SZENT ISTVÁN EGYETEM

A fruktóz 2,6-biszfoszfát koncentráció módosításának hatása a szegfű szénhidrát anyagcseréjére

Doktori értekezés

Szőke Antal

Gödöllő

2007

A doktori iskola

Megnevezése: Növénytudományi Doktori Iskola

Tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

Vezetője: Dr. Virányi Ferenc
Egyetemi tanár, az MTA doktora
SZIE, Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar,
Növényvédelmi Tanszék

Témavezető: Dr. Kiss Erzsébet
Egyetemi tanár, a mezőgazdasági tudomány kandidátusa
SZIE, Mezőgazdaság és Környezettudományi Kar
Genetika és Biotechnológiai Intézet

....

Az iskolavezető jóváhagyása A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK ... 3
Rövidítések jegyzéke ... 5
1. Bevezetés és célkitűzés ... 7
1.1. A téma aktualitása ... 7
1.2. Célkitűzések ... 8
2. Irodalmi áttekintés ... 9
2.1. A szénhidrát metabolizmus jelentősége ... 9
2.2. A keményítő bioszintézise és szabályozása ... 9
2.3. Szacharóz anyagcsere ... 11
2.4. A fruktóz 2,6-biszfoszfát élettani szerepe ... 12
2.5. A fruktóz 2,6-biszfoszfát szintézise és lebontása ... 14
2.6. A fru 2,6P2 szabályozó szerepe a szacharóz és a keményítő szintézisben ... 16
2.7. A kloroplasztisz és a citoplazma szénhidrát-anyagcseréjének integrációja ... 17
2.8. A szénhidrát anyagcsere módosításának lehetőségei ... 18
2.9. Keményítő módosítás ... 19
2.10. Fruktántermelő transzgénikus növények ... 21
2.11. Dextrántermelő transzgénikus növények ... 22
2.12. A fruktóz 2,6-biszfoszfát koncentrációjának módosítása ... 22
2.13. A szegfű rendszertana és biológiája ... 24
2.14. A szegfű nemesítése és genetikája ... 24
2.15. A szegfű növényregenerációs rendszere ... 26
2.16. A szegfű transzformációs rendszere ... 27
2.17. Transzgénikus szegfű ... 27
3. Anyagok és módszerek ... 30
3.1. Növényanyag ... 30
3.2. Sejtgenetikai és szövettenyésztési módszerek ... 30
3.3. A transzformációra felhasznált gének ... 30
3.4. A transzformációra felhasznált vektorok ... 31
3.5. A szegfű transzformációja ... 31
3.5.1. Az Agrobacterium előkészítése ... 31
3.5.2. Transzformáció ... 32
3.5.3. Növényregeneráció és szelekció ... 32
3.6. A növények kiültetése, nevelése ... 32
3.7. Nukleinsav izolálás ... 32
3.8. PCR ... 33

3.9. RT-PCR 33
3.10. Southern hibridizáció 33
3.11. Biokémiai és élettani mérések 34
3.11.1. Fruktóz 2,6-biszfoszfát 35
3.11.2. Enzimaktivitások 35
3.11.3. Szénhidrátok és foszforilált intermedierek 36
3.11.4. Gázcsere mérések 37
3.11.5. Klorofill tartalom 38
3.11.6. A vázaélettartam mérése 38
3.12. A szárszilárdság mérése 39
3.13. Statisztikai értékelés 39
4. Eredmények és megvitatásuk 40
4.1. Növénytranszformáció, szelekció 40
4.2. Transzformációs hatékonyság 41
4.3. A transzgén integrációjának és működésének bizonyítása 42
4.4. A transzgénikus növények biokémiai és élettani vizsgálata 44
4.4.1. Fruktóz 2,6-biszfoszfát 45
4.4.2. Enzimaktivitások 47
4.4.3. Szénhidrátok és foszforilált intermedierek 49
4.4.4. Fotoszintézis 52
4.4.5. Klorofill tartalom meghatározása 55
4.4.6. Növekedés, fejlődés 55
4.5. Gazdasági értékmérő tulajdonságok 59
4.5.1. Virágzás, virágszín, virágmorfológia 59
4.5.2. Vázaélettartam 60
4.5.3. Szárszilárdság 61
4.6. Új tudományos eredmények 62
5. Következtetések és javaslatok 63
6. Összefoglalás 65
Summary 68
7. Mellékletek 70
M1. Irodalomjegyzék 70
M2. Hibridizációs oldatok 86
M3. Alapadatok 87
Köszönetnyilvánítás 91

