lezárva a Yang körciklust.



1. ábra. Az etilén bioszintezis útvonala (Yang és Hoffmann, 1984)

Ez a folyamat teszi lehetővé egy állandó celluláris metionin koncentráció fenntartását és metil-tio csoportok megőrzését még abban az esetben is, ha egyébként az etilén bioszintézise nagymértékű a sejtben.

Végül, utolsó lépésként az ACC etilénné, szén-dioxiddá és cianiddá alakul egy oxigénfüggő folyamatban, az ACC-oxidáz enzim (régebbi nevén „ethylene-forming enzyme" EFE) segítségével, vagy pedig malonil-ACC-vé (MACC) alakul melyet a malonil-transzferáz enzim katalizál (Amhrein et al. 1982, Hoffman et al. 1982). Ez utóbbi reakció az ACC

molekulák inaktiválásával az etiléntermelés lehetséges szabályozó lépése (Yang és Hoffman 1984). Az etilénszintézis melléktermékeként keletkezett toxikus cianidokat a β-cianoalanin szintáz enzim detoxifikálja β-cianoalaninné.

ACC-szintáz és ACC-oxidáz enzimeket már több mint 40 növényfajból izoláltak és jellemeztek. Bebizonyosodott, hogy az enzimet egy géncsalád kódolja a különböző fajokban.

2.1.3. Az ACC-szintáz (ACS) géncsalád

Az ACC-szintáz enzimet kódoló gént elsőként Sato és Theologis (1989) klónozták cukkíniből. Azóta már szinte minden gazdaságilag jelentős fajból sikerült izolálni, beleértve az almát is (Dong et al. 1991, Lay-Yee és Knighton 1995, Rosenfield et al. 1996, Harada et al. 1997, Sunako et al. 2000). Minden fajnál az enzimet egy többtagú géncsalád kódolja (Zarembinski és Theologis 1994), és tagjainak eltérő expresszióját különböző fejlődési, környezeti, valamint hormon szignálok szabályozzák (Zarembinski és Theologis 1994, Johnson és Ecker 1998, Barry et al. 2000, Alexander és Grierson 2002).

Meglepő módon a géncsalád tagjai között a hasonlóság DNS és fehérje szinten is kisebb lehet 50%-nál. Ez a meglepőnek tűnő eredmény azzal magyarázható, hogy a fehérje N-terminális szakasza ugyan konzervatív, de a C-terminális hipervariábilis (Li és Mattoo 1994). Ez a hipervariábilis, pozitív töltésű karboxil vég fontos a dimerizációhoz és az enzim néhány kinetikai paraméterét is meghatározza. Az enzim kristályszerkezete homodimer (Capitani et al. 1999). A fehérje harmadlagos szerkezetéből kiderült, hogy az egyes monomerek két különböző doménből, egy nagyból és egy kicsiből állnak. A nagy domén alkotja az enzim központi régióját és hozza létre a nagymértékben konzerválódott másodlagos szerkezetet, amely minden piridoxál 5'-foszfát függő enzimcsaládban megtalálható. A kisebb domén, amely szerkezetében nagyobb variabilitást mutat, tartalmazza a fehérje amino- és karboxil régióit. A fehérje aktív centruma feltételezhetően a két domén által közrefogott résben helyezkedik el a piridoxál 5'-foszfát kofaktorral kapcsoltan (Capitani et al. 1999). Meglepő módon az aktív centrum azon régióit, melyek a piridoxál 5'-foszfáttal kapcsolatba lépnek a környező alegységek szolgáltatják. Ez a megfigyelés alátámasztja azt a hipotézist, hogy az ACC-szintáz enzim működéséhez dimerizációra van szükség (Tarun és Theologis, 1998).

Az *Arabidopsis* genom, melynek a teljes szekvenciája már ismert összesen 13 ACC-szintáz gént (*ACS*1-13) tartalmaz (Schaller és Kieber 2002), azonban az *ACS*3-ról kiderült, hogy pszeudogén, az *ACS*1 pedig egy nem funkcionális ACC-szintáz enzimet kódol (Liang et al. 1992, Liang et al. 1995). A paradicsom esetében, amely a gyümölcs fejlődés és érés tanulmányozásának modellnövényévé vált, eddig összesen kilenc ACC-szintáz gént izoláltak,

de valószínűleg a végső szám még magasabb is lehet (Rottmann et al. 1991, Yip et al. 1992, Lincoln et al. 1993, Zarembinski és Theologis 1994, Olson et al. 1995, Nakatsuka et al. 1998, Shiu et al. 1998, Vogel et al. 1998).

2.1.4. Az ACC-oxidáz (ACO) géncsalád

Az első ACC-oxidáz gént paradicsomból izolálták (*pTOM*13) és antiszensz technikával sikerült igazolni az etilén bioszintézisében betöltött szerepét (Holdsworth et al. 1987, Hamilton et al. 1990). Később három ACO gént (*LEACO*1-3) sikerült izolálni paradicsomból, melyek sebzés, virágfejlődés, levél és virág szeneszcencia és gyümölcsérés során indukálódnak (Holdsworth et al. 1988, Barry et al. 1996, Blume és Grierson 1997, Nakatsuka et al. 1998, Llop-Tous et al. 2000). Heterológ hibridizáció segítségével almából (Dong et al. 1992, Dupille et al. 1993, Pirrung et al. 1993) és még számos más növényfajból is sikerült ACO géneket izolálni és jellemezni (Jiang és Fu 2000).

Ellentétben az ACS génekkel, az ACO géncsalád kevesebb taggal rendelkezik az egyes növényfajokban (pl. petúnia 4, paradicsom 3, alma 3, mungó bab 2) és közöttük a homológia a 90%-ot is meghaladja. A géneken belül az intronok száma és elhelyezkedése azonos. Az enzim monomerként működik (Poneleit és Dilley 1993) és a vas (II) függő oxidáz/oxigenázok csoportjába tartozik (Hamilton et al. 1990, Prescott 1993). Az ACO aktivitáshoz aszkorbát szubsztrát, szén-dioxid (Dong et al. 1992, Smith és John 1993), valamint oxigén (Yip és Yang 1988) is szükséges.

$$\text{ACC} + O_2 + \text{aszkorbát} \xRightarrow{Fe^{2+},\ CO_2} \mathbf{C_2H_4} + CO_2 + \text{HCN} + \text{dehidro-aszkorbát} + 2\ H_2O$$

Az még a mai napig sem tisztázott, hogy az ACO enzim hogyan katalizálja az ACC oxidációját, hogy az etilén szabaddá váljon. A legújabb álláspont szerint a Fe(II) ion indítja be az ACC katalízisét az etilén irányába miután egyidejűleg kötődik hozzá és az oxigén molekulákhoz, lehetővé téve ezáltal az elektron-transzfert (Rocklin et al. 1999).

2.1.5. A gyümölcsök érése

Az öregedés, szeneszcencia univerzális jelenség az élő szervezetekben, a fejlődés és differenciáció végső fázisa (Varner 1961). A növényeknél a gyümölcsök, termések érése az öregedés előjátéka. A biokémiai és fiziológiai változások végső célja a gyümölcsszövetet ehetővé és kívánatossá tenni az azokat elfogyasztó állatok számára és így a magvak (a következő generáció) elterjesztésének biztosítása. Ezek a folyamatok, bár fajonként változóak, általánosan a sejtfal struktúrájában következnek be, a keményítő cukorrá alakul, a

patogén fertőzésekkel szembeni fogékonyság nő, növekszik a pigment bioszintézis és felhalmozódás, az íz és aroma anyagok feldúsulnak (Rhodes 1980, Seymour et al. 1993). Az érés során megfigyelhető respirációs- és endogén etilén-szint változások alapján a gyümölcsök két fő csoportba sorolhatók. Az utóérő csoportba tartozó (paradicsom, körte, alma, őszibarack, banán, cukkíni, avokadó stb.) esetén az érés jelentős respirációs aktivitás és összetétel változással jellemezhető; a másik, a nem utóérő csoportban (narancs, citrom, eper, szőlő) a gyümölcsök összetételében nem figyelhetők meg ezek a változások (Biale és Young 1981, Lelievre et al. 1997a).

Az utóérő gyümölcsöknél - a légzésnövekedést kísérve - az etiléntermelés ugrásszerű, hirtelen emelkedése figyelhető meg. A gyümölcsök e csoportjában a termések érését exogén etilén kezeléssel (0.1 µl/l felett) is indukálni lehet. Az etilén ezen hatása legjobban azzal a mindenki által jól ismert jelenséggel bizonyítható, hogy egyetlen érett gyümölcs egy egész kosár tartalmát érésre serkenti az utóérő csoportba tartozó fajoknál (Theologis 1992). Elsőként paradicsomban bizonyították molekuláris szinten is, hogy az etilén az a növényi hormon, amely szabályozza a gyümölcsök érését. (Lincoln et al. 1987, Maunder et al. 1987).

A nem-utóérő gyümölcsök érése egy etilén független útvonalon történik, bár narancsban már kimutattak etilén-függő mRNS- és pigment felhalmozódást (Alonso et al. 1995), de még hiányos ismerettel rendelkezünk a biokémiai folyamatokat szabályozó mechanizmusokról.

Az etilén termelés szabályozása a magasabbrendű növényekben két szinten történik (Lelievre et al. 1997a). Az alapszint, a normál vegetatív növekedéshez, valamint a stressz-etilén termeléshez szükséges etilén szintet biztosítja, amely minden szövetben kimutatható, beleértve az éretlen gyümölcsöt is. A hirtelen beinduló és sokkal nagyobb értékkel jellemezhető második szint, csak az utóérő gyümölcsök érését, valamint a virágszirmok szeneszcenciáját szabályozza. Exogén etilén adagolására az etiléntermelés alapszinten negatív visszacsatolással válaszol (Zeroni et al. 1976, Vendrell és McGlasson 1971). Etilén antagonisták alkalmazása esetén pedig növekszik az etilén szintézise (Atta-Aly et al. 1987). Ezzel ellentétben, az érésben lévő utóérő gyümölcsökben (második szint) az etilén termelés egy autokatalitikus öngerjesztő folyamat. Ezen a szinten inhibítorok alkalmazása teljesen blokkolja az etilén termelést és érést (Sisler és Lallu 1994, Dupille és Sisler 1995). Az autokatalitikus etiléntermeléshez a bioszintézist limitáló ACS és ACO enzimek felgyorsított termelése szükséges. Paradicsomban (Picton et al. 1993) és dinnyében (Guis et al. 1997) is kimutatták, hogy az ACS aktivitás és ACC felhalmozódás már az érés beindulása előtt is

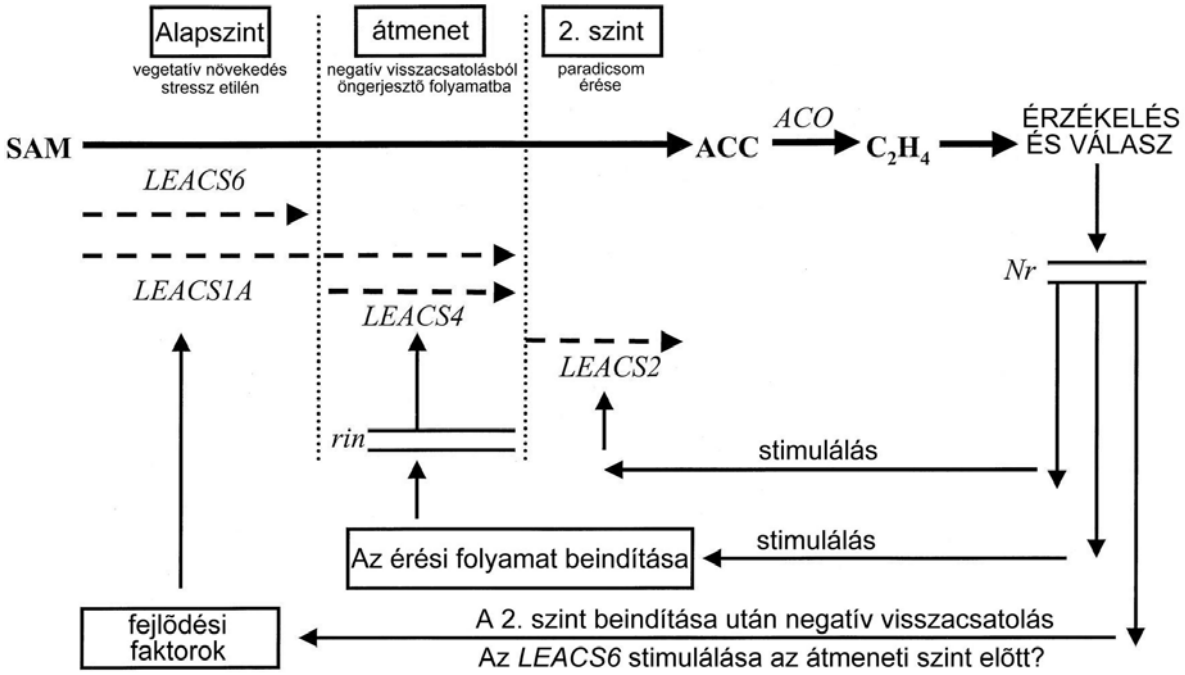
megemelkedik, még azokban az antiszensz technikával gátolt gyümölcsökben is, amelyek később sem termelnek számottevő etilént.

Más megfigyelések is azt az álláspontot támasztják alá, hogy az ACC ⇒ etilén átalakulást fejlődési faktorok szabályozzák. Meglepő módon az ACO aktivitás (Liu et al. 1985, Bufler 1986, Starrett és Laties 1991) és génexpresszió (Dong et al. 1992, Kneissl és Deikman 1996) indukálható éretlen gyümölcsök etilén kezelésével, míg az ACS és etilén bioszintézis nem. Ez azt mutatja, hogy a fejlődési faktorok által szabályozott ACS gén expressziója a kritikus tényező a gyümölcsök autokatalitikus etilén termeléséhez (Knapp et al. 1989, Terai 1993). Mivel az ACO és ACS géneket egy többtagú géncsalád kódolja a növényekben, ezért valószínűleg a negatív visszacsatolásból öngerjesztő folyamattá átváltó etilén termelésben a géncsalád tagjainak eltérő szabályozása játssza a főszerepet.

2.1.6. Az ACS és ACO gének szabályozása a gyümölcsérés során (paradicsom modell)

Az utóérő gyümölcsök érésének tanulmányozásában a paradicsom vált modellnövénnyé, mivel viszonylag rövid generációs idővel rendelkezik (~45-100 nap fajtától és évszaktól függően), könnyű szaporítani és keresztezni, diploid (2n = 24), genetikailag jól jellemzett, nagyszámú mutánst izoláltak, üvegházban egész évben termeszthető. Előnye még a viszonylag kis genommérete (0.9 pg / haploid genom) és hogy már több, mint 1000 molekuláris markert azonosítottak, melyek átlagos távolsága kisebb, mint 2 cM (Tanksley et al. 1992). A genetikai térkép hatékonyan alkalmazható olyan QTL-ek azonosítására is, melyek kapcsolatban vannak a gyümölcsfejlődéssel és az éréssel. (Grandillo et al. 1999, Ku et al. 1999, Doganlar et al. 2000). Ezen kívül ma már több, mint 40000 EST szekvencia áll rendelkezésre (http://www.tigr.org/tdb/lgi/), melyek kizárólag a gyümölcsfejlődés és érés különböző állapotaiban expresszálódnak (Moore et al. 2002).

A már említett 9 izolált ACS (*LEACS*1A, *LEACS*1B és *LEACS*2-8) gén közül elsőként az *LEACS*2 és *LEACS*4 gének érés-specifikus expresszióját bizonyították és széleskörűen tanulmányozták (Olson et al. 1991, Rottmann et al. 1991, Yip et al. 1992, Lincoln et al. 1993). Az *LEACS*2 gén antiszensz gátlása az endogén *LEACS*2 és *LEACS*4 gének expressziójának nagyfokú csökkenését, valamint az érés-specifikus etilén szintézis gátlását (0.1%-ra) okozta transzgénikus paradicsomban (Oeller et al. 1991). Később igazolódott, hogy az *LEACS*1A és *LEACS*6 gének is részt vesznek az érési folyamat előkészítésében (2. ábra. - Barry et al. 2000) és hogy mindegyik gén különböző expressziós mintázattal rendelkezik az érési folyamat során.



2. ábra. Az ACS gének expressziójának szabályozása az alap-, átmeneti- és érési szintek között paradicsomban (Barry et al. 2000 nyomán)

A paradicsomban előforduló érési mutánsok segítségével azonosították azokat a géneket, melyek közvetlen etilén szabályozás alatt állnak. Az érésre képtelen, „Never ripe" (*Nr*) mutáns nem képes az etilént érzékelni és így a szignáltranszdukciót elindítani, mivel az NR etilén receptorának etilén kötő domén-jében következett be a mutáció (Lanahan et al. 1994, Wilkinson et al. 1995). Az érésben gátolt „ripening inhibitor" (*rin*) mutánsok gyümölcseiben sem indulhat be az autokatalitikus etiléntermelés (Herner és Sink 1973), mert - bár itt a jelfelfogás működik -, de a RIN transzkripciós faktorban bekövetkezett mutáció eredményeként szintén gátlódik a jelátvitel (Vrebalov et al. 2002). A mutáns gyümölcsök analízisével bizonyították, hogy az *LEACS*2 gén expressziója etilén függő. Az *LEACS*1A és *LEACS*4 gének működésében csak kismértékű késést tapasztaltak, amely azt mutatja, hogy etilén nem szükséges ezeknek a géneknek a szabályozásához (Barry et al. 2000). Éretlen gyümölcsök etilén kezelése az *LEACS*1 és *LEACS*6 transzkriptumok jelentős csökkenését eredményezte, negatív visszacsatolást jelezve a génregulációban (Barry et al. 2000).

A 2. ábrán vázolt elmélet szerint a vegetatív fejlődés stádiumában szükséges alap etilén szintet az *LEACS*1A és *LEACS*6 gének biztosítják. Ez egészen a gyümölcsfejlődés azon szakaszáig tart, amikor is fejlődési faktorok hatására beindul az érés. Ekkor elsőként az *LEACS*1A gén expressziója nő, majd az *LEACS*4 gén is aktiválódik. Feltehetően a RIN fehérjének fontos szerepe van ezekben a folyamatokban. Ebben az átmeneti szakaszban indul be az autokatalitikus etilén szintézis, melyet az etilén függő *LEACS*2 gén folyamatos

működése tart fent. A megemelkedett etilén szint negatív visszacsatolást eredményez az alap etilén szintet biztosító gének működésében.

Az érési folyamat beindulása előtt az *LEACO*1 és kisebb mértékben az *LEACO*3 gének aktivitása megelőzi az ACS génekét, tehát feltehetőleg ezek is résztvesznek az etilén termelés szabályozásában (Barry et al. 1996). Az *LEACO*2 transzkriptumokat szinte kizárólag csak portok szövetben sikerült kimutatni. Az *LEACO*1 expressziója a paradicsom esetében az érési folyamat beindulását („breaker" fázis - zsendülés) követő harmadik napon éri el maximumát, majd visszacsökken a kiinduló szintre. Az *LEACO*3 transzkriptumok csak a paradicsom érésének „breaker" fázisában mutathatók ki, utána eltűnnek. Feltehetőleg az autokatalitikus etilén szintézis az *LEACO*1 *de novo* szintézisével kezdődik és az ennek hatására megemelkedett etilén szint indítja el az *LEACS*1A gén fokozott expresszióját, majd - a már ismertetett úton - az érési folyamatot.

2.1.7. Az érést befolyásoló egyéb külső tényezők

Azok a környezeti hatások, amelyek a betakarítást követően a szállítás és tárolás során érik a gyümölcsöket, nagymértékben befolyásolják azok etilén szintézisét is. Az alacsony hőmérsékleten történő tárolást széleskörűen alkalmazzák a tárolási idő meghosszabbítására, azonban például az őszibarack esetében éppen ez a hideg kezelés szükséges az autokatalitikus etilén termelés beindításához (Blankenship és Richardson 1985, Morin et al. 1985, Knee 1987). Az alacsony hőmérséklet indukálja az ACO és ACS gének működését. Hűtés nélkül exogén etilén adagolással sem lehet az ACS gének expresszióját indukálni (Lelievre et al. 1997b). A hideg kezelés az etilén érzékenységet is befolyásolja.

Azokban a gyümölcsökben, melyek nem igényelnek hideg kezelést (ide tartozik az alma is) a tárolási idő növelhető, de a hűtés előmozdítja az etilén szintézis gyors bekapcsolását, a hideg periódus után. Ez elősegíti a gyümölcsök homogén beérését (Knee et al. 1983, Jobling et al. 1991). Granny Smith fajtában bizonyították, hogy a hideg kezelés indukálja az ACO aktivitást és ACO fehérje halmozódik fel (Larrigaudière és Vendrell 1993, Lelievre et al. 1995). Ezeket (ACO transzkriptum és fehérje) hőkezeléssel (38°C) próbálták csökkenteni paradicsomban mely három nap után sikerült is (Lurie et al. 1996). Irreverzibilis gátlásra azonban nincs lehetőség, így önmagában a hideg kezelés és azt követő hőkezelés nem oldja meg a tárolási problémákat.

A tárolótér gázösszetételének megváltoztatása azonban döntő módon képes gátolni az etilén és prekurzorai szintézisét. Már korán megfigyelték, hogy a levegő oxigén tartalmának 1-3 %-ra történő csökkentése 50%-kal mérsékelte az alma etilén termelését (Burg és Thimann

1959). Ez az ACO aktivitás gátlásával magyarázható, mivel mint láttuk működéséhez oxigén szükséges (lásd. az ACC-oxidáz géncsalád fejezet). A csökkentett oxigén szint és alacsony hőmérséklet kombinációjával késleltethető az autokatalitikus etilén termelés beindítása az ACS és ACO aktivitás gátlásával (Gorny és Kader 1996).

A szén-dioxid ~2%-os koncentrációja fenntartja az *in vitro* ACO aktivitást (John 1997). Magasabb koncentrációban már az etilén működés inhibítorának számít (Burg és Burg 1967) ezért az autokatalitikus etilén termelés beindulása ezúton is megelőzhető. A tárolótér szén-dioxid tartalmának 5%-ra történő emelése már az ACS és ACO aktivitást erősen limitálja (Bufler 1984, 1986; Blanke 1991, Mathooko 1996).

Tehát a hidegkezelés, alacsony oxigén szint és megemelt szén-dioxid koncentráció kombinálásával a gyümölcsök tárolási problémái megoldhatóvá válhatnak. A gázösszetétel szabályozását lehetővé tevő hűtőtárolók alkalmazása azonban jelentősen megnöveli a tárolási költségeket.

2.1.8. Az etilén termelés gátlása

Régóta ismert, hogy specifikus inhibitorokkal az etilén szintézise illetve működése gátolható. Aminoetoxivinilglicin (AVG) és aminooxiecetsav (AOA) blokkolja a SAM $\Rightarrow$ ACC átalakulást (Beyer 1976, Beyer et al. 1984). A nehézfémek közül a kobalt és nikkel viszont képes megakadályozni az ACC $\Rightarrow$ etilén átalakulást. Az ezüst ionok ezüst nitrátként és tioszulfátként alkalmazva, valamint az újonnan felfedezett szintetikus ciklopropének [ciklopropén (CP), 1-metilciklopropén (1-MCP), 3,3 dimetil ciklopropén (3,3-DMCP)] az etilén receptorokhoz kapcsolódnak és gátolják a jelátviteli mechanizmust (Serek et al. 1994, Sisler et al. 1996, Sisler és Serek 1997). Ezek közül a gyümölcsök eltarthatóságának növelésére az 1-MCP használata terjedt el, mivel már kis mennyiségben alkalmazva is hatékony (0.1-1 µl/l) és ebben a koncentráció tartományban nem mérgező.

Almában az 1-MCP hatását eddig az ’Anna’, ’Empire’, ’Fuji’, ’Gala’, ’Ginger Gold’, ’Granny Smith’, ’Jonagold’, ’Law Rome’, ’McIntosh’ és ’Redchief Delicious’ fajták esetében vizsgálták (Fan et al. 1999a,b, Rupasinghe et al. 2000, Watkins et al. 2000, Mir et al. 2001, Pre-Aymard et al. 2003). A kezelés hatására gátlódott a gyümölcsök etilén termelése, respirációja, puhulása és a titrálható savasság is kevésbé csökkent. Az 1-MCP hatása a szabályozható gázösszetételű hűtőtárolókban jelentősebb volt, mint normál levegő összetétel mellett (Watkins et al. 2000). Almafajták esetében az alkalmazott 1-MCP koncentráció 0.5-1 µl/l között volt a leghatékonyabb, azonban ez függött a hőmérséklettől és a gyümölcsök érettségi állapotától is. Az optimális időpontot csak négy nappal meghaladó késésnek sem

volt szinte semmi hatása a gyümölcsök érésének gátlásában (Pre-Aymard et al. 2003). Annak ellenére, hogy az 1-MCP irreverzibilisen kapcsolódik az etilén receptorokhoz, új receptorok megjelenése a kezelést követően feloldhatja gátló hatását (Jiang et al. 1999).

Az etilén termelés gátlásának molekuláris és géntechnológiai megközelítését a bioszintézisben szerepet játszó enzimek expressziójának antiszensz vagy szensz génekkel történő gátlása jelenti.

2.1.9. A génexpresszió molekuláris gátlása növényekben

Az antiszensz RNS-sel kiváltott génszupresszió növényekben (Ecker és Davis 1986) nagymértékben elősegítette a növényi géntermékek funkciójának megismerését és jellemzését az utóbbi 15 évben. Az első antiszensz RNS-sel gátolt növényi génről Van der Krol et al. (1988) számoltak be. Az antocián és flavonoid bioszintézisben kulcsszerepet játszó csalkon szintáz (CHS) gén antiszensz gátlása vizuálisan is megfigyelhető volt a virágok pigmentszintézisének csökkenése vagy hiánya miatt. A transzformáció azonban annak ellenére, hogy az antiszensz RNS a virág minden régiójában működött nem csak tiszta fehér, hanem átmeneti pigmentáltságú virágokat is eredményezett. Később igazolódott, hogy a virágszín kialakulásában más folyamatok is hatással lehetnek, például a gibberellinsav-szintézis inhibítora növelte a gátlást (Blokland et al. 1993).

A gyümölcsök érési folyamatában résztvevő gének alapvető szerepének megértését is az antiszensz technika tette lehetővé (Gray et al. 1992). Elsőként a növényi sejtfal pektin összetevőjének lebontásáért felelős poligalakturonáz (PG) enzim működését gátolták paradicsomban antiszensz módszerrel (Smith et al. 1988). Annak ellenére, hogy a transzgénikus gyümölcsökben a PG aktivitás a normál szint 1 %-ára csökkent és a pektin degradációja is gátolt volt (Smith et al. 1990), a bogyók puhulásában nem volt kimutatható szignifikáns különbség (Schuch et al. 1991). Ez azt mutatta, hogy a PG aktivitás nem egyedül önmaga felelős a gyümölcsök puhulásáért. A PG antiszensz növényekben az etilén szintézis és érés nem volt gátolt (Smith et al. 1990), tehát az érési folyamat iniciációjában nem vesz részt, ellentétben az addigi feltételezésekkel (Baldwin és Pressey 1988). A feldolgozás szempontjából azonban voltak kedvező tulajdonságai a transzgénikus fajtának, a hasadásnak, mechanikai sérüléseknek és a másodlagos gombás fertőzéseknek jobban ellenállt (Schuch et al. 1991). Az első köztermesztésbe került GMO fajta („Flavr Savr” paradicsom fajta – Calgene Inc. / 1994) is antiszensz PG gént tartalmazott, azonban nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket és ezért kereskedelmi forgalomban kevesebb, mint egy évig volt.

A sejtfal pektin alkotórészének lebontásában résztvevő másik enzim a pektinészteráz (PE), melynek antiszensz gátlása a PG gén szupressziójához hasonló eredményhez vezetett (Tieman et al. 1992, Hall et al. 1993). Hiába gátlódott a PE aktivitás több mint 90%-kal, a bogyók puhulására nem volt hatással; azonban a PG aktivitást gátolta. Ez alátámasztja a PG és PE enzimek szinergikus együttműködéséről korábban kialakított álláspontot (Seymour et al. 1987). Mivel azonban a pektin polimerek hosszabbak maradtak az antiszensz PE paradicsomban, a belőlük készült pürének nagyobb lett a viszkozitása, így a kívánatos konzisztenciájú püré elkészítése könnyebbé vált. Emiatt mind a mai napig kereskedelmi forgalomban maradt nem csak az USA-ban, de Angliában is.

A paradicsom puhulásának és érésének nagyfokú késleltetését az etilén bioszintézist katalizáló enzimek antiszensz szupressziója tette lehetővé. Mint már említettük, a *pTOM*13 cDNS-t antiszensz orientációban paradicsomba transzformálva sikerült megállapítani, hogy az ACO enzimet kódolja (Hamilton et al. 1990). Az etilén szintézis a transzgénikus bogyókban a normális szint 5%-ára csökkent és jelentős késést mutattak érésben és puhulásban a kontrollhoz viszonyítva. A növények részletesebb vizsgálata során (Picton et al. 1993) kiderült, hogy az érés gátlásának mértéke erősen függött attól, hogy milyen fejlődési stádiumban takarították be a terméseket. Az érés beindulása („breaker” fázis, mikor a bogyók elkezdenek pirosodni) előtt gyűjtött bogyók érése jelentősebb mértékben gátlódott. Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy ebben a stádiumban még nem kezdődik el a citokininek (az érési folyamat inhibítorai) intenzív kiáramlása a gyümölcsből (Martineau et al. 1994), amely az érés során megfigyelhető. A levelek szeneszcenciája is szignifikáns késést mutatott a transzgénikus növényekben (Picton et al. 1993).

Az etilén szintézis még nagyobb mértékű gátlását sikerült elérni az ACS enzim antiszensz szupressziójával paradicsomban (Oeller et al. 1991). Valószínűleg ez azzal magyarázható, hogy az ACS enzim kevésbé stabil *in vivo* és így érzékenyebb az antiszensz gátlásra. A transzgénikus gyümölcsök etilén termelése 99.5%-kal csökkent, de exogén etilén adagolással az érési folyamatot vissza lehetett állítani. Ezek a kísérletek jelentették végső soron az etilén szerepének első nyilvánvaló bizonyítékát az érési folyamatokban. Antiszensz ACS gént hordozó paradicsom fajta 1995-ben került a piacra „Endless Summer” néven (DNA Plant Technology Inc.).

Meglepő módon a szensz génnel történő transzformáció az esetek többségében nem fehérje túltermeléshez vezet, hanem az antiszensz gátláshoz hasonló génszupresszióhoz. Ezt a jelenséget koszupressziónak nevezték el (Napoli et al. 1990). Ez a hatás azonban nem

univerzális; például a teljes hosszúságú peroxidáz cDNS szensz orientációban növelte a peroxidáz aktivitást dohányban (Lagrimini et al. 1990).

A PG enzim expresszióját paradicsomban nemcsak antiszensz, hanem szensz PG gén transzformációjával is sikerült gátolni (Smith et al. 1990). Az endogén (vad gén) és a bejuttatott homológ transzgén megnyilvánulásában kölcsönös csökkenés volt tapasztalható. Ezt sikerült kimutatni szensz csalkon szintáz (CHS) génnel (Napoli et al. 1990, Van der Krol et al. 1990) és szensz dihidroflavonol 4-reduktáz (DFR) génnel transzformált petúniából is. A génszupresszió magyarázatára Napoli et al. (1990) és Jorgensen (1990) azt a nézetet támogatták, hogy az a homológ DNS szekvenciák között fellépő transz interakciók következménye, míg Van der Krol et al. (1990) szerint a feleslegben lévő RNS blokkolja a transzkripciót. Később megfigyelték, hogy szensz RNS molekulák direkt injektálása a sejtekbe hasonló hatást okozott (Guo és Kemphueses 1995). A legnagyobb meglepetést az keltette, hogy kettős szálú RNS (dsRNS) injektálásával a megfelelő endogén gén szupressziója még kifejezettebb volt (Fire et al. 1998). Ezt a jelenséget RNS interferenciának (RNAi) nevezték el. Ez a felfedezés a poszt-transzkripcionális géncsendesítés (PTGS) pontosabb megismeréséhez vezetett, mivel bebizonyosodott, hogy az eddig bemutatott génexpressziós gátlások az RNAi különböző példáinak tekinthetők.

A kialakult dsRNS molekulákat specifikus ribonukleázok (Dicer) 21-25 bp hosszúságú rövid szakaszokra [kis interferáló RNS-ek (siRNAs)] hasítják fel (Hamilton és Baulcombe 1999, Bernstein et al. 2001). Ezek a termékek 5’ foszfát, 3’ hidroxil végekkel és két túlnyúló nukleotiddal rendelkeznek a 3’ végükön, melyek elengedhetetlen kellékei az RNAi kialakulásának (Hamilton és Baulcombe 1999). A következő lépésben specifikus fehérjékkel komplexet alkotnak (Nykänen et al. 2001), melyek önmagukban még nem képesek az RNS interferenciát kifejteni, ehhez először térben át kell rendeződniük (Hammond et al. 2001). A kialakult aktív forma már képes a komplexben lévő siRNS-sel komplementer mRNS-t felismerni és a komplexet alkotó ribonukleázzal elhasítani (Elbashir et al. 2001), így a transzlációra képtelenné tenni (Hutvágner és Zamore 2002).

Meglepő módon ez a mechanizmus szinte minden eukarióta szervezetben megtalálható és a benne szereplő enzimek nagy homológiát mutatnak a fajok között. Néhány enzim más, lényeges sejtfunkció kialakításában is szerepet játszik, amely fontos együttműködést sejtet a különböző anyagcsereutak és az RNS interferencia között. Feltehetően ez a mechanizmus egy ősi védekezési módszer az eukarióta sejtekben az idegen DNS- és vírusfertőzések ellen (Hutvágner és Zamore 2002).

2.2. Az alma transzformációja

Elsőként James et al. 1989-ben számoltak be a „Greensleeves” fajta sikeres transzformációjáról *Agrobacterium tumefaciens*-re alapozott levéllemez transzformációval, a pBIN6 bináris vektorral. A transzgénikus növények, amelyeket a transzformációt követően 5 hónap elteltével kaptak, tartalmazták a nopalin-szintáz riporter gént, valamint a neomicin-foszfotranszferáz marker gént, amely a kanamicin rezisztenciáért felelős. A gének stabilan integrálódtak a genomba és 5 év elteltével a magoncokban 1:1 arányban hasadtak, a mendeli öröklésmenetnek megfelelően (James et al. 1994). A transzformációs hatékonyság azonban alacsony volt (1-2%), és a hajtásokat a genetikailag instabil kallusz stádiumon keresztül kapták. Napjainkig már csaknem 25 almafajta és számos alany transzformációja megoldottnak tekinthető, bár a hatékonyságot azóta sem sikerült számottevően növelni (1. táblázat). Az eddigi eredmények alapján a legnagyobb transzformációs hatékonyságot M26, Jork 9, M9, M29 alany- és Royal Gala valamint Greensleeves fajtákkal érték el. A transzformáció eredményességét befolyásoló tényezők közül a genotípus hatása meghatározó. Ennek következtében minden genotípusra külön-külön kell kidolgozni a megfelelő transzformációs, szelekciós, regenerációs, gyökeresítési stb. rendszert. Azon felül, hogy az egyes genotípusok különböző eredményességgel transzformálhatóak, a tranziens expresszió sem mutat pozitív korrelációt a stabil expresszióval. Úgy tűnik, hogy a genotípus-függő faktorok különbözőképpen hatnak a DNS felvételére és integrációjára (De Bondt et al. 1994).

1. táblázat. Az alma *Agrobacterium*ra alapozott transzformációja során elért eddigi eredmények (Galli et al. 2001a)

Transzformált fajt(á)k	Agrobacterium törzs(ek)	Transzgén	Regenerációs hatékonyság	Hivatkozás
Greensleeves	LBA 4404	*nos*	1-2%	James et al. 1989
Empire, Freedom, Golden Delicious, Liberty, McIntosh, M7A, M26	LBA 4404	*gusA*	néhány%	Yepes 1990
M26	A4 (A. rhizogenes)	*Ri T-DNA*	-	Lambert és Tepfer 1992
M26	LBA 4404 CZ707 EHA 101	*gusA*	1.8-4%	Maheswaran et al. 1992
Greensleeves	C58C1 pGV3850	*gusA*	néhány%	James et al. 1993
M26	C58sZ707	*gusA*	-	Norelli és Aldwinckle 1993
Jonagold, Elstar, Gala, Braeburn, Merlijn, Fuji	LBA 4404 C58C1 EHA 101	*gusA*	-	De Bondt et al. 1994

1. táblázat folytatása

Transzformált fajt(á)k	Agrobacterium törzs(ek)	Transzgén	Regenerációs hatékonyság	Hivatkozás
Granny Smith	C58C1	*ipt*$_1$, *ipt*$_2$	0.07%	Trifonova et al. 1994
M26	LBA 4404	*attacinE*	0.15%	Norelli et al.1994
Delicious	C58C1	*gusA*	1-2%	Srikandarajah.et al. 1994
Gala, Golden Delicious	AGL0	*gusA*	0.8%	Schaart et al. 1995
Royal Gala	LBA 4404	*uid*A, *als*	4.6%	Yao et al. 1995
Jonagold, Elstar, Gala, Golden Delicious, Fuji, Jonagold King, Braeburn, Jonagored, Merlijn	EHA 101 EHA 105	*gusA, bar*	0-3.7%	De Bondt et al. 1996
Florina, Gala, M26	EHA 101 EHA 105	*uid*A,	0.9-2.9%	Perales et al. 1996
Gala,Golden Delicious, Elstar	AGL0 EHA101	*gusA*	0.4-8%	Puite és Schaart 1996
Royal Gala	EHA105	*gusA*	-	Liu et al. 1998
M26	GV3101	*rolA*	0.9%	Holefors et al. 1998
M26	C58C1	*gusA, rolB*	-	Welander et al. 1998
Delicious, Pink Lady	pGV3850	*gusA*	1.2-2.6%	Srikandarajah és Goodwin 1998
Delicious, Golden Delicious, Royal Gala Greensleeves	EHA101	*gusA*	0-5.6%	Maximova et al. 1998
Marshall McIntosh	EHA105	*gusA*	2.2-3.1%	Bolar et al. 1999
Marshall McIntosh	EHA105	*ech42*	-	Bolar et al. 2000
Jork 9	EHA101A C58C1	*gusA, rolB*	1.6-6.5%	Sedira et al. 2001
Royal Gala	EHA105	*MB39*	1.7%	Liu et al. 2001
M9, M29	C58C1	*rolB*	0-6.6%	Zhu et al. 2001
Ringo (*M. prunifolia*)	EHA101	*rolC*	-	Igarashi et al. 2002

1. táblázat folytatása

Transzformált fajt(á)k	Agrobacterium törzs(ek)	Transzgén	Regenerációs hatékonyság	Hivatkozás
Galaxy	EHA105	*attacinE, lizozim*	-	Ko et al. 2002

Rövidítések: ***als***: acetolaktát-szintáz gén, ***attacinE***: *Hyalophora cecropia* litikus fehérjét kódoló attacin E génje, ***bar***: foszfinotricin-acetil transzferáz gén kódoló régiója, ***ech42***: *Trichoderma harzianum* endokitináz génje, ***gus*A**: β-glucuronidáz gén kódoló régiója (tartalmaz egy növényi intront, így nem nyilvánul meg az *Agrobacterium*ban (Vancanneyt et al. 1990), ***ipt₁*:**: izopentenil-transzferáz gén pTiB653-ból izolálva, ***ipt₂***: izopentil-transzferáz gén pTiC58-ból izolálva, ***MB39***: *Hyalophora cecropia* litikus fehérjét kódoló cecropin génje, ***nos***: nopalin-szintáz gén, ***rolABC***: az *Agrobacterium rhizogenes* gyökérindukáló lókuszának (root loci-rol) génjei, ***Ri T-DNA***: az *Agrobacterium rhizogenes* gyökérindukáló T-DNS régiója, ***uid*A**: β-glucuronidáz gén kódoló régiója (egy bakteriális riboszóma-kötő hely hiánya miatt nem nyilvánul meg az *Agrobacterium*ban (Janssen és Gardner 1989).