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2PGA	2-foszfoglicerinsav
3PGA	3-foszfoglicerinsav
6PF2K	6-foszfofrukto-2-kináz
ADP	adenozin 5-difoszfát
ADP glu	ADP glükóz
AGPáz	ADP-glükóz pirofoszforiláz
ATP	adenozin 5-trifoszfát
BSA	szarvasmarha (bovin) szérum albumin
CAM	crassulacean acid metabolism
cAMP	ciklikus adenozin-monofoszfát
CaMV35S	karfiol mozaik vírus promoter
cDNS	copy DNS
DHAP	dihidroxiaceton foszfát
dNTPs	dezoxinukleotid-trifoszfátok
DTT	1,4-dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	etilén-diamin tetra-ecetsav
EGTA	etilén-glikol-bisz(ß-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetra-ecetsav
F406, F407	funkcionális fruktóz 2,6 biszfoszfatázt expresszáló transzgénikus növények
FBPáz	fruktóz 1,6-biszfoszfatáz
Fru 1,6P2	fruktóz 1,6-biszfoszfát
Fru 2,6P2	fruktóz 2,6-biszfoszfát
Fru 2,6P2áz	fruktóz 2,6-biszfoszfatáz
Fru 6P	fruktóz 6-foszfát
GBSS	szemcséhez kötött keményítő szintáz (**G**ranule **B**ound **S**tarch **S**ynthase)
Glu 1P	glükóz 1-foszfát
Glu 6P	glükóz 6-foszfát
Hepes	4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etánszulfonsav
IWS	Improved White Sim szegfűfajta
K	nem transzformált kontroll növény

kDA	kiloDalton
MS	Murashige-Skoog táptalaj
NAD^+	nikotinsavamid-adenin dinukleotid
NADH	redukált nikotinsavamid-adenin dinukleotid
NADP	nikotinsavamid-adenin dinukleotid foszfát
NPT II	neomicin foszfotranszferáz
P207, P228	funkcionális 6-foszfofrukto-2-kinázt expresszáló transzgénikus növények
PCR	polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction)
PEP	foszfoenol piruvát
PFP	pirofoszfát függő foszfofrukto-kináz
PFK	6-foszfofrukto-1-kináz
Pi	szervetlen foszfát
PPi	pirofoszfát
RT-PCR	reverz transzkriptáz PCR
Ru 1,5P2	ribulóz 1,5-biszfoszfát
SBE	keményítő elágazási enzim (**s**tarch **b**ranching **e**nzyme)
SSS	oldható keményítő szintáz
tDNS	transzfer DNS
TPT	triózfoszfát transzlokátor
UDP glu	UDP glükóz

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

1.1. A téma aktualitása

Az utóbbi évtizedekben a hagyományos növénynemesítés az új fajták előállítása során egyre inkább támaszkodhat a biotechnológiai kutatások eredményeire is. Az egyes növényfajok genomjának szekvenálása csak az első lépés a növényélettani folyamatok molekuláris hátterének megértéséhez. A következő lépcső az izolált gének funkciójának vizsgálata knock-out mutánsokban (T-DNS, transzpozon mutagenezis) vagy transzgénikus növényekben. Az így szerzett ismeretek lehetővé tehetik az egyes tulajdonságok célzott megváltoztatását, javítását, új tulajdonságok kialakítását. Ennek legfontosabb területei a terméshozam növelés, beltartalmi értékek javítása, ipari alapanyagok és speciális molekulák előállítása, hatékonyabb vízfelhasználás, jobb post-harvest minőség, biotikus és abiotikus stresszrezisztencia lehetnek.

A dísznövények nemesítésében is kiemelt szerepet kaphat a biotechnológia, mivel a genetikai háttér a keresztezéses nemesítésben az új tulajdonságok kialakítására korlátozott, illetve sok dísznövény steril.

A szegfű a rózsa, a gerbera és a krizantém mellett a legkedveltebb vágott virág világszerte. A kereskedelmi forgalomban lévő fajtákat három kivételével (Florigene) klasszikus nemesítési módszerekkel állították elő. A nemesítési programok legfontosabb célja a vázaélet, a károsítókkal szembeni rezisztencia, az illatanyagok növelése, a virágszín- és szerkezet javítása, módosítása. A szegfű életfolyamatainak molekuláris hátterét még alig vizsgálták. Ezen a területen elsősorban az etilén szerepét tisztázták a virágok öregedés-élettanában, valamint a virágok pigment és illatanyag szintézisének molekuláris hátterét, rezisztencia génekkel kapcsolt markereket, illetve a virágok szerkezetével kapcsolt molekuláris markereket írtak le.

A növények a szénhidrátokat a napfény, a légköri CO_2 és a víz felhasználásával folyamatosan megújuló erőforrásainkká tették. Ezért napjainkra a szénhidrát anyagcserével és a benne résztvevő enzimekkel és szabályozó molekulákkal kapcsolatban sok új eredmény született.

Az egyik ilyen új mérföldkő a fruktóz 2,6-biszfoszfát (fru 2,6P2) szignál metabolit felfedezése és funkciójának megismerése volt a növényekben. Ez a molekula központi szerepet tölt be a fotoszintetikus CO_2 fixációjában és a szacharóz szintézis koordinálásában, valamint a megkötött szén elosztásának szabályozásában a keményítő és a szacharóz szintézis között.

A szegfű szénhidrát anyagcseréjéről kevés információ áll rendelkezésünkre, annak ellenére, hogy produktivitásának az egyik legfontosabb tényezője a fotoszintézis és a szénhidrát anyagcsere. A szénhidrát összetétel és az elérhető szacharóz mennyisége befolyásolhatja a növények növekedését, a virágzási időt és az anyanövényenkénti virágzó hajtások számát is, vágott virágként pedig a vázaélettartamot.

A fru 2,6P2 szénhidrát-anyagcserében betöltött szabályozó szerepét korábban már különböző modellnövényekben (dohány, *Arabidopsis*, burgonya) vizsgálták. Ezekben a növényekben az alapvető funkciója hasonló volt, azonban bizonyos eltérések rámutattak a fajok közötti különbségekre is. Transzgénikus dohányban a fru 2,6P2 koncentrációjának növelése a szacharóz szintézis rovására fokozta a keményítő akkumulációját és éjszaka csökkentette a tranziens keményítő lebontásának mértékét a kloroplasztiszban. *Arabidopsis*-ban, burgonyában és dohányban a fru 2,6P2 mennyiségének csökkentése a szacharóz szintézis irányába tolta el a szénhidrát anyagcserét. *Arabidopsis*-ban 20-30%-kal nőtt a szacharóz tartalom és késleltette a keményítő felhalmozódását. Burgonyában és dohányban ez az extra szacharóz hidrolizált és hexózok formájában akkumulálódott a levelekben. Ezek a kísérletek is igazolták, hogy a fru 2,6P2 szignál metabolit endogén koncentrációjának módosításával (az ún. kulcsenzim stratégia mellett) képesek lehetünk a szénhidrát anyagcsere komplex befolyásolására és célzott módosítására.

1.2. Célkitűzések

A fenti ismeretek alapján szegfű kísérleti rendszerünkben a következő célokat tűztük ki:

- a fruktóz 2,6-biszfoszfát szabályozó szerepének tisztázása a szegfű szénhidrát anyagcseréjében;
- ennek érdekében olyan transzgénikus szegfűvonalak előállítása, amelyekben géntechnológiai úton módosítjuk a fruktóz 2,6-biszfoszfát koncentrációját a lebontásáért és szintéziséért felelős gének heterológ expressziójával;
- a transzgénikus szegfűvonalak biokémiai (szénhidrát komponensek, enzim aktivitások) és élettani (fotoszintézis, növekedés) jellemzése;
- a szénhidrát anyagcserében módosított szegfűk fontosabb gazdasági tulajdonságainak értékelése (virágzás, virágszín, vázaélettartam).

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A szénhidrát metabolizmus jelentősége

A földi élet alapja a fotoszintetizáló szervezetek (növények, algák, cyanobaktériumok) által termelt oxigén és a napfény energiájának megkötése különböző szénhidrátokban, illetve nagy energiájú molekulákban. A fotoszintézis eredményeként molekuláris oxigén szabadul fel és az atmoszférából CO_2 kötődik meg, amelyet a növények a fennmaradásukhoz és növekedésükhöz szükséges szerves anyagokká alakítanak át.

A fotoszintézis két szakaszra osztható: a fény szakaszban kötődik meg a napfény energiája ATP és NADH formájában, míg a sötét szakaszban az asszimilált CO_2 redukciója történik meg a Calvin-Benson ciklusban (LEEGOOD, 1996). A kloroplasztiszban a CO_2 elsődlegesen trióz foszfátok formájában kötődik meg az ATP hidrolíziséből származó energia segítségével.

A legtöbb növényben a fotoszintézis elsődleges terméke a szacharóz és a keményítő. Az elsődlegesen szintetizált trióz foszfátok egy része a citoplazmába szállítódik és a növekedéshez, fejlődéshez szükséges végtermékekké alakul át (szacharóz, aminosavak, fehérjék, nukleotid trifoszfátok, stb.). A trióz foszfátok másik része a kloroplasztiszban közvetlenül keményítő és zsírsavak szintézisére fordítódik (DENNIS et al., 1997). Ezek a mechanizmusok a növényekben komplex feed