Mint az 1. táblázatból is kitűnik, a transzformációk túlnyomó többségében a β-glükuronidáz riporter gén szerepelt. Az alanyok törpésítésére és gyökeresedési képességük javítására az *Agrobacterium rhizogenes*-ből származó *rol*ABC génekkel próbálkoztak (Lambert és Tepfer 1992, Holefors et al. 1998, Welander et al. 1998, Sedira et al. 2001, Zhu et al. 2001, Igarashi et al. 2002). A mai modern karcsú-orsó termesztésben elengedhetetlen feltétel a törpésítés, hogy a tőtávolságot csökkenthessék és a szüretelést is könnyítsék. A transzgénikus alanyok ilyen jellegű felhasználása azért is előnyös, mert a transzgén megszökésének nincs veszélye és a ráoltott nemes fajta már nem tartalmazza a transzgént.

A citokinin bioszintézis első enzimével, az izopentil-transzferázzal transzformált növényekben az apikális dominancia drasztikusan lecsökkent, így elvileg ezzel a módszerrel is elérhető a törpésítés (Trifanova et al. 1994). A megemelkedett citokinin koncentráció következtében azonban ezek a növények gyökeresedésre képtelenek, csak auxin és anticitokinin (4-substituted-triazolo [4,5,d] pyrimidine) hozzáadásával képeznek gyökérzetet.

A baktériumos fertőzések - különös tekintettel az *Erwinia amylovorá*ra, amely 1996-tól már hazánkban is komoly károkat okozott - elleni védekezésnek egyik genetikai módszere a *Hyalophora cecropia* litikus fehérjéit (attacin, cecropin vagy szintetikus analógjai: shiva-1, SB-37) kódoló génekkel történő transzformáció (Norelli et al. 1994, Liu et al. 2000, Ko et al. 2002). Mind ezzel a megközelítéssel, mind a T4 bakteriofágból izolált lizozim génjével történt transzformációt követően néhány transzgénikus vonal rezisztensnek bizonyult az *E. amylovora* fertőzéssel szemben (Ko et al. 2002).

Az alma varasodásáért felelős *Venturia inaequalis* gomba elleni rezisztenciát Bolar et al. (2000) egy másik gombafajból származó (*Trichoderma harzianum*) endokitináz génnel történő transzformációval érték el. A magas endokitináz szint azonban nem csak a betegség kialakulását, hanem a növény növekedését is gátolta.

2.3. Festuca fajok molekuláris taxonómiája

2.3.1. A Festuca fajok jellemzése

A *Festuca* nemzetség fajai nagy számban fordulnak elő a hazai természetes- és kultúrflórában. Fajaik természetes gyepeink állományalkotói, ezért az ősgyepeinken folytatott legeltetés miatt is nagy a gazdasági jelentőségük. Az úgynevezett aprócsenkeszek az abiotikus stressznek (szárazság, só stb.) kitett területek jellegzetes fajai. Közepes mennyiségű, de kiváló minőségű termést adnak még olyan területen is, ahol más faj nem jöhet számításba.

Ezeket a fajokat, melyek a Kárpát-medence központi, homokosabb területein találhatók, a flóraművekben a *Festuca Ovinae* csoportba sorolták (Hackel 1882, Soó 1955, 1973a, 1973b, Stohr 1960, 2002, Patzke 1961, 1968, Májovský 1962, Nyárády és Nyárády 1964, Schwarzová 1967, 1968, Horánszky et al. 1971, Tzvelev 1971, Beldie 1972, Alexeev 1973, Pils 1984, Englmaier 1994, Horánszky 1992, 2000).

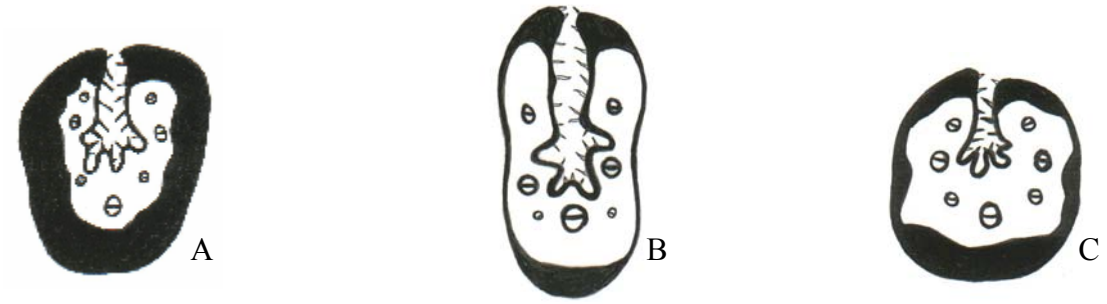
A fajok pontos meghatározása több szempontból is vitatott. Taxonómiai problematikájuk alapja, hogy a morfológiai hasonlóság mellett, mely alapján a leírásuk is történt, jelentősek a mikroszisztematikai eltérések. Besorolásukat tovább zavarja a taxonómiai bélyegek környezetfüggősége, a fajok nagy száma (besorolástól függően 150-500 faj), ploidszintjük változatossága (2n=2x=14-től 2n=12x=84-ig) és hogy többségükben idegentermékenyülők.

A *Festuca* fajok monográfia szintű összefoglalását és feldolgozását Hackel (1882) végezte el. Az addig leírt fajokat rendszerbe foglalva, az általa leírt új taxonokkal kiegészítve jelentette meg. Fajfelfogása, ami az egyes taxonoknak gyűjtőfajként való alkalmazását jelenti, Horánszky (1969) szerint nem követendő szemlélet, mert csak a különben is nehezen áttekinthető és használható nómenklatúra zűrzavart növeli, és elmossa a valóban jól körülhatárolható külön fajként való értékelést. A rendszertanilag igazán problematikus csoport taxonjai Hackel (1882) művében a *F. Ovinae* körül, és azon belül is a *F. sulcata* gyűjtőcsoportban találhatók. A taxonok közül különösen azok érdekesek, melyeket sok szerző (Májovszky 1962, Soó 1973a, 1973b, Pils 1985, Simon 1992), mint intraspecifikus taxonokat tárgyal (*F. stricta, F. wagneri, F. javorkae*). A lehetséges, de nem bizonyított szülőfajaik: *F. rupicola, F. valesiaca, F. pseudovina,* illetve *F. vaginata, F. pallens*.

A *F. Ovinae* csoport fajainak meghatározását továbbá az is nehezíti, hogy ezek a taxonok sokszor csak méretbeli különbségeik alapján választhatók el egymástól (Soó 1955, Csányi-Kovács és Horánszky 1973, Horánszky 1969, 1970, Pils 1985). A növények epidermisz struktúrája is meghatározó, és rendkívül fontos bélyeg (Horánszky 1954, Penksza

és Engloner 1999, Penksza 1999, 2000). A különböző flóraművekben és a határozókban a levelek szövettani felépítése a fajok elkülönítésekor használt kulcsok alapja.

A levélkeresztmetszet alapján a hazai szálaslevelű fajok három csoportba sorolhatók (Penksza 2000). Az első csoportba a gyűrűs, a második csoportba a köteges és a harmadik csoportba az átmeneti szklerenchimázottságú formát mutató taxonok tartoznak (3. ábra). A köteges és az átmeneti formát mutató fajok meghatározása nem egyértelmű. Az átmeneti formát mutatók közé soroljuk a hibrideredetűként nyilvántartott taxonokat.



F. vaginata
F. pallens

F. rupicola *F. pseudovina*
F. valesiaca *F. dalmatica*
F. pseudodalmatica

F. wagneri
F. stricta
F.javorkae

3. ábra. A gyűrűs (A), köteges (B) és átmeneti (C) szklerenchimázottságú formát mutató taxonok

Különleges helyet foglal el a *F. javorkae*, melyet Májovszky (1962) írt le. A fajleírás alapján a taxon szintén átmeneti formát mutat. A típuspéldányok alapján Penksza (1999) pontosította a fajleírást, miszerint 3-5 szklerenchimával rendelkező taxonról van szó, amely megjelenésében nagyon hasonlít a *F. rupicola*, elsősorban vastagabb típusú példányaira.

A fajok kromoszomális feldolgozásával is több munka foglalkozott (Baksay 1957, Pils 1985, Horánszky et al. 1971). A terepi és tenyészkerti állomásokon is végeztek populáció szintű citológiai vizsgálatokat (Csányi-Kovács és Horánszky 1973, Horánszky et al. 1980).

Horánszky (1969) arra vonatkozóan is végzett vizsgálatot, hogy mi az a megfelelő egyedszám, mely herbáriumi példányokon végzett összehasonlító értékelés esetén megfelelő eredményt adhat. Horánszky (1969), Csányi-Kovács és Horánszky (1973) amellett, hogy a lokalizált mintavételre is felhívta a figyelmet, több egymáshoz közel élő faj morfológiai összehasonlítását is elvégezte a buga bélyegei alapján.

A külső morfológiai és belső anatómiai és fenológiai tulajdonságokra alapozott klasszikus taxonómia nagy hibája, hogy ezeket a bélyegeket a környezeti tényezők jelentősen módosíthatják. A molekuláris genetikai módszerek alkalmazásával viszont a környezeti tényezők hatása eliminálható. A racionális megközelítést tehát a DNS alapú markerek

jelenthetik, a fajok azonossága vagy különbözősége a genetikai távolságok, a genomiális eltéréseik alapján meghatározható.

Molekuláris vizsgálati eredmények elsősorban a termesztésbe vont *Festuca* fajokra állnak rendelkezésre. RFLP markerek alapján genetikai kapcsoltsági térképet készítettek a *F. arundinacea* fajra (Xu et al. 1991, 1995; Xu és Sleper 1994) és bizonyították, hogy a *F. arundinacea* 'P' genomja a *F. pratensis*-ből származik (Chen et al. 1998). A *Festuca* fajok filogenetikai kapcsolatait vizsgálták fehérjeelektroforézis (Bulinska-Radomska és Lester 1988, Charmet és Balfourier 1994), kloroplaszt DNS (Darbyshire és Warwick 1992, Lehvaslaiho et al. 1987, Torrecilla et al. 2003), RAPD (Stammers et al. 1995, Galli et al. 2001b), RFLP (Charmet et al. 1997, Xu és Sleper 1994) és ITS rDNS (Charmet et al. 1997, Gaut et al. 2000, Torrecilla és Catalán 2002, Torrecilla et al. 2003) technikák felhasználásával. Kétségkívül, a legértékesebb információt a DNS szekvenciák összehasonlítása szolgáltatja.

2.3.2. PCR technikán alapuló vizsgálatok

Csak a disszertáció témáján belül alkalmazott módszereket mutatjuk be.

2.3.2.1. RAPD és AP-PCR analízis

A RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) technika kifejlesztését követően (Williams et al. 1990) széleskörűen elterjedt és nagy karriert futott be, manapság azonban már kiszorulóban van. Ezzel a technikával a genom ismeretlen szakaszai szaporíthatók fel egy random, általában 10 bp hosszúságú oligonukleotid primer segítségével. Az AP-PCR (Arbitrary Primed-PCR) analízis elve (Welsh és McClelland 1990) is ugyanez, csupán a felhasznált primerek hosszúságában különbözik a RAPD technikától. Rendszerint egy specifikus fragmentum felszaporítására használt primerpárok egy-egy tagját használják fel, ezért ezek méretben hosszabbak és változatosak. Míg a primer kapcsolódási hőmérséklet RAPD esetében állandó (36°C), addig az AP-PCR-nél ezt a primer hosszúságának és szekvenciájának ismeretében kell meghatározni.

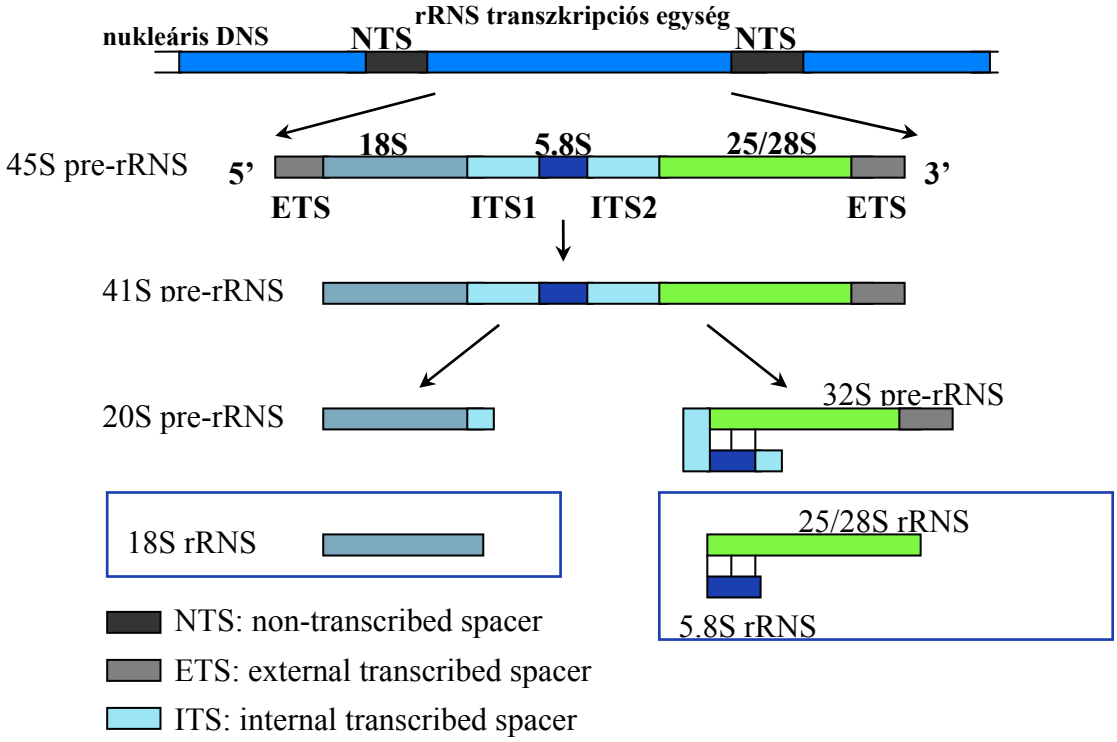
A RAPD és AP-PCR analízis előnye, hogy kevés templát DNS szükséges és könnyű kivitelezni. A különböző genotípusok mintázataiban detektálható különbségek a primerkötő helyekben bekövetkező változások, vagy a felszaporított fragmentum hosszában meglévő különbségek (deléciók, inszerciók vagy inverziók következtében) formájában jelentkeznek. A módszer hátrányaként meg kell említeni, hogy a reakciók ismételhetősége változó és az azonosított markerek általában dominánsan öröklődnek, tehát a heterozigóták detektálása

nehéz. Azonban inter- és intraspecifikus polimorfizmusok kimutatására, genetikai különbözőség és/vagy rokonsági kapcsolatok megállapítására és kapcsolt markerek azonosítására kiválóan alkalmazhatók.

2.3.3. Összehasonlító szekvencia elemzés

2.3.3.1. Az ITS (Internal Transcribed Spacer) szekvenciák jellemzői

A riboszómális RNS molekulákat kódoló DNS szakaszok közötti spacer szekvenciák (ITS: internal transcribed spacer) a filogenetikai kutatások leggyakrabban alkalmazott eszközei a baktériumoktól az emberig. Ezek a szekvenciák határolják a 18S és 5.8S (ITS1), illetve az 5.8S és 25/28S (ITS2) riboszómális RNS géneket (4. ábra). Az elsődleges (45S pre-rRNS) átiratban még átíródnak, később azonban kivágódnak. Ezek az elemek a genomban több száz kópiában tandem elrendezésben találhatók, biztosítva ezzel a sejt működéséhez szükséges nagymennyiségű rRNS-t. Az 5S riboszómális RNS-eket kódoló szakaszok ezektől függetlenül, külön transzkripciós egységet képviselnek. Amíg a kódoló szekvenciák nagymértékben konzerválódtak a törzsfejlődés során, az ITS szekvenciák elegendő különbséget biztosítanak akár közeli rokonsági körbe tartozó fajok elkülönítésére is. Az ITS szekvenciákról több szerző is bizonyította már, hogy a fűféléken belül faji határok elkülönítésére alkalmazható (Hsiao et 1994, 1995a, 1995b, Gaut et al. 2000, Torrecilla és Catalán 2002, Torrecilla et al. 2003).



4.ábra. A 18S, 5.8S és 25/28S rRNS molekulák szintézise (Darnell et al. 1986 nyomán)

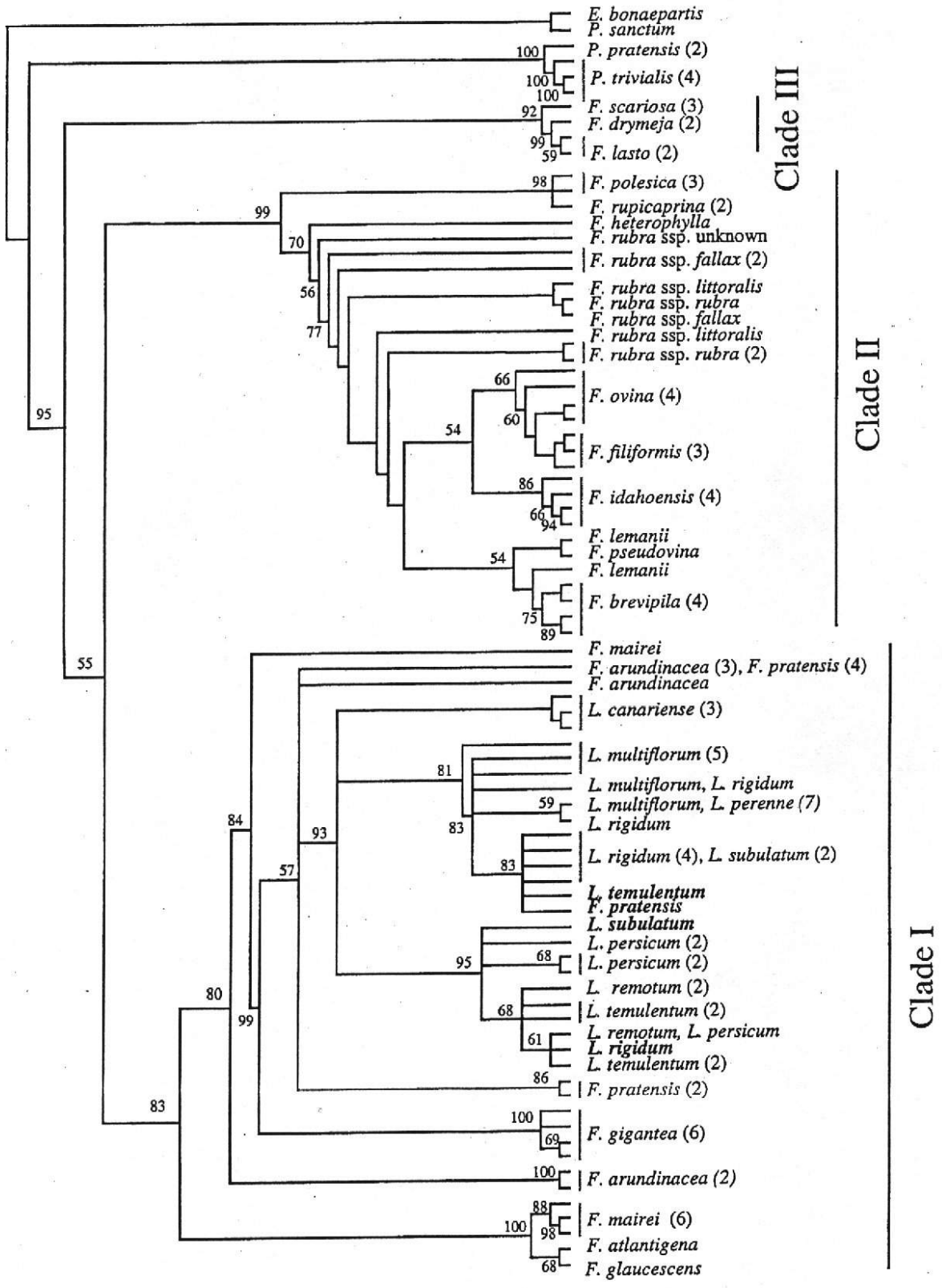
2.3.3.2. A *Festuca* fajok ITS szekvenciáinak összehasonlítása

A *Festuca* fajok filogenetikai vizsgálatához elsőként Charmet et al. (1997) alkalmazták az ITS szekvenciák összehasonlítását. Munkájukban a *Lolium* nemzetség mind a nyolc faján kívül a *Festuca* nemzetségből is szerepelt 11 faj. A részletes RFLP (564 fragmentum) és RAPD (422 fragmentum) vizsgálataikat egészítették ki a kloroplaszt DNS 6 nem kódoló régiójának restrikciós emésztésével és a fajok ITS szekvenviáinak összehasonlításával kapott eredményekkel. Ezzel bizonyították, hogy az ITS szekvenciák felhasználhatók a *Festuca* fajok taxonómiai problémáinak megválaszolásához is. A fajok azonban nem voltak kellően reprezentálva, a 19 taxon közül 13 esetben csak egy-egy tövet vizsgáltak. A filogenetikai következtetést is csak távolságalapú módszerek (UPGMA, Neighbor-joining) alapján vonták le.

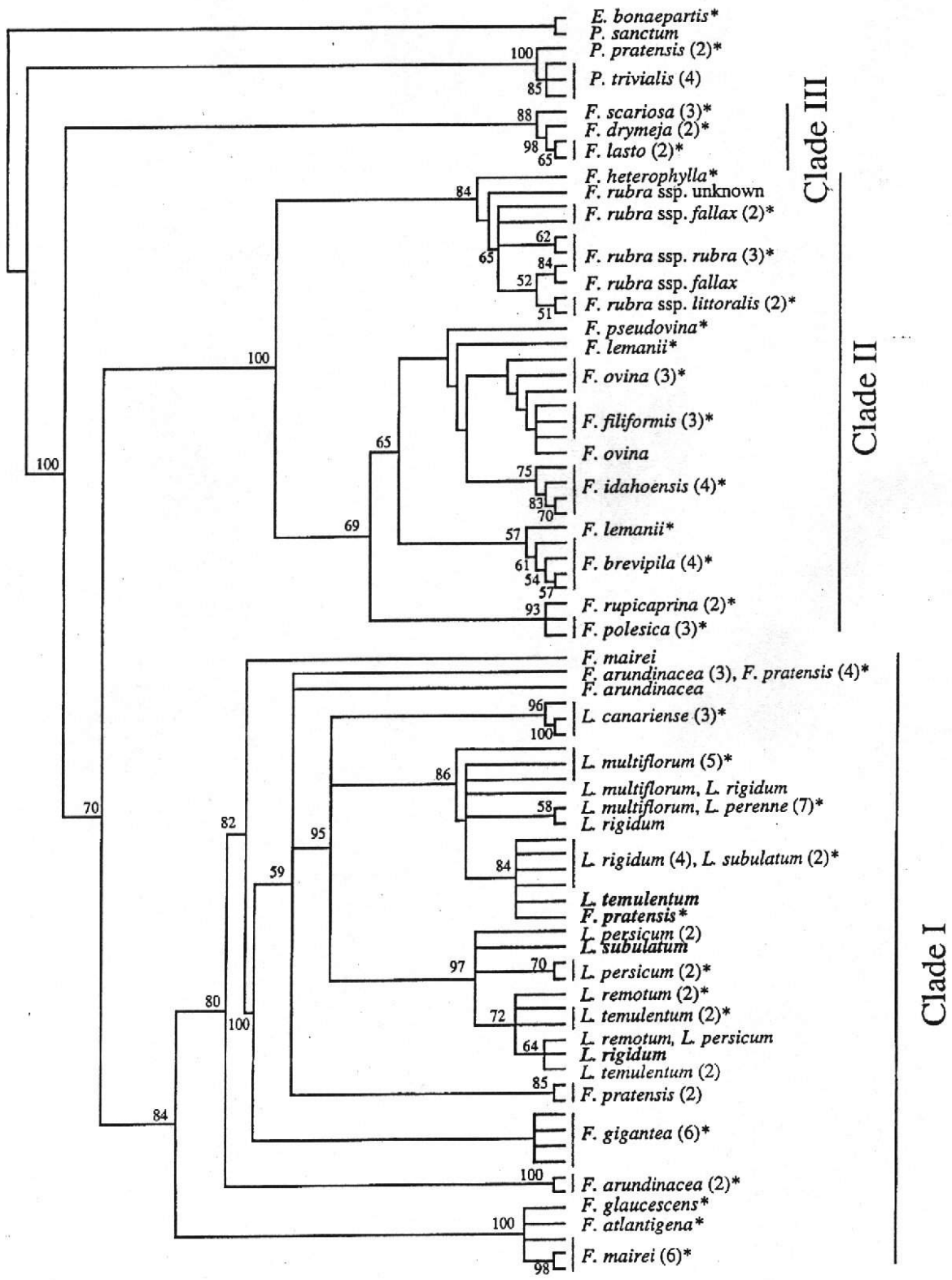
Gaut et al. (2000) már kizárólag ITS szekvenciák alapján vizsgálták a *Lolium* és *Festuca* fajok leszármazási viszonyait. Az általuk vizsgált 19 Festuca fajból izolált szekvenciákat kiegészítették a génbankban addig talált összes ITS szekvenciákkal más *Festuca* fajokból (így Charmet et al. (1997) szekvenciáival is) és egy fajon belül minimum két tövet vizsgáltak.

A „legnagyobb takarékosság" (Maximum Parsimony) módszerrel (lásd 3.1.2 fejezet) két típusú konszenzus fát alakítottak ki. Az egyikben a szekvenciák összerendezését követően kialakult réseket (gaps), mint valós karaktereket vették figyelembe (5. ábra), míg a másik esetben ezeket hiányzó karakterekként kezelték (6. ábra).

Mint az ábrákból látható, mindkét esetben három főcsoportra (kládra) osztották fel a vizsgált fajokat. Az első főcsoportba tartoznak a széleslevelű *Festuca* fajok (mind poliploid) és az összes *Lolium* faj. A *Lolium* nemzetség monofiletikus eredetről tanúskodik 93 %-os (5. ábra), illetve 95 %-os (6. ábra) magas bootstrap értékekkel alátámasztva, ha egy *F. pratensis* (Y09814) szekvenciát figyelmen kívül hagyunk. Erről feltételezték, hogy mintavételi hiba következményeként került a kiértékelésbe. Ez a vizsgálati eredmény megerősíteni látszik azt a feltételezést, hogy a *Lolium* fajokat a *Festuca* nemzetségen belüli alcsoportnak kellene tekinteni. Ezt már a korábbi morfológiai (Bulinska-Radomska és Lester 1988) és RFLP analízis (Charmet et al. 1997) eredményei is sejtetni engedték. Azt, hogy a *Lolium* fajok evolúciós szempontból fiatalok, a poliploidok hiánya és szűk elterjedési terület is bizonyíthatják.



5. ábra. Különböző *Festuca* és *Lolium* fajok ITS szekvenciáik alapján felállított MP (Maximum Parsimony) konszenzus filogenetikai fája. A bootstrap értékek az egyes elágazások felett illetve alatt láthatók. A vizsgálatban a szekvenciák összerendezését követően kialakult réseket, mint meglévő karaktereket vették figyelembe (Gaut et al. 2000).



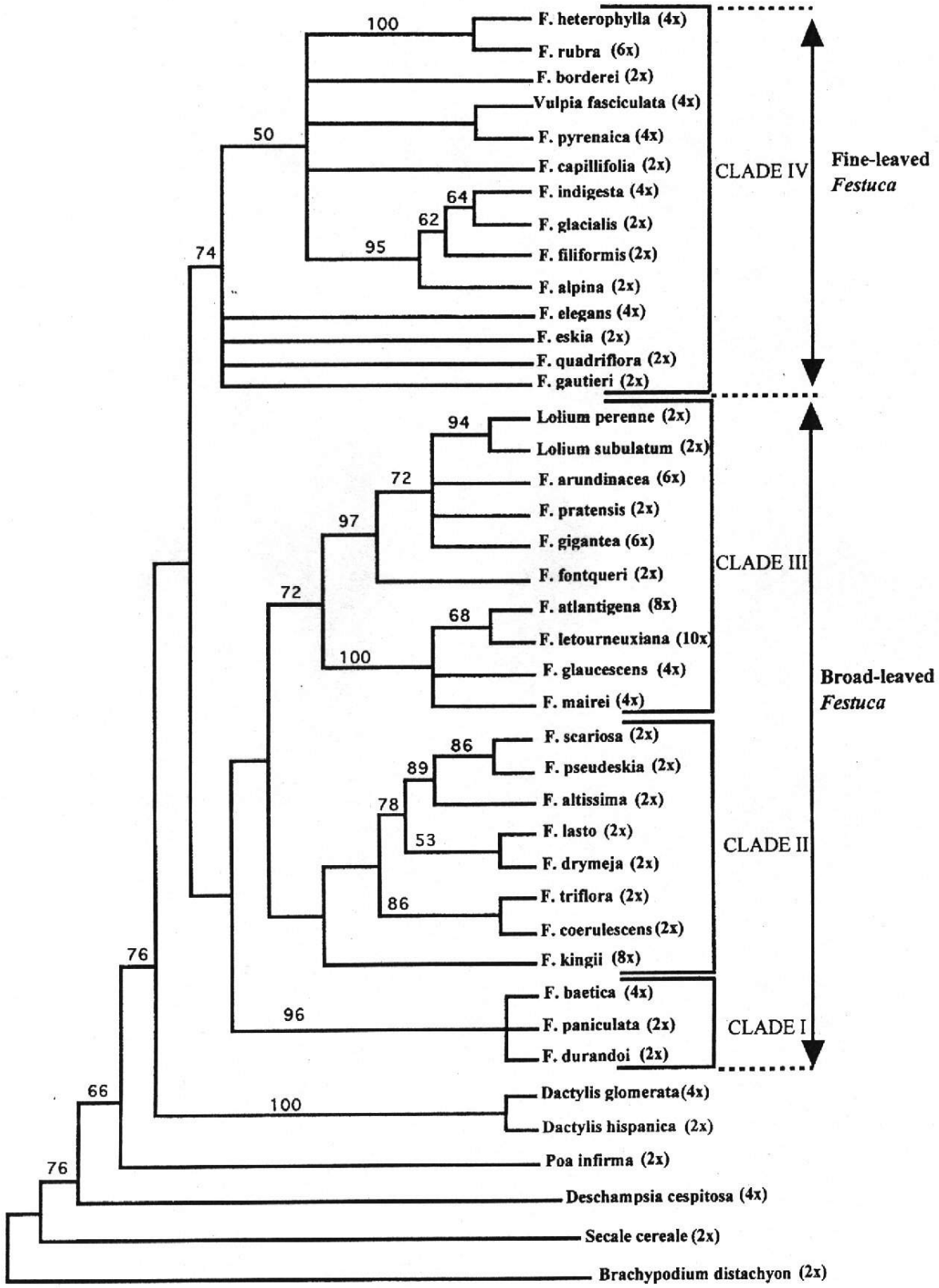
6. ábra. Különböző *Festuca* és *Lolium* fajok ITS szekvenciáik alapján felállított MP (Maximum Parsimony) konszenzus filogenetikai fája. A bootstrap értékek az egyes elágazások felett illetve alatt láthatók. A vizsgálatban a szekvenciák összerendezését követően kialakult réseket, hiányzó karakterekként vették figyelembe (Gaut et al. 2000).

A második főcsoportba a *Festuca* nemzetség *Ovinae* csoportjába tartozó fajok kerültek. Az első vizsgálatban (5. ábra) a *F. polesica* és *F. rupicaprina* fajok reprezentálják a bazális, legősibb szekvenciát, míg a második vizsgálatban (6. ábra) a *F. rubra* és *F. heterophylla* fajok tekinthetők a legősibbnek.

A harmadik főcsoportot három faj alkotja (*F. scariosa, F. drymeja, F. lasto*), amelyek az összes *Festuca-Lolium* fajnak a legősibb, bazális szekvenciáit hordozzák, bár ezt a bootstrap analízissel kapott megbízhatósági értékek (55 % az 5. ábrán illetve 70 % a 6. ábrán) nem igazán erősítik meg.

Ennek a harmadik főcsoportnak a meglétét Torrecilla és Catalán (2002) eredményei sem támasztották alá, akik a *Festuca* és *Lolium* fajok ITS szekvenciái alapján heurisztikus analízissel állítottak fel filogenetikai fát (7. ábra). A széleslevelű és keskenylevelű *Festuca* fajok korai elválása jól nyomonkövethető, azonban a mindkét csoportra legősibbnek feltételezett *F. scariosa, F. drymeja, F. lasto* fajok a széleslevelű *Festuca* fajokon belül, mégcsak nem is azonos elágazásban helyezkednek el.

Torrecilla et al. (2003) a kloroplaszt eredetű *trn*L-F intron, exon és spacer szekvenciák összehasonlításának felhasználási lehetőségét bizonyították a *Festuca* fajok rendszertanában. Egy szűkebb csoporton elvégzett kísérletek eredményeként, az ITS és *trn*L-F szekvenciák alapján felállított filogenetikai fák topológiája szinte minden elágazásban megegyezett egymással. Vizsgálataikban az *Eskia* (Willkomm), *Pseudatropis* (Krivotulenko) és *Amphigenes* (Tzvelev) szekció fajai alkotnak egy parafiletikus bazális csoportot a keskenylevelű *Festuca* fajokon belül. Eredményeik szintén nem támasztották alá egy harmadik, legősibb főcsoport meglétét.



7. ábra. Különböző *Festuca* és *Lolium* fajok ITS szekvenciáik alapján heurisztikus analízissel felállított konszenzus filogenetikai fája. A bootstrap értékek az egyes elágazások felett láthatók. (Torrecilla és Catalán 2002)

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Növényanyag

3.1.1. Almaminták

In vitro hajtástenyészetet alvórügyből kipreparált merisztémából indítottunk 1996-ban az Újfehértói Gyümölcstermesztési Kutató és Szaktanácsadó Kht. által rendelkezésre bocsájtott vesszőkből. Néhány fajta esetében, melyek mikroszaporítása már megoldott volt, a Westsik Vilmos Kutató Intézettől (Nyíregyháza) közvetlenül jutottunk hajtástenyészethez. Így a következő alany- és nemesfajták állnak rendelkezésünkre steril tenyészet formájában: M26, MM106, JTE-F, JTE-H, Royal Gala, McIntosh, Galaxy, Jonagold, Red Fuji, Freedom, Húsvéti Rozmaring, Príma, Braeburn. A transzformációs kísérleteket az M26 alany-, valamint Royal Gala és McIntosh nemesfajtákkal végeztük.

A transzgénikus Royal Gala és McIntosh gyümölcsöket a Cornell Egyetem genevai kutatóintézetének (New York State Agricultural Experiment Station, Department of Food Science and Technology, Geneva NY, USA) transzgénikus ültetvényéből gyűjtöttük 2001. májustól szeptember közepéig. A gyümölcsök egy részét szobahőmérsékleten, míg a maradékot hidegszobában (5°C) tároltuk és vizsgáltuk 2002 április végéig. Minden fa 3-3 gyümölcsét 5 ismétlésben műanyag edényekbe helyeztük (a hidegről kihozott mintáknál megvártuk, amíg felveszik a szobahőmérsékletet), majd 24 órára lezártuk az etilén mérése előtt. Minden mérés után egy almát eltávolítottunk minden egyes vonalból, cukortartalmat majd keménységet mértünk, majd -80°C-on tároltuk RNS izolálásig.

3.1.2. Festuca minták

A RAPD és AP-PCR vizsgálatokhoz a *F. Ovinae* csoportba tartozó fajokból, különböző élőhelyekről több év alatt gyűjtött és a SZIE Növénytani és Növényélettani Tanszékének botanikus kertjében (Gödöllő) elültetett fajok töveiből összesen 114-et vizsgáltunk. A begyűjtött, illetve a vizsgálathoz felhasznált egyedek kiválasztásakor arra törekedtünk, hogy a példányok a lehető legnagyobb biztonsággal a megjelölt fajt reprezentálják. Ehhez Dr. Penksza Károly botanikus, egyetemi docens volt a segítségemre, aki minden vizsgálat előtt ellenőrizte az adott töveket. A minták kiválasztása és begyűjtése előtt a következő lépések történtek meg:

- A kritikus taxonok esetében az eredeti fajleírás újbóli elővétele.
- A fajleírás alapját képező kép és típuspéldányok ellenőrzése.

- Az eredeti fajleírás és a típuspéldányok összevetése (morfológiai és szöveti vizsgálatokkal).
- A leírt faj lelő-, és termőhelyének, *locus classicus*-ának, felkeresése és mintagyűjtés.
- A *locus classicus*ról begyűjtött és a típuspéldányok összevetése.

A pontos revízió és meghatározás után a begyűjtött anyag került molekuláris értékelésre, de ezzel párhuzamosan további vizsgálatokhoz tenyészkertben is fenntartjuk.

A vizsgált egyedek a következők voltak (Zárójelben jelöltük a gyűjtési helyet és a felhasznált tövek számát.):

1: *F. wagneri* (Degen Thaisz et Flatt) in Degen Thaisz et Flatt (Deliblát – *locus classicus* – 20 db)
2: *F. wagneri* (Degen Thaisz et Flatt) in Degen Thaisz et Flatt (magyar keverék: Örkény, Imrehegy, Domonyvölgy – 10 db)
3: *F. vaginata* W. et K. ex Willd. (magyar keverék: Imrehegy, Domonyvölgy – 18 db)
4: *F. valesiaca* Schleicher ex Gaudin (Gerecse – 9 db)
5: *F. pseudovina* Hackel (Farmos – 16 db)
6: *F. rupicola* Heuffel (Deliblát – 9 db)
7: *F. rupicola* Heuffel (Herkulesfürdő – *locus classicus* - vastag levelű – 7 db)
8: *F. rupicola* Heuffel (Herkulesfürdő – *locus classicus* - vékony levelű – 7 db)
9: *F. javorkae* Májovsky (Szlovákia - *locus classicus* – 4 db)
10: *F. pallens* Host (Szarvaskő – 4 db)
11: *F. pallens* Host (a *F. stricta locus classicus*-áról – 4 db)
12: *F. pallens* Host (Budai-hegység – 1 db)
13: *F. stricta* Host (Baden - *locus classicus* – 3 db)
14: *F. stricta* Host (München – 2 db).

Az ITS szekvenciákkal végzett vizsgálatokhoz a fent felsorolt összesen 8 fajt kiegészítettük a *F. dalmatica* (6 db) Szársomlyón- és a *F. pseudodalmatica* (5 db) Mátrában gyűjtött példányaival, melyeket a SZIE Genetika és Növénynemesítés tanszékének kísérleti terén tartunk fent.

3.2. Sejtgenetikai és szövettenyésztési módszerek

3.2.1. Merisztéma izolálás

Az érett vesszőket detergenssel mostuk, az alvórügyeket kevés fás résszel együtt szikével vágtuk ki. A sterilizálás 70%-os alkoholban másfél percig, 3:1 arányú víz:hypoclorit-oldatban húsz percig, majd steril vízben ötször 5 perces mosással történt. A merisztémákat mikroszkóp alatt preparáltuk ki, majd hajtásindukciós táptalajra helyeztük (2. táblázat). A fejlődő hajtásokat havonta friss táptalajra oltottuk át, majd három hónap után kezdődött a felszaporításuk.

3.2.2. A hajtások szaporítása

A legintenzívebben szaporodó tenyészetek 0.5-1.5 cm hosszú hajtásait összegyűjtöttük és 12-12 növényt vertikálisan 70ml hajtás-sokszorosító táptalajt (2. táblázat) tartalmazó weg-boxokba helyeztünk. A tenyészeteket 22±2°C-on inkubáltuk fényszobában „cool-white" (40 W-os Tungsram fénycsövek) fluoreszcens fényben, 16 órás fotoperiódus és 40µEm^2s^{-1} fényintenzitás mellett. A felszaporodott hajtásokat 4 hét után egyenként levágtuk, majd ismét hajtás-sokszorozó, vagy a levelek megnyújtását elősegítő, illetve gyökereztető táptalajra kerültek (2. táblázat).

2. táblázat. A hajtásindukcióhoz, hajtásszaporításhoz, levélmegnyújtáshoz, regenerációhoz és gyökereztetéshez felhasznált táptalajok összetétele

		Hajtászaporítás				Regeneráció				
Összetevők:	**hajtásindukció**	**Alma IV[A]**	**M26prolif[B]**	**RG prolif[C]**	**Elongáció**	**R_1[C]**	**R_2[D]**	**R_3[E]**	**R_4[F]**	**Gyökereztetés[G]**
Makroelemek	(mg/l)	(mg/l)								
KNO_3	900	1000								
NH_4NO_3	825	1000								
$Ca(NO_3)_2*4H_2O$		260								
$CaCl_2*2H_2O$	220									
$MgSO_4*7H_2O$	185	360	MS	MS	MS	MS	N_6	MS	N_6	1/2 MS
KH_2PO_4	85									
$NaH_2PO_4*H_2O$		465								
Na_2EDTA	37.25	37.25								
$FeSO_4*7H_2O$	27.85	27.85								
Mikroelemek	(mg/l)	(mg/l)								
$MnSO_4*4H_2O$	22.30	7.50								
$ZnSO_4*7H_2O$	10.50	4.50								
H_2BO_3	6.2	4.50	MS	MS	MS	MS	MS	MS	N_6	MS
KJ	0.83	0.83								
$Na_2MoO_4*2H_2O$	0.25	0.025								
$CuSO_4*5H_2O$	0.025	0.025								
$CoCl_2*6H_2O$	0.025	0.037								
Vitaminok	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)					(mg/l)
Myo-inositol	100	100	100	100	100					100
Nicotinic acid	0.50	5.00	1.00	1.00	1.00					
Pyridaxine	0.50	1.00	1.00	1.00	1.00	LS	MS	LS	N_6	
Thiamine-HCl	0.10	10.00	0.80	0.80	0.80					1.00
Glycine	2.00	10.00								
Biotine			0.08	0.08	0.08					
Növényi hormonok	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)
BA	1.00	0.20	1.00	1.00			5.00	1.00	5.00	
TDZ						2.00				
2iP					8.3					
NAA				0.10	0.10		0.20	0.10		
IBA	0.30		0.30			0.30			0.10	3.00
Kinetin				3.00						
GA_3	0.10	0.20	0.20							
Egyéb kiegészítések										
Sucrose	30 g/l	30 g/l	30 g/l	30 g/l	30 g/l	30 g/l	30 g/l	30 g/l	30 g/l	20 g/l
Difco Bacro agar	7 g/l	7 g/l	8 g/l	8 g/l	8 g/l					7 g/l
gelrite						2.5 g/l	2.5 g/l	2.5 g/l	2.5 g/l	
Aszkorbinsav										
L-Glutamin		50								
Ca-DL-pantotenát		0.25								
PVP	5 mg/l									
pH:	5.0-5.5	5.0	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6

[A]: Németh (1982), [B]: Norelli és Aldwinckle (1993), [C]: Norelli szóbeli közlése alapján, [D]: Welander 1988, [E]: Fasolo et al. (1990), [F]: Theiler-Hedtrich és Theiler-Hedtrich (1990), [G]: Bolar et al. (1998)

3.2.3. A levelek megnyújtása (elongáció)

12 db 0.5-1.5 cm hosszú hajtást helyeztünk 70 ml levélnyújtó táptalajt (2. táblázat) tartalmazó weg-boxokba horizontálisan. A tenyészeteket szintén 22±2°C-on inkubáltuk

fényszobában „cool-white” (40 W-os Tungsram fénycsövek) fluoreszcens fényben 16 órás fotoperiódus és 40μEm^{2}s^{-1} fényintenzitás mellett. 1 hónap után begyűjtöttük a regenerációhoz szükséges leveleket, majd a tenyészeteket kidobtuk.

3.2.4. Regeneráció

4 hét után a legfiatalabb, intenzíven növekedő csúcsi hajtásokat használtuk levélszövetből történő regeneráció céljára. Ezek a levelek az alattuk lévőknél kisebbek és világosabb zöld színűek voltak. A levéllemezt a levél méretétől függően 3-4 részre vágtuk a főérre merőlegesen, majd fonáki résszel felfelé a regenerációs táptalajra (2. táblázat) helyeztük. Egy-egy 9 cm átmérőjű petri-csészébe 9-9 db levelet helyeztünk. A tenyészeteket 3 hétig sötétben szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd gyenge fényre (20μEm^{2}s^{-1}) fényszobába helyeztük. 1 hét után az explantumokat friss táptalajra és erősebb fényre (40μEm^{2}s^{-1}) raktuk. A táptalajra helyezést követő 6-8. héten a regenerálódott, 0.5-1 cm hosszúságú hajtásokat hajtás-sokszorozó (2. táblázat) táptalajra raktuk.

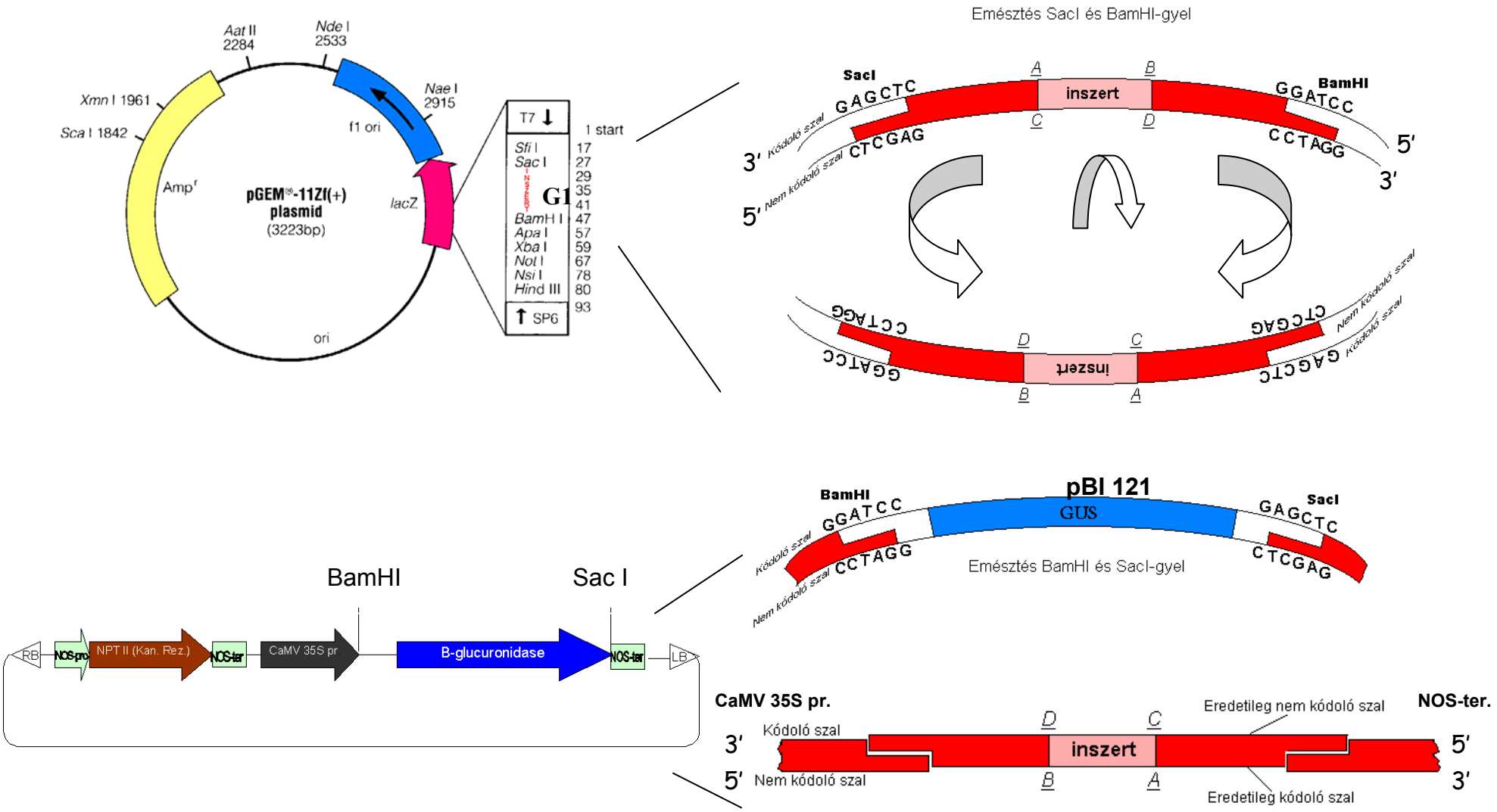
3.2.5. Ploidszint meghatározás (Festuca)

A vizsgálatainkban szereplő *Festuca* fajok pontos ploidfokát PARTEC I típusú flow citométerrel határoztuk meg 2-5-ig terjedő példányszámon. A sejtmagok izolálása céljából a növények leveleit pengével feldaraboltuk, majd Dolezel pufferben szuszpendáltuk (Dolezel et al. 1994). A szuszpenziót membrán szűrőn (Cell Trics/TM szűrő) szűrtük, majd a sejtmagokat DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindole) festékkel festettük.

3.3. Mikrobiális módszerek

3.3.1. Baktérium törzsek, szubklónozás, bakteriális transzformáció

McIntosh almafajtából Kiss et al. (1995) által izolált részleges, 1094 bp hosszúságú ACS cDNS-t (*MdACS*2 – Génbank száma: U73815) a pBluescript SK +/- plazmid EcoRV helyére klónozták (Rosenfield et al. 1996). Mivel ez a restrikciós enzim tompa véggel hasít, így két klónt sikerült elkülöníteni; az egyikben az inszert 5’⇒ 3’ (G1), a másikban 3’⇒ 5’ (K1) orientációban szerepel. A pBI 121-es bináris vektorba történő bevitelhez szubklónozási lépésre volt szükség. Elsőként az inszertet a pGEM®-11Zf(+) EcoRI-XhoI helyére klónoztuk, majd innen a pBI 121 bináris vektor BamH1-SacI helyére. A G1 klónból kiindulva így megkaptuk az *MdACS*2 génszakasz antiszensz (8. ábra), míg a K1 klónból kiindulva a szensz konstrukcióját.



8. ábra. Az 1094 bp hosszúságú MdACS2 inszert antiszensz orientációjú klónozása a pGEM-11Zf(+) plazmidból a pBI 121-es bináris vektorba a GUS gén helyére

Ezekhez a lépésekhez a –70°C-on tárolt kompetens *Escherichia coli* DH5α sejteket Hanahan (1985) módszerével transzformáltuk. Az *E. coli* kolóniákat a pGEM®-11Zf(+) (Promega) plazmid esetében ampicillin (50 µg/ml), a pBI 121-es plazmid esetében kanamicin (50 µg/ml) táptalajon szelektáltuk. A rekombinánsokat plazmid izolálással (Sambrook et al. 1989) és restrikciós emésztéssel azonosítottuk. Az emésztéseket Promega enzimeket használva és standard protokollt követve végeztük.

3.3.2. Agrobacterium törzsek és transzformáció

Kísérleteinkben az EHA 105, LBA 4404 és C58C1 *Agrobacterium tumefaciens* törzseket használtuk fel. Az inszert bejuttatására háromszülős konjugáció (triparental mating) (Ditta et al. 1980) és direkt géntranszfer (An, 1987) módszereket alkalmaztunk. A szelekciót szilárd YEP táptalajon 15 µg/ml kanamicinnel végeztük.

3.4. Az alma transzformációja *Agrobacterium*-mal

3.4.1. Az Agrobacterium előkészítése

A -80°C-on tárolt *Agrobacterium* törzsekből 3-4 nappal a transzformáció előtt szilárd LB táptalajon, amely 50 µg/ml kanamicint tartalmazott, tenyészeteket indítottunk (egy transzformációhoz öt petricsészében), majd 28°C-on inkubáltuk. A felhasználás napján YEP táptalajjal (50 µg/ml kanamicinnel kiegészítve) lemostuk a tenyészeteket, majd Erlenmeyer-lombikban 28°C-os vízfürdőben rázattuk őket. Amikor a spektrofotométerrel mért (600 nm) optikai denzitás mértéke elérte a 0.6-0.8 értéket (~10^8 baktériumsejt/ml), virulencia gének fokozására 1mM betaine-foszfátot és 0.1 mM acetosziringont adtunk (James et al. 1993) a szuszpenzióhoz és további 5 órát rázattuk felhasználás előtt.

3.4.2. Transzformáció

A transzformációhoz a 3-4 hetes, világoszöld, a hajtáscsúcson lévő legfiatalabb, teljesen kinyílt leveleket vágtuk le. Egy hajtásról 1-2 levelet használtunk fel. Levágás után először nedvesített szűrőpapírt tartalmazó petricsészében gyűjtöttük őket, majd egyszerre helyeztük az *Agrobacterium*-szuszpenzióba, melyben 10-15 percig rázattuk. A felesleges inokulumot száraz, steril szűrőpapíron leitattuk, és a leveleket fonákkal lefelé 1mM betaine-foszfátot és 0.1 mM acetosziringont tartalmazó regenerációs táptalajra (R_2) helyeztük. Az együtt-tenyésztés (kokultiváció) három napig 25°C-on sötétben történt.

3.4.3. Növényregeneráció és szelekció

A kokultivációt követően a leveleket 500 mg/l cefotaximot tartalmazó folyékony regenerációs táptalajban (R_2) mostuk rázóasztalon 10 percig. A steril szűrőpapíron szárított levelek alapi és csúcsi részét eltávolítottuk, a levéllemezt pedig három részre vágtuk. A szegmenseket fonákkal felfelé szelektív regenerációs táptalajra (R_2 + 25 µg/ml kanamicin, 300 µg/ml cefotaxime) fektettük, és 21 napig sötétben, szobahőmérsékleten inkubáltuk.

A három hét elteltével friss, szelektív táptalajra tettük át a leveleket, és egy hétig kis fényintenzitású helyen (20µEm^2s^{-1}) tároltuk őket. Ezután megnöveltük a fényintenzitást (40µEm^2s^{-1}).

Minden harmadik héten friss táptalajra helyeztük a levélexplantumokat, hetente pedig figyeltük a regeneránsok megjelenését. A levélről a regenerálódó szövetrészt szikével eltávolítottuk, és havonta friss hajtásszaporító táptalajra helyeztük. A kontroll növényekkel is ugyanígy jártunk el, kivéve hogy a kívánt gént nem tartalmazó *Agrobacterium* törzzsel (EHA 105) végeztük a fertőzést.

3.4.4. Gyökereztetés

A hajtás-sokszorozó táptalajról 2-3 cm hosszúságú hajtásokat gyűjtöttünk, majd 12-12 db-ot gyökérindukciós táptalajt tartalmazó weg-boxokba helyeztünk. A tenyészeteket 1 hét szobahőmérsékleten és sötétben történő inkubálás után gyökérmegnyúlást elősegítő táptalajra és erős megvilágításra helyeztük (22±2°C 16 órás fotoperiódus, 40µEm^2s^{-1} fényintenzitás mellett). Ez utóbbi csak annyiban különbözött a gyökérindukciós táptalajtól, hogy nem tartalmazott IBA-t. Amikor a fejlődő gyökerek elérték a 0.5-1 cm-es hosszúságot - 2-3 héttel a gyökérindukciót követően -, a gyökeres hajtásokat óvatosan kihúztuk a táptalajból, majd csapvízzel lemostuk vigyázva arra, hogy a gyökerek ne sérüljenek. A gyökeres hajtásokat negyed óráig csapvízben duzzasztott Jiffy-7 (perlit + tőzeg) indító tápkockába ültettük. Az így előkészített 6-6 db hajtást weg-boxokba helyeztük és folpack-kal fedtük. A dobozokat fényszobában erős fényre helyeztük (22±2°C 16 órás fotoperiódus, 40µEm^2s^{-1} fényintenzitás mellett). Ezt követően 1-2 héttel, mikor a Jiffy oldalán láthatóvá váltak a gyökerek, cserepekbe ültettük őket átlátszó műanyag zacskóval lefedve. A zacskókon 1 hét után lyukakat képeztünk, és folyamatosan hozzászoktattuk a növényeket az *in situ* körülményekhez.

3.5. DNS és RNS izolálás

3.5.1. DNS izolálás almából

Az izolálást vagy a Dellaporta et al. (1983) által közölt módszerrel, vagy a QIAGEN cég DNeasy kit-jének felhasználásával végeztük a mennyiségi és minőségi igényektől függően.

3.5.2. RNS izolálás almából

Lopez-Gomez et al. (1992) és Franke et al. (1995) módszereit kissé módosítottuk és kombináltuk egymással. Folyékony nitrogénben 7.5 g gyümölcshúst porítottunk el, majd 15 ml RNS extrakciós (150 mM Tris, 50 mM EDTA, 2% SDS, 1% 2-merkaptoetanol, a pH-t 1 M-os bórsavval 7.5-re állítottuk) pufferben szuszpendáltuk. A szuszpenziót 65°C-on 5 percig inkubáltuk, majd 0.25 térfogat etilalkohollal (100%) és 0.11 térfogat K-acetáttal (5 M-os) vortexeltük. Azonos térfogatú kloroform/izoamilalkohol (49:1) keverékkel extraháltuk 1 percig, majd 15 percig 4°C-on 15000 g-vel centrifugáltuk. A vizes fázissal megismételtük az extrakciót először azonos térfogatú fenol/kloroformmal (1:1), majd ismét kloroform/izoamil-alkohollal (49:1). Az RNS-t 0.6 térfogat 8 M LiCl-dal csaptuk ki egy éjszakán át -20°C-on, majd 4°C-on centrifugáltuk 90 percig 15000 g-vel. Az RNS-t 400 µl steril vízben oldottuk, majd 25.2 µl 5 M K-acetáttal és 1 ml 100% etilalkohollal kicsaptuk éjszakán át -20°C-on. Az RNS-t ismét centrifugálással gyűjtöttük: 4°C-on 15 percig 15000 g-vel, majd 75% etilalkohollal mostuk. A csapadékot feloldottuk 300 µl DEPC kezelt vízzel, majd 150 µl 100% etilalkohollal 30 percig jégen inkubáltuk, majd 4°C-on centrifugáltuk 10 percig 15000 g-vel. Végül a felülúszóban lévő RNS-t 0.1 térfogat 3 M Na-acetáttal (pH: 5.2) és 2.5 térfogat 100 % etilalkohollal kicsaptuk. Centrifugálást követően a csapadékot megszárítottuk és 200 µl DEPC kezelt vízben oldottuk fel.

3.5.3. DNS izolálás Festuca fajokból

Benito et al. (1993) magból történő DNS kivonására kidolgozott módszerét módosítottuk nagy molekulatömegű és tisztaságú DNS izolálásra a *Festuca* levelekből. Fiatal levelekből 140-160 mg-ot apróra vágtunk, majd folyékony nitrogénben porítottuk; ezt követően 250 µl EB pufferrel (100 mM Tris-HCl pH: 8.0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl), 120 µl 10 %-os SDS-sel és 5 µl proteináz K-val (10 mg/ml) a mintákat összekevertük. A 10 perces 65 °C-on történő inkubálást követően, 6 µl (10 mg/ml) RN-áz hozzáadása után a mintákat 5 percig szobahőmérsékleten tartottuk, majd 350 µl 5M K-acetátot (pH: 5.3) adtunk

a mintákhoz és összekevertük, majd 20 percre jégfürdőbe helyeztük. Centrifugálás (20 perc 4 °C-on) után a felülúszóhoz 1/10 térfogat 3M Na-acetátot és kétszeres térfogat 96 %-os etilalkoholt adtunk, 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A DNS-t 70 %-os etilalkoholban mostuk. Ezt követően egy éjszakán keresztül szárítottuk, majd 350 µl TE1 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) pufferben oldottuk fel. A DNS minőségét 0.8 %-os agaróz gélen vizsgáltuk.

3.6. PCR technikán alapuló módszerek

3.6.1. RAPD és AP-PCR analízis

A PCR reakciókat Perkin-Elmer GeneAmp 9700 és BIO-RAD ICycler készülékekben végeztük 20 µl végtérfogatban. A reakció előtt a DNS-törzsoldatokat az agaróz gélen készült kép alapján a szükséges mértékben hígítottuk.

2. táblázat. A RAPD és AP-PCR vizsgálatokban felhasznált primerek.
RAPD primerek:

Primerek	Szekvencia 5'-3'	Primerek	Szekvencia 5'-3'	Primerek	Szekvencia 5'-3'
OPA 01 [a]	CAGGCCCTTC	OPA19 [a]	CAAACGTCGG	OPK 02 [a]	GTCTCCGCAA
OPA 02 [a]	TGCCGAGCTG	OPB 03 [a]	CATCCCCCTG	OPO 08 [a]	CCTCCAGTGT
OPA 03 [a]	AGTCAGCCAC	OPB 04 [a]	GGACTGGAGT	OPP 08 [a]	GTCCCGTTAC
OPA 04 [a]	AATCGGGCTG	OPB 05 [a]	TGCGCCCTTC	OPQ 14 [a]	GGACGCTTCA
OPA 05 [a]	AGGGGTCTTG	OPB 07 [a]	GGTGACGCAG	OPU 08 [a]	GGCGAAGGTT
OPA 06 [a]	GGTCCCTGAC	OPC 15 [a]	GACGGATCAG	OPX 11 [a]	GGAGCCTCAG
OPA 07 [a]	GAAACGGGTG	OPD 05 [a]	TGAGCGGACA	OPX 18 [a]	GACTAGGTGG
OPA 08 [a]	GTGACGTAGG	OPD 12 [a]	CACCGTATCC	OPAB 09 [a]	GGGCGACTAC
OPA 09 [a]	GGGTAACGCC	OPH 11 [a]	CTTCCGCAGT	OPAI 21 [a]	CACGCGAACC
OPA 11 [a]	CAATCGCCGT	OPJ 01 [a]	CCCGGCATAA	OPAL 20 [a]	AGGAGTCGGA
OPA 12 [a]	TCGGCGATAG	OPJ 05 [a]	CTCCATGGGG	UBC 354 [b]	CTAGAGGCCG
OPA 13 [a]	CAGCACCCAC	OPJ 06 [a]	TCGTTCCGCA	NO 08 [c]	ATCCGCGTTC
OPA 14 [a]	TCTGTGCTGG	OPJ 09 [a]	TGAGCCTCAC	NO 11 [c]	ACGGCATATG
OPA 16 [a]	AGCCAGCGAA	OPJ 17 [a]	ACGCCAGTTC	PAL 1 [d]	GCGATGTAGCG
OPA 17 [a]	GACCGCTTGT	OPJ 19 [a]	GGACACCACT	PAL 2 [d]	CCAGGTGGACC
OPA 18 [a]	AGGTGACCGT	OPJ 20 [a]	AAGCGGCCTC		

AP-PCR primerek

Primerek	Szekvencia 5'-3'	Primerek	Szekvencia 5'-3'
E6 [d]	ATTTTCCGCCAAACCCATCTG	WMS174R [e]	GACACACATGTTCCTGCCAC
E8 [d]	TGGTTCCGGGTATGC	WMS186F [e]	GCAGAGCCTGGTTCAAAAAG
E9 [d]	ATTTCATCGCGCTCTTCG	WMS186R [e]	CGCCTCTAGCGAGAGCTATG
E12 [d]	GACGAGATCTACGC	WMS261F [e]	CTCCCTGTACGCCTAAGGC
E13 [d]	CAAACTCGGAACCA	WMS261R [e]	CTCGCGCTAGCCATTG
WMS5F [e]	GCCAGCTACCTCGATACAACTC	WMS410F [e]	GCTTGAGACCGGCACAGT
WMS5R [e]	AGAAAGGGCCAGGCTAGTAGT	WMS410R [e]	CGAGACCCTGAGGGTCTAGA
WMS55F [e]	GCATCTGGTACACTAGCTGCC	DX51 [f]	GCCTAGCAACCTTCACAATC
WMS55R [e]	TCATGGATGCATCACATCCT	DX52 [f]	GAAACCTGCTGCGGACAAG
WMS174F [e]	GGGTTCCTATCTGGTAAATCCC		

[a]: Operon Technologies, [b]: UBC: University of British Columbia, [c]: Sakamoto et al. (1995), [d]: Tanszékünkön tervezett primerek, [e]: Röder et al. (1998), [f]: Anderson et al. (1989)

Egy-egy reakcióelegy a következő összetevőket tartalmazta: 20-50 ng templát DNS, 1 x reakció puffer, 3 µl dNTP (25mM törzs), 1.5 µl $MgCl_2$ (25mM törzs), 0.75-0.75 µl RAPD

primer illetve AP-PCR primer-pár 10µM törzsből (2. táblázat), 1.2 Unit Red-Taq DNS polimeráz (Sigma). A reakció körülmények a következők voltak: 2 perces 94°C-os előciklus után 10 másodperc 94°C, 30 másodperc 36°C RAPD illetve 44°C AP-PCR esetén és 1 perc 72°C lépések következtek negyvenszer ismételve, majd 5 perces 72°C-on történő utópolimerizációval zárult. A mintákat 1.2 %-os, Et-Br-dal vagy Sybr Gold festékkel festett agaróz gélen futtattuk 10 V/cm-es feszültséggel, majd a mintázatokat 313 nm-es UV fényben polaroid kamerával fényképeztük le.

3.6.2. Az ITS régió felszaporítása (Festuca)

A teljes ITS szakaszt (ITS1-5.8S-ITS2) felszaporítottuk az ITSL (5'-TCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTG-3') és ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primerek segítségével (Hsiao et al. 1995a). A reakció megközelítőleg egy 700 bp méretű fragmentet eredményezett. Egy-egy reakcióelegy a következő összetevőket tartalmazta: 20-50 ng templát DNS, 1 x reakció puffer, 3 µl dNTP (25mM törzs), 1.5 µl $MgCl_2$ (25mM törzs), 0.75 µl ITSL primer, 0.75 µl ITS4 primer (10µM törzs), 1.2 Unit Red-Taq DNS polimeráz (Sigma). A reakció körülmények a következők voltak: 2 perces 94°C-os előciklus után 10 másodperc 94°C, 30 másodperc 59°C és 1 perc 72°C lépések következtek 35X ismételve, majd 5 perces 72°C-on történő utópolimerizációval zárult. A mintákat 1.0 %-os, Et-Br-dal festett gélen futtattuk, a ~700 bp méretű ITS régiót szikével kivágtuk és a Sigma cég GeneElute Minus Et-Br kitjével tisztítottuk szekvenáláshoz.

3.7. Southern analízis

3.7.1. Digoxigeninnel jelölt próbával

Az 1 %-os agaróz gélről nitrocellulóz membránra történő blottolást Sambrook et al. (1989) módszerével végeztük. A próbaként használt *nptII* génszakaszt a következő primerekkel szaporítottuk fel a pBI 121-es bináris plazmidból: 5'-CTG AAT GAA CTG CAG GAC GAG G-3' és 5'-GCC AAC GCT ATG TCC TGA TAG C-3', majd a 11-digoxigenin-dUTP-vel (Boehringer Mannheim) történő jelölését random primer módszerrel végeztük. A próba DNS-eket (5-10 µg) 10 percig forró vízben denaturáltuk, majd sós jégre helyeztük. Hozzáadtunk 2 µl hexanukleotid primert és 2 µl dNTP-t, amely tartalmazta a digoxigeninnel jelölt dUTP-t is, majd 1 µl Klenow enzimet és 9 µl desztillált vizet. A mintákat 37 °C-on 20 órát inkubáltuk, majd a reakciót 2 µl 0.2 M EDTA (pH: 8.0) hozzáadásával állítottuk le. A DNS-t 2.5 µl 4 M LiCl-dal és 75 µl 96 %-os etanollal csaptuk ki 2 órát –20°C-on tartva. 15

perces centrifugálást követően (12000 g) a DNS-t 50 µl 70 %-os etanollal mostuk, vákuum alatt megszárítottuk, majd 50 µl TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) pufferben feloldottuk.

Az előkészített nitrocellulóz membránokat fóliatasakokba helyeztük, hibridizációs puffert (5X SSPE, 5X Denhardt, 0.2 % SDS, 0.25 mg/ml denaturált heringsperma) öntöttünk bele (20 ml/100 cm^2), majd lezártuk. A tasakokat 68 °C-on inkubáltuk 1 órán keresztül (prehibridizáció). Ezt követően a puffert eltávolítottuk és új hibridizációs pufferrel helyettesítettük, amely már tartalmazta a denaturált, digoxigeninnel jelölt próba DNS-eket is (5 µl/2.5 ml). A membránokat ezt követően 10-12 órát inkubáltuk 68 °C-on. Ezután a membránokat kétszer 5 percig 2X SSC / 0.1 % SDS oldattal, majd kétszer 15 percig (68 °C-on) 0.1X SSC / 0.1 % SDS oldattal mostuk, majd 30 percig blokkoló oldatban inkubáltuk szobahőmérsékleten.

A membránokat ezután 30 percig inkubáltuk 4 µl anti-DIG AP konjugátumot tartalmazó puffer II-ben (Boehringer Mannheim). Utána a membránokat kétszer 15 percig mosópufferrel mostuk, majd 2 percig detektáló pufferben inkubáltuk. Ezt követően 45 µl nitro kék tetrazólium klorid és 35 µl 5-bróm-4-klór-3-indolil foszfát oldatot összekevertünk 10 ml detektáló pufferrel és ebbe helyeztük a membránt és sötét helyre helyeztük. A színreakciót a megfelelő színintenzitás elérése után a membránok TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) pufferbe helyezésével állítottuk le.

3.7.2. Izotóppal jelölt próbával

Sambrook et al. (1989) által leírt standard protokollt alkalmaztuk. A próba ^{32}P izotóppal jelölt CaMV35S promóter és *MdACS*2 gén fragmentumokat tartalmazott, melyeket a következő primerekkel szaporítottunk fel:

F35S: 5'-TTG AAG ATG CCT CTG CCG AC-3'

R1 ACS2: 5'-GCT TCC ATG CTA TCA GAC AC-3' vagy

R2 ACS2: 5'-CAT TGA AGA GTA ATG CTG GAC AC-3'

3.8. Northern analízis (alma)

Minden mintából 15µg total RNS-t denaturáltunk, majd 1%-os 2.2 M formaldehidet tartalmazó denaturáló gélen szétválasztottuk. Ezt követően kapilláris úton 20X SSC-vel Hybond N^+ (Amersham) nylon membránhoz rögzítettük. Előhibridizációt ~ 2 ml / 10 cm^2 térfogatban 3.5 órán keresztül 42°C-on végeztük. Az oldat összetétele a következő volt: 5X SSC, 5X Denhardt oldat, 1% SDS, 50% formamid, 10% dextrán szulfát, 100 µg/µl ultrahanggal töredezett és denaturált lazac sperma DNS. Az ezt követő hibridizálás legalább

16 órán keresztül 42°C-on történt ^{32}P izotóppal jelölt 1094 bp hosszúságú *MdACS*2 cDNS próbával, melyet a Prime-a-Gene System labelling kit-tel (Promega) jelöltünk standard protokollt alkalmazva. A hibridizációt követően a blot-ot először kétszer szobahőmérsékleten 5 percig mostuk 0.2X SSC / 0.1% SDS oldattal, majd kétszer 42°C-on 15 percig 0.2X SSC / 0.1% SDS oldattal és végül kétszer 50°C-on 15 percig 0.1X SSC / 0.1% SDS oldattal. A hibridizációs mintázatot röntgen filmen detektáltuk, az intenzitástól függően 1-5 nap -80°C-on történt expozíció után.

3.9. Szekvenálás

A szekvenálási reakciókat az MBK (Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Gödöllő) szekvenáló laborjában végeztettük ABI Prism 310 (Applied Biosystems) készülékkel, az ITSL és ITS4 primerek (Hsiao et al. 1995a) felhasználásával.

3.10. Gyümölcs vizsgálati módszerek

3.10.1. Az etilén termelés mérése

Minden egyes transzgénikus vonalról (42 Royal Gala és 58 McIntosh) és nem transzformált kontroll fákról 2001 szeptember 10-11-én gyűjtött 3-3 gyümölcsöt 5 ismétlésben 2.1 literes műanyag edényekbe helyeztünk és 24 órára lezártunk az etilén mérése előtt. A maradék gyümölcsöket rögtön hidegszobában (5°C) helyeztük el tárolásra. (A későbbi mérések során a hidegen tárolt gyümölcsök esetében 1-2 órát vártunk az edények lezárás előtt, hogy a gyümölcsök felmelegedjenek szobahőmérsékletre.) A 24 órás tárolás és azt követő mérés szobahőmérsékleten történt (22-25°C). Pontosan egy nap elteltével 1 ml gázmintát vettünk ki fecskendővel a tető gumi szeptumán keresztül és gázkromatográfba (típus: SRI 8610, 2 mm X 90 cm szilika oszloppal felszerelve) injektáltuk. A gázkromatográfot előzetesen ismert mennyiségű etilén standardokkal kalibráltuk. Az oszlop hőmérsékletét 80°C-on tartottuk és carriernek nitrogén gázt használtunk. Az etilén csúcs az injektálást követően 1.5-1.8 perccel jelentkezett, melyet a gázkromatográfhoz csatlakoztatott IBM számítógéppel detektáltunk és tároltunk.

3.10.2. Az oldható anyagok (Brix) és gyümölcs keménység mérése

A Brix értékét AO ABBE refraktométerrel határoztuk meg, amely a gyümölcslében oldott összes oldható anyag (legfőképpen cukrok, de kisebb mennyiségben különböző sók, savak, fehérjék …) mennyiségét adja meg százalékban. A gyümölcshús keménységét Newton-ban mértük QA FT327 kézi penetrométer segítségével. A mérések után a

gyümölcsök nem sérült részéből származó mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és RNS izolálásig –80°C-on tároltuk.

3.10.3. Az ACS tisztítása és enzimaktivitás mérés

Lizada és Yang (1979) és Yip et al. (1991) módszereit kissé módosítottuk és kombináltuk egymással. Az extrakciót megelőzően a gyümölcsöket 0°C-on tároltuk 3 napig. Ezután 25 g gyümölcshúst homogenizáltunk azonos térfogatú pufferben: 400 mM K-foszfát puffer (pH: 8.5) 1 mM EDTA, 10 µM piridoxál-foszfát, 0.5% 2-merkaptoetanol, majd két réteg steril Miracle cloth anyagon átszűrtük. Centrifugálást (15000 g, 30 perc) követően a csapadékot 5 ml oldatban (20 mM K-foszfát puffer (pH: 8.5), 1 mM EDTA, 10 µM piridoxál-foszfát, 30% glicerin, 1 mM 2-merkaptoetanol) szuszpendáltuk, majd folyamatos keverés mellett hozzáadtunk azonos térfogatban ugyanezt a puffert kiegészítve 0.2% Triton X-100-zal. Szobahőmérsékleten történő inkubálást (30 perc) követően az oldatot 20 percig 15000 g-vel centrifugáltuk. A felülúszó tartalmazta az ACS fehérjét.

Minden mintából 0.2 ml felülúszót 12mm x 75 mm-es csövecskékbe pipettáztunk, majd 200 µM S-adenozil metionint, 10 µM piridoxál foszfátot, 50 mM Hepes-KOH puffert (pH: 8.5), 1 µM $HgCl_2$-ot adtunk hozzá, majd a térfogatot 900 µl-re bidesztvízzel töltöttük fel. A csövecskéket gumi tetővel zártuk és jégre helyeztük. A 100 µl jégbe hűtött 5%-os NaOCl és telített NaOH (2:1) keverékét a gumitetőn keresztül az oldathoz injektáltunk, majd 5 másodpercig vortexeltük és 2.5 percre jégre helyeztük. Közvetlenül az etilén mérés előtt újra vortexeltük 5 másodpercig. A gázkromatográfba 1 ml gázmintát injektáltunk, melyben az oszlop hőmérsékletét 80°C-on tartottuk.

3.11. Statisztikai analízis

3.11. A mintázatok kiértékelése

A gélelektroforézissel kapott fragmentumokat binárisan kódoltuk és a kiértékelésnél minden sávot figyelembe vettünk. Az SPSS 8.0 statisztikai programmal a Jaccard (1908) index alapján klaszter analízist készítettünk. A páronkénti összehasonlítással kapott egyezési koefficienseket félmátrix táblázatban adtuk meg. Elkészítettük a fajok többdimenziós MDS (Multi-dimensional analysis) analízisét is, ami a genotípusok közötti hasonlóság/különbözőség bemutatását egy két- vagy háromdimenziós euklideszi térben teszi lehetővé.

3.1.2. A szekvenciák kiértékelése

Összesen 27 ITS régiót sikerült szekvenálnunk a különböző *Festuca* fajokból, melyeket a részletes filogenetikai analízishez kiegészítettünk az összes eddig publikált és az NCBI GenBank-ban (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) szereplő szekvenciákkal: Hsiao et al. (1995a) 2 szekvencia, Charmet et al. (1997) 11 szekvencia, Tredway et al. (1999) 46 szekvencia, Gaut et al. (2000) 32 szekvencia, Torrecilla és Catalán (2002) 26 szekvencia (3. táblázat).

3. táblázat. 117 *Festuca* fajokból izolált ITS szekvencia, melyek előzetes vizsgálatokból elérhetőek voltak.

Hsiao et al. (1995)	
L36514	*F. mairei*
Y09814	*F. pratensis*
Charmet et al. (1997)	
AJ240151	*F. pratensis*
AJ240152	*F. pratensis*
AJ240153	*F. arundinacea*
AJ240154	*F. arundinacea*
AJ240155	*F. atlantigena*
AJ240156	*F. letournexiana*
AJ240157	*F. glaucescens*
AJ240158	*F. rubra*
AJ240159	*F. heterophylla*
AJ240160	*F. filiformis*
AJ240163	*F. mairei*
Tredway (1999)	
AF147135	*F. lemanii*
AF147136	*F. lemanii*
AF147137	*F. lemanii*
AF147138	*F. valesiaca*
AF147139	*F. lemanii*
AF147140	*F. rubra*
AF147141	*F. rubra*
AF147142	*F. rubra*
AF147143	*F. rubra*
AF147144	*F. lemanii*
AF147145	*F. rubra*
AF147146	*F. rubra*
AF147147	*F. rubra*
AF147148	*F. rubra*
AF147149	*F. valesiaca*
AF147150	*F. rubra*
AF147151	*F. brevipila*
AF147152	*F. brevipila*
AF147153	*F. brevipila*
AF147154	*F. ovina*
AF147155	*F. filiformis*
AF147156	*F. idahoensis*
AF147157	*F. brevipila*
AF147158	*F. idahoensis*
AF147159	*F. idahoensis*
AF147160	*F. filiformis*
AF147161	*F. brevipila*
AF147162	*F. rubra*
AF147163	*F. rubra*
AF147164	*F. rubra*
AF147165	*F. brevipila*
AF147166	*F. rubra*
AF147167	*F. ovina*
AF147168	*F. pseudovina*
AF147169	*F. ovina*
AF147170	*F. ovina*
AF147171	*F. ovina*
AF147172	*F. idahoensis*
AF147173	*F. valesiaca*
AF147174	*F. glauca*
AF147175	*F. glauca*
AF147176	*F. rubra*
AF147177	*F. idahoensis*
AF147178	*F. glauca*
AF147179	*F. brevipila*
AF147180	*F. brevipila*
Gaut et al. (2000)	
AF171128	*F. gigantea*
AF171129	*F. gigantea*
AF171130	*F. polesica*
AF171131	*F. polesica*
AF171132	*F. polesica*
AF171133	*F. gigantea*
AF171134	*F. lasto*
AF171135	*F. lasto*
AF171136	*F. drymeja*
AF171137	*F. drymeja*
AF171138	*F. mairei*
AF171139	*F. mairei*
AF171140	*F. mairei*
AF171141	*F. mairei*
AF171142	*F. mairei*
AF171144	*F. pratensis*
AF171145	*F. rupicaprina*
AF171146	*F. rupicaprina*
AF171147	*F. scariosa*
AF171148	*F. scariosa*
AF171149	*F. scariosa*
AF171174	*F. arundinacea*
AF171175	*F. arundinacea*
AF171176	*F. arundinacea*
AF171177	*F. arundinacea*
AF171178	*F. pratensis*
AF171179	*F. pratensis*
AF171180	*F. pratensis*
AF171181	*F. pratensis*
AF171187	*F. gigantea*
AF171188	*F. gigantea*
AF171189	*F. gigantea*
Torrecilla & Catalán (2002)	
AF303403	*F. borderii*
AF303404	*F. fontqueri*
AF303405	*F. baetica*
AF303406	*F. elegans*
AF303407	*F. paniculata*
AF303408	*F. scariosa*
AF303409	*F. durandoi*
AF303410	*F. kingii*
AF303411	*F. altissima*
AF303412	*F. eskia*
AF303413	*F. quadriflora*
AF303414	*F. gautieri*
AF303415	*F. alpina*
AF303416	*F. gigantea*
AF303417	*F. pseudeskia*
AF303418	*F. lasto*
AF303419	*F. capillifolia*
AF303420	*F. triflora*
AF303421	*F. pratensis*
AF303422	*F. rubra*
AF303423	*F. pyrenaica*
AF303424	*F. mairei*
AF303425	*F. drymeja*
AF303426	*F. indigesta*
AF303427	*F. coerulescens*
AF303428	*F. glacialis*

A filogenetikai fa „gyökeresítésére” kívülálló fajként a *Secale cereale* (AF303400) és *Poa pratensis* (AF171182) szekvenciáit használtuk. A szekvenciák összerendezését (alignment) elsőként a ClustalW program (Thompson et al. 1994) segítségével végeztük, majd manuálisan javítottuk. Az így összerendezett szekvenciákat a MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) program 2.1 verziójával (Kumar et al. 2001) a „legnagyobb

takarékosság" (Maximum Parsimony) módszerével elemeztük. Ezzel a módszerrel olyan fát építünk, amely a lehető legkevesebb mutációs eseménnyel magyarázza meg a meglévő szekvenciák létrejöttét. Számos azonos pontszámú fát szolgáltat, ezek közös részét (konszenzus) vehetjük, mint megbízhatót.

A kapott filogenetikai fa pontosságának és megbízhatóságának tesztelésére végzett bootstrap vizsgálatban 250 ismétléssel (mintavétellel) dolgoztunk.

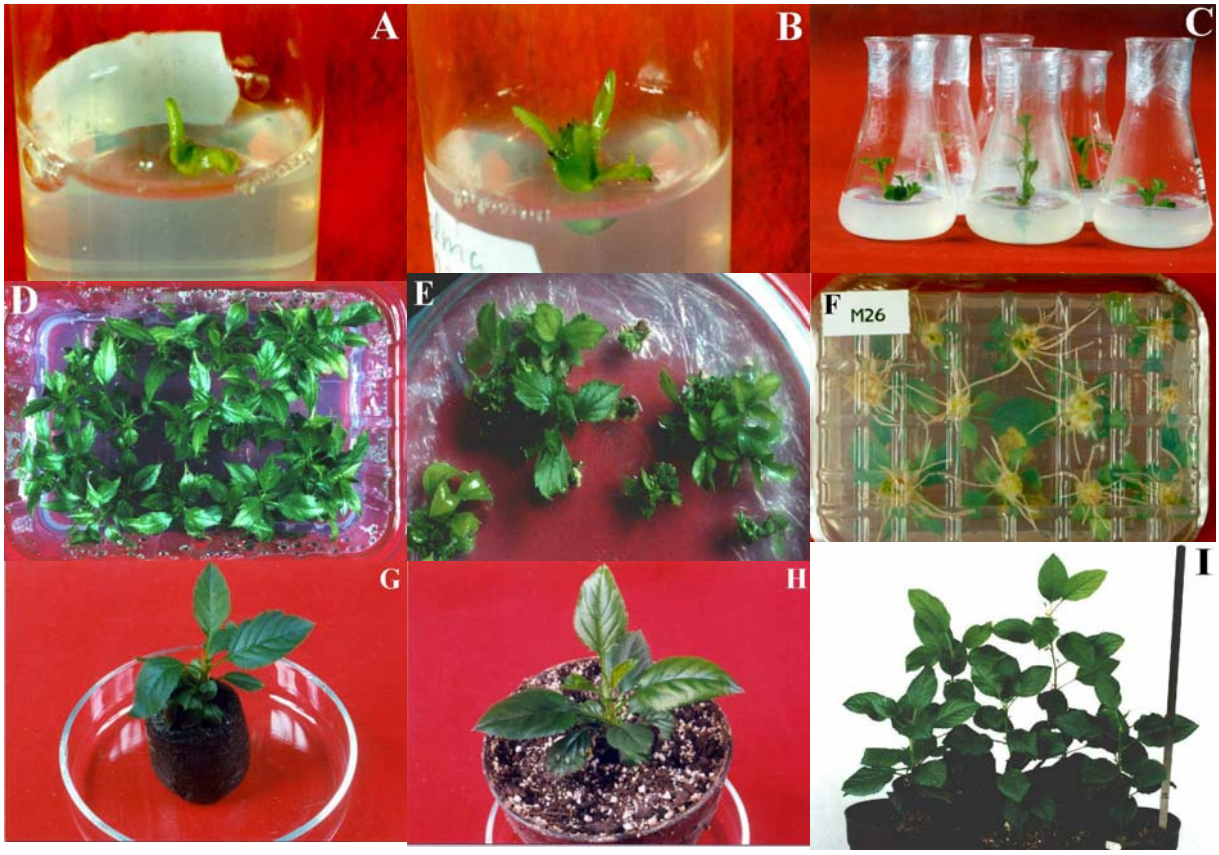
Az ún. bootstrap vizsgálattal a standard hibát becsüljük, a meglévő adatokat ismét összerendezzük, de minden szekvenciában a nukleotidokat adott pozícióban, amelyekben eredetileg eltértek, véletlenszerűen cserélgetjük. Ezekből ismét az eredeti filogenetikai fa kialakításához használt módszerrel (jelen esetben Maximum Parsimony) egy új filogenetikai fát állítunk elő. Ezt követően minden elágazást összehasonlítunk az eredeti fa elágazásaival. Eltérés esetén az adott elágazás 0 értéket kap, míg egyezőség esetén 1-et. Ezt több százszor megismételjük és az így kapott bootstrap érték %-ban azt fejezi ki, hogy mennyi esetben egyezett abban az adott elágazásban a kialakított filogenetikai fa az eredetivel (Nei és Kumar 2000). Általános szabályként azt mondhatjuk, hogy ha a bootstrap érték 90 % felett van, akkor az adott elágazás topológiája megfelelő.

A dolgozatban szereplő egyéb statisztikai analízishez a Microsoft Corporation Excel programját használtuk.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

4.1. Mikroszaporítás és növényregenerálás

Az általunk használt alma genotípusok sikeres molekuláris transzformációja előfeltételeként ki kellett dolgozni a szóban forgó alany- és nemesfajták *in vitro* tenyészeteinek indítását, fenntartását, felszaporítását, majd egy hatékony levélszövetből kiinduló regenerációt, végül pedig a kapott hajtások gyökereztetését és akklimatizálását. Célunk az volt, hogy e folyamat egyes lépéseiben felmerülő problémákat megoldjuk és lehetőség szerint rutinszerűen használható technikákat dolgozzunk ki. Az itt bemutatott módszerrel alig több, mint 11 hónap alatt (45 hét) az egész folyamat véghezvihető, azonban ha az *in vitro* hajtástenyészet rendelkezésünkre áll, akkor a folyamat további 24 héttel rövidíthető.



9. ábra. Az alma mikroszaporításának folyamata a merisztéma izolálástól a szabadföldbe ültetésig. **A:** Három hetes, merisztémából indított fejlődő hajtáskezdemény hajtásindukciós táptalajon. **B:** Nyolc hetes, merisztémából indított fejlődő hajtáskezdemény hajtásindukciós táptalajon. **C:** Három hónapos fejlődő hajtások hajtásindukciós táptalajt tartalmazó Erlenmeyer lombikokban. **D:** A hajtások felszaporítása weg-boxban hajtás-sokszorosító táptalajon. **E:** Levéllemezből történő hajtásregeneráció a táptalajra helyezést követő hatodik héten. **F:** Hajtások gyökereztetése weg-boxban a gyökérindukciót követő harmadik héten. **G:** A gyökeresített hajtások Jiffy-7 indító tápkockába helyezve. **H:** Öt héttel a gyökérindukciót

követően a hajtások virágcserepekbe ültetve (az akklimatizáció kezdete). **I:** Két hónap elteltével 15-20 cm-es magasságot elért hajtások.

Az alma törzstenyészeteket alvórügyekből izolált merisztémákból indítottuk. Mivel a fásszárú növények *in vitro* tenyészetének létrehozását erősen befolyásolja a szezonalitás, ezért tavasszal még a nedvkeringés beindulása előtt gyűjtöttünk vesszőket. A merisztémákat mikroszkóp alatt preparáltuk ki és hajtásindukciós táptalajra (2. táblázat) helyeztük. Így az endogén fertőzések megjelenését és a szövetek barnulását, melyeket a növényi szövetekből kibocsátott és oxidálódott fenolszármazékok okoznak, sikerült minimálisra lecsökkentenünk. Ennek kiküszöbölésére még polyvinylpirrolidonnal (PVP) is kiegészítettük a táptalajt (5 mg/l), amely hatásosnak bizonyult és a merisztémák nagyobb százalékban indultak fejlődésnek. Az alma mikroszaporításának a folyamatát a 9. ábra mutatja be.
A létrehozott hajtástenyészetet immár nyolcadik éve folyamatosan fenntartjuk, szükség esetén transzformációhoz felszaporítjuk.

A sikeres növényi transzformációhoz a növény-sejt-növény rendszer kidolgozása szükséges (Dudits és Heszky 2000). Ennek segítségével illeszthető be a transzformáció a mikroszaporítás folyamatába. Esetünkben levélszövetből történő regenerációs kísérleteket végeztünk (4. táblázat). Az MS és N_6 alaptáptalajok hatását vizsgáltuk különböző citokininek (BA, TDZ) és auxinok (NAA, IBA) kombinálásával.

A kísérletek értékelését hat héttel a levelek táptalajra helyezése után végeztük el. A 4-es táptalajon szinte semmilyen reakciót nem tapasztaltunk ezért erdeményei nem szerepelnek a táblázatokban. A levéllemez zöld maradt, de sok volt rajta a nekrotikus folt. A bazális végen enyhén morzsás kalluszt figyelhettünk meg. Regenerálódott hajtást nem kaptunk, valószínűleg ebben az ammónium-nitrát, mint nitrogénforrás hiánya is szerepet játszott. A hajtásregeneráció ugyanis nem csak a nitrogén jelenlétét igényli, hanem meghatározott NO_3^- :NH_4^+ arányt is, tehát mind a nitrogén koncentrációja, mind a formája fontos. Predieri et al. (1989) megállapították, hogy a nitrogén szint 75%-ra csökkenthető anélkül, hogy bármilyen negatív hatása lenne; a NO_3^-:NH_4^+ arányt 2:1-ről 1:1-re változtatva azonban csökkent a regenerálódó hajtások száma még akkor is, ha az össz-nitrogén tartalom nagyobb volt.

Az 1-es táptalajon a regenerálódott hajtások kicsik voltak (az átlagos hajtáshossz csupán néhány mm), sok közülük vitrifikálódott, nehéz volt elkülöníteni őket. A hajtások nem csak a vágási felület mentén fejlődtek. A levéllemez antociános elszíneződést mutatott, ami a stresszhatás egyik megnyilvánulása. Nehezen tudtuk megszámlálni a hajtásokat, mert sűrűn fejlődtek egymás mellett, valamint sok csak levélkezdeménynek látszott.

4 táblázat. A regenerációs kísérlet eredményei háromféle táptalajon alany (M26)- és nemesfajtánál (Royal Gala). Az alapadatok a mellékletben találhatók.

M26	1. Táptalaj		2. Táptalaj		3. Táptalaj	
	1. ismétlés	2. ismétlés	1. ismétlés	2. ismétlés	1. ismétlés	2. ismétlés
átlag:	3,71	3,57	5,31	5,57	3,48	3,17
szórás:	1,36	1,24	1,92	1,64	1,73	1,48
szórásnégyzet	1,85	1,54	3,69	2,70	3,01	2,21
max:	7	7	9	9	6	7
min:	0	1	1	2	0	0
levélszám:	45	46	35	37	33	35
z:	0,51		0,62		0,79	
	7,22		7,42			

α = 0,05 szignifikancia szint mellett z* = 1,96 (átlag=átlagos hajtásszám/explantum)

Royal Gala	1. Táptalaj		2. Táptalaj		3. Táptalaj	
	1. ismétlés	2. ismétlés	1. ismétlés	2. ismétlés	1. ismétlés	2. ismétlés
átlag:	3,90	3,88	5,33	4,78	0,44	0,60
szórás:	1,43	1,01	1,79	2,09	0,72	0,59
szórásnégyzet	2,04	1,03	3,20	4,38	0,51	0,35
max:	7	6	10	8	3	2
min:	1	2	2	0	0	0
levélszám:	39	51	40	40	32	40
z:	0,07		1,26		1,02	
	4,59		19,53			

α = 0,05 szignifikancia szint mellett z* = 1,96 (átlag=átlagos hajtásszám/explantum)

A Royal Gala esetében a levéllemez kalluszosodása is megfigyelhető volt. A vitrifikáció és a hajtások rövidülése valószínűleg az alkalmazott szintetikus citokinin, a TDZ hatásának tulajdonítható. Már Fasolo et al. (1988) is felhívták a figyelmet arra, hogy TDZ hatására rövid internódiummal és kis levelekkel rendelkező hajtásokat kaptak. A regenerációs százalék szempontjából az 5 mg/l-es BA hormonkoncentráció helyettesíthető volt 2 mg/l TDZ-vel, de a regenerálódott hajtások minőségét a citokinin típusa befolyásolta.

A 2-es táptalajon mindkét fajtánál sok szép zöld, egészséges hajtás fejlődött, már hathetes korban elérték a 0.5-1 cm-es magasságot. A hajtások könnyen elkülöníthetők voltak egymástól, és a levéllemez is zöld maradt. A hajtások szinte 100 %-ban a vágás bazális végén fejlődtek.

A 3-as táptalajon a hajtások jól elkülöníthetők voltak egymástól, sok közülük hathetesen elérte a 0.5-1 cm-es magasságot. Kevés, bár egészséges, szép hajtásokat nyertünk, azonban levelük vékony volt és gyorsabban öregedtek. A levéllemez kissé antociános lett, kalluszosodás is megfigyelhető volt, néhány hajtás pedig vitrifikálódott.

A 4. táblázatban bemutatott eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy mindkét genotípusnál a 2. táptalaj bizonyult a legjobbnak levélszövetből történő regenerációra. Ezt az

eredményt statisztikailag kétmintás z-próba segítségével támasztottuk alá a következő képlet segítségével:

$$Z = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}}$$

$\bar{x}$ = átlag
σ = szórás
n = mintaszám

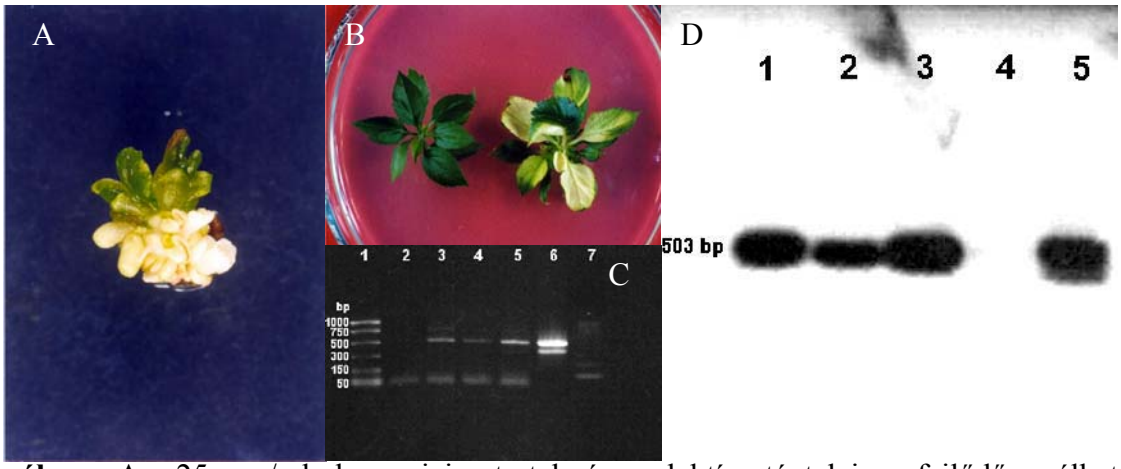
Mivel a táptalajok összehasonlításánál minden esetben $z \geq z^*$, ezért 95%-os valószínűséggel megállapítható, hogy a kapott eredmények egymástól szignifikánsan eltérnek. Az egyes ismétlések között ennek az ellenkezője figyelhető meg, tehát az ismétlések nem térnek el egymástól szignifikánsan.

Eredményeinkből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy mind az M26 alany- és Royal Gala nemes fajtáknál a levélszövetből történő regenerációhoz, az N_6 makro- és MS mikroelem összeállítású táptalaj kedvezett, magas citokinin (5 mg/l BA) és alacsony auxin (0.2 mg/l NAA) hormonkoncentrációk mellett. A BA hatékonyabbnak bizonyult a TDZ-nél.

4.2. Az alma (molekuláris) transzformációja

Az *MdACS*2 gén antiszensz és szensz konstrukcióival egyaránt transzformáltunk levélszegmenseket. Az első szelektív táptalajon túlélő hajtáskezdeményeket az M26 alannyal kaptuk EHA 105-ös *Agrobacterium* törzzsel történt transzformációt követően, amely az antiszensz konstrukciót tartalmazta. A szelekcióhóz 25 µg/ml koncentrációban kanamicint alkalmaztunk, amely hatékonynak bizonyult, ugyanis a kontroll, nem transzformált szegmensek egy esetben sem produkáltak hajtáskezdeményt szelektív táptalajon. A transzformációs hatékonyság nagyon alacsonynak bizonyult, több ezer levélszegmens transzformációját követően jóval 1% alatt maradt. Összesen 26 db M26, vélhetően transzgénikus növény fejlődött szelektív táptalajon, melyekben kezdetben PCR reakcióval, majd később amikor már több DNS-t tudtunk izolálni, Southern hibridizációval is bizonyítottunk a transzgén jelenlétét.

A 10/A ábrán egy tipikus sikeres transzformációt követő képet láthatunk. A vélhetően transzgénikus növény zöld és növekszik szelektív táptalajon, míg a nem transzformáns szegmensekről az esetleges regenerációs próbálkozások kudarcba fulladnak és kifehérednek, elpusztulnak. Egy esetben kaptunk kiméra növényt is, melyet később nem sikerült életben tartanunk (10/B ábra).



10. ábra. A: 25 µg/ml kanamicin tartalmú szelektív táptalajon fejlődő, vélhetően transzgénikus, rezisztens (zöld) és nem-transzgénikus, szenzitív (fehér) hajtások **B:** Szelektív táptalajon fejlődő rezisztens (bal) és kiméra növény (jobb) **C:** Az npt II-es génspecifikus primerekkel indított PCR reakció eredménye. (A primerek egy 503 bp hosszú DNS szakaszt szaporítanak fel.) 1: PCR molekulatömeg marker 2: Nem transzformált (kontroll) növényből izolált DNS-sel indított reakció 3-5: Az antiszensz ACS-szintáz génnel transzformált növényekből izolált DNS-sel indított reakció 6: Pozitív kontrollként használt pBI 426-os plazmiddal indított PCR 7: 100 bp DNS létra molekulatömeg marker **D:** Southern hibridizáció eredménye digoxigenoinnel jelölt npt II-es próbával. 1-3: Az antiszensz ACS génnel transzformált növényekből npt II specifikus primerekkel felszaporított DNS fragmentum hibridizációja jelölt próbával 4: Nem transzformált (kontroll) növényből npt II specifikus primerekkel felszaporított DNS fragmentum hibridizációja jelölt próbával 5: Pozitív kontrollként használt pBI 426-os plazmid hibridizációs képe

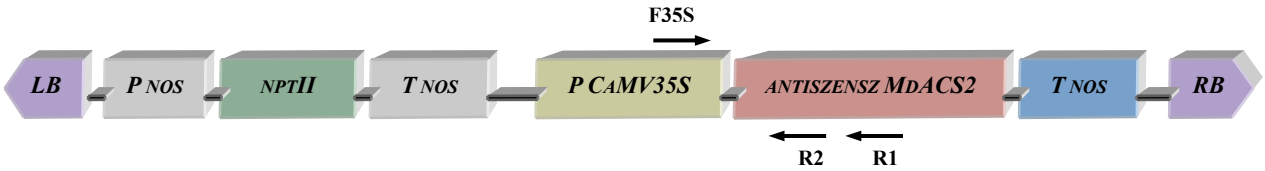
A szensz *MdACS*2 konstrukciót tartalmazó vektorral is folytattunk kísérleteket és szintén csak az EHA 105-ös *Agrobacterium* törzzsel kaptunk szelektív táptalajon túlélő transzgénikus hajtásokat. Irodalmi adatok alapján már sejteni lehetett, hogy az EHA 105-ös törzs lesz a leghatékonyabb (De Bondt et al. 1994), azonban ennek ellenére számos laboratóriumban használják az LBA 4404 és C58C1 törzseket is, valószínűleg azért, mert az EHA 105-ös törzs elpusztítása az együttenyésztés után nehéz. A szensz konstrukvióval összesen 8 db bizonyítottan transzgénikus hajtást kaptunk, ebben az esetben Royal Gala fajtából kiindulva. A transzgénikus növények zárt üvegházban kerültek kiültetésre az Újfehértói Gyümölcstermesztési Kutató- és Szaktanácsadó Kht felügyelete alatt. A fácskák termőre fordulásáig azonban legalább három évet kell még várnunk, ezért a transzgénikus gyümölcsök vizsgálatát Amerikában végeztük el.

4.3. A transzgén jelenlétének bizonyítása termőrefordult fákban

A Cornell Egyetemen (USA) Géza Hrazdina vezetésével dolgozó kutatócsoport, az *MdACS*2 gén izolálását követően már 1995-ben a gént antiszensz orientációban Royal Gala és McIntosh almafajtákba transzformálta. Az 1996-97-ben kiültetett transzgénikus almafák

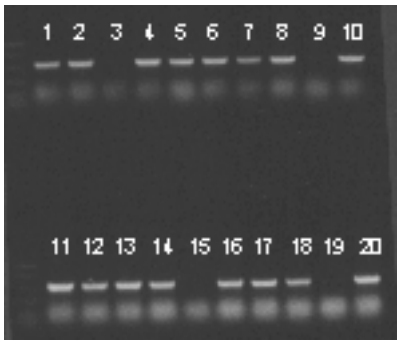
többsége 2001-re már termőre fordult, és megfelelő mennyiségű gyümölcsöt produkált ahhoz, hogy megvizsgálhassuk milyen hatással volt a "beültetett" antiszensz transzgén az ACS gén expressziójára, az etilén produkcióra és a gyümölcs tárolási paramétereire. A Cornell Egyetemen 2001-2002-ben lehetőségem volt a transzgénikus gyümölcsök vizsgálatát elvégezni.

A transzgén jelenlétének kimutatása céljából a transzgénikus ültetvényben szereplő 101 Royal Gala és 65 McIntosh transzgénikus növényből DNS izolálást követően PCR reakciót indítottunk a CaMV35S promóter- valamint ACS-specifikus primerekkel (11. ábra).



11. ábra. A transzformációhoz alkalmazott bináris vektor felépítése és primer kapcsolódási pontok (LB: baloldali határszekvencia, P_{nos}: nopalin-szintáz promóter, nptII: neomicin-foszfotranszferáz markergén, T_{nos}: nopalin-szintáz gén terminációs szekvenciája, $P_{CaMV35S}$: karfiol mozaik vírus 35S promóter, RB: jobboldali határszekvencia)

Az F35S+R1ACS2 primerkombinációban egy ≈550bp méretű, míg az F35S+R2ACS2 kombinációban ≈450bp méretű fragmentum szaporodik fel. Ahol a transzformáció sikertelen volt, vagy más konstrukcióval történt a transzformáció, ott ennek a fragmentumnak a megjelenése nem várható (12. ábra).



12. ábra. Az F35S és R1ACS2 primerpárral végzett PCR analízis transzformált McIntosh vonalakban
1-2, 4-8, 10-14, 16-18, 20: Sikeres transzformáció mintázata
3,9: Poligalakturonáz génnel transzformált vonalakból izolált DNS-sel indított reakció
15: Sikertelen transzformáció az ACS génnel az egyik vonalban
19: Kontroll McIntosh növényből izolált DNS-sel indított reakció

A 65 transzgénikus McIntosh vonal közül 7 poligalakturonáz (PG) génnel, egy szensz ACS-sel és 57 antiszensz ACS-sel volt transzformálva. A PG és szensz ACS transzformánsok ebben az esetben kontrollként viselkedtek, mivel más génnel illetve vektorral voltak transzformálva, ezért a transzgén jelenlétét bennük más primerekkel kellett igazolni. Az 57 ACS transzformáns közül 1 bizonyult negatívnak, amellyel a későbbiekben nem foglalkoztunk, egy fa pedig még nem fordult termőre. A 101 Royal Gala transzformáns közül 3 β-glükuronidáz génnel és 98 antiszensz ACS-sel volt transzformálva, amelyek közül nyolc

negatívnak bizonyult, melyekkel a későbbiekben nem foglalkoztunk. A megmaradt 90 termőrefordult fa közül 48-nak a termését Kanadában vizsgálták tovább.

4.4 A transzgénikus gyümölcsök vizsgálata

Összesen 42 transzgénikus Royal Gala, 55 transzgénikus McIntosh és 5-5 kontroll fa gyümölcseinek analízisét végeztük el (Galli et al. 2003). Az előző évben (2000) jóval kevesebb mintaszámmal (mivel a fák még nem teremtek elég gyümölcsöt) már végeztek etilén méréseket és azt tapasztalták, hogy a hidegtárolás 37. napján érték el a kontroll gyümölcsök etiléntermelésük csúcspontját. Hogy az adatok összehasonlíthatóak legyenek, mi is a tárolás 37. napján végeztük el a méréseket az összes vonal esetében (5. táblázat).

A McIntosh vonalak közül találtunk néhányat, ahol a gyümölcsök etiléntermelése 50-70%-ban gátlódott, azonban az ACS enzimaktivitása nem mutatott számottevő különbséget a kontrollhoz viszonyítva.

5. táblázat. A legjobb transzgénikus vonalak néhány érési paramétere a hidegtárolás 37. napján 2000 és 2001-ben. Az alapadatok és a számítás menete a mellékletben találhatók.

	Transzgénikus vonal	C_2H_4 (nmol/100g/h)	Oldható anyagok (°Brix)	Keménység (Newton)	ACS aktivitás (nmol/mg prot/15min)
2000	Kontroll McIntosh	186.6	14.2	39.5	46.13
	TM 503	106.2	15.3	50.7	14.34
	Kontroll Royal Gala	120.0	15.6	66.7	23.4
	TG 196	0.8	17.5	77.3	0
	TG 197	13.0	16.2	57.2	5.9
	TG 198	3.7	16.0	68.1	1.3
2001	Kontroll McIntosh	253.76	15.4	50.4	24.03
	TM 503	157.96	15.7	66.4	22.15
	TM 574	109.18	13.8	50.4	20.63
	TM 558	70.25	14.9	48.3	19.03
	Kontroll Royal Gala	230.3	16.4	86.2	24.5
	TG 196	70.21	16.3	95.3	11.1
	TG 197	8.11	15.0	98.7	2.9
	TG 198	68,95	16.6	82.8	10.5
	TG 233	95.75	16.5	69.2	17.9
	TG 236	15.37	17.0	94.1	9.8
	TG 507	34.74	20.0	72.6	4.3
	TG 508	11.52	17.8	105.5	0.9
	TG 508	6.64	22.8	111.1	1.3

A Royal Gala esetében nyolc olyan fát találtunk, melynek gyümölcsei 60-97%-os gátlást mutattak alacsony ACS aktivitás értékekkel kísérve. A transzgénikus gyümölcsök általában keményebbek maradtak, mint a kontroll és az oldható anyagok mennyisége sem csökkent.

Az összes többi transzgénikus vonal gyümölcsei etilén termelésükben nem mutattak számottevő eltérést a kontrollhoz képest, sőt néhány esetben nagyobb etilén produkció volt megfigyelhető. Az egyes vonalak közötti eltérések valószínűleg az integrálódott transzgén különböző kópiaszámával, pozícionális hatásukkal és az ezt kísérő géncsendesítéssel magyarázható.

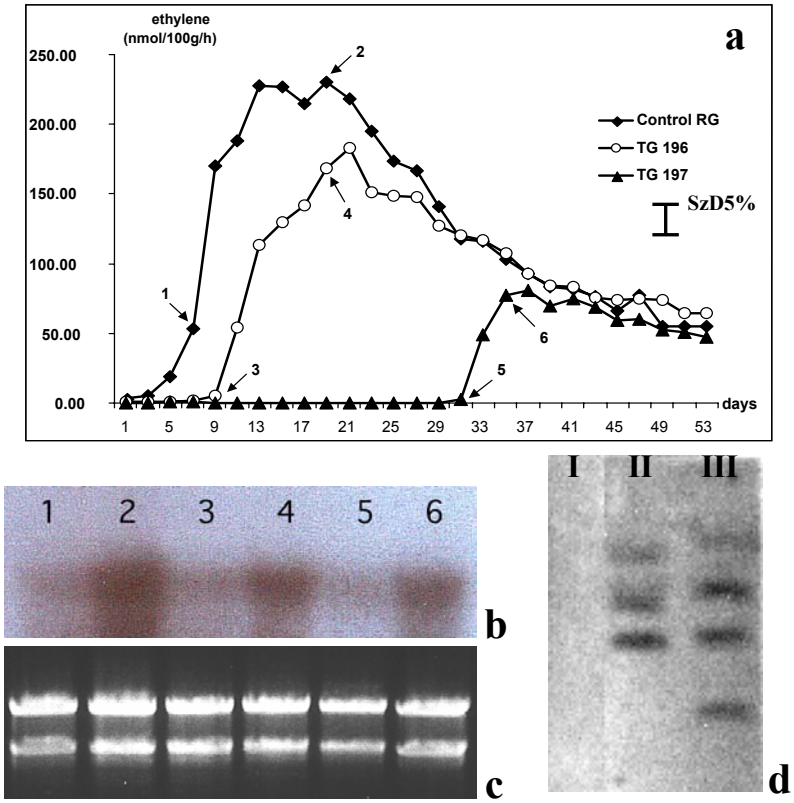
Mivel a gyümölcsök azonos időpontban lettek szüretelve 2000-ben és 2001-ben, ezért a két év eredményeinek nagymértékű eltérését szezonális hatásnak tulajdoníthatjuk. 2000-ben az időjárás hűvösebb és csapadékosabb volt, míg 2001-ben száraz meleg.

4.4.1. A gyümölcsök etiléntermelése szobahőmérsékleten tárolva

A 2000-ben legnagyobb mértékben gátlódott fák gyümölcseivel még részletesebb vizsgálatot terveztünk 2001-ben, szobahőmérsékleten mértük etilén termelésüket, minden második nap, nyolc héten keresztül, öt ismétlésben. Négy héten keresztül minden mérés után eltávolítottunk egy-egy almát, meghatároztuk a cukortartalmat és keménységüket, majd RNS-t és fehérjét izoláltunk belőlük.

Közvetlenül a betakarítást követően a kontroll gyümölcsökben az etilén termelés ugrásszerű, gyors növekedése volt tapasztalható; kezdetben exponenciális, majd lineráris görbét rajzolva (13/a ábra). Két héten belül az etilén produkció elérte csúcspontját, csaknem 250 nmol/100g/h értékkel. A következő héten már csökkenni kezdett és egy elnyúló, lecsendesedő, néhol hullámos ívet rajzolt. Hasonló etilén görbéket publikált már Song et al. (1996) is, ahol betakarítás után a gyümölcsökben a belső etilén szintet mérték, szintén szobahőmérsékleten. Az etilén termelés „hullámzása” esetükben még szembetűnőbb volt, feltehetően a különböző érés-specifikus ACS gének működésének és szabályozásának következtében. A transzgénikus vonalakban az etilén szintézise 1-4 hetes késést mutatott. A kezdeti exponenciális, majd lineáris emelkedés itt is megfigyelhető volt, azonban maximumuk jóval elmaradt a kontrolltól (13/a ábra). A TG 197 transzgénikus fa gyümölcsei még egy hónapos szobahőmérsékleten történő tárolás során sem mutattak etilénszintjükben emelkedést. Eddig ilyen jellegű késést akkor tapasztaltak, ha az optimális betakarítást megelőzően négy héttel szüreteltek (Song et al. 1996). Később az etiléntermelés gyors emelkedése itt is megfigyelhető volt, de a csúcspontja csak a kontroll egyharmadáig jutott.

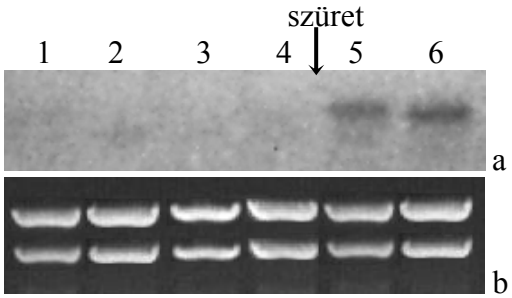
Mivel a gyümölcsöket azonos időpontban szüreteltük, az etilén produkcióban bemutatott késedelem az autokatalitikus etilén termelés beindulásának gátlását bizonyítja.



13 (a) ábra. Transzgénikus és kontroll gyümölcsök etiléntermelése szobahőmérsékleten. Az ismétlések száma: 5, a legnagyobb szignifikáns differencia (5%) van feltüntetve. A jelölt pontokon (1-6) történt mintavétel RNS izoláláshoz. **(b):** Az *MdACS*2 gén expressziója. ^{32}P izotóppal jelölt *MdACS*2 (U73815) cDNS próbával hibridizáltunk 15 µg total RNS-t. Az 1-6 számok jelentik az 1/a ábrán jelölt mintavételi pontokat. **(c):** rRNS kontroll. **(d):** A beépült transzgén kópiaszámának vizsgálata. A kontroll (I), TG 196 (II) és TG 197 (III) vonalakból izolált DNS, jelölt CaMV 35S promóter és *MdACS*2 fragmentummal hibridizált autoradiográfiás képe.

4.4.2. Az MDACS2 gén expressziója

Az *MdACS*2 gén működését Northern analízissel, ^{32}P izotóppal jelölt próbával vizsgáltuk. Már a gyümölcsfejlődés korai stádiumától, május közepétől kezdve mintát gyűjtöttünk abból a célból, hogy meghatározzuk a génexpresszió legkorábbi időpontját és annak mértékét.



14. (a) ábra. Az *MdACS*2 gén expressziója kontroll gyümölcsökben Northern hibridizációval. A mintavételek időpontja: 1: máj. 15, 2: jún. 15, 3: júl. 15, 4: aug. 15, 5: szept. 15, 6: szept. 17. **(b):** rRNS kontroll

Az első pozitív reakciót a kontroll gyümölcsökben kaptuk, a betakarítást követő 3. napon. Az 14. ábra kontroll gyümölcsökből származó, totál RNS-sel végzett Northern hibridizációs mintázatot mutat a gyümölcsfejlődés korai szakaszától egészen a tárolás kezdetéig. Ezzel a kísérlettel sikerült egyértelműen bizonyítanunk, hogy az *MdACS*2 gén valóban érés-specifikus expressziót mutat és szerepe az autokatalitikus etilén szintézis beindításában van.

A transzgénikus vonalakban a génexpresszió 1-4 hetes késést mutatott (13/b ábra). Az ábra egyértelműen bizonyítja, hogy a gén expressziója szoros korrelációban van a mért etilén értékekkel. A kontroll gyümölcsök Northern mintázata a maximális expressziónál sokkal intenzívebb (13/b/2 ábra), mint a TG196 (13/b/4 ábra) vagy TG197 (13/b/6 ábra) transzgénikus vonalak maximális etilénértéküknél.

4.4.3. Az integrálódott transzgén kópiaszáma

Az etilén termelés sikeres antiszensz gátlásához nagyszámú, különböző transzformációs eseményekből származó növényekre van szükség (Picton et al. 1993). Az első transzformációs eredményekből azt a következtetést vonták le, hogy az antiszensz géndózis növelésével hatékonyabb gátlás érhető el (Hamilton et al. 1990), továbbá hogy azt az integráció helye is nagymértékben befolyásolja (Stockhause et al. 1990). Ezért a transzgén kópiaszámának meghatározásához a legjobb transzgénikus vonalainkban Southern analízist végeztünk, olyan próba segítségével, amely a CaMV35S promóterből és az *MdACS*2 génből is tartalmazott egy-egy szegmentumot (13/d ábra). Az eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a vizsgált TG196 és TG197 transzgénikus vonalainkban legalább 3-4 antiszensz gén integrálódott. A paradicsom esetében, ahol az etilén szintézisét az eredeti szint 5%-ára sikerült csökkenteni antiszensz ACO génnel, 2 kópiát mutattak ki (Hamilton et al. 1990); míg antiszensz ACS génnel, amikor a gátlás 99.5%-os volt, 10 antiszensz gén beépülését feltételezték (Oeller et al. 1991). Végeredményben a sikeres gátlás kialakítására mind a géndózis, mind a transzgén pozíciója jelentős hatással van.

4.4.4. A gyümölcsök etilén termelése hidegen (5°C) tárolva

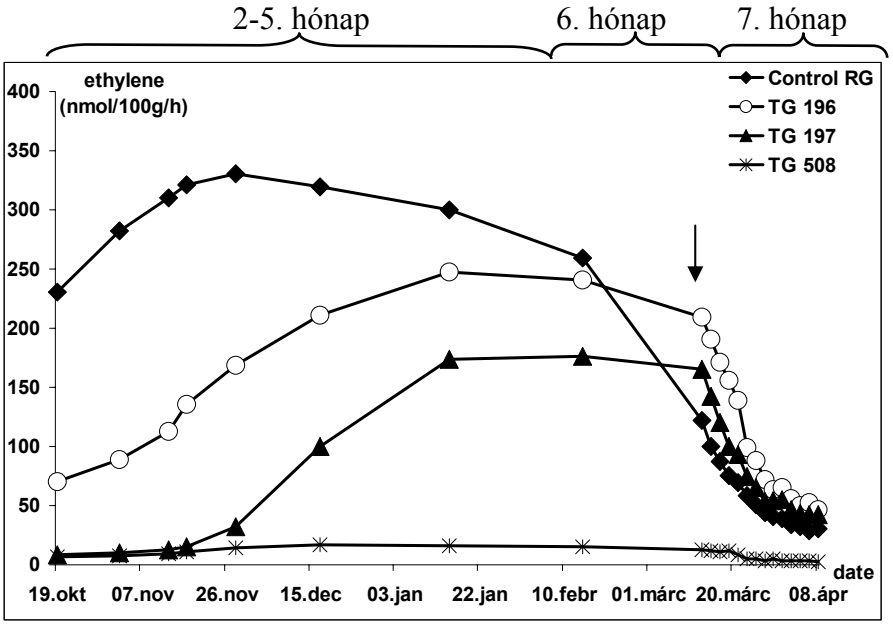
A hidegtárolás során a transzgénikus gyümölcsök etiléntermelése az első 4 hónapon keresztül alacsony szinten maradt. Később – a TG508 transzgénikus vonal kivételével – az etilén produkció emelkedett, majd 5 hónap elteltével megközelítette, majd meghaladta a kontrollét, ahol ebben az időben már csökkenő tendencia volt megfigyelhető (15. ábra).

Sajnos a TG508-as vonal 2000-ben még nem hozott gyümölcsöt, ezért nem szerepelt a korábban már bemutatott, részletesebb, szobahőmérsékleten végzett vizsgálatokban.

A transzgénikus gyümölcsök autokatalitikus etiléntermelése a kezdeti gátlás ellenére, eddig még meg nem magyarázható úton indult be. Feltehetően, a beinduláshoz az *MDACS*2 mRNS-ek akkumulációjának egy küszöbértéket kell átlépnie.

Hat hónapos hidegen történő tárolás után számottevő etilénprodukció csak a transzgénikus gyümölcsöknél volt kimutatható, a kontrollok etiléntermelése erre az időszakra már jelentősen lecsökkent. Az említett TG508-as vonal kivételt jelentett, ugyanis a hidegtárolás teljes ideje alatt sem volt megfigyelhető növekedés a gyümölcsök etiléntermelésében, az végig nagyon alacsony szinten maradt.

A féléves tárolási vizsgálat végén az összes megmaradt gyümölcsöt szobahőmérsékletre helyeztük és kétnaponta mértük az etilén termelésüket. Az etilénszint az összes vizsgált vonal esetében gyors csökkenést mutatott, kivéve a TG508-as vonalat, amely még szobahőmérsékleten sem tudott a gátlás alól felszabadulni (15. ábra).

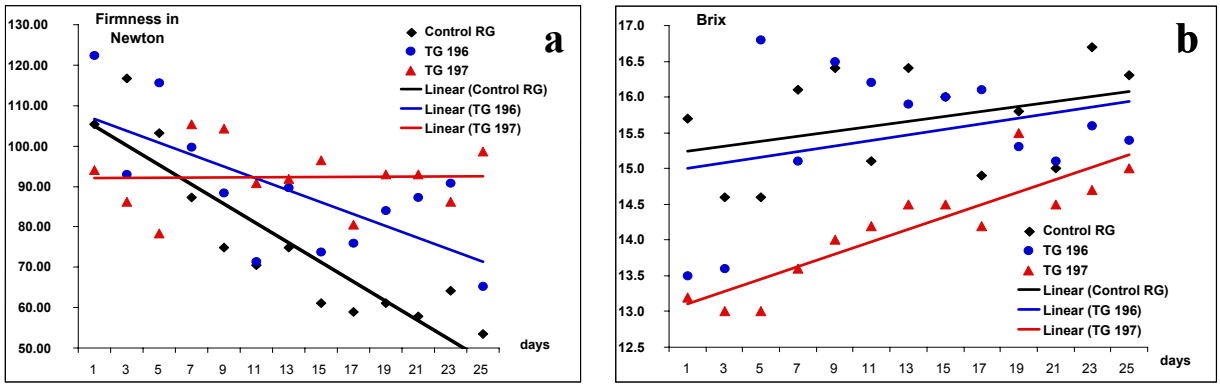


15. ábra. Néhány transzgénikus vonal és kontroll gyümölcs etilén termelése 5°C-on történő tárolás során. A nyíl a szobahőmérsékletre helyezés időpontját mutatja

4.4.5. A gyümölcsök keménységének és cukortartalmának változása az érés során

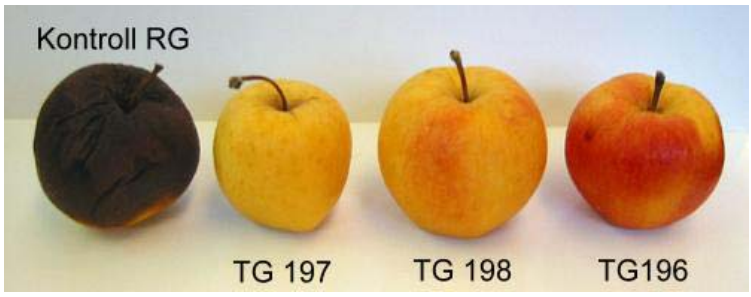
Három hét szobahőmérsékleten történő tárolás során, mikorra a kontroll gyümölcsök etiléntermelése egyre magasabb értékeket ért el, keménységük folyamatosan csökkent az eredeti 50%-ára (16/a ábra). A TG197 vonal gyümölcsei gyakorlatilag nem puhultak a három hét alatt, azonban a Brix értékek csaknem kiegyenlítődtek (16/b ábra) jelezve, hogy cukortartalmuk nem tér el jelentősen a kontrolltól.

A TG196 gyümölcsök érése és puhulása kisebb késést mutatott annak ellenére, hogy a Brix értékekben szinte nem volt különbség, a kontrollhoz viszonyítva. Az azonos fáról származó gyümölcsök esetében is szembetűnők a különbségek, mivel nehéz egy fán két, azonos érettségi állapotban lévő gyümölcsöt találni. Ezért a fő trendvonalakat lineáris regresszióval ábrázoltuk (16. ábra).



16. ábra. Kontroll és transzgénikus gyümölcsök keménysége (**a**) és Brix értéke (**b**) szobahőmérsékleten történő tárolás során

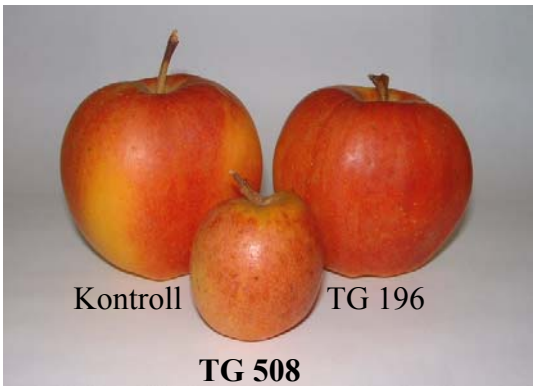
A transzgénikus gyümölcsök a fentieken kívül az ú.n. post-harvest változásokkal (ráncosodás, zsugorodás, hasadás) és fertőzésekkel (bakteriális és gombás) szemben is ellenállást tanúsítottak (17. ábra). Még három hónapos szobahőmérsékleten történő tárolást követően is csak kisebb mértékű vízvesztés és ráncosodás volt megfigyelhető. Ez feltehetően a sejtfalbontó enzimek (poligalakturonáz, pektin metil-észteráz, celluláz, hemicelluláz) csökkent aktivitásának a következménye, amelyek közvetlenül etilén szabályozás alatt állnak.



17. ábra. Transzgénikus és kontroll almák 90 napos szobahőmérsékleten történő tárolást követően

4.4.6. „Knock out" transzgénikus vonal

A legalacsonyabb etilén produkció mellett (15. ábra) a TG508 transzgénikus vonal gyümölcsei mutatták a legmagasabb Brix értékeket is és a legtovább maradtak kemények (5. táblázat).



18. ábra. A TG 508 „knock out" transzgénikus genotípus gyümölcsében bekövetkezett morfológiai változás

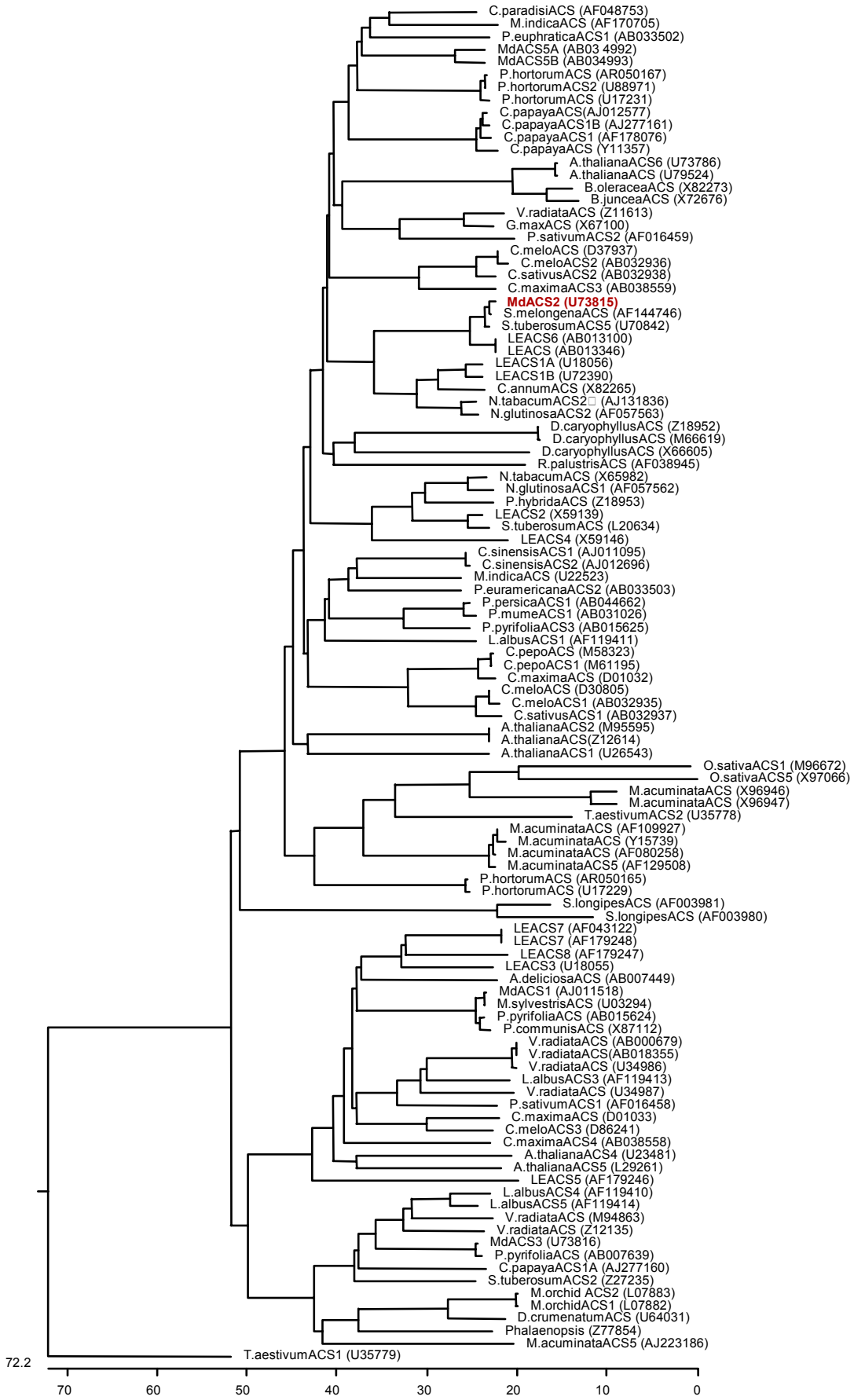
A transzgénikus vonal gyümölcseinek morfológiájában is változás következett be (18. ábra). A gyümölcsök sokkal kisebbek, bogyó alakúak maradtak, a kocsányuk is kisebb és vastagabb lett, továbbá nehezen vált el a termővesszőktől. A gyümölcshús még hat hónapos tárolás alatt is extrém kemény maradt, azonban a magas cukortartalom és koncentrált aromaanyagok miatt a legízletesebbnek bizonyult.

Valószínűleg egy kiváló pozícióban bekövetkezett transzgén integráció következtében olyan mértékű gátlás következett be az etilénszintézisben, amely még a sejtek megnyúlását is hátráltatta; vagy beépüléskor az ezért felelős gént rontotta el. Mivel ebben a genotípusban az érés-specifikus etilén termelés teljes mértékben gátlódott, a későbbiekben a gyümölcsérés fiziológiájának és biológiájának tanulmányozására kiváló objektumként jöhet számításba.

Annak tanulmányozására, hogy pontosan milyen funkciót láthat el ez a gén a gyümölcsök érésében, előállítottunk egy filogenetikai fát a Megalign (DNASTAR) program segítségével, amelyben a napjainkig izolált összes ACS gén szerepel (19. ábra). A szekvenciahasonlóság alapján a géncsalád tagjai legalább hat fő csoportba oszthatók.

Az *MdACS*2 gén a *Solanaceae* család tagjaiból izolált ACS génekkel közelebbi hasonlóságot mutat, mint a többi eddig izolált alma ACS génnel. Az *MdACS*2 gén működése alapján feltételezhetjük, hogy az autokatalitikus etilénszintézis beindításában játszik szerepet a paradicsom LEACS4 génjéhez hasonlóan.

Az itt bemutatott eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy néhány transzgénikus vonalban sikerült elérnünk a kívánt célt, a csökkent etiléntermelést és ezáltal a post-harvest érés késleltetését. Az *MdACS*2 gén expressziója érés-specifikus, amit Northern hibridizációval bizonyítottunk. A gén mRNS aktivitása szoros korrelációt mutat a gyümölcsök etilén termelésével. Azokban a transzgénikus vonalakban, ahol a legmagasabb mértékű etilén gátlás volt megfigyelhető, az integrálódott transzgén 3-4 kópiában szerepelt. Ez a géndózis és az antiszensz fenotípus közötti korrelációt sejtet.

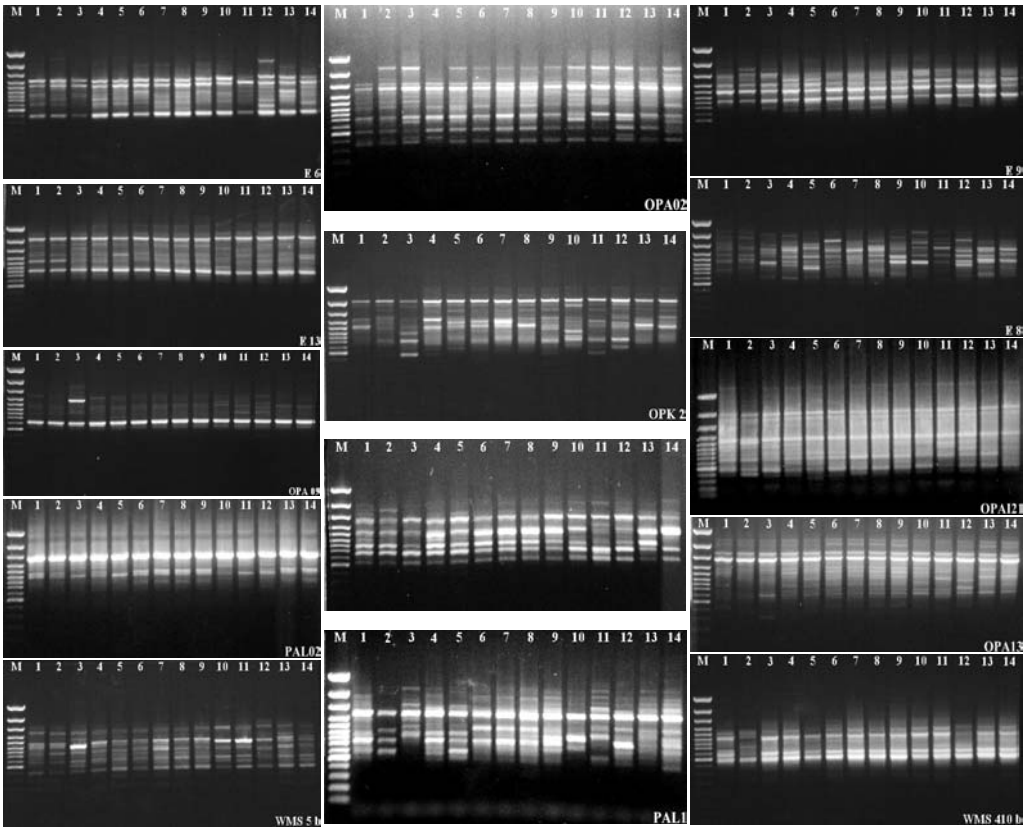


19. ábra. Az ACS géncsalád filogenetikai fája

Ez a molekuláris megközelítés új, alternatív lehetőséget jelenthet a későbbiekben a gyümölcsök tárolási problémáinak megoldásában. Eredményeink alapján az etilén bioszintézis gátlásával szobahőmérsékleten 1-2 hónappal, míg hidegen tárolva 4-6 hónappal hosszabb ideig tarthatók a gyümölcsök, szinte azonos minőségben.

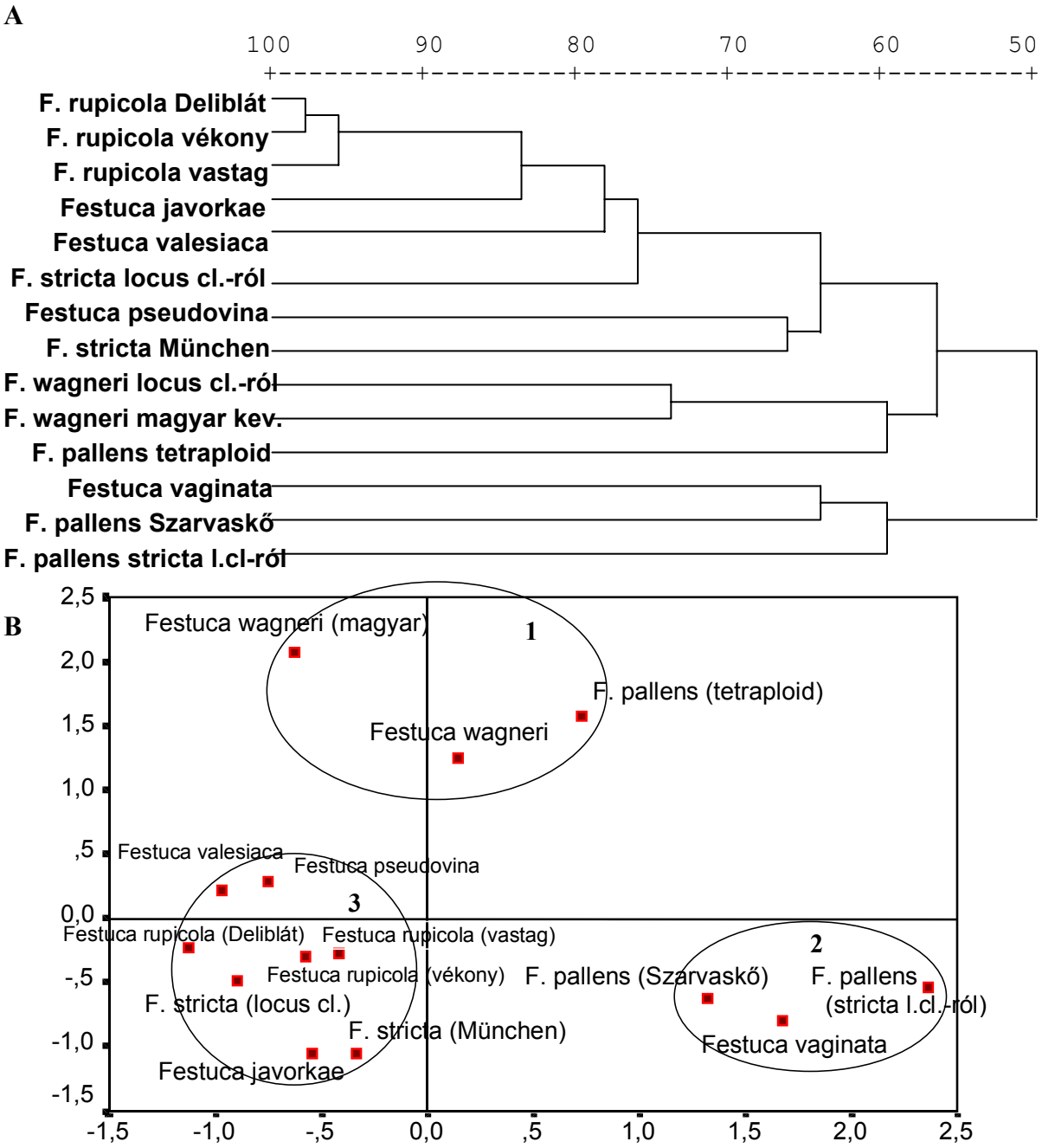
4.5. Festuca fajok RAPD és AP-PCR vizsgálata

A vizsgált *Festuca* fajok genetikai azonosságának vagy különbözőségének meghatározására megfelelő polimorfizmust adó DNS markereket elsőként a RAPD technika felhasználásával kerestünk. Egy fajból több élőhelyről származó mintákat használtunk és élőhelyenként csoportokat (pool-okat) képeztünk, mivel a fajon belüli egyedszintű molekuláris polimorfizmust a lehetséges idegentermékenyülés következtében jelentősnek becsültük.



20. ábra. RAPD és AP-PCR primerekkel kapott mintázatok. M: molekulatömeg marker (3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp méretű fragmentumok; 1: *F. wagneri* (*locus classicus*); 2: *F. wagneri* (magyar keverék); 3: *F. vaginata*; 4: *F. valesiaca*; 5: *F. pseudovina;* 6: *F. rupicola* (Deliblát); 7: *F. rupicola* (Herkulesfürdő-vastag levelű); 8: *F. rupicola* (Herkulesfürdő-vékony levelű); 9: *F. javorkae*; 10: *F. pallens* (Szarvaskő); 11: *F. pallens* (a *F. stricta locus classicus*-ról); 12: *F. pallens* (Budai hegység); 13: *F. stricta* (*locus classicus*); 14: *F. stricta* (München)

A *Festuca* fajok RAPD analízisét összesen 47 primerrel végeztük el (2. táblázat). Ezek közül 6 nem működött, 33 pedig vagy monomorf, vagy jelenlegi elválasztási technikánkkal értékelhetetlen mintázatot eredményezett. A 19 AP-PCR-hez kipróbált primer közül (2. táblázat) 12 működött megfelelően, melyek közül 6 szerepel a kiértékelésben. Összességében az alábbi 14 primerrel (8 RAPD és 6 AP-PCR) kaptunk polimorf mintázatot: OPA 02, OPA 09, OPA 11, OPA 13, OPK 02, PAL 1, PAL 2, OPAI 21, E 6, E 8, E 9, E 13, WMS 410 b, WMS 5 b (20. ábra). A 14 polimorf és értékelhető mintázatot eredményező primer 111 db fragmentumának bináris kódjai szolgáltak alapadatként.



21. ábra. Különböző *Festuca* fajok és típusok dendogramja (**A**) és többdimenziós MDS analízise (**B**)

6. tábázat. Páronkénti összehasonlítással kapott egyezési koefficiensek félmátrix táblázata. (A sorszámok az anyag és módszertani fejezetben jelzettekkel azonosak.)

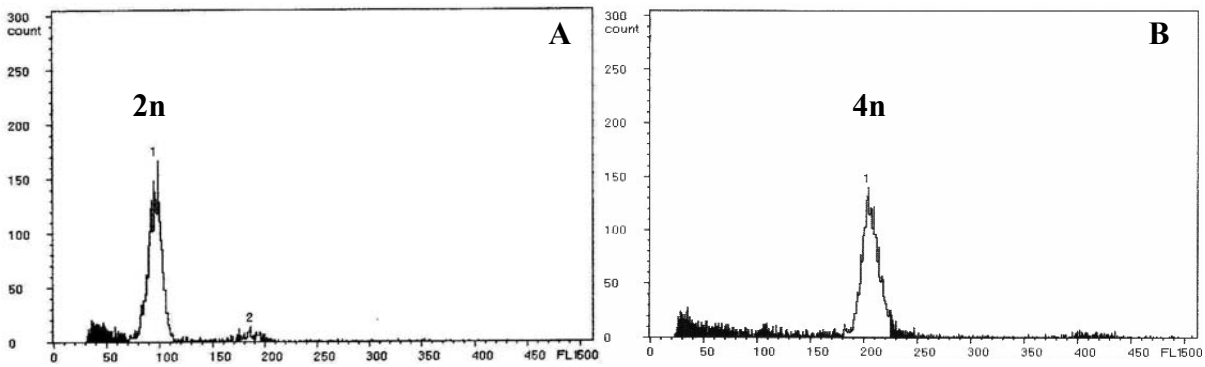
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	Festuca wagneri	Festuca wagneri magyar	Festuca vaginata	Festuca valesiaca	Festuca pseudovi-na	Festuca rupicola Deliblát	Festuca rupicola vastag	Festuca rupicola vékony	Festuca javorkae	F. pallens Szarvaskő	F. pallens F. stricta l.cl.-ról	F. pallens tetraploid	F. stricta locus cl.	F. stricta München
Festuca wagneri		,785	,667	,776	,727	,675	,692	,709	,646	,701	,617	,711	,700	,655
Festuca wagneri magyar			,591	,687	,704	,675	,651	,667	,628	,600	,581	,709	,679	,655
Festuca vaginata				,675	,630	,622	,679	,654	,654	,733	,688	,659	,688	,663
Festuca valesiaca					,737	,822	,819	,811	,763	,646	,548	,699	,776	,683
Festuca pseudovi-na						,724	,720	,760	,692	,662	,620	,675	,727	,744
Festuca rupicola Deliblát							,912	,928	,822	,654	,593	,667	,787	,712
Festuca rupicola vastag								,899	,871	,693	,608	,704	,808	,753
Festuca rupicola vékony									,836	,688	,625	,699	,824	,747
Festuca javorkae										,688	,625	,659	,776	,725
F. pallens Szarvaskő											,726	,651	,679	,654
F. pallens F. stricta l.cl.-ról												,631	,598	,654
F. pallens tetraploid													,651	,667
F. stricta locus cl.														,738
F. stricta München														

Az SPSS 8.0 statisztikai program segítségével elkészítettük páronkénti összehasonlítással az egyezési koefficiensek félmátrix táblázatát (6. táblázat). A könnyebb vizuális áttekinthetőség kedvéért dendrogrammot és kétdimenziós analízist is végeztünk.

A dendrogram (21/A ábra) és MDS analízis (21/B ábra) alapján megállapítható, hogy a legnagyobb genetikai távolságot a *F. stricta locus classicus*-áról származó *F. pallens* és a *F. valesiaca* között kaptuk. A *F. rupicola* morfológiailag eltérő csoportjai viszont 90 %-ot meghaladó genetikai azonosságot mutattak. Figyelemre méltó ezzel szemben, hogy több szerző által azonos fajba sorolt *F. javorkae* csak 82-87 %-os homológiát mutat a *F. rupicolával*. Szembetűnő még a *F. rupicola* és *F. valesiaca* közötti 80 %-ot meghaladó homológia. A többi faj ennél nagyobb mértékben, 30-50 % között tér el egymástól.

Az 21/B. ábra alapján a fajok 3 olyan csoportba sorolhatóak, ahol csoporton belül a fajok közötti homológia a 70 %-ot meghaladja:

Az *első csoportba* tartozik a *F. wagneri* delibláti gyűjtése és magyar keveréke, valamint a Budai hegység déli lejtőin gyűjtött *F. pallens*. Ez utóbbiról flow citométeres vizsgálattal bizonyítottuk (22/B ábra), hogy szubmediterrán tetraploid, szemben a Szarvaskő melletti szurdok-völgy alsó részéről begyűjtött alhavasi diploid tövekkel (22/A ábra). Ez a vizsgálati eredmény, valamint a többi *F. pallens* fajtól való nagyfokú genetikai különbözőség alapján a tetraploid *F. pallens* ebben a vizsgálatban különálló taxonnak tekinthető.

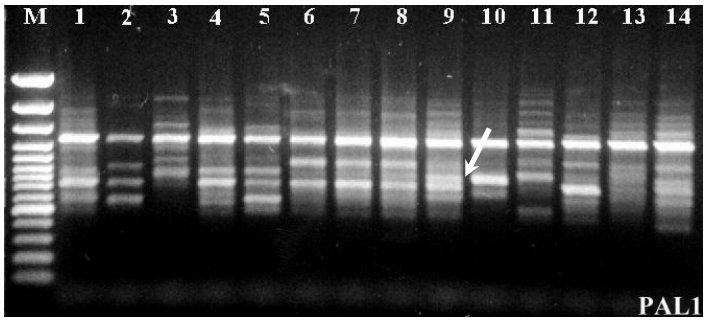


22. ábra. A Szarvaskőn (A) és a Budai-hegységben (B) gyűjtött F. pallens tövek flow citométeres vizsgálattal meghatározott DNS mennyisége

A *második csoportba* a másik két vizsgált diploid *F. pallens*, valamint *F. vaginata* fajok tartoznak. Jól megfigyelhető, hogy a tetraploid *F. pallens* genetikailag távol helyezkedik el ezektől a fajoktól (21/B ábra). Ez a csoport megfelel a morfológiai leírások alapján kialakított beosztásnak is, mivel ezen fajok tartoznak a gyűrűs szklerenchimázottságú formát mutató taxonok közé.

A *harmadik csoportba* sorolható az összes többi vizsgált faj. A *F. rupicola* morfológiailag eltérő típusai rendkívül közel helyezkednek el egymáshoz. A PAL1 primer

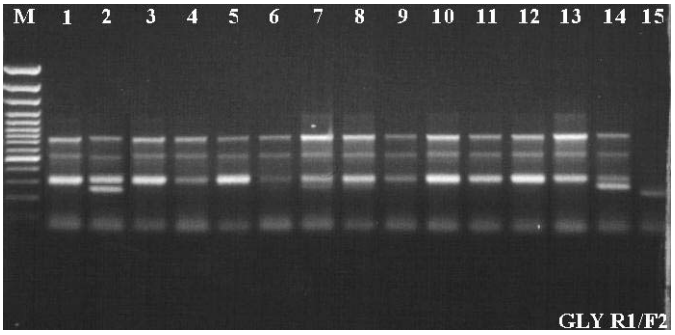
800 bp méretű fragmentuma alapján a *F. javorkae* egyértelműen elkülöníthető ettől a csoporttól (23. ábra).



23. ábra. A PAL1 primerrel kapott mintázatok; F. rupicola (6-8. minta) F. javorkae (9. minta); a 800 bp méretű fragmentumot nyíl jelöli

A RAPD és AP-PCR analízissel ezek az eredmények születtek, ezt követően próbálkoztunk nagyobb felbontást nyújtó molekuláris markerek keresésével is. A taxonómiai vizsgálatokban értékesebb eredményt szolgáltatnak a mikroszatellit régiókat határoló szekvenciákra tervezett SSR, valamint a génspecifikus primerpárok mintázatai. Ezek egyszerű sávmintázatot adnak, kodominánsan öröklődnek, polimorfok és a genomban egyenletesen oszlanak el. Ehhez azonban a pontos szekvenciák ismerete szükséges, melyek a *Festuca* fajok esetében génbankokban nagyon korlátozottan állnak rendelkezésünkre. Ezért első lépésben a búza genomjára tervezett primereket próbáltuk adaptálni, de a búzában mikroszatellit régiókat határoló szekvenciákra tervezett primer-párok a *Festuca* genomban nem működtek. A párok tagjai külön-külön AP-PCR-hez viszont felhasználhatónak bizonyultak.

Egy pszeudogénre tervezett gliadin-specifikus primerpár polimorf mintázatot eredményezett. A búzától eltérően több fragmentumot kaptunk, ami feltehetően a gén multiallélikus tulajdonságára utal (24. ábra).



24. ábra. GLY R1/F2 primerrel kapott mintázatok; Festuca tételek (1-14 minták), T. aestivum (15. minta)

Mivel mikroszatellit markereket nem tudtunk használni, az AFLP módszer pedig még nem állt rendelkezésünkre, ezért következő lépésben szekvencia szintű összehasonlítást

terveztünk. A leggyakrabban alkalmazott ITS (internal transcribed spacer) szakaszok szekvenálását és összehasonlítását tűztük ki célul.

4.6. *Festuca* fajok ITS vizsgálata

A teljes ITS régió (ITS1-5.8S-ITS2) felszaporítását elvégeztük a *F. Ovinae* csoport 10 fajának 27 egyedén (7. táblázat).

7. táblázat. Az ITS vizsgálatokban szereplő *Festuca* fajok, mintagyűjtési helyeik, génbank számuk és a szekvenált egyedek száma.

Fajok - Auctor	Mintagyűjtési helyek	Acc. no.	Szekv.
F. dalmatica (Hackel) K. Richter	Szársomlyó (H)	AY254371	2
F. javorkae Májovský	Sturovó *locus cl.* (SK)	AY254372	3
F. pallens Host	Szarvaskő, Budai hg. (H), Baden (A)	AY254373	3
F. pseudodalmatica Hackel	Mátra (H)	AY254374	2
F. pseudovina Krajina ex Domin	Farmos, Albertirsa (H)	AY254375	2
F. rupicola Heuffel	Baile Herculaneum *locus cl.* (RO), Deliblato (YU) Vésztő Nyírád (H)	AJ508379 AY254376	4
F. stricta Host	Baden (A), München (D), Alsóörs (H)	AY254377	3
F. vaginata W. et K. ex Willd	Imrehegy, Domonyvölgy (H)	AY254379	2
F. valesiaca Schleicher ex Gaudin	Gerecse (H)	AJ508377	2
F. wagneri Degen Thaisz et Flatt	Deliblato locus cl. (YU), Örkény, Imrehegy, Domonyvölgy (H)	AY254378	4

A szekvenálás mindegyik faj esetében egy 596 bp méretű szakaszt eredményezett (25. ábra). Intraspecifikus ITS variációt csak a *F. rupicola* fajon belül találtunk, ahol a Nyírádról gyűjtött egyedek két helyen mutattak kétértelmű pozíciót, míg a többi előfordulási helyről gyűjtött minták csak egy helyen. A többi faj esetében a különböző egyedek között nem találtunk eltérést, még távoli előfordulási helyek között sem. A többi 9 fajnál a polimorfizmust csak intragenomikus különbségek jelentették. A *F. pseudovina, F. dalmatica, F. pseudodalmatica, F. rupicola* (Nyírád), *F. javorkae* esetében 2-2 pozícióban, míg a *F. stricta, F.vaginata, F. valesiaca, F. rupicola* (Vésztő, Herkulesfürdő), esetében 1-1 pozícióban kaptunk egyeden belüli intragenomikus polimorfizmust (25. ábra). A kétértelmű szekvenciák pirimidin bázisokat jelentettek (T vagy C = Y) egy kivételtől eltekintve (*F. pseudovina* - Farmos) ahol guanin ill. adenin nem voltak egymástól elkülöníthetők. *A F. wagneri és F. pallens* esetében még intragenomikus polimorfizmust sem találtunk.

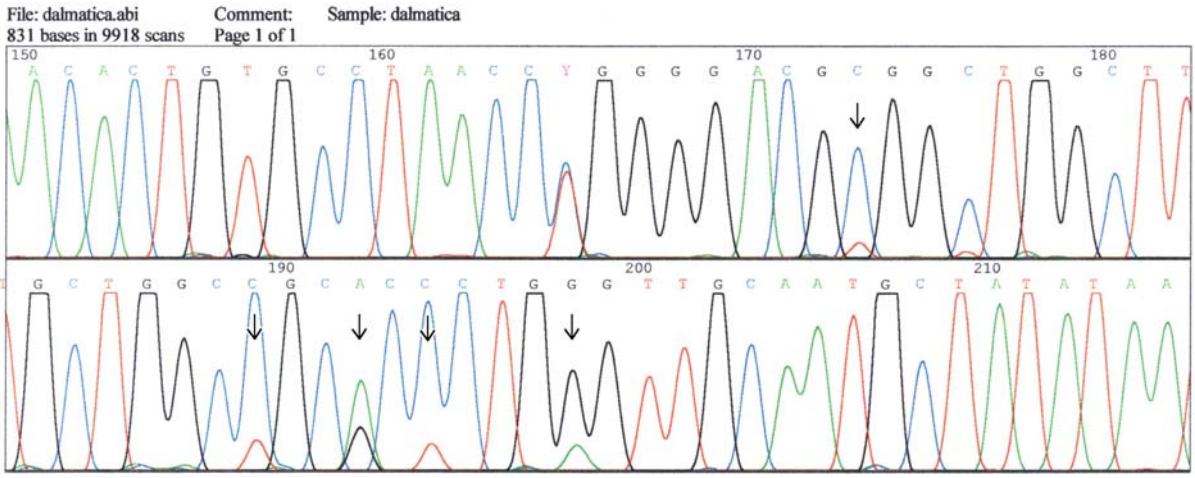
Meg kell azonban jegyeznünk, hogy az egyeden belüli intragenomikus polimorfizmust, amely az rDNS nagy kópiaszámával magyarázható, valószínűleg alábecsültük mintáinkban. A nemzetközi gyakorlatot követve ugyanis csak ott jelöltük, ahol a kromatogramm csúcsai kb. egyforma magasságig mutattak (26. ábra), így a számítógép sem tudta eldönteni a helyes bázist.

```
                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          ITS1→     5          15         25         35         45         55
F.dalmatica      TCGTGACCCT GACCAAAACA GACCGCGCAC GCGTCATCCT GCCTGCCGGG CGGCGGCACC
F.javorkae       TCGTGACCCT GACCAAAACA GACCGCGCAC GCGTCATCCT GCYTGCCGGG CGGCGGCACC
F.pallens        TCGTGACCCT GACCAAAACA GACCGCGCAC GCGTCATCCT GCCTGCCGGG CGGCGGCACC
F.psedalma       TCGTGACCCT GACCAAAACA GACCGCGCAC GCGTCATCCT GCCTGCCGGG CGGCGGCACC
F.pseudovi       TCGTGACCCT GACCAAAACA GACCGCGCAC GCGTCATCCT GCCTGCCGGG CGGCGGCACC
F.rupicola       TCGTGACCCT GACCAAAACA GACCGCGCAC GCGTCATCCT GCCTGCCGGG CGGCGGCACC
F.rupic(Ny)      TCGTGACCCT GACCAAAACA GACCGCGCAC GCGTCATCCT GCCTGCCGGG CGGCGGYACC
F.stricta        TCGTGACCCT GACCAAAACA GACCGCGCAC GCGTCATCCT GCCTGCCGGG CGGCGGCACC
F.vaginata       TCGTGACCCT GACCAAAACA GACCGCGCAC GCGTCATCCT GCCTGCCGGG CGGCGGCACC
F.valesiaca      TCGTGACCCT GACCAAAACA GACCGCGCAC GCGTCATCCT GCCTGCCGGG CGGCGGCACC
F.wagneri        TCGTGACCCT GACCAAAACA GACCGCGCAC GCGTCATCCT GCCTGCCGGG CGGCGGCACC

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                     65         75         85         95        105        115
F.dalmatica      GTCTGTCGCC CAGCCAAAGT CCTCGAAACT CCTCTCTTCG GAGGGGCGGC TCGAGGTAAA
F.javorkae       GTCTGTCGCC CAGCCAAAGT CCTCGAAACT CCTCTCTTCG GAGGGGCGGC TCGAGGTAAA
F.pallens        GTCTGTCGCC CAGCCAAAGT CCTCGAAACT CCTCTCTTCG GAGGGGCGGC TCGAGGTAAA
F.psedalma       GTCTGTCGCC CAGCCAAAGT CCTCGAAACT CCTCTCTTCG GAGGGGYGGC TCGAGGTAAA
F.pseudovi       GTCTGTCGCC CAGCCAAAGT CCTCGAAACT CCTCTCTTCG GAGGGGCGGC TCKAGGTAAA
F.rupicola       GTCTGTCGCC CAGCCAAAGT CCTCGAAACT CCTCTCTTCG GAGGGGCGGC TCGAGGTAAA
F.rupic(Ny)      GTCTGTCGCC CAGCCAAAGT CCTCGAAACT CCTCTCTTCG GAGGGGCGGC TCGAGGTAAA
F.stricta        GTCTGTCGCC CAGCCAAAGT CCTCGAAACT CCTCTCTTCG GAGGGGCGGC TCGAGGTAAA
F.vaginata       GTCTGTCGCC CAGCCAAAGT CCTCGAAACT CCTCTCTTCG GAGGGGYGGC TCGAGGTAAA
F.valesiaca      GTCTGTCGCC CAGCCAAAGT CCTCGAAACT CCTCTCTTCG GAGGGGCGGC TCGAGGTAAA
F.wagneri        GTCTGTCGCC CAGCCAAAGT CCTCGAAACT CCTCTCTTCG GAGGGGCGGC TCGAGGTAAA

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    125        135        145        155        165        175
F.dalmatica      AGAACCCACG GCGCCGAAGG CGTCAAGGAA CACTGTGCCT AACCYGGGGA CGCGGCTGGC
F.javorkae       AGAACCCACG GCGCCGAAGG CGTCAAGGAA CACTGTGCCT AACCYGGGGA CGCGGCTGGC
F.pallens        AGAACCCACG GCGCCGAAGG CGTCAAGGAA CACTGTGCCT AACCCGGGGA CGCGGCTGGC
F.psedalma       AGAACCCACG GCGCCGAAGG CGTCAAGGAA CACTGTGCCT AACCCGGGGA CGCGGCTGGC
F.pseudovi       AGAACCCACG GCGCCGAAGG CGTCAAGGAA CACTGTGCCT AACCCGGGGA CGCGGCTGGC
F.rupicola       AGAACCCACG GCGCCGAAGG CGTCAAGGAA CACTGTGCCT AACCYGGGGA CGCGGCTGGC
F.rupic(Ny)      AGAACCCACG GCGCCGAAGG CGTCAAGGAA CACTGTGCCT AACCYGGGGA CGCGGCTGGC
F.stricta        AGAACCCACG GCGCCGAAGG CGTCAAGGAA CACTGTGCCT AACCYGGGGA CGCGGCTGGC
F.vaginata       AGAACCCACG GCGCCGAAGG CGTCAAGGAA CACTGTGCCT AACCCGGGGA CGCGGCTGGC
F.valesiaca      AGAACCCACG GCGCCGAAGG CGTCAAGGAA CACTGTGCCT AACCCGGGGA CGCGGCTGGC
F.wagneri        AGAACCCACG GCGCCGAAGG CGTCAAGGAA CACTGTGCCT AACCCGGGGA CGCGGCTGGC
                                                   5.8S rRNS
                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    185        195        205        215        225        235
F.dalmatica      TTGCTGGCCG CACCCTGGGT TGCAATGCTA TATAATCCAC ACGACTCTCG GCAACGGATA
F.javorkae       TTGCTGGCCG CACCCTGGGT TGCAATGCTA TATAATCCAC ACGACTCTCG GCAACGGATA
F.pallens        TTGCTGGCCG CACCCTGGGT TGCAATGCTA TATAATCCAC ACGACTCTCG GCAACGGATA
F.psedalma       TTGCTGGCCG CACCCTGGGT TGCAATGCTA TATAATCCAC ACGACTCTCG GCAACGGATA
F.pseudovi       TTGCTGGCCG CACCCTGGGT TGCAATGCTA TATAATCCAC ACGACTCTCG GCAACGGATA
F.rupicola       TTGCTGGCCG CACCCTGGGT TGCAATGCTA TATAATCCAC ACGACTCTCG GCAACGGATA
F.rupic(Ny)      TTGCTGGCCG CACCCTGGGT TGCAATGCTA TATAATCCAC ACGACTCTCG GCAACGGATA
F.stricta        TTGCTGGCCG CACCCTGGGT TGCAATGCTA TATAATCCAC ACGACTCTCG GCAACGGATA
F.vaginata       TTGCTGGCCG CACCCTGGGT TGCAATGCTA TATAATCCAC ACGACTCTCG GCAACGGATA
F.valesiaca      TTGCTGGCCG CACCCTGGGT TGCAATGCTA TATAATCCAC ACGACTCTCG GCAACGGATA
F.wagneri        TTGCTGGCCG CACCCTGGGT TGCAATGCTA TATAATCCAC ACGACTCTCG GCAACGGATA
```

```
                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   245        255        265        275        285        295
F.dalmatica     TCTCGGCTCT CGCATCGATG AAGAACGTAG CGAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA
F.javorkae      TCTCGGCTCT CGCATCGATG AAGAACGTAG CGAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA
F.pallens       TCTCGGCTCT CGCATCGATG AAGAACGTAG CGAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA
F.psedalma      TCTCGGCTCT CGCATCGATG AAGAACGTAG CGAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA
F.pseudovi      TCTCGGCTCT CGCATCGATG AAGAACGTAG CGAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA
F.rupicola      TCTCGGCTCT CGCATCGATG AAGAACGTAG CGAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA
F.rupic(Ny)     TCTCGGCTCT CGCATCGATG AAGAACGTAG CGAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA
F.stricta       TCTCGGCTCT CGCATCGATG AAGAACGTAG CGAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA
F.vaginata      TCTCGGCTCT CGCATCGATG AAGAACGTAG CGAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA
F.valesiaca     TCTCGGCTCT CGCATCGATG AAGAACGTAG CGAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA
F.wagneri       TCTCGGCTCT CGCATCGATG AAGAACGTAG CGAAATGCGA TACCTGGTGT GAATTGCAGA

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   305        315        325        335        345        355
F.dalmatica     ATCCCGCGAA CCATCGAGTC TTTGAACGCA AGTTGCGCCC GAGGCCTTCT GGCCGAGGGC
F.javorkae      ATCCCGCGAA CCATCGAGTC TTTGAACGCA AGTTGCGCCC GAGGCCTTCT GGCCGAGGGC
F.pallens       ATCCCGCGAA CCATCGAGTC TTTGAACGCA AGTTGCGCCC GAGGCCTTCT GGCCGAGGGC
F.psedalma      ATCCCGCGAA CCATCGAGTC TTTGAACGCA AGTTGCGCCC GAGGCCTTCT GGCCGAGGGC
F.pseudovi      ATCCCGCGAA CCATCGAGTC TTTGAACGCA AGTTGCGCCC GAGGCCTTCT GGCCGAGGGC
F.rupicola      ATCCCGCGAA CCATCGAGTC TTTGAACGCA AGTTGCGCCC GAGGCCTTCT GGCCGAGGGC
F.rupic(Ny)     ATCCCGCGAA CCATCGAGTC TTTGAACGCA AGTTGCGCCC GAGGCCTTCT GGCCGAGGGC
F.stricta       ATCCCGCGAA CCATCGAGTC TTTGAACGCA AGTTGCGCCC GAGGCCTTCT GGCCGAGGGC
F.vaginata      ATCCCGCGAA CCATCGAGTC TTTGAACGCA AGTTGCGCCC GAGGCCTTCT GGCCGAGGGC
F.valesiaca     ATCCCGCGAA CCATCGAGTC TTTGAACGCA AGTTGCGCCC GAGGCCTTCT GGCCGAGGGC
F.wagneri       ATCCCGCGAA CCATCGAGTC TTTGAACGCA AGTTGCGCCC GAGGCCTTCT GGCCGAGGGC
                                     ITS2
                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   365        375        385        395        405        415
F.dalmatica     ACGCCTGCCT GGGCGTCACG CCAAACACGC TCCCACCCCA CTAAACATGG GGCGGGAYGC
F.javorkae      ACGCCTGCCT GGGCGTCACG CCAAACACGC TCCCACCCCA CTAAACATGG GGCGGGATGC
F.pallens       ACGCCTGCCT GGGCGTCACG CCAAACACGC TCCCACCCCA CTAAACATGG GGCGGGATGC
F.psedalma      ACGCCTGCCT GGGCGTCACG CCAAACACGC TCCCACCCCA CTAAACATGG GGCGGGAYGC
F.pseudovi      ACGCCTGCCT GGGCGTCACG CCAAACACGC TCCCACCCCA CTAAACATGG GGCGGGAYGC
F.rupicola      ACGCCTGCCT GGGCGTCACG CCAAACACGC TCCCACCCCA CTAAACATGG GGCGGGATGC
F.rupic(Ny)     ACGCCTGCCT GGGCGTCACG CCAAACACGC TCCCACCCCA CTAAACATGG GGCGGGATGC
F.stricta       ACGCCTGCCT GGGCGTCACG CCAAACACGC TCCCACCCCA CTAAACATGG GGCGGGATGC
F.vaginata      ACGCCTGCCT GGGCGTCACG CCAAACACGC TCCCACCCCA CTAAACATGG GGCGGGATGC
F.valesiaca     ACGCCTGCCT GGGCGTCACG CCAAACACGC TCCCACCCCA CTAAACATGG GGCGGGAYGC
F.wagneri       ACGCCTGCCT GGGCGTCACG CCAAACACGC TCCCACCCCA CTAAACATGG GGCGGGATGC

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   425        435        445        455        465        475
F.dalmatica     GGCATGTGGC TCTCCGTCTC GCAAGGGGCG GTGGGCCGAA GATCCGGCTG CCGGTGTATC
F.javorkae      GGCATGTGGC TCTCCGTCTC GCAAGGGGCG GTGGGCCGAA GATCCGGCTG CCGGTGTATC
F.pallens       GGCATGTGGC TCTCCGTCTC GCAAGGGGCG GTGGGCCGAA GATCCGGCTG CCGGTGTATC
F.psedalma      GGCATGTGGC TCTCCGTCTC GCAAGGGGCG GTGGGCCGAA GATCCGGCTG CCGGTGTATC
F.pseudovi      GGCATGTGGC TCTCCGTCTC GCAAGGGGCG GTGGGCCGAA GATCCGGCTG CCGGTGTATC
F.rupicola      GGCATGTGGC TCTCCGTCTC GCAAGGGGCG GTGGGCCGAA GATCCGGCTG CCGGTGTATC
F.rupic(Ny)     GGCATGTGGC TCTCCGTCTC GCAAGGGGCG GTGGGCCGAA GATCCGGCTG CCGGTGTATC
F.stricta       GGCATGTGGC TCTCCGTCTC GCAAGGGGCG GTGGGCCGAA GATCCGGCTG CCGGTGTATC
F.vaginata      GGCATGTGGC TCTCCGTCTC GCAAGGGGCG GTGGGCCGAA GATCCGGCTG CCGGTGTATC
F.valesiaca     GGCATGTGGC TCTCCGTCTC GCAAGGGGCG GTGGGCCGAA GATCCGGCTG CCGGTGTATC
F.wagneri       GGCATGTGGC TCTCCGTCTC GCAAGGGGCG GTGGGCCGAA GATCCGGCTG CCGGTGTATC
```

```
                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    485        495        505        515        525        535
F.dalmatica      GTGCCGGACA CAGCGCGTGG TAGGCGATCT CGCTATACTA AACGCAGTGC ATCCGGGACG
F.javorkae       GTGCCGGACA CAGCGCGTGG TAGGCGATCT CGCTATACTA AACGCAGTGC ATCCGGGACG
F.pallens        GTGCCGGACA CAGCGCGTGG TAGGCGATCT CGCTATACTA AACGCAGTGC ATCCGGGACG
F.psedalma       GTGCCGGACA CAGCGCGTGG TAGGCGATCT CGCTATACTA AACGCAGTGC ATCCGGGACG
F.pseudovi       GTGCCGGACA CAGCGCGTGG TAGGCGATCT CGCTATACTA AACGCAGTGC ATCCGGGACG
F.rupicola       GTGCCGGACA CAGCGCGTGG TAGGCGATCT CGCTATACTA AACGCAGTGC ATCCGGGACG
F.rupic(Ny)      GTGCCGGACA CAGCGCGTGG TAGGCGATCT CGCTATACTA AACGCAGTGC ATCCGGGACG
F.stricta        GTGCCGGACA CAGCGCGTGG TAGGCGATCT CGCTATACTA AACGCAGTGC ATCCGGGACG
F.vaginata       GTGCCGGACA CAGCGCGTGG TAGGCGATCT CGCTATACTA AACGCAGTGC ATCCGGGACG
F.valesiaca      GTGCCGGACA CAGCGCGTGG TAGGCGATCT CGCTATACTA AACGCAGTGC ATCCGGGACG
F.wagneri        GTGCCGGACA CAGCGCGTGG TAGGCGATCT CGCTATACTA AACGCAGTGC ATCCGGGACG

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|.
                    545        555        565        575        585        595
F.dalmatica      TAGCCGACTC AATGCCCTCA ATGGACCCTA TTAACGGAGC GCACGACGCT TCGACC
F.javorkae       TAGCCGACTC AATGCCCTCA ATGGACCCTA TTAACGGAGC GCACGACGCT TCGACC
F.pallens        TAGCCGACTC AATGCCCTCA ATGGACCCTA TTAACGGAGC GCACGACGCT TCGACC
F.psedalma       TAGCCGACTC AATGCCCTCA ATGGACCCTA TTAACGGAGC GCACGACGCT TCGACC
F.pseudovi       TAGCCGACTC AATGCCCTCA ATGGACCCTA TTAACGGAGC GCACGACGCT TCGACC
F.rupicola       TAGCCGACTC AATGCCCTCA ATGGACCCTA TTAACGGAGC GCACGACGCT TCGACC
F.rupic(Ny)      TAGCCGACTC AATGCCCTCA ATGGACCCTA TTAACGGAGC GCACGACGCT TCGACC
F.stricta        TAGCCGACTC AATGCCCTCA ATGGACCCTA TTAACGGAGC GCACGACGCT TCGACC
F.vaginata       TAGCCGACTC AATGCCCTCA ATGGACCCTA TTAACGGAGC GCACGACGCT TCGACC
F.valesiaca      TAGCCGACTC AATGCCCTCA ATGGACCCTA TTAACGGAGC GCACGACGCT TCGACC
F.wagneri        TAGCCGACTC AATGCCCTCA ATGGACCCTA TTAACGGAGC GCACGACGCT TCGACC
```

25. ábra. A *Festuca Ovinae* csoporton belül tanulmányozott 10 faj teljes ITS szekvenciája. A számok az ITS1 szakasz kezdetétől az ITS2 végéig feltüntetik a pontos pozíciókat. A nyilak jelölik az ITS1, 5.8S és ITS2 szakaszok pontos kezdeteit, illetve végeit Hsiao et al. (1995a) szerint. (Az eltéréseket aláhúzással jelöltük.)



26. ábra. Részlet a *F. dalmatica* ITS1 szekvenciájából. A detektált és feltüntetett intragenomikus polimorfizmus a 165. pozícióban látható. A nyilak más, lehetséges polimorf intragenomikus helyeket mutatnak a 173, 189, 192, 194, 198 pozíciókban.

Azonban a *F. dalmatica* szekvenciájából kivett részleten is látható, hogy még legalább öt különböző helyen kisebb csúcsok is felfedezhetők a fő csúcsok alatt. Ezt a mintázatot kaptuk a megismételt kétirányú szekvenálási reakciókban is, így nem tekinthetők szekvenálási

hibáknak. Ezekben az esetekben feltehetően a tandem ismétlődő rDNS szekvenciák bizonyos %-ában (<50%) az adott pozícióban báziscsere következett be, intragenomikus polimorfizmust okozva. Ez a leggyakrabban pirimidin (T vagy C = Y) vagy purin (G vagy A = R) bázisok között történt (tranzíció). Ezek a változások tekinthetők az evolúciós különválás kezdeti lépéseinek.

A filogenetikai analízishez a saját szekvenciáinkat kibővítettük az adatbankban található *Festuca* fajokra leközölt összes (117) ITS szekvenciával és – a nem *Festuca* nemzetségbe tartozó – két „kívülálló" (outgroup) faj (*Poa pratensis, Secale cereale*) szekvenciáival (3. táblázat). Közülük eltávolítottuk a 100% homológiát mutató szekvenciákat. Egy kivételtől eltekintve az összes esetben fajon belüli minták teljes egyezőséget mutattak. A kivételt a *F. arundinacea* és *F. pratensis* jelentik, mivel a hexaploid *F. arundinacea* a diploid *F. pratensis* genomot is tartalmazza, így többek között a *F. pratensis* ITS variánsa is megtalálható genomjában.

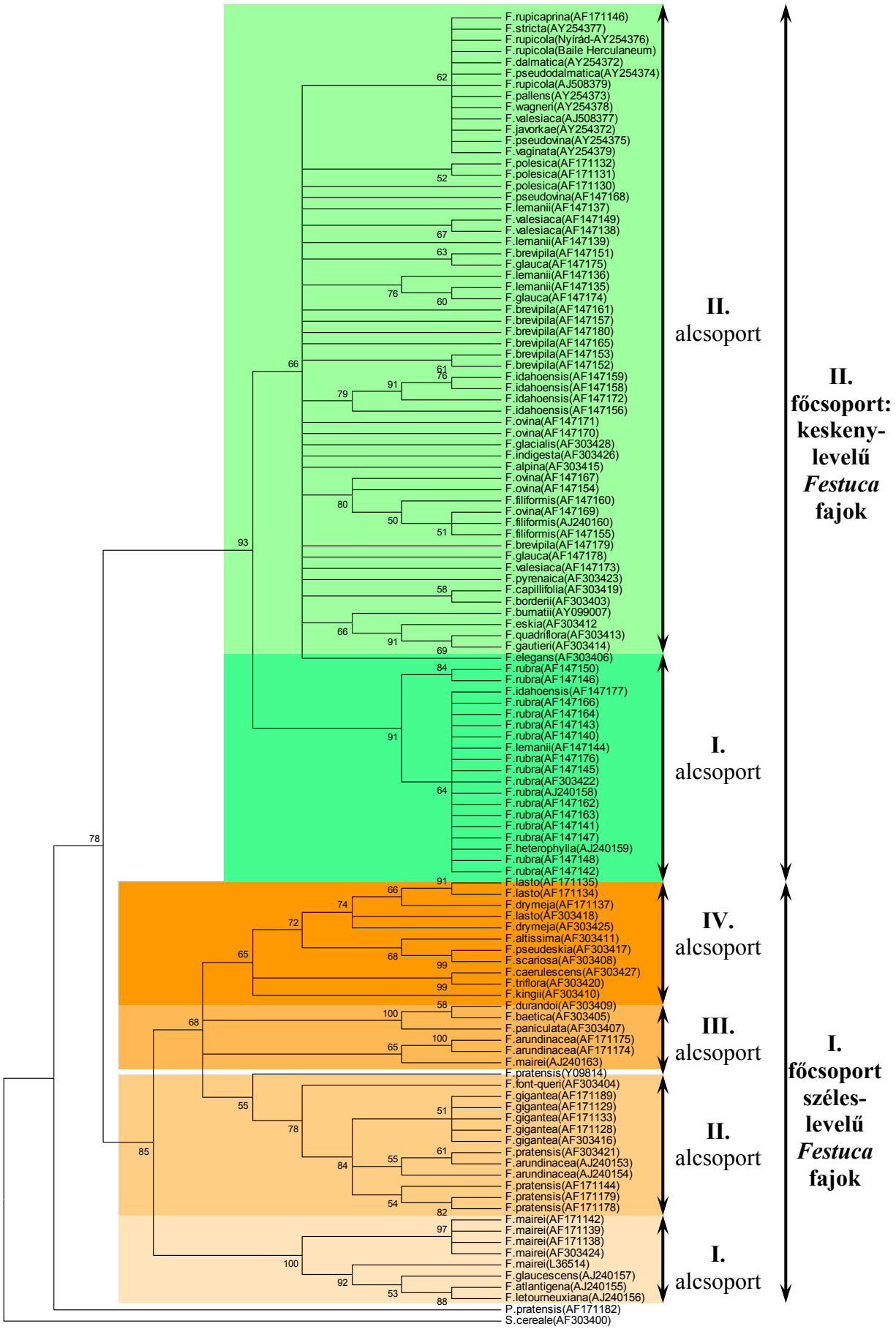
A „kívülálló" fajok (*Poa pratensis, Secale cereale*) felvétele után ClustalW programmal és manuálisan kialakított aligned mátrix 629 pozícióból állt és 41 rést tartalmazott. A réshosszúság 1-tól 4 bp között változott, az ITS1 18 rést, az 5.8S szakasz 8 rést, az ITS2 15 rést tartalmazott. A teljes régióban 270 pozícióban voltak különbségek (az összes 43%-a) melyek közül a filogenetikai analízishez 154 volt informatív (84 az ITS1, 10 az 5.8S és 60 az ITS2 régiókban).

4.6.1. Filogenetikai analízis

A filogenetikai analízishez az adatbankban napjainkig fellelhető összes 103 különböző ITS szekvenciát kiegészítettük az általunk izolált szekvenciákkal. Az MP analízissel kapott 1609 azonos értékű filogenetikai fa 629 bp hosszúságú volt, a Consistency Index 0.5895 (CI) és a Retention Index (RI) 0.8777 volt. A számítás Pentium 4-es számítógéppel is több, mint 3 napig tartott. A végső, letesztelt konszenzus fát bootstrap értékekkel a 27. ábra tartalmazza.

Amint az ábrából is kitűnik, a filogenetikai fa elsődlegesen 2 nagy főcsoportra osztja fel az összes vizsgált *Festuca* fajt 93 illetve 85 magas bootstrap értékekkel támogatva. Ez teljesen egybevág a Gaut et al. (2000) és Torrecilla & Catalán (2002) által közöltekkel, tehát a széleslevelű és keskenylevelű *Festuca* fajok korai különválásával. Nem támasztja alá azonban Gaut et al. –nak (2000) azt a nézetét, hogy létezik egy harmadik és egyben legősibb *Festuca* főcsoport is a *F. drymeja, F. scariosa* és *F. lasto* reprezentánsaival.

A széleslevelű *Festuca* fajokon belül további négy alcsoportot különíthetünk el:



27. ábra. *Festuca* fajok MP konszenzus filogenetikai fája. A bootstrap értékek az egyes elágazások felett, illetve alatt láthatók.

Az I. alcsoportba tartozik a *F. mairei* és tesvércsoportja *F. glaucescens, F. atlantigena* és *F. letournexiana*. Ezek a fajok nagy ploidszinttel rendelkeznek, mely a tetraploidtól az oktoploidig terjed.

A II. alcsoportba a *F. pratensis, F. arundinacea, F. gigantea* és *F. font-queri* fajok tartoznak. Minden kétséget kizárólag ebbe a csoportba tartoznak a *Lolium* fajok is, ahogyan azt előzetesen már bizonyították (Gaut et al. 2000, Torrecilla és Catalán 2002). A II. és III. főcsoport határán elhelyezkedő *F. pratensis* (Y09814) szekvencia feltehetően jelölési hiba következtében keletkezett, mivel a többi *F. pratensis* szekvenciától nagymértékű eltérést mutat. Ezt már Gaut et al. (2000) eredményei is sejtetni engedték.

A III. alcsoport két kisebb csoportból áll a *F. durandoi, F. baetica* és *F. paniculata* amely Torrecilla és Catalán (2002) kimutatásában még a széleslevelű *Festuca* fajok bazális csoportját alkották; valamint egy újabb *F. arundinacea* és *F. mairei* szekvencia, amelyek az eddigi II. illetve I. alcsoportba nem voltak besorolhatóak.

A IV. alcsoportba tartoznak a már Torrecilla és Catalán (2002) által is egy csoportba sorolt *F. kingii, F. triflora, F. caurelescens, F. scariosa, F. pseudoeskia, F. altissima* továbbá a *F. lasto* és *F. drymeja* fajok. E két utóbbi faj a *F. scariosaval* kiegészülve alkották Gaut et al. (2000) tanulmányában a harmadik főcsoportot, amelyet azonban már Torrecilla és Catalán (2002) eredményei sem támasztották alá.

A vékonylevelű *Festuca* fajok főcsoportján belül:

Az I. alcsoportban a legszembetűnőbb a *F. rubra* csoport elkülönülése kiegészülve a *F. heterophylla, F. lemanii* és *F. idahoensis* egy-egy példányával. Ez az alcsoport monofiletikus eredetet és a legősibb csoportot mutatja összhangban Gaut et al. (2000) azon eredményével, ahol az összerendezés után kialakult szekvencián belüli réseket, mint hiányzó karaktereket vették figyelembe. Azt, hogy a *F. rubra* mintegy átmenetet képez a keskenylevelű és széleslevelű *Festuca* fajok között és a keskenylevelűeken belül a legősibb, morfológiai adatok is alátámasztják. A pödrődött tőlevelek alapján a keskenylevelűek közé sorolható, míg a virágzati hajtáson fejlődő levelek kiterülnek, így a faj morfológiailag is átmenetet képez a széleslevelű *Festuca* fajok felé. Ezt alátámasztja az is, hogy a magashegységektől a száraz homokig előfordul, emiatt a nagy adaptív értéke miatt is a gyepkeverékek egyik fő összetevője.

A főcsoport összes többi tagja testvér csoportokat alkotva nehezen különíthetők el egymástól, így kevés bepillantást enged a fajok közötti rokonsági viszonyokba. Érdekes észrevétel, hogy a Kárpát-medencében előforduló, általunk izolált *F. Ovinae* csoportba tartozó fajok 100%-ban megegyeznek a már korábban közölt *F. rupicaprina* szekvenciájával. A

Festuca fajokkal foglalkozó cikkek közül eddig minden esetben az azonos ITS szekvenciákkal rendelkező egyedek azonos taxonba is tartoztak. Gaut et al. (2000) Lolium fajok esetében számolt be azonos ITS szekvenciákról. Allopoliploid fajok esetében azonban természetesen megtalálhatóak a genomjuk összeállításában résztvevő alacsonyabb ploidszintű fajok genomjai is. Tehát az egyeden belüli ITS szekvenciák polimorfizmusa nemcsak az rDNS nagy kópiaszámával és a bennük lehetséges különbségekkel magyarázható, hanem allopoliploid fajok esetében a különböző genomokból származó rDNS variációkkal is. Talán a legjobban dokumentált példa erre a már említett *F. arundinacea* ($PPG_1G_1G_2G_2$) esete, melyben a P genom szinte biztosan a *F. pratensis*ből (PP) származik, melyet alátámasztottak meiotikus kromoszómapárosodással (Chandrasekharan és Thomas 1971, Sleper 1985), RFLP-vel (Xu & Sleper 1994, Chen et al. 1998), *in situ* hibridizációval (Humphreys et al. 1995) és ITS szekvenciák 100%-os homológiájával (Gaut et al. 2000) is. Ezért mutatnak a poliploid fajok nagyobb különbségeket ITS szekvenciájukban, mint a diploidok. Mivel azonban még a legjobban tanulmányozott *F. arundinacea* esetében sem tisztázott a másik két genom eredete (feltehetően a *F. glaucescens*, *F. mairei* vagy valamelyik *Lolium* faj – Jauhar 1993), az allopoliploid fajoknál kapott eredményeket óvatosan kell kezelni. A legtöbb poliploid faj esetében azonban még az sem tisztázott, hogy auto- vagy alloploidiával állunk-e szembe. A dolgot tovább nehezíti az a tény, hogy egyes fajoknál komplett autopoliploid sorozatot fedezhetünk fel alkalmazkodva a különböző természeti körülményekhez. Az általunk vizsgált fajok ploidszintje diploidtól oktoploidig terjed. Mivel alap ITS szekvenciájuk minden esetben azonos volt, más genomból származó ITS szekvenciát nem találtunk, ezért feltehetően a magasabb ploidfokú fajoknál autopoliploidiával állunk szemben. Más genomok jelenlétére utaló eltérő ITS szekvenciákat nem sikerült kimutatnunk.

A II. alcsoporton belül további 4 csoport különíthető el egymástól. Az első csoportba tartozik a *F. burnatii* és testvércsoportjai *a F. eskia, F. quadriflora* és *F. gautieri*. A másodikba a közeli rokonságban álló *F. ovina* és *F. filiformis* fajok tartoznak, egy harmadik csoportot alkotnak a *F. idahoensis* szekvenciák, míg végül a 4. csoportot a *F. lemanii* és *F. glauca* fajok.

Mivel a filogenetikai analízisben különböző *Festuca* fajokból az összes eddig izolált (2003-ig) ITS szekvencia szerepel, napjainkig ez tekinthető a legteljesebb vizsgálatnak.

Eredményeinkből az alábbi megállapításokat tehetjük, illetve következtetéseket vonhatjuk le:

- A széleslevelű és keskenylevelű fajok korai különválását megerősítettük.
- Analízisünk cáfolja egy harmadik, legősibb főcsoport meglétét.

- A széleslevelű *Festuca* fajok fejlődése szinte pontosan nyomonkövethető, míg a keskenylevelűeknél további vizsgálatokra van szükség.
- A *Festuca rubra* csoport legősibb, monofiletikus eredete azonban megerősítést nyert.
- Ezen a főcsoporton belül a többi faj ITS szekvenciái nagy homológiát mutatnak, mivel evolúciós szempontból feltehetőleg közeli rokonok, ezért ez a vizsgálat kevés bepillantást enged a rokonsági kapcsolataikba.

Az ITS szekvenciákról már korábban bebizonyosodott, hogy a fűféléken belül faji határok elkülönítésére alkalmazható (Hsiao et al. 1994, 1995a, 1995b, Gaut et al. 2000, Torrecilla és Catalán 2002). A vizsgált fajoknál a faji határok ITS szekvenciáik alapján nem különíthetők el, ezért azok nagy valószínűséggel faj alatti taxonoknak tekinthetők. A morfológiai és molekuláris alapú taxonómia a jövőben – amellett, hogy egymást erősítik – konfrontálni is fognak egymással. Ennek következményeként a morfológiai különbségek alapján kialakított faji határok a későbbiekben várhatóan átértékelődnek és sok esetben nem fognak a molekuláris módszerekkel kialakított határokkal megegyezni. Ez azzal is magyarázható, hogy azonos genetikai háttér mellett a génregulációs különbségek, melyek a genomikus DNS metilációs mintázatának öröklődő következményei, esetenként fenotípusos különbségeket okozhatnak (morfológiai alapú taxonómia), anélkül, hogy a DNS szekvenciájában változás következne be (molekuláris alapú taxonómia).

4.7. Új tudományos eredmények

1. Az alma etilén bioszintézisének molekuláris gátlása

1.1. Bizonyítottuk az etilén bioszintézis molekuláris gátlását az antiszensz ACC-szintáz génnel (*MdACS*2) transzformált almafák termésében és az eltérést a gátlás mértékében az egyes transzgénikus fák között.

1.2. Bizonyítottuk, hogy az *MdACS*2 gén expressziója érés-specifikus, továbbá hogy a gén mRNS akkumulációja szoros korrelációt mutat a transzgénikus gyümölcsök etiléntermelésével.

1.3. Bizonyítottuk, hogy azokban a transzgénikus vonalakban, amelyeknél az antiszensz gátlás hatékonyan működött, a gyümölcsök – a nem transzformált kontrollhoz képest – 1-2 hónappal hosszabb ideig tárolhatók szobahő-mérsékleten, minőségi romlás nélkül.

1.4. Bizonyítottuk, hogy az etilén szintézisben gátolt transzgénikus gyümölcsök hosszan tartó tárolásához – a jelenleg alkalmazott technológiákhoz képest – nincs szükség a hűtőtárolók oxigén-, széndioxid- és páratartalmának szabályozására.

1.5. Bizonyítottuk, hogy az etilén szintézis antiszensz gátlásával a gyümölcsök puhulása is mérséklődött.

2. *Festuca* fajok molekuláris taxonómiája

2.1. A *Festuca Ovinae* csoportba tartozó – taxonómiai szempontból legproblematikusabb – 10 fajt RAPD és AP-PCR technikákkal 3 csoportba soroltuk. Klaszter és MDS analízissel megbecsültük a köztük lévő genetikai távolságot. Bizonyítottuk, hogy a *F. rupicola* egyedek – függetlenül levélméret alapján történő szétválasztásuktól – egységes fajt alkotnak. A *F. javorkae*, bár meglehetősen közel áll a *F. rupicola* egyedeihez, a PAL1 primer 800 bp méretű fragmentuma alapján molekulárisan elkülöníthető.

2.2. Bizonyítottuk, hogy a Budai hegységben található *Festuca pallens* faj tetraploid. A RAPD és AP-PCR vizsgálatokban a diploid fajhoz képest mutatott nagyfokú genetikai különbözőség alapján különálló taxonnak tekinthető.

2.3. A tíz vizsgált faj közül nyolcnak elsőként írtuk le pontos ITS (internal transcribed spacer) szekvenciáját. Megállapítottuk, hogy ITS szekvenciájuk alapján faji határok nem különíthetők el, ezért feltehetően faj alatti taxonoknak tekinthetők.

2.4. *In silico* kutatás eredményeként – ITS szekvenciáik alapján – elkészítettük a *Festuca* nemzetség filogenetikai fáját, mellyel bizonyítottuk, hogy a keskenylevelű *Festuca* fajokon belül a *Festuca rubra* a legősibb csoport, és monofiletikus eredetű.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Az alma etilén bioszintézisének molekuláris gátlása

Az ezen a területen elért eredményeink az első adatokat jelentik almában az etilén bioszintézisben gátolt gyümölcsök post-harvest viselkedésére vonatkozóan.

Az eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy az etilén bioszintézisének molekuláris gátlása megoldható az *MdACS*2 gén antiszensz orientációban történő genetikai transzformációjával. Nagyszámú, különböző transzformációs eseményből származó transzgénikus vonal közül kiválaszthatók olyanok, amelyek gyümölcsei megfelelő mértékű etiléntermelés csökkenést mutatnak. Mivel a sejtfalbontó enzimek is az etilén közvetlen kontrollja alatt állnak, ezért ezeknek az almáknak a puhulása is késleltethető. A gyümölcsök szobahőmérsékleten 1-2 hónappal hosszabb ideig tárolhatók minőségi romlás nélkül, ezáltal feltételezhetően a piacokon, boltok polcain is tovább tarthatók. Hidegen tárolva pedig az autokatalitikus etilénszintézis kezdete és csúcspontja 4-5 hónappal késleltethető. Ezeknél a gyümölcsöknél tehát nincs szükség a hűtőtárolókban az oxigén- széndioxid- és páratartalom szabályozására, amelyek a tárolási költségek jelentős növekedését idézik elő. A TG508-as „knock out” transzgénikus vonal, melyben feltehetően egy jó pozicionális hatás következtében az érés során bekövetkező autokatalitikus etiléntermelés nem képes beindulni, kiváló kísérleti objektumként szolgálhat a gyümölcsfejlődés és érés fiziológiájának és biokémiájának jobb megértéséhez és molekuláris tisztázásához. Gazdasági szempontok figyelembevételével mérlegelendő a jövőben a transzformációs vektorban szereplő konstitutív promóter gyümölcs- és/vagy érés-specifikus promóterrel történő cseréje.

Festuca fajok molekuláris taxonómiája

A vizsgált 10, hazánkban is előforduló *Festuca* faj molekuláris analízisével elsőként foglalkoztunk.

Az általunk használt RAPD és AP-PCR molekuláris módszerek alkalmasnak bizonyultak a *Festuca* nemzetség kísérletünkbe vont fajai és genotípusai megkülönböztethetőségének, illetve azonosságának előzetes vizsgálatára. Az ezt követő, ITS (internal transcribed spacer) régióban történő szekvencia szintű összehasonlítás – a fajok közötti eltérések kimutatására – nem vezetett eredményre. Evolúciós szempontból ezek a fajok feltehetően még a különválás kezdeti szakaszán állnak. A vizsgált fajok ploidszintje diploidtól oktoploidig terjed. Mivel ITS szekvenciájuk szinte minden esetben azonos volt és

más genomból származtatható ITS szekvenciát nem találtunk, ezért a magasabb ploidfokú fajok autopoliploidoknak feltételezhetők.

Nagyobb polimorfizmust adó szekvenciák izolálását tervezzük a későbbiekben, nevezetesen kloroplaszt és mitokondrium eredetű gének és intronok szekvencia szintű összehasonlítását. Ezt az idegenmegporzás léte is indokolttá teszi. Tervezzük még nagyobb felbontást nyújtó molekuláris markerek bevonását is a taxonómiai problémák tisztázásához. *Festuca* fajokra specifikus mikroszatellit markereket még nem publikáltak, a *Lolium* nemzetségre leírtak pedig nem működtek megfelelően. Ezért AFLP vizsgálatok bevonását tervezzük kísérleteinkbe.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A dolgozat két - első pillanatban távolinak tűnő - kutatási területen elért eredményeket foglal össze. Molekuláris szinten azonban, mindkét esetben egyetlen molekulának, a genetikai örökítő anyagnak a vizsgálatáról van szó, annak megváltoztatásáról (genetikai transzformáció), illetve összehasonlító vizsgálatáról (molekuláris taxonómia).

Az *első témakörben* azt tűztük ki célul, hogy almában a gyümölcsök érési folyamatát gátoljuk, a betakarítás utáni eltarthatóság növelése céljából. Ehhez az etilén bioszintézisben kulcsszerepet játszó ACC-szintáz enzim génjét (*MdACS*2) nemzetközi együttműködés keretein belül izoláltuk és juttattuk antiszensz orientációban különböző almafajták genomjába. A hazai transzformációs kísérletek elkezdéséhez egyszerű, gyors és hatékony levélszövetből történő hajtásregenerációt kellett kialakítanunk, majd a hajtások gyökereztetését és akklimatizációját. Ezt követően M26 alany- és Royal Gala nemesfajtákat transzformáltunk, a transzgénikus növényeket üvegházban helyeztük el. A transzgénikus gyümölcsök vizsgálatára az Egyesült Államokbeli Cornell Egyetem genevai kutatóintézetének (New York State Agricultural Experiment Station, Department of Food Science and Technology, Geneva NY) transzgénikus ültetvényéből származó gyümölcsökön került sor. A vizsgálatokhoz már több mint 150 különböző transzformációs eseményből származó termőre fordult transzgénikus vonal állt rendelkezésünkre. E területen elért eredményeink az első adatokat jelentik az etilén bioszintézisben gátolt transzgénikus gyümölcsök post-harvest viselkedésére vonatkozóan.

A transzgén jelenlétének tesztelését követően az egyes transzgénikus fákról származó, szobahőmérsékleten és hidegen tárolt gyümölcsökben különböző időpontokban mértük az etilén termelődést, cukortartalmat és keménységet. A különböző transzgénikus fák gyümölcseiben, az antiszensz génnel kiváltott etilén termelés gátlása nagy különbségeket mutatott. A legtöbb esetben nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a kontrollhoz képest, néhány esetben pedig még a kontrollnál is nagyobb etilénszinteket mértünk. Azokban a transzgénikus vonalakban (az összes 2-3 %-a), amelyeknél az etiléntermelés antiszensz gátlása hatékonyan működött, a gyümölcsök etilén produkciója szobahőmérsékleten tárolva 1-4 hetes késést mutatott. A tárolás 1-4 hetét követően az autokatalitikus etilén termelés ezekben a vonalakban is beindult, bár csökkent intenzitással. Ezek a gyümölcsök cukortartalom (Brix°) szempontjából alig különböztek a kontrolltól, míg a húsuk hosszabb ideig maradt kemény. Eredményeink bizonyították, hogy antiszensz ACC-szintáz gén bevitelével a gyümölcsök puhulása is gátolható.

Northern hibridizációval követtük az *MdACS*2 gén aktivitását a gyümölcskötődéstől a tárolási időszak második hónapjáig. Mivel a génaktivitás csak a betakarítást követő 2-3. napon nyilvánult meg, ezáltal bizonyítottá vált, hogy az MdACS2 génnek érés-specifikus az expressziója. Ezt követően az adott időpontban mért mRNS akkumuláció és az etilén szint változása között szoros korrelációt tapasztaltunk.

A hűtött tárolás eredményei alapján megállapítottuk, hogy a legjobb transzgénikus vonalak gyümölcsei 3-4 hónapos késéssel érték el etiléntermelésük csúcspontját. Egy vonal esetében (TG 508) ez az érték a tárolási periódus teljes időtartama alatt nagyon alacsony szinten maradt. Ezeknél a gyümölcsöknél szembetűnő morfológiai változás is bekövetkezett, sokkal kisebbek maradtak, azonban keménységük és cukortartalmuk a legmagasabb értéket mutatták.

Az egyes transzgénikus vonalak közötti nagymértékű különbségek az integrálódott transzgén kópiaszámával és feltehetően az integrálódás helyének pozíciójával függhetnek össze.

A bemutatott eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy az antiszensz technikára alapozott génszupresszió alternatív lehetőséget jelenthet a jövőben az utóérő gyümölcsök tárolási problémáinak megoldásában.

A *második témakörben* a *Festuca Ovinae* csoportba tartozó, besorolás szempontjából problematikus fajainak molekuláris szintű összehasonlítását tűztük ki célul. A kísérleteinkben vizsgált, hazánkban is előforduló 10 *Festuca* faj molekuláris analízisére nem találtunk adatokat az irodalomban. A tesztelt 47 RAPD primer közül nyolc, míg a 19 AP-PCR primer közül 6 eredményezett polimorf mintázatot. A genetikai távolságok meghatározásához a 14 polimorf és értékelhető mintázatot eredményező primerek 111 fragmentumának bináris kódjai szolgáltak alapadatként. A fragmentumok mérete 200-2500 bp között volt. Az SPSS 8.0 statisztikai programcsomag segítségével hasonlósági értékeket számítottunk, valamint klaszter és többdimenziós analízist végeztünk. Az eredmények alapján a vizsgált fajokat három csoportba soroltuk.

Bizonyítottuk, hogy a *F. rupicola* egyedek - a levélméret alapján történő szétválasztástól függetlenül - molekulárisan egységes fajt alkotnak.

A szubmediterrán tetraploid *F. pallens* (4x) molekuláris szempontból jelentősen eltért az alhavasi diploid *F. pallens* (2x) változattól, mely jelenlegi taxonómiai besorolását módosíthatja.

A *F. javorkae*, bár meglehetősen közel áll a *F. rupicola* egyedeihez, morfológiai sajátosságaiban is hasonló, molekulárisan mégis elkülöníthető a PAL1 primerrel generált ≈800 bp méretű fragmentum alapján.

Figyelemreméltó, hogy a molekuláris besorolhatóság alapján a *F. wagneri* más csoportba került, mint a feltételezett szülőfajai (♀: *F. vaginata*, ♂: *F. valesiaca* vagy *F. pseudovina* vagy *F. rupicola*).

Eredményeink bizonyítják, hogy az általunk használt molekuláris módszerek alkalmasak a *Festuca* nemzetség kísérletbe vont fajai és genotípusai megkülönböztethetőségének, illetve azonosságának vizsgálatára.

A PCR alapú vizsgálatokat követően elvégeztük a vizsgált fajok ITS (internal transcribed spacer) régiójának szekvencia szintű összehasonlító elemzését. Az ITS régió felszaporítását és szekvenálását a 10 faj összesen 27 egyedén végeztük el. A kapott szekvenciákat az NCBI génbankban helyeztük el, ahol a vizsgált fajok közül nyolcnak ez az első bejegyzése. A szekvenálás mindegyik faj esetében egy 596 bp méretű szakaszt eredményezett. Intraspecifikus ITS variációt csak a *F. rupicola* fajon belül találtunk, ahol a Nyírádról gyűjtött egyedek két helyen mutattak kétértelmű pozíciót, míg a többi előfordulási helyről gyűjtött minták csak egy-egy helyen. A többi 9 faj esetében a különböző egyedek között nem találtunk eltérést, még távoli előfordulási helyek között sem. Ezeknél a fajoknál a polimorfizmust csak intragenomikus különbségek jelentették, ami az rDNS nagy kópiaszámával és a bennük lehetséges variációkkal magyarázható. A *Festuca Ovinae* csoportba tartozó vizsgált fajoknál tehát a faji határok ITS szekvenciáik alapján nem különíthetők el, ezért ebben a vizsgálatban faj alatti taxonoknak tekinthetők; feltehetően evolúciós szempontból a faji különválás kezdeti szakaszán lehetnek.

A teljes *Festuca* nemzetség filogenetikai revíziójához az általunk izolált ITS szekvenciákat kibővítettük az adatbankban található más *Festuca* fajokra leközölt ITS szekvenciákkal. A Maximum Parsimony analízissel kapott 1609 azonos értékű filogenetikai fa 629 bp hosszúságú volt, amelyekből a végső konszenzust fát bootstrap analízissel teszteltük. Eredményeink megerősítik a keskenylevelű és széleslevelű fajok korai különválását, cáfolják azonban egy harmadik, legősibb csoport meglétét. A széleslevelű *Festuca* fajok leszármazási sora és fejlődése pontosan nyomonkövethető, míg a keskenylevelű csoporton belül a fajok nagy homológiát mutatnak. A *Festuca rubra* alcsoport legősibb, monofiletikus eredetét a saját eredményeink megerősítik.

A morfológiai (fenotípusos) különbségek alapján kialakított faji határok a jövőben feltehetően átértékelődnek és sok esetben nem fognak a molekuláris módszerekkel elért

eredményekkel megegyezni. Ez azzal is magyarázható, hogy azonos genetikai háttér mellett a génregulációs különbségek, melyek részben a genomikus DNS kémiai megváltozásának (metilációs mintázat) következményei, nagyobb fenotípusos eltéréseket okozhatnak (morfológiai alapú taxonómia), anélkül, hogy a DNS szekvenciájában változás következne be (molekuláris alapú taxonómia).

SUMMARY

This thesis contains results from two research fields that might seem far from each other at first sight. However, at molecular level there is a very close relationship, a single molecule (DNA) was investigated in both cases. In the first case it was modified by genetic transformation while in the second case the same segments of different DNA molecules were compared in molecular taxonomy.

In the first field our goal was the inhibition of the ripening process of apple fruits to increase the storage life after harvesting. A gene coding for ACC synthase enzyme was isolated (*MdACS*2) within a framework of an international collaboration. This gene was introduced in antisense orientation into the genome of different varieties of apple. To start the transformation experiments at home we had to establish a single, rapid and efficient regeneration system from leafes tissues, and a quick method of rooting of the gained shoots and acclimatization to the field. After that M26 rootstock and Royal Gala scion cultivars were transformed with the antisense gene and the transgenic trees were placed in a greenhouse. The examination of transgenic fruits took place in the USA at the research center of the Cornell University (New York State Agricultural Experiment Station, Department of Food Science and Technology, Geneva NY). More than 150 fruit bearing transgenic trees were available for the investigation which were originated from different transgenic events. In this field our results mean the first data to address the transgenic fruits in which the ethylene biosynthesis was inhibited by genetic engineering.

The first step was testing the presence of the transgene in all transgenic lines. After harvesting, the fruits were stored at room temperature and cold room (5 °C), respectively and ethylene production, sugar content and firmness were measured at different intervals. Great difference was observed in ethylene production of each transgenic tree. Most of the lines showed no significant difference compared to controls while in some lines higher ethylene production was observed. In those transgenic lines where the inhibition of ethylene production worked well (2-3 %), the delay of onset of ethylene synthesis was 1-4 weeks. After delay, the autocatalytic ethylene synthesis started up in these fruits as well, but the peak of ethylene level remained lower. These fruits barely differed from the control´s regarding sugar content, while the firmness of their fruit-flesh kept up for a longer time. Our results proved that the introduction of an antisense ACC-synthase gene into the apple genome inhibited the softening of fruits, also.

Expression of *MdACS*2 gene was followed from early stage of fruit development to the second months after harvesting by Northern hybridization. The gene activity was detectable only after the harvesting time, so the *MdACS*2 gene has a ripening specific expression. A strong correlation was perceived between the measured ethylene level and mRNA accumulation during storage.

According to the results of cold storage the fruits of the best transgenic lines reached their peak of ethylene production after a delay of 3-4 months. There was no remarkable ethylene production observed in a transgenic line (TG 508) during the whole storage period. Changes in morphology were also observed in these fruits. Fruits remained smaller with a berry shape, the fruit-flesh was extremely hard but the most delicious with high sugar content and concentrate flavour.

The variance between the transgenic lines is probably due to the different copy number of the integrated transgene and the position of their place of integration.

According to our detailed examinations, this molecular approach based on antisense technology can provide an alternative way to replace the commonly used and costly atmospheric storage of fruits.

In the second field our aim was the molecular comparison of the most disputed *Festuca* species belonging to the *Ovinae* section. There was no available scientific literature at molecular level regarding the examined 10 *Festuca* species which are present in the Carpathian Basin. Among the tested 47 RAPD and 19 AP-PCR primers, eight and six showed polymorphic patterns, respectively. For the determination of genetic distance between the examined species, the binary codes of 111 fragments of these 14 polymorphic primers were used. The length of these fragments varied between 200 and 2500 basepairs. Similarity values were computed and cluster and multidimensional analysis were conducted using the SPSS 8.0 pack of statistical programs. The examined *Festuca* species were classified into three well-separable groups on the basis of these results.

It has been proved that the separate *Festuca rupicola* groups independently of their separation based on the shape and size of their leaves, compose uniform species at molecular level.

It has been proved that the sub-Mediterranean tetraploid *F. pallens* (4x) differs genetically from the subalpine diploid *F. pallens* (2x), which may modify the present classification.

The species *F. javorkae* and *F. rupicola* can be differentiated from each other at the molecular level based on a 800 bp fragment amplified by the PAL1 primer.

It is worthy of note that the species *F. wagneri* based on our molecular classification was placed in a different group than its supposed parent species (♀: *F. vaginata*, ♂: *F. valesiaca* or *F. pseudovina* or *F. rupicola*).

According to our results, the used molecular methods are capable of distinguishing or to assess the identity of species of the genus *Festuca*.

After the above experiments based on PCR techology, comparison of internal transcribed region (ITS) have been executed at sequence level in the studied species. The amplification and sequencing of the ITS region was achieved in 27 specimens of 10 species. The determined sequences were placed into the NCBI Genbank where among the 10 species in 8 cases this meant the first entry. Sequencing resulted in a fragment of 596 bp in each species. Intraspecific ITS variation was detected only in *F. rupicola* where individuals from 'Nyírád' contained two, while the other samples only one ambiguous nucleotide sites. In the other 9 species there was no detectable difference between their individuals even if they originated from different locations. In these species polymorphism was manifested only in intragenomic differences which can be explained by the high number of copies of rDNA and the possible differences between them. Based on the results of ITS sequences the examined species from the *Ovinae* section cannot be considered as species but subspecies. Supposedly, they are on the beginning of separation to be different taxon.

For the phylogenetic analysis of the whole *Festuca* genus, our isolated sequences were completed with all available ITS sequences from the Genbank which were isolated from other *Festuca* species. The found 1609 parsimonuos Maximum Parsimony trees were 629 steps long and the strict consensus tree was tested by bootstrap analysis. According to our results, the early divergence of broad-leaved and fine-leaved fescues was confirmed while the existence of a third and basal *Festuca* clade was not supported. The phylogeny of broad-leaved *Festuca* species is almost completely resolved, while in the case of fine-leaved *Festuca* species more detailed experiments are required, although the monophyletic and basal origin of the *Festuca rubra* aggregate was confirmed.

The identification and classification of the species using morphological traits should be reassessed in the future since in many cases it is not going to be the same as the separation created by molecular methods. The differences of gene regulation in the same genetic background, which are the results of the inherited methylation patterns of the genomic DNA,

can occasionally cause bigger phenotypic differences (taxonomy based on morphology) than the change of DNA itself (taxonomy based on molecular methods).

MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

Abeles FB, Morgan PW, Saltveit Jr. ME (1992) Ethylene in plant biology. 2nd edition (Academic Press, San Diego)

Adams DO, Yand SF (1979) Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 170-174

Alexander L, Grierson D (2002) Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. J. Exp. Botany 277: 2039-2055

Alexeev EB (1973) Les fetuques du groupe Intravaginales Hack. de la section *Festuca* (*Ovinae* Fr.) dans le Causacae. – Bjull. Moskovsk. Obsc. Isp. Prir., Otd. Biol. 78: 94-110.

Alonso JM, Chamaro J, Granell A (1995) Evidence for the involvement of ethylene in the expression of specific RNAs during maturation of the orange, a non-climacteric fruit. Plant Mol. Biol. 29: 385-390

Alonso JM, Hirayama T, Roman G, Nourizadeh S, Ecker JR (1999) EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. Science 284: 2148-2152

Amhrein N, Breuing F, Eberle J, Skorupka H, Tophof S (1982) The metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. In: Plant Growth Substances 1982, Wareing PF ed. p. 249-258 Academic Press, London

An G (1987) Binary Ti Vectors for Plant Transformation and Promoter Analysis. Methods in Enzymology. 153: 292-305

Anderson DD, Greene FC, Yip RE, Halford NG, Shewry PR, Malpica-Romero JM (1989) Nucleotides sequences of the two high-molecular-weight glutenin genes from the D-genome of a hexaploid bread wheat *Triticum aestivum* L. cv Cheyenne. Nucleic Acids Res. 17: 461-462

Atta-Aly MA, Saltveit ME, Hobson GE (1987) Effect of silver ions on ethylene biosynthesis by tomato fruit tissue. Plant Physiol. 83: 44-48

Baksay L (1957) The Chromosome Numbers and Cytotaxonomical Relations of Some European Plant Species. Annales Historico-Naturales Musei Nationalis Hungarici, Tomus VIII. p. 169-174

Baldwin EA, Pressey R (1988) Tomato polygalacturonase elicits ethylene production in tomato fruit. J. Am. Soc. Hort. Sci. 113: 92-95

Barry CS, Blume B, Bouzayen M, Cooper W, Hamilton AJ, Grierson D (1996) Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. The Plant Journal 9: 525-535

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

Beldie AI (1972) *Festuca* L. – In: Nyárády et al Flora Reip. Soc. Romania XII. - Edit. Acad. Reipub. Social. Romania. p. 459-559., 790-791.

Benito C, Figueras AM, Zaragoza C, Gallego FJ, de la Pena A (1993) Rapid identification of Triticeae genotypes from single seeds using the polymerase chain reaction. Plant. Mol. Biol. 21: 181-183

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature 409: 363-366

Beyer EM Jr. (1976) A potent inhibitor of ethylene action in plants. Plant Physiol. 58: 268-271

Beyer EM Jr., Morgan PW, Yang SF (1984) Ethylene. In: Advanced Plant Physiology. Wilkins MB ed. Pitman, London, p. 111-126

Biale JB, Young RE (1981) Respiration and ripening in fruits: retrospect and prospect. In: Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables. Friend J, Rhodes MJC eds. London Academic Press, p. 1-39

Blanke MM (1991) Respiration of apple and avocado fruits. Postharv. News Inf. 2: 429-436

Blankenship SM, Richardson DG (1985) Development of ethylene biosynthesis and ethylene-induced ripening in d'Anjou pears during the cold requirement for ripening. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 107: 807-812

Bleecker AB, Estelle MA, Somerville C, Kende H (1988) Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. Science 241: 1086-1089

Bleecker AB, Kende H (2000) Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 16: 1-18

Blokland R, De Lange P, Mol JNM, Kooter JM (1993) Modulation of gene expression in plants by antisense genes. In: Antisense research and applications. Cook ST, Lebleu B eds. Boca Raton: CRC Press p. 125-148

Blume B, Grierson D (1997) Expression of ACC oxidase promoter-GUS fusion in tomato and *Nicotiana plumbaginifolia* regulated by developmental and environmental stimuli. The Plant Journal 12: 731-746

Bolar JP, Norelli JL, Aldwinckle HS (1998) An efficient method for rooting and acclimation of micropropagated apple cultivars. HortScience 33: 1251-1252

Bolar JP, Brown SK, Norelli JL, Aldwinckle HS (1999) Factors affecting the transformation of 'Marshall McIntosh' apple by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 55: 31-38

Bolar JP, Norelli JL, Wong KW, Hayes CK, Harman GE, Aldwinckle HS (2000) Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor. Phytopathology 90: 72-77

Bufler G (1984) Ethylene-enhanced 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase activity in ripening apples. Plant Physiol. 75: 192-195

Bufler G (1986) Ethylene-promoted conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in peel of apple at various stages of fruit development. Plant Physiol. 80: 539-543

Bulinska-Radomska Z, Lester N (1988) Intergeneric relationships of *Lolium*, *Festuca*, and *Vulpia* (Poaceae) and their phylogeny. Plant Syst. Evol. 159: 217-227

Burg SP, Thimann KV (1959) The physiology of ethylene formation in apples. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 45: 335-344

Burg SP, Burg EA (1967) Molecular requirements for the biological activity of ethylene. Plant Physiol. 42: 144-152

Capitani G, Hohenester E, Feng L, Storici P, Kirsch JF, Jansoni JN (1999) Structure of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, a key enzyme in the biosynthesis of the plant hormone ethylene. J. Mol. Biol. 294: 745-756

Chandrasekharan P, Thomas H (1971) Studies in *Festuca* V. Cytogenetic relationships between species of *bovinea* and *scariosae*. Z Pflanzenzücht 65: 345-354

Charmet G, Balfourier F (1994) Isozyme variation and species relationships in the genus *Lolium* L. (ryegrasses, *Graminaceae*). Theor. Appl. Genet. 87: 641-649

Charmet G, Ravel C, Balfourier F (1997) Phylogenetic analysis in the *Festuca-Lolium* complex using molecular markers and ITS rDNA. Theor. Appl. Genet. 94: 1038-1046

Chen C, Sleper DA, Johal GS (1998) Comparative RFLP mapping of meadow and tall fescue. Theor. Appl. Genet. 97: 255-260

Csányi-Kovács CS, Horánszky A (1973) Charakterisierung der *Festuca* Populationen aufgrund der Markmale der Rispe. - Ann. Univ. Sci. Budapest Sect. Biol. 15*:* 59-74.

Darbshyre SJ, Warwick SI (1992) Phylogeny of North American *Festuca* (Poaceae) and related genera using chloroplast DNA restriction site variation. Can. J. Bot. 70: 2415-2429

Darnell J, Lodish H, Baltimore D (1986) Molecular Cell Biology. Scientific American Books Inc. New York

De Bondt AD, Eggermont K, Druart P, Vil MD, Goderis I, Vanderleyden J, Broekaert WF (1994) *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus x domestica* Borkh.): an assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps. Plant Cell Reports 13: 587-593

De Bondt AD, Eggermont K, Penninckx I, Goderis I, Broekaert WF (1996) *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus x domestica* Borkh.): an assessment of factors affecting regeneration of transgenic plants. Plant Cell Reports 15: 549-554

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA minipreparation: Version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1:19-21

Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR (1980) Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77: 7347-7351

Doganlar S, Tanksley SD, Mutschler MA (2000) Identification and molecular mapping of loci controlling fruit ripening time in tomato. Theor. Appl. Genet. 100: 249-255

Dolezel J, Lucretti S, Schubert J (1994) Plant chromosome analysis and sorting by flow cytometry. Crit. Rev. Plant Sci. 13: 275-309

Dong JG, Kim WT, Jip WK, Thompson GA, Li L, Bennett AB, Yang SF (1991) Cloning of a cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate sytnhase and expression of its mRNA in ripening apple fruit. Planta 183: 38-45

Dong JG, Fernandezmaculet JC, Yang SF (1992) Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from apple fruit. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9789-9793

Dudits D, Heszky LE (2000) Növényi biotechnológia és géntechnológia. Agroinform kiadó, Budapest

Dupille E, Rombaldi C, Lelievre JM, Cleyet-Marel JC, Pech JC, Latche A (1993) Purification, properties and partial amino-acid sequence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from apple fruits. Planta 190: 65-70

Dupille E, Sisler E (1995) Effects of an ethylene receptor antagonist on plant material. In: Postharvest Physiology, Pathology and Technologies for Horticultural Commodities: Recent Advances. Ait-Oubahou A, El-Otmani eds. ISBN 9981-9842-2-1 p. 294-301

Ecker JR, Davis RW (1986) Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 5372-5376

Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. Genes. Dev. 15: 188-200

Englmaier P (1994) Festuca. - In: Adler, W., Oswald, K. end Fischer, R. (eds.): Exkursionflora von Österreich. Ulmer, Stuttgart, Wien, p. 993-1005.

Fan X, Blankenship SM, Mattheis JP (1999a) 1-Methylcyclopropane inhibits apple ripening. J. Am. Soc. Hort. Sci. 124: 690-695

Fan X, Mattheis JP, Blankenship SM (1999b) Development of apple superficiald scald, soft scald, core flush and greasiness is reduced by MCP. J. Agric. Food. Chem. 47: 3063-3068

Fasolo F, Zimmerman R, Fordham I (1988) Adventitious shoot formation on excised leaves of *in vitro* grown shoots of apple cultivars. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 16: 75-87

Fasolo F, Malavasi F, Predieri S (1990) Cultivar dependent responses to regeneration from leaves in apple. Acta Horticulturae 280: 61-68

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostos SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391: 806-811

Fluhr R, Mattoo AK (1996) Ethylene – Biosynthesis and perception. Crit. Rev. Plant Sci. 15: 479-523

Franke KE, Liu Y, Adams DO (1995) Yield and quality of RNA from grape berries at different developmental stages. Am. J. Enol. Vitic. 46:315-318

Galli Z, Debreceni D, Kiss E, Heszky LE (2001a) Az alma sikeres transzformációját befolyásoló tényezők. Kertgazdaság 33 (2): 23-32

Galli Z, Penksza K, Kiss E, Bucherna N, Heszky LE (2001b) *Festuca* fajok molekuláris taxonómiai vizsgálata: a *F. ovina* csoport RAPD és AP-PCR analízise. Növénytermelés 50: 375-384

Galli Z, Kiss E, Hrazdina G, Heszky LE (2003) The effects of ACS (1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase) gene down regulation on ethylene production and fruit softening in transgenic apple. Int. J. Hort. Sci. 9 (2): 65-70

Gane R (1934) Production of ethylene by some fruits. Nature 134: 1008

Gaut BS, Tredway LP, Kubik C, Gaut RL, Meyer W (2000) Phylogenetic relationships and genetic diversity among members of the *Festuca-Lolium* complex (*Poaceae*) based on ITS sequence data. Plant Syst. Evol. 224: 33-53

Gorny JR, Kader A (1996) Controlled atmosphere suppression of ACC synthase and ACC oxidase in 'Golden delicious' apple during long-term cold storage. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 121: 751-755

Grandillo S, Ku HM, Tanksley SD (1999) Identifying the loci responsible for natural variation in fruit size and shape in tomato. Theor. Appl. Genet. 99: 978-987

Gray J, Picton S, Shabbeer J, Schuch W, Grierson D (1992) Molecular biology of fruit ripening and its manipulation with antisense genes. Plant Mol. Biol. 19: 69-87

Guis M, Botondi R, BenAmor M, Ayub R, Bouzayen M, Pech JC, Latche A (1997) Ripening-associated biochemical traits of Cantaloupe Charentais melons expressing an antisense ACC oxidase transgene. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 122 748-751

Guo S, Kemphues K (1995) *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryo, encodes a putative Ser/Thr kinase that is assymmetrically distributed. Cell 81: 611-620

Guzmán P, Ecker JR (1990) Exploiting the triple response of Arabidopsis to identify ethylene-related mutants. Plant Cell 2: 513-523

Hackel E (1882) Monographia Festucarum Europaearum. Kassel, Berlin: Theodor Fischer.

Hall LN, Tucker GA, Smith CJS, Watson CF, Seymour GB, Bundick Y, Boniwell JM, Fletcher JD, Ray JA, Schuch W, Bird CR, Grierson D (1993) Antisense inhibition of pectinesterase gene expression in transgenic tomatoes. Plant Journal 3: 121-129

Hammond S, Boettcher S, Caudy A, Kobayashi R, Hannon GJ (2001) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. Science 293: 1146-1150

Hamilton AJ, Bouzayen M, Grierson D (1990) Identification of a tomato gene for the ethylene forming enzyme by expression in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7434-7437

Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. Science 286: 950-952

Hanahan D (1985) Techniques for transformation of E. coli. In: DNA cloning: A practical approach. Glover DM ed. IRL Press Oxford vol. 1, p. 109

Harada T, Sunako T, Sakuraba W, Goto S, Akada S, Senda M, Ishikawa R and Niizeki M (1997) Genomic nucleotide sequence of a ripening-related 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (*MdACS*-1). Plant Physiology 113: 1465

Herner RC, Sink KC (1973) Ethylene production and respiratory behavior of the *rin* tomato mutant. Plant Physiol. 52: 38-42

Hoffman NE, Yang SF, McKeon T (1982) Identification of 1-(malonylamino) cyclopropane-1-carboxylic acid as a major conjugate of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, an ethylene precursor in higher plants. Biochem. Biophys. Res. Commun. 104: 765-770

Holdsworth MJ, Bird CR, Ray J, Schuch W, Grierson D (1987) Structure and expression of an ethylene-related mRNA from tomato. Nucl. Acids Res. 15: 731-739

Holdsworth MJ, Schuch W, Grierson D (1988) Organization and expression for a wound/ripening-related small multigene family from tomato. Plant Mol. Biol. 11: 81-88

Holefors A, Xue ZT, Welander M (1998) Transformation of the apple rootstock M26 with the *rol*A gene and its influence on growth. Plant Science 136: 69-78

Horánszky A (1954) Die Kenntnis der *Festuca*-Arten auf Grund der Blattepidermis. - Acta Bot. Acad. Sci. Hung. 1*:* 61-87.

Horánszky A (1969) *Festuca* tanulmányok I. – Bot. Közlem. 56: 149-154

Horánszky A (1970) *Festuca* tanulmányok II. – Bot. Közlem. 57: 207-215

Horánszky A, Jankó B, Vida G (1971) Zur Biosystematik der *Festuca ovina*-Gruppe in Ungarn. - Ann. Univ. Sci. Budapest, Sect. Biol. 13: 95-101

Horánszky A, Fekete G, Précsényi I, Tölgyesi Gy (1980) Comparative experimental morphological investigations on populations of *Festuca vaginata* W. et K., I. Acta Bot. Acad. Sci. Hung., 26: 61-69.

Horánszky A (1992) A *Festuca* nemzettség. In Simon T. (ed) A magyarországi edényes flóra határozója. p. 736-741

Horánszky A (2000) *Festuca*. – In: Simon, T. (ed.): A magyarországi edényes flóra határozója. (Field guide to the Hungarian vascular flora). - Tankönyvkiadó, Budapest. p. 768-773

Hsiao C, Chatterton NJ, Asay KH, Jensen KB (1994) Phylogenetic relationships of 10 grass species: an assessment of phylogenetic utility of the internal transcribed spacer region in nuclear ribosomal DNA in monocots. Genome 37: 112-120.

Hsiao C, Chatterton NJ, Asay KH, Jensen KB (1995a) Phylogenetic relationships of the monogenomic species of the wheat tribe, *Triticeae* (*Poaceae*), inferred from nuclear rDNA (internal transcribed spacer) sequences. Genome 38: 211-223.

Hsiao C, Chatterton NJ, Asay KH, Jensen KB (1995b) Molecular phylogeny of the *Pooideae* (*Poaceae*) based on nuclear rDNA (ITS) sequences. Theor. Appl. Genet. 90: 389-398.

Humphreys MW, Thomas HM, Morgan WG, Meredith MR, Harper JA, Thomas H, Zwierzykowsky Z, Ghesquiere M (1995) Discriminating the ancestral progenitors of hexaploid *Festuca arundinacea* using genomic in situ hybridization. Heredity 75: 171-174

Hutvágner G, Zamore PD (2002) RNAi: nature abhors a double-strand. Current Opinion in Genetics & Development. 12: 225-232

Igarashi M, Ogasawara H, Hatsuyama Y, Saito A, Suzuki M (2002) Introduction of *rol*C into Marubakaidou [*Malus prunifolia* Borkh. var. ringo Asami Mo 84-A] apple rootstock via *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Science 163 (3): 463-473

Jaccard P (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat. 44: 223-270

James DJ, Passey AJ, Barbara DJ, Bevan M (1989) Genetic transformation of apple using a disarmed Ti-binary vector. Plant Cell Reports 7: 658-661

James DJ, Uratsu S, Chebg J, Negri P, Viss P, Dandekar AM (1993) Acetosyringone and osmoprotectants like betaine or proline synergistically enhance *Agrobacterium*-mediated transformation of apple. Plant Cell Reports 12: 559-563

James DJ, Passey AJ, Baker SA (1994) Stable gene expression in transgenic apple tree tissues and segregation of transgenes in the progeny - preliminary evidence. Euphytica 77: 119-121

Janssen BJ, Gardner RC (1989) Localized transient expression of GUS in leaf discs following cocultivation with *Agrobacterium*. Plant Mol. Biol. 14: 61-72

Jauhar PP (1993) Cytogenetics of the Festuca-Lolium complex. Springer, Berlin Heidelberg.

Jiang YM, Joyce DC, Macnish AJ (1999) Responses of banana fruit to treatment with 1-methylcyclopropene. Plant Growth Regul. 28: 77-82

Jiang YM, Fu JR (2000) Ethylene regulation of fruit ripening: molecular aspects. Plant Growth Regul. 30: 193-200

Jobling J, McGlasson WB, Dilley DR (1991) Induction of ethylene synthesizing competency in Granny Smith apples by exposure to low temperature in air. Postharv. Biol. Technol. 1: 111-118

John P (1997) Ethylene biosynthesis: The role of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase, and its possible evolutionary origin. Physiol. Plant. 100: 583-592

Johnson PR, Ecker JR (1998) The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. Annu. Rev. Genet. 32: 227-54

Jorgensen R (1990) Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes. Trends Biotechnol. 8: 340

Kende H (1993) Ethylene biosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 44: 283-307

Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldman KA, Ecker JR (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the Raf family of protein kinases. Cell 72: 427-441

Kiss E, Norelli J, Aldwinckle H, Hrazdina G (1995) Down-regulation of ethylene biosynthesis in apples. Cloning and sequencing of the partial ACC synthase gene in the McIntosh cultivar. Induced Mutations and Molecular Techniques for Crop Improvement. p. 562-564

Knapp J, Moureau P, Schuch W, Grierson D (1989) Organization and expression of polygalacturonase and other ripening related genes in Ailsa Craig ’Never ripe’ and ’ripening inhibitor’ tomato mutants. Plant Mol. Biol. 12: 105-116

Knee M. Looney NE, Hatfield SGS, Smith SM (1983) Initiation of rapid ethylene synthesis by apple and pear fruits in relation to storage temperature. J. Exp. Bot. 34: 1207-1212

Knee M (1987) Development of ethylene biosynthesis in pear fruits at –1°C. J. Exp. Bot. 38: 1724-1733

Kneissl ML, Deikman J (1996) The tomato E8 gene influences ethylene biosynthesis in fruit but not in flowers. Plant Physiol. 112: 537-547

Knight LI, Rose RC, Crocker W (1910) Effects of various gases and vapors upon etiolated seedlings of the sweet pea. Science 31: 635-636

Ko KS, Norelli JL, Reynoird JP, Aldwinckle HS, Brown SK (2002) T4 lysozyme and attacin genes enhance resistance of transgenic 'Galaxy' apple against *Erwinia amylovora*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 127 (4): 515-519

Koch KA, Capitani G, Gruetter MG, Kirsch JF (2001) The human cDNA for a homologue of the plant enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase encodes a protein lacking that activity. Gene 272: 75-84

Krasko A, Schroder HC, Perovic S, Steffen R, Kruse M, Reichert W, Muller IM, Muller WEG (1999) Ethylene modulates gene expression in cells of the marine sponge *Suberites domuncula* and reduces the degree of apoptosis. J. Biol. Chem. 274: 31524-31530

Ku HM, Doganlar S, Chen KY, Tanksley SD (1999) The genetic basis of pear-shaped tomato fruit. Theor. Appl. Genet. 99: 844-850

Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M (2001) MEGA 2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. Bioinformatics 17(12): 1244-1245

Lagrimini LM, Bradford S, Rothstein S (1990) Peroxidase-induced wilting in transgenic tobacco plants. Plant Cell 2: 7-18

Lambert C, Tepfer D (1992) Use of *Agrobacterium rhizogenes* to create transgenic apple trees having an altered organogenic response to hormones. Theor Appl Genet 85: 105-109

Lanahan MB, Yen HC, Giovannoni JJ, Klee HJ (1994) The Never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. Plant Cell 6: 521-530

Larrigaudière C, Vendrell M (1993) Short-term activation of the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in rewarmed Granny Smith apples. Plant Physiol. Biochem. 31: 585-591

Lay-Yee M, Knighton M (1995) A full-length cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from apple. Plant Physiol. 107: 1017-1018.

Lehvaslaiho H, Saura A, Lokki J (1987) Chloroplast DNA variation in the grass tribe Festuceae. Theor. Appl. Genet. 74: 298-302

Lelievre JM, Tichit L, Larrigaudière C, Vendrell M, Pech JC, (1995) Cold-induced accumulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxydase protein in Granny Smith apples. Postharv. Biol. Technol. 5: 11-17

Lelievre JM, Latche A, Jones B, Bouzayen M, Pech JC (1997a) Ethylene and fruit ripening. Physiol. Plant. 101: 727-739

Lelievre JM, Tichit L, Dao P, Fillion L, Nam YW, Pech JC, Latche A (1997b) Effect of chilling on the expression of ethylene biosynthetic genes in Passe-Crassane pear (*Pyrus communis* L.) fruits. Plant Mol. Biol. 33: 847-855

Li N, Mattoo AK (1994) Deletion of the carboxyl-terminal region of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, a key protein in the biosynthesis of ethylene, results in catalitically hyperactive, monomeric enzyme. J. Biol. Chem. 269: 6908-6917

Liang X, Abel S, Keller JA, Shen NF, Theologis A (1992) The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 11046-11050

Liang X, Oono Y, Shen NF, Kohler C, Li K, Scolnik PA, Theologis A (1995): Characterization of two members (*ACS*1 and *ACS*3) of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. Gene 167: 17-24

Lieberman M, Mapson LW (1964) Genesis and biogenesis of ethylene. Nature 204: 343-345

Lincoln JE, Cordes S, Read E, Fischer RL (1987) Regulation of gene expression by ethylene during *Lycopersicon esculentum* (tomato) fruit development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 2793-2797

Lincoln JE, Campbell AD, Oetiker J, Rottmann WH, Oeller PW, Shen NF, Theologis A (1993) *Le-ACS*4, a fruit ripening and wound-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of tomato (*Lycopersicon esculentum*): expression in *Escherichia coli*, structural characterization, expression characteristics, and phylogenetic analysis. J. Biol. Chem. 268: 19422-19430

Liu Y, Hoffman NE, Yang SF (1985) Promotion by ethylene of the capability to convert 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in preclimacteric tomato and cantaloupe fruit. Plant Physil. 77: 407-411

Liu Q, Salih S, Hammerschlag F (1998) Etiolation of 'Royal Gala' apple (*Malus x domestica* Borkh.) shoots promotes high-frequency shoot organogenesis and enhanced ß-glucuronidase expression from stem internodes. Plant Cell Reports 18: 32-36

Liu Q, Ingersoll J, Owens L, Salih S, Meng R, Hammerschlag F (2001) Response of transgenic Royal Gala apple (*Malus x domestica* Borkh.) shoots carrying a modified cecropin MB39 gene, to *Erwinia amylovora*. Plant Cell Rep. 20: 306-312

Lizada MCC, Yang SF (1979) A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxilic acid. Analytical Biochemistry 100: 140-145

Llop-Tous I, Barry CS, Grierson D (2000) Regulation of ethylene biosynthesis in response to pollination in tomato flowers. Plant Physiol. 123: 971-978

Lopez-Gomez R, Gomez-Lim MA (1992) A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. Hortscience 27:440-442

Lurie S, Handros A, Fallik E, Shapira R (1996) Reversible inhibition of tomato fruit gene expression at high temperature. Plant Physiol. 110: 1207-1214

Maheswaran G, Welander M, Hutchinson JF, Graham MW, Richards D (1992) Transformation of Apple Rootstock M26 with *Agrobacterium tumefaciens*. Journal of Plant Physiology 139: 560-568

Martineau B, Houck CM, Sheehy RE, Hiatt WR (1994) Fruit specific expression of the *A. tumefaciens* isopentenyl transferase gene in tomato: effects on fruit ripening and defense-related gene expression in leaves. Plant Journal 5: 11-19

Mathooko FM, (1996) Regulation of ethylene biosynthesis in higher plants by carbon dioxide. Postharv. Biol. Technol. 7: 1-26

Mattoo AK, Suttle C (eds). (1991) The plant hormone ethylene. – CRC Press, Boca Raton, FL. ISBN 0-8493-4566-9.

Maunder M, Holdsworth M, Slater A, Knapp J, Bird C (1987) Ethylene stimulates the accumulation of ripening-related mRNAs in tomatoes. Plant Cell Environ. 10: 177-184

Maximova SN, Dandekar AM, Guiltinan MJ (1998) Investigation of *Agrobacterium*-mediated transformation of apple using green fluorescent protein: high transient expression and low stable transformation suggest that factors other than T-DNA transfer are rate-limiting. Plant Molecular Biology 37: 549-559

Májovský J (1962) Adnotationes ad species gen. *Festuca* florae Slovakiae additamentum I. - Acta Fac. Rerum Nat. Univ. Comenianae Bot. 7: 317-335.

Mir NA, Curell E, Khan N, Whitaker M, Beaudry RM, (2001) Harvest maturity, storage temperature, and 1-MCP application frequency alter firmness retention and chlorophyll fluorescence of 'Redchief Delicious' apples. J. Am. Soc. Hort. Sci. 126: 618-624

Moore S, Vrebalov J, Payton P, Giovannoni J (2002) Use of genomics tools to isolate key ripening genes and analyse fruit maturation in tomato. J. Exp. Botany 53: 2023-2030

Morin F, Rigault C, Hartmann C (1985) Conséquences d'un séjour au froid sur le métabolisme de l'éthylène au cours de la maturation de la poire Passe-Crassane après récolte. Physiol. Vég. 23: 353-359

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

Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990) Introduction of a chimaeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. Plant Cell 2: 279-289

Nei M, Kumar S (2000) Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York p. 25-26

Neljubow D (1901) Ueber die horizontale Nutation der Stengel von *Pisum sativum* und einiger Anderer. Pflanzen Beih. Bot. Zentralbl. 10: 128-39

Németh G (1982) Gyümölcsfa alanyok *in vitro* mikroszaporítása. Kandidátusi értekezés.

Norelli JL, Aldwinckle HS (1993) The Role of Aminoglycoside Antibiotics in the Regeneration and Selection of Neomycin Phosphotransferase-transgenic Apple Tissue. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 118 (2): 311-316

Norelli JL, Aldwinckle HS, Destefano-Beltran L, Jaynes M (1994) Transgenic 'Malling 26' apple expressing the attacin E gene has increased resistance to *Erwinia amylovora*. Euphytica 77: 123-128

Nykänen A, Haley B, Zamore PD (2001) ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. Cell 107: 309-321

Nyárády EI, Nyárády A (1964) Studie über die Arten der Sektion Ovinae Fr. der Gattung Festuca in der RVR. - Revue Roumaine Biol. Sér. Botan. 9: 99-172.

Oeller PW, Wong LM, Taylor LP, Pike DA, Theologis A (1991) Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. Science 254: 437-439

Olson DC, White JA, Edelman L, Harkins RN, Kende H (1991) Differential expression of two genes for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato fruits. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5340-5344

Olson DC, Oetiker JH, Yang SF (1995) Analysis of *Le-ACS*3, a 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expressed during flooding in the roots of tomato plants. J. Biol. Chem. 270: 14056-14061

Patzke E (1961) Vorschlag zur Gliederung *Festuca ovina* L. Gruppe in Mitteleuropa. - Öst. Bot. Zeschr. 108: 505-507

Patzke E (1968) Zur Kenntnis der Sammelart *Festuca ovina* L. im südlichen Niedersachen. - Götting. Flor. Rundbr. 4: 14-17

Penksza K (1999) Die Koerrektur der histologischen Beschreibung von *Festuca javorkae* von Májovszky im Jahre 1962, und Angaben zum Vorkommnis der Art in Ungarn – Ber. Inst. Landschafts-Pflanzenökologie Univ. Hohenheim 10: 49-54

Penksza K (2000) A *Festuca javorkae* Májovsky és a *Festuca wagneri* Degen Thaisz et Flatt jellemzése, és a tőlevelek morfológiája alapján készült szálaslevelű *Festuca* fajok (*Festuca ovina* csoport) határozókulcsa. (Kiegészítések Magyarország edényes flórájának határozójához). Kitaibelia, 5: 275-278

Penksza K, Engloner A (1999) Taxonomic study of *Festuca wagneri* (Degen Thaisz et Flatt) in Degen Thaisz et Flatt. 1905. - Acta Bot. Sci. Hung. 42: 257-264

Perales EH, Zeh M, Thünemann S, Scheider O (1996) *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of apple. Proceedings of the 1. Conference on Fruit Production in the Tropics and Subtropics, Berlin

Picton S, Barton SL, Bouzayen M, Hamilton AJ, Grierson D (1993) Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene-forming enzyme transgene. Plant J. 3: 469-481

Pils G (1985) Systematik, Karyologie und Verbreitung der *Festuca valesiaca*-gruppe (*Poaceae*) in Österreich und Südtirol. Phyton 24: 35-77

Pirrung MC, Kaiser LM, Chen J (1993) Purification and properties of the apple fruit ethylene-forming enzyme. Biochem. 32: 7445-7450

Poneleit LS, Dilley DR (1993) Carbon dioxide activation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase in ethylene biosynthesis. Postharvest Biol. Technol. 3: 191-199

Predieri S, Fasolo F, Malavasi F (1989) High-frequency shoot regeneration from leaves of the apple rootstock M26 (*Malus pumila* Mill.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 17: 133-142

Pre-Aymard C, Weksler A, Lurie S (2003) Responses of 'Anna', a rapidly ripening summer apple, to 1-methylcyclopropane. Postharvest Biol. Technol. 27: 163-170

Prescott AG (1993) A dilemma of dioxygenases (or where biochemistry and molecular biology fail to meet). J. Exp. Botany 44: 849-861

Puite KJ, Schaart JG (1996) Genetic modification of the commercial apple cultivars Gala, Golden Delicious and Elstar via an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation method. Plant Science 119: 125-133

Ravanel S, Gakiere B, Job D, Douce R (1998) The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 7805-7812

Rhodes MJC (1980) The maturation and ripening of fruits. In: Senescence in Plants, ed. Thimann KV, p. 157-205. Boca Raton, FL: CRC Press

Rocklin AM, Tierney DL, Kofman V, Brunhuber NMW, Hoffman BM, Christoffersen RE, Reich NO, Lipscomb JD, Que L. (1999) Role of the nonheme Fe(II) center in the biosynthesis of the plant hormone ethylene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 7905-7909

Roman G, Lubarsky B, Kieber JJ, Rothenberg M, Ecker JR (1995) Genetic analysis of ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*: five novel mutant loci integrated into a stress response pathway. Genetics 139: 1393-1409

Rosenfield CL, Kiss E, Hrazdina G (1996) *Md-ACS*-2 and *Md-ACS*-3: Two new 1-aminocyclopropane-1-carboxylate-synthases in ripening apple fruit. Plant Gene Register PGR96-122. Plant Physiol. 112: 1735

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

Röder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixter MH, Lerox P, Ganal MW (1998) A microsatellite map of wheat. Genetics 149: 2007-2023

Rupasinghe H, Murr D, Paliyath G, Skog L (2000) Inhibitory effect of 1-MCP on ripening and superficial scald development in 'McIntosh' and 'Delicious' apples. J. Hort. Sci. Biotechnol. 75: 271-276

Sakamoto K, Shimomura K, Komeda Y, Kamada H, Satoh S (1995) A male-associated DNA sequence in a dioecious plant, *Cannabis sativa* L. Plant Cell Physiol 36: 1549-1554

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sato T, Theologis A (1989) Cloning the mRNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key enzyme for ethylene biosynthesis in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6621-6625

Schaart JG, Puite KJ, Kolova L, Progrebnyak N (1995) Some methodological aspects of apple transformation by *Agrobacterium*. Euphytica 85: 131-134

Schaller GE, Kieber JJ (2002) Ethylene. In: The Arabidopsis Book, eds. Somerville CR, Meyerowitz EM, American Society of Plant Biologists
http://www.aspb.org/downloads/arabidopsis/schall2.pdf

Schuch W, Hobson G, Kanczler J, Tucker G, Robertson D, Grierson D, Bright S, Bird C (1991) Improvment of tomato fruit quality through genetic engineering. Hort. Sci. 26: 1517-1520

Sedira M, Holefors A, Welander M (2001) Protocol for transformation of the apple rootstock Jork 9 with the *rol*B gene and its influence on rooting. Plant Cell Rep 20: 517-524

Serek M, Sisler EC, Reid MS (1994) Novel gaseous ethylene binding inhibitor prevents ethylene effects in potted flowering plants. J. Am. Soc. Hort. Sci. 119: 1230-1233

Seymour GB, Lasslett Y, Tucker GA (1987) Differential effects of pectolytic enzymes on tomato polyuronides in vivo and in vitro. Phytochemistry 26: 3137-3139

Seymour GB, Taylor JE, Tucker GA eds. (1993) Biochemistry of fruit ripening. London: Chapman & Hall. 442 p.

Shiu OY, Oetiker JH, Yip WK, Yang SF (1998) The promoter of *LE-ACS*7, an an early flooding-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of tomato, is tagged by a sol3 transposon. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 10334-10339

Simon T (1992) A magyarországi edényes flóra határozója. (Field guide to the Hungarian vascular flora). - Tankönyvkiadó, Budapest

Sisler EC (1991) Ethylene-binding components in plants. In The Plant Hormone Ethylene. Mattoo AK és Suttle JC eds. Boca Raton: CRC Press. p. 81-99

Sisler EC, Lallu N (1994) Effect of diazocyclopentadiene (DACP) on tomato fruits harvested at different ripening stages. Postharv. Biol. Technol. 63: 245-254

Sisler EC, Serek M, Dupille E (1996) Comparison of cyclopropene, 1-methylcyclopropene, and 3,3-dimethylcyclopropene as ethylene antagonists in plants. Plant Growth Reg. 18: 169-174

Sisler EC, Serek M (1997) Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments. Physiol. Plant. 100: 577-582

Sleper DA (1985) Breeding tall fescue. J. Plant Breed. Rev. 3: 313-342

Smith CJS, Watson CF, Ray J, Bird CR, Morris PC, Schuch W, Grierson D (1988) Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. Nature 334: 724

Smith CJS, Watson CF, Bird CR, Schuch W, Grierson D (1990) Expression of a truncated tomato polygalacturonase gene inhibits expression of the endogeneous gene in transgenic plants. Mol. Gen. Genet. 224: 477

Smith JJ, John P (1993) Activation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase by bicarbonate carbon-dioxide. Phytochemistry 32: 1381-1386

Song J, Bangerth F (1996) The effect of harvest date on aroma compound production from 'Golden Delicious' apple fruit and relationship to respiration and ethylene production. Postharvest Biol. Technol. 8: 259-269

Soó R (1955) *Festuca* Studien. - Acta Bot. Acad. Sci. Hung. 2: 187-221.

Soó R (1973a) Zeitgemässe Taxonomie der *Festuca ovina*-gruppe. - Acta Bot. Acad. Sci. Hung. 18: 363-377.

Soó R (1973b) A magyar flóra és vegetáció rendszertani - növényföldrajzi kézikönyve V. (Synopsis Systematico-Geobotanica Florae Vegetationisque Hungariae V). - Akadémiai Kiadó, Budapest.

Sriskandarajah S, Goodwin P, Speirs J (1994) Genetic transformation of the apple scion cultivar 'Delicious' via *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 36: 317-329

Sriskandarajah S, Goodwin P (1998) Conditioning promotes regeneration and transformation in apple leaf explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 53: 1-11

Stammers M, Harris J, Evans GM, Hayward MD, Forster JW (1995) Use of random PCR (RAPD) technology to analyse phylogenetic relationships in the *Lolium/Festuca* complex. Heredity 74: 19-27

Starrett DA, Laties GG (1991) The effect of ethylene and propylene pulses on respiration, ripening advancement, ethylene-forming enzyme and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase activity in avocado fruit. Plant Physiol. 95: 921-927

Stepanova AN, Ecker JR (2000) Ethylene signaling: from mutants to molecules. Current Opinion in Plant Biology 3: 353-360

Stockhause J, Höfer M, Renger G, Westoff P, Wydrzynski T and Willmitzer L (1990): Anti-sense RNA efficiently inhibits formation of the 10 kd polypeptide of photosystem II in transgenic potato plants: analysis of the role of the 10 kd protein. EMBO J. 9: 3013-3021

Stohr G (1960) Gliderung der *Festuca ovina*-Gruppei in Mitteldeutschland unter Einschlusseiniger benachbarter Formen. – Wiss. Z. Univ. Halle, Math.-Nat. 9: 393-414.

Stohr G (2002) *Festuca*. – In: Rothmaler, W., Jäger, E.J. and Werner, K. (eds.): Exursionsflora von Deutschland 4. - Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin. p. 844-852.

Sunako T, Ishikawa R, Senda M, Akada S, Niizeki M and Harada T (2000) *MdACS*-5A and 5B, two wound-responsive genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in apple. Plant Physiol. 122: 620

Tanksley SD, Ganal MW, Prince JP, de Vicente MC, Bonierbale MW (1992) High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. Genetics 132: 1141-1160

Tarun AS, Theologis A (1998) Complementation analysis of mutants of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase reveals the enzyme is a dimer with shared active sites. J. Biol. Chem. 273: 12509-12514

Terai H (1993) Behavior of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and ACC synthase responsible for ethylene production in normal and mutant (nor and rin) tomato fruits at various ripening stages. J. Jpn. Soc. Hortic. Sci. 61: 805-812

Theiler-Hedtrich C, Theiler-Hedtrich R (1990) Influence of TDZ and BA on adventitious shoot regeneration from apple leaves. Acta Horticulturae 280: 195-199

Theologis A (1992) One rotten apple spoils the whole bushel: the role of ethylene in fruit ripening. Cell 70: 181-184

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Clustal W – Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl. Acids Res. 22: 4673-4680

Tieman DM, Harriman RW, Ramamohan G, Handa AK (1992) An antisense pectin methylesterase gene alters pectin chemistry and soluble solids in tomato fruit. Plant Cell 4: 667-679

Torrecilla P, Catalán P (2002) Phylogeny of broad-leaved and fine-leaved *Festuca* lineages (*Poaceae*) based on nuclear ITS sequences. Syst. Bot. 27: 241-251.

Torrecilla P, López Rodríguez JA, Stancik D, Catalán P (2003): Systematics of *Festuca* L. sects. *Eskia* Willk., *Pseudatropis* Kriv., *Aphigenes* (Janka) Tzvel., *Pseudoscariosa* Kriv., and *Scariosae* Hack. based on analysis of morphological characters and DNA sequences. Plant Syst. Evol. 239: 113-139

Tredway LP, White JF, Clarke BB (1999) Ribosomal DNA sequences as a tool for identification of fine fescue selections. Unpublished – NCBI Genbank Nos: AF147135-AF147180

Trifanova A, Savova D, Ivanova K (1994) *Agrobacterium*-mediated transformation of the apple scion cultivar Granny Smith. Progress in Temperate Fruit Breedings 343-347

Tzvelev NN (1971) On the taxonomy and phylogeny of genus *Festuca* L. of the U.S.S.R. flora. I. The system of the genus and main trends of evolution. – Botanicheskij Zhurnal 56: 1252-1262.

Vancanneyt G, Schmidt R, O'Connor-Sanchez A, Willmitzer L, Rocha-Sosa M (1990) Construction of an intron-containig marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium* mediated plant transformation. Plant Science 119: 125-133

Van der Krol AR, Lenting PE, Veenstra J, van der Meer IM, Koes RE, Gerats AGM, Mol JNM, Stuitje AR (1988) An antisense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. Nature 333: 886

Van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JNM, Stuitje A (1990) Flavenoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. Plant Cell 2: 291-299

Varner JE (1961) Biochemistry of senescence. Annu. Rev. Plant Physiol. 12: 245-264

Vendrell M. McGlasson WB (1971) Inhibition of ethylene production in banana fruit tissue by ethylene treatment. Aust. J. Biol. Sci. 24: 885-895

Vogel JP, Woeste KE, Theologis A, Kieber JJ (1998) Recessive and dominant mutations in the ethylene biosynthetic gene *ACS*5 of *Arabidopsis* confer cytokinin insensitivity and ethylene overproduction, respectively. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 4766-4771

Vrebalov J, Ruezinsky D, Padmanabhan V, White R, Medrano D, Drake R, Schuch W, Giovannoni J (2002) A MADS-box gene necessary for fruit ripening at tomato Ripening-inhibitor (Rin) locus. Science 296: 343-346

Wang KLC, Li H, Ecker JR (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. The Plant Cell S131-151

Watkins GB, Nock JE, Whitaker BD (2000) Responses of early, mid and late season apple cultivars to postharvest application of 1-methylcyclopropane (1-MCP) under air and controlled atmosphere storage conditions. Postharvest Biol. Technol. 19: 17-32

Wesh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18: 7213-7218

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KL, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primes are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535

Wilkinson JQ, Lanahan MB, Yen HC, Giovannoni JJ, Klee HJ (1995) An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by Never-ripe. Science 270: 1807-1809

Welander M (1988) Plant regeneration from leaf and stem segments of shoots raised in vitro from mature apple trees. J. Plant Physiol. 132: 738-744

Welander M, Pawlicki N, Holefors A, Wilson F (1998) Genetic transformation of the apple rootstock M26 with the *Rol*B gene and its influence on rooting. J. Plant Physiol. 153 (3-4): 371-380

Xu WW, Sleper DA, Hoisington DA (1991) A survey of restriction fragment length polymorphisms in tall fescue and its relatives. Genome, 34*:* 686-692

Xu WW, Sleper DA (1994) Phylogeny of tall fescue and related species using RFLPs. Theor. Appl. Genet. 88: 685-690

Xu WW, Sleper DA, Chao S (1995) Genome mapping of polyploid tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) with RFLP markers. Theor. Appl. Genet. 91*:* 947-955

Yao JL, Cohen D, Atkinson R, Richardson K, Morris B (1995) Regeneration of transgenic plants from the commercial apple cultivar Royal Gala. Plant Cell Reports 14: 407-412

Yang SF, Hoffman NE (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher-plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 35: 155-189

Yepes LM (1990) Genetic transformation of apple and techniques for in vitro selection of regenerants resistant to *Venturia inequalis*. Ph.D thesis, Cornell University USA

Yip WK, Yang SF (1988) Cyanide metabolism in relation to ethylene production in plant tissues. Plant Physiol. 88: 473-476

Yip WK, Dong JG, Yang SF (1991) Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from apple fruits. Plant Physiol. 95:251-257

Yip WK, Moore T, Yang SF (1992) Differential accumulation of transcripts for four tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase homologs under various conditions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 2475-2479

Zarembinski TI, Theologis A (1994) Ethylene biosynthesis and action: A case of conservation. Plant Mol. Biol. 26: 1579-1597

Zeroni M, Galil J, Ben-Yehoshua S (1976) Autoinhibition of ethylene formation in non ripening stages of the fruit of sycamore fig (*Ficus Sycomorus* L.). Plant Physiol. 57: 647-650

Zhu LH, Holefors A, Ahlman A, Xue ZT, Welander M (2001) Transformation of the apple rootstock M.9/29 with *rol*B gene and its influence on rooting and growth. Plant Science 160: 433-439

M2. Alapadatok és a számítások menete

I. táblázat. A 4-es számú táblázat alapadatai

Regenerációs kísérlet 3 féle táptalajon (M26)

(Regenerálódott hajtásszám/explantum)

1. Táptalaj		2. Táptalaj		3. Táptalaj	
1. ismétlés	**2. ismétlés**	**1. ismétlés**	**2. ismétlés**	**1. ismétlés**	**2. ismétlés**
7, 3, 2, 5, 2, 6, 3, 5	3, 4, 3, 4, 4, 4, 2, 1	6, 8, 6, 5, 6, 6, 5, 6	8, 2, 7, 6, 9, 6, 7, 7	1, 4, 0, 2, 4, 5, 5, 5	3, 4, 5, 1, 3, 5, 4, 2
3, 4, 3, 2, 3, 2, 4, 4	3, 5, 5, 7, 3, 5, 7, 4	2, 2, 4, 4, 4, 7, 5, 4	5, 8, 7, 4, 3, 5, 5, 3	3, 4, 5, 4, 3, 4, 6, 2	3, 2, 4, 3, 3, 4, 3, 3
3, 3, 4, 2, 6, 4, 5, 3	4, 3, 2, 3, 4, 5, 4, 3	5, 9, 9, 7, 4, 6, 4, 6	5, 5, 6, 5, 4, 6, 6, 6	1, 3, 0, 3, 6, 2, 3, 5	3, 4, 0, 3, 3, 2, 0, 2
4, 5, 5, 6, 4, 5, 3, 3	1, 3, 2, 4, 3, 3, 3, 4	8, 6, 5, 7, 8, 6, 5, 1	5, 5, 7, 7, 4, 7, 6, 2	2, 3, 5, 6, 6, 5, 1, 4	5, 2, 2, 7, 5, 2, 5, 3
4, 5, 4, 4, 5, 4, 3, 2	3, 5, 3, 4, 2, 4, 4, 2	4, 3, 3	3, 6, 6, 7, 6	3	4, 5, 2
4, 2, 3, 4, 0	3, 3, 4, 3, 4, 5				

Regenerációs kísérlet 3 táptalajon (Royal Gala)

(Regenerálódott hajtásszám/explantum)

1. Táptalaj		2. Táptalaj		3. Táptalaj	
1. ismétlés	**2. ismétlés**	**1. ismétlés**	**2. ismétlés**	**1. ismétlés**	**2. ismétlés**
5, 4, 4, 4, 3, 3, 6, 6	2, 5, 4, 5, 3, 4, 4, 4	3, 5, 9, 3, 4, 10, 8	6, 4, 3, 7, 6, 6, 3, 8	0, 1, 1, 1, 1, 3, 0, 0	1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1
7, 6, 4, 6, 5, 3, 3, 5	4, 5, 4, 3, 5, 3, 3, 4	5, 4, 7, 6, 2, 4, 7, 5	7, 3, 2, 1, 2, 4, 7, 3	0, 0, 0, 0, 0, 0, 2, 0	1, 1, 1, 0, 0, 0, 0, 0
5, 2, 5, 4, 5, 5, 3, 2	2, 3, 4, 4, 5, 3, 3, 5	5, 4, 4, 6, 3, 5, 5, 6	4, 7, 5, 4, 4, 6, 0, 6	1, 1, 0, 0, 0, 0, 0, 0	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0
3, 4, 3, 2, 5, 3, 5, 4	3, 3, 2, 5, 4, 3, 5, 4	5, 5, 4, 8, 4, 9, 3, 4	6, 5, 5, 3, 2, 6, 7, 7	0, 0, 0, 0, 0, 1, 1, 1	0, 0, 0, 0, 0, 2, 2, 1
1, 4, 4, 3, 1, 3, 2	5, 3, 3, 5, 4, 3, 3, 5	4, 6, 7, 6, 6, 5, 6, 5	7, 4, 0, 6, 5, 7, 7, 6		1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1
	3, 4, 5, 3, 3, 4, 5, 6	6			
	5, 3, 6				

II táblázat. az 5. számú táblázat alapadatai (McIntosh)

Transzgénikus vonalak	Mért etilén (pmol)	Átlag (pmol)	Almák tömege (g)	Nettó térfogat (ml)	C_2H_4 (nmol/100g/h)	Oldható anyagok (°Brix)	Keménység (Newton)
2-20 TM474	16973,85	17006,91	489,55	1610,45	**233,11**	16,1	37,87
	17039,97						
2-21 TM554	16919,12	16908,70	436,68	1663,32	**268,36**	15,6	48,31
	16898,28						
2-28 TM579	4848,89	4846,24	217,41	1882,59	**174,85**	15,7	51,44
	4843,58						
2-46 TM597	3519,70	3541,78	210,20	1889,80	**132,68**	14,7	54,61
	3563,85						
2-47 TM553	27822,47	27768,68	413,10	1686,90	**472,47**	16,5	62,10
	27714,88						
2-48 TM597	17730,98	17732,02	511,32	1588,68	**229,56**	16,7	59,92
	17733,05						
2-49 TM551	9776,68	9801,60	212,80	1887,20	**362,19**	16,7	47,17
	9826,51						
2-50 TM555	12529,20	12565,47	537,81	1562,19	**152,08**	15,8	44,86
	12601,74						
2-51 TM554	10988,12	11067,72	478,34	1621,66	**156,34**	15,4	54,60
	11147,31						
2-54 TM579	13712,17	13783,54	558,70	1541,30	**158,44**	16,8	39,14
	13854,90						
2-56 TM597	5603,67	5610,68	411,16	1688,84	**96,02**	15,4	57,74
	5617,69						

2-119 TM558	5503,97 5478,36	5491,17	515,94	1584,06	**70,25**	14,9	48,31
2-57 TM474	15153,23 15012,13	15082,68	445,53	1654,47	**233,37**	16,2	50,41
2-58 TM555	27319,99 27289,61	27304,80	555,96	1544,04	**315,97**	14,7	49,35
2-59 TM586	20156,38 20033,97	20095,18	480,90	1619,10	**281,90**	14,8	47,17
2-70 TM579	12572,19 12498,23	12535,21	511,75	1588,25	**162,10**	15,0	51,44
2-71 TM589	14673,03 14886,33	14779,68	380,97	1719,03	**277,87**	16,9	39,14
2-72 TM589	13233,39 13343,49	13288,44	557,09	1542,91	**153,35**	16,1	43,73
2-149 TM475	20468,95 20563,21	20516,08	205,15	1894,85	**789,56**	14,5	54,61
2-151 TM598	7540,31 7490,48	7515,40	459,52	1640,48	**111,79**	16,4	47,17
2-165 TM474	9886,58 9756,11	9821,35	495,70	1604,30	**132,44**	14,0	52,50
2-175 TM574	3324,18 3323,42	3323,80	236,40	1863,60	**109,18**	13,8	50,41
2-184 TM553	22119,47 22033,23	22076,35	463,54	1636,46	**324,74**	15,7	48,31
2-128 TM557	8303,45 8215,17	8259,31	384,81	1715,19	**153,39**	15,3	51,44
2-189 TM558	16734,80 16612,10	16673,45	406,90	1693,10	**289,07**	15,2	50,41
2-192 TM503	14964,70 14813,17	14888,94	418,80	1681,20	**249,04**	14,5	55,75
2-198 TM599	11596,35 11413,70	11505,03	255,80	1844,20	**345,61**	16,7	48,31
2-208 TM563	11753,67 11904,57	11829,12	344,99	1755,01	**250,73**	14,3	54,61
2-235 TM578	11801,11 11666,04	11733,58	398,97	1701,03	**208,44**	15,1	39,14
3-190 TM610	25726,79 25545,33	25636,06	462,40	1637,60	**378,29**	14,1	65,36
3-194 TM588	18213,87 18347,43	18280,65	434,50	1665,50	**291,97**	15,3	44,86
3-195 TM581	16159,33 15987,70	16073,52	302,80	1797,20	**397,50**	14,9	46,02
3-197 TM556	19094,31 18715,13	18904,72	506,80	1593,20	**247,62**	17,5	58,88
3-191 TM611	14179,55 14355,58	14267,57	504,24	1595,76	**188,13**	15,6	51,44
3-200 TM610	21759,69 21545,98	21652,84	490,40	1609,60	**296,12**	16,0	74,84
3-201 TM504	16577,62 16358,58	16468,10	423,28	1676,72	**271,81**	15,7	48,31
3-202 TM581	17071,92 16952,59	17012,26	436,73	1663,27	**269,96**	13,2	63,20
3-204 TM556	10690,85 10547,54	10619,20	503,60	1596,40	**140,26**	15,7	43,73

3-205 TM581	20713,84 20651,13	20682,49	468,77	1631,23	**299,88**	12,5	50,41
3-207 TM556	6498,28 6415,48	6456,88	287,85	1812,15	**169,37**	16,7	54,61
3-221 TM610	20730,52 20859,41	20794,97	479,00	1621,00	**293,22**	16,1	74,84
? ANONYMUS ?	15403,16 15366,63	15384,90	460,27	1639,73	**228,37**	14,0	48,31
15-44 TM474	17715,81 17529,66	17622,74	377,40	1722,60	**335,15**	17,1	58,88
9-23 TM562	13410,38 13284,80	13347,59	361,94	1738,06	**267,07**	13,4	68,36
15-14 TM475	14287,71 14339,96	14313,84	333,04	1666,96	**298,52**	17,9	69,38
9-44 TM562	1775,53 1791,69	1783,61	131,18	1868,82	**105,87**	15,3	66,36
15-20 TM475	4244,86 4181,65	4213,26	182,72	1817,28	**174,60**	16,4	66,36
1-16 TM838	23196,84 23316,70	23256,77	467,95	1532,05	**317,26**	15,8	62,10
1-18 TM834	11268,80 11166,10	11217,45	306,43	1693,57	**258,32**	15,3	50,41
15-37 TM503	20747,90 20636,17	20692,04	463,80	1536,20	**285,57**	14,1	65,36
1-2 TM836	26650,88 26493,05	26571,97	504,26	1595,74	**350,36**	14,2	54,61
15-11 TM475	25419,49 25302,14	25360,82	388,85	1611,15	**437,83**	17,2	54,61
1-4 TM834	28232,28 28107,31	28169,80	436,00	1664,00	**447,96**	15,1	48,31
1-19 TM838	13918,63 14196,48	14057,56	465,61	1634,39	**205,60**	16,3	53,52
15-46 TM503	7168,53 7134,25	7151,39	317,40	1682,60	**157,96**	15,7	66,36
Az 5 kontroll fa átlaga:					**253,76**	15,4	50,41

III táblázat. az 5. számú táblázat alapadatai (Royal Gala)

Transzgénikus vonalak	Mért etilén (pmol)	Átlag (pmol)	Almák tömege (g)	Nettó térfogat (ml)	C_2H_4 (nmol/100g/h)	Oldható anyagok (°Brix)	Keménység (Newton)
3-9 TG196	2563,99 2497,91	2530,95	485,10	1614,90	**35,11**	16,3	95,26
3-6 TG198	5823,48 5849,56	5836,52	441,43	1658,57	**91,37**	16,2	75,98
3-40 TG198	5293,76 5262,42	5278,09	507,81	1592,19	**68,95**	16,6	82,78
3-60 TG213	19067,15 18897,23	18982,19	481,88	1518,12	**249,17**	15,0	58,86
3-81 TG213	18848,77 18787,96	18818,37	484,70	1615,30	**261,31**	14,4	73,71
3-93 TG213	21658,38 21736,52	21697,45	508,96	1591,04	**282,61**	16,1	66,36

3-93 TG213	18730,19 18688,05	18709,12	532,06	1567,94	**229,73**	17,4	69,38
3-19 TG214	12847,28 12908,96	12878,12	488,10	1611,90	**177,20**	14,7	69,38
3-63 TG214	8980,65 8915,95	8948,30	513,85	1586,15	**115,09**	17,1	64,27
3-24 TG215	21568,42 21479,26	21523,84	423,20	1676,80	**355,34**	15,4	66,36
3-26 TG215	11089,01 11063,67	11076,34	459,27	1640,73	**164,87**	15,2	72,39
3-30 TG215	9902,86 9778,52	9840,69	393,59	1706,41	**177,77**	15,4	73,39
3-62 TG217	12013,64 11965,13	11989,39	466,08	1633,92	**175,13**	16,4	66,36
3-77 TG217	16933,53 16793,13	16863,33	520,24	1579,76	**213,36**	14,4	64,27
3-79 TG217	15469,24 15610,62	15539,93	492,39	1607,61	**211,40**	14,4	63,20
3-61 TG218	17515,86 17499,69	17507,78	488,95	1611,05	**240,36**	16,1	66,36
3-95 TG220	7726,46 7665,11	7695,79	523,97	1576,03	**96,45**	15,7	73,71
3-3 TG231	9945,99 9893,72	9919,86	506,04	1493,96	**122,02**	15,4	78,25
3-31 TG231	12151,94 12013,56	12082,75	528,15	1471,85	**140,30**	16,6	72,39
3-32 TG231	10061,09 9956,60	10008,85	572,20	1527,80	**111,35**	16,0	71,38
3-51 TG231	4420,80 4538,84	4479,82	544,62	1555,38	**53,31**	12,1	56,70
3-32 TG232	14268,92 14125,49	14197,21	407,60	1692,40	**245,62**	14,8	63,20
3-52 TG232	19024,91 18926,54	18975,73	571,74	1528,26	**211,34**	15,7	65,36
3-68 TG232	15008,73 14914,68	14961,71	473,90	1626,10	**213,91**	16,2	63,20
3-92 TG232	22752,14 22446,69	22599,42	494,33	1605,67	**305,86**	14,2	70,35
3-69 TG233	12061,36 12058,37	12059,87	386,80	1713,20	**222,56**	16,9	69,38
3-70 TG233	5746,98 5544,88	5645,93	414,20	1685,80	**95,75**	16,5	70,35
3-18 TG234	13953,53 14075,11	14014,32	493,24	1606,76	**190,22**	16,0	74,84
3-64 TG234	18017,44 17903,17	17960,31	455,83	1544,17	**253,51**	16,1	74,84
3-66 TG234	12468,81 12440,51	12454,66	427,24	1672,76	**203,18**	15,4	66,36
3-20 TG235	4336,05 4535,09	4435,57	467,45	1632,55	**64,55**	16,6	67,37
3-80 TG235	24697,20 24412,13	24554,67	515,90	1584,10	**314,15**	14,6	62,10
3-35 TG236	926,53 885,57	906,05	414,07	1685,93	**15,37**	17,0	94,12

3-50 TG239	9224,06 9209,40	9216,73	480,90	1619,10	**129,30**	16,9	71,38
3-82 TG239	14642,11 14554,71	14598,41	556,00	1544,00	**168,91**	13,6	49,35
3-82 TG239	17394,27 17376,70	17385,49	503,28	1596,72	**229,82**	15,0	57,74
3-83 TG240	11906,57 11811,09	11858,83	517,00	1583,00	**151,29**	14,6	65,36
3-83 TG240	12118,09 11972,00	12045,05	450,67	1649,33	**183,67**	14,5	70,35
3-11 TG507	2441,30 2501,60	2471,45	480,10	1619,90	**34,75**	20,0	73,39
3-54 TG507	16671,27 16508,08	16589,68	417,01	1682,99	**278,97**	13,6	62,10
3-56 TG507	13303,00 13296,36	13299,68	486,20	1613,80	**183,94**	16,4	69,38
3-72 TG507	13918,95 13813,94	13866,45	429,30	1670,70	**224,85**	14,6	67,37
3-72 TG507	20519,79 20360,81	20440,30	450,20	1649,80	**312,11**	13,3	66,36
15-32 TG508	206,49 206,85	206,67	241,14	1858,86	**6,64**	22,8	111,13
3-94 TG508	347,97 340,27	344,12	221,42	1778,58	**11,52**	17,8	105,46
3-87 TG509	22618,44 22449,56	22534,00	531,32	1568,68	**277,21**	12,6	58,88
3-87 TG509	18590,09 18447,42	18518,76	449,00	1651,00	**283,73**	13,6	67,37
Az 5 kontroll fa átlaga:					**230,31**	16,4	89,59

Az etilén érték kiszámítása: Az előzetesen megmért gyümölcsöket (3-3 db vonalanként) 2100 ml-es edényekbe helyeztük és lezártuk 24 órára. Feltételeztük, hogy 1 g alma 1 ml levegőt szorít ki, így a 2100 ml-ből az almák tömegét levonva megkaptuk a nettó térfogatot. Pontosan 24 óra elteltével a lezárt edényből 1 ml-t fecskendeztünk a gázkromatográfba, és mértük a gáz etilén tartalmát (pmol). Ezt a lépést megismételtük és a két értékből átlagot számítottunk. A kapott eredményt megszoroztuk a nettó térfogattal és elosztottuk 24-gyel, így megkaptuk, hogy a gyümölcsök egy óra alatt mennyi etilént termeltek (nmol). Ezt az értéket 100-zal szorozva és elosztva az almák tömegével, megkaptuk, hogy 100 g alma egy óra leforgása alatt mennyi etilén gázt termelt (nmol/100g/h).

Példaszámítás:

Minta: TG 196-os vonal almák tömege: 485.10g

2100 ml – 485.10 g≈ml = 1614.9 ml

1614.9 ml X 2530.95 pmol : 24 = 170301.3 pmol/1h = 170.3013 nmol/1h

170.3013 X 100 / 485.10 = <u>35.11 nmol/100g/h</u>

Az ACS enzimaktivitás kiszámítása:
Elsőként ismert ACC koncentrációjú oldatsorozat segítségével kiszámítottuk azt a képletet, amelybe a későbbiekben ismeretlen ACC koncentrációjú oldatok etilén értékeit helyettesítve, a kiindulási ACC mennyiséget meghatározhatjuk. Ehhez 3 törzsoldatot készítettünk: (Az ACC molekula tömege 101.1 g/mol)

1. törzs (2 µmol/ml): 4.044 mg ACC-t 20 ml bidesztvízben feloldottunk.
2. törzs (200 nmol/ml): Az 1. törzsből 1 ml-t 10 ml-re hígítottunk bidesztvízzel
3. törzs (2 nmol/ml): A 2. törzsből 1 ml-t 10 ml-re hígítottunk bidesztvízzel

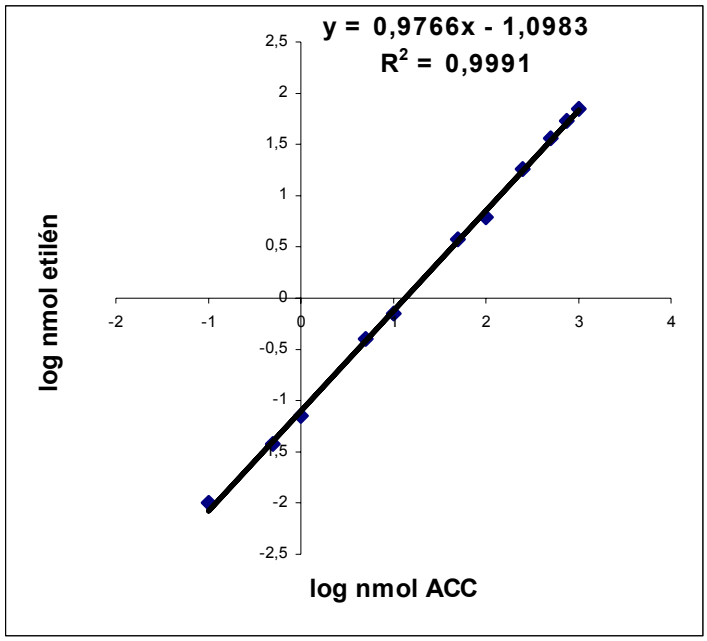
A három törzs segítségével 10 pmol-tól 1 µmol-ig különböző ACC koncentrációjú oldatokat készítettünk

IV. táblázat. Standarizálás az etilén ⇒ ACC átszámításhoz.

	mol ACC	ACC törzs (µl)	Víz (µl)	$HgCl_2$	NaOH+ NaOCl	Etilén pmol/ml 1. ismétlés	2. ismétlés	Átlag (nmol)
3. törzsből	0.01	5	595	300 µl (1 µmol / 300 µl)	5% NaOCl és telített NaOH 2:1 arányú keverékéből 100 µl	2.09	2.26	0.002175
	0.05	25	575			5.99	7.39	0.00669
	0.1	50	550			9.93	10.04	0.009985
	0.5	250	350			36.19	39.5	0.037845
	1	500	100			71.48	70.98	0.07123
2. törzsből	5	25	575			410.26	389.82	0.40004
	10	50	550			693.9	716.6	0.70525
	50	250	350			3734.03	3831.81	3.78292
	100	500	100			6131.85	6208.11	6.16998
1.törzsből	250	125	475			17996.2	18196.88	18.09654
	500	250	350			36234.22	36348.77	36.291495
	750	375	225			53808.29	53639.3	53.723795
	1000	500	100			69707.18	70397.98	70.05258

A kapott etilén és ismert ACC értékek logaritmusait koordináta rendszerben ábrázoltuk, majd lineáris regressziót illesztettünk rá. Az így nyert standardizált egyenes egyenletébe beillesztve ismeretlen koncentrációjú ACC-t tartalmazó „fehérjekoktélból" mért etilénértéket, az ACC mennyiség kiszámíthatóvá válik.

nmol ACC	log ACC	log C_2H_4
0.1	-1	-2
0.5	-0,3	-1,422
1.0	0	-1,147
5.0	0,6989	-0,398
10.0	1	-0,1516
50.0	1,6989	0,5715
100.0	2	0,7903
250.0	2,3979	1,2576
500.0	2,6989	1,5598
750.0	2,875	1,7302
1000.0	3	1,8454



Ezt követően Yip et al. (1991) módszerével összfehérjét izoláltunk 20-20 g gyümölcshúsból minden egyes transzgénikus vonal esetében 5-5 ml végtérfogatban. A fehérje tartalmat Bradford teszttel határoztuk meg 595 nm-en mérve. Ezt követően Lizada és Yang

(1979) módszerét követve 0.2 ml összfehérje izolátumból meghatároztuk a teszt hatására felszabaduló etilén tartalmat gázkromatográffal, amelyből a fehérje frakció ACC tartalmát kiszámíthattuk az y=0.9766x-1.0983 képlet segítségével.

Példaszámítás:
Minta: TG 196-os vonalból 20 g gyümölcshús, melyből 5 ml végtérfogatban összfehérjét izoláltunk, melynek a Bradford teszttel meghatározott fehérje tartalma 0.11 mg/ml volt. Az izolátumból 0.2 ml minta átlagosan 20.02 pmol etilént termelt a teszt során. Ez 20 g mintára számítva = 20.02 X 25 (5 ml / 0.2 ml) = 500.5 pmol, 1 g mintára pedig = 500.5 / 20 = 25.025 pmol. A következő lépés kiszámítani az ismert képlet alapján, hogy ez mennyi ACC-nek felel meg.
log(25.025/1000) = log0.9766x-1.0983 x = 0.3052 nmol ACC
Tehát 1 g gyümölcshúsban 0.3052 nmol ACC van. Végül ki kell számítanunk, hogy 1 mg fehérje mennyi ACC termeléséért felelős:
0.3052 : (0.55 / 20) = <u>11.098 nmol ACC/mg fehérje</u>

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Témavezetőimnek, Dr. Kiss Erzsébetnek és Dr. Heszky Lászlónak először is hálásan köszönöm a belém vetett bizalmukat, hogy lehetőséget biztosítottak a disszertációban tárgyalt tudományos témakörök kutatásához. Köszönöm továbbá a kísérletek tervezésében, kivitelezésében és tudományos nyelven történő értékelékelésükben nyújtott segítségüket, melyek mellett nagyfokú önállóságot is biztosítottak munkámban.

Köszönettel tartozom Dr. Imre Tamásnak és Dr. Géza Hrazdinának, hogy amerikai tanulmányutaim során magasszintű szakmai irányításom mellett segítettek a minél könnyebb beilleszkedésben is.

Köszönöm Dr. Penksza Károlynak a *Festuca* fajok azonosításában és mintagyűjtésükben, valamint a kísérletek kiértékelésében nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom Dr. Dobránszky Juditnak, Dr. Gémesné Juhász Anikónak, Dr. Gyulai Gábornak, Dr Törjék Ottónak, Dr Kiss Józsefnek, Kondrák Mihálynak és Dr. Bucherna Nándornak értékes szakmai javaslataikért és baráti támogatásukért. Köszönöm továbbá Dr. Bálint Andornak, hogy saját értékes könyvtárából mindig rendelkezésemre bocsátotta a számomra szükséges könyveket.

Köszönöm a nyugodt, baráti és inspiratív munkahelyi légkör megteremtését és mindig áldozatkész segítségét a tanszék minden dolgozójának: Dr. Hajósné Novák Mártának, Dr. Mázikné Tőkei Katalinnak, Dr. Bellusné Daniek Ágnesnek, Katona Melindának, Tóth Péternének, Bakos Györgynének, Ócsai Sándornének, Veres Anikónak, Balogh Andreának, Debreceni Diánának, Szőke Antalnak, Szabó Zoltánnak, Füle Lórántnak és Bittsánszky Andrásnak. Külön szeretném kiemelni Ádám Zoltánné -Stefi nénit-, akinek segítségéért és lelkesítő szavaiért sokat köszönhetek.

Köszönöm feleségemnek és szüleimnek a lankadatlan támogatást, megértést és bizalmat, valamint az általuk kialakított nyugodt családi légkört melyet a hosszúra nyúlt tanulóéveim alatt mindvégig élvezhettem.

Köszönöm a Magyar Állami Eötvös Ösztöndíj Bizottságnak, valamint a Fulbright hivatalnak, hogy külfödi útjaimhoz ösztöndíjakat biztosítottak számomra.

A kísérleteinket az alábbi pályázatok támogatták: OTKA T26502, T37861, M36630, TS040887, FKFP 380/2000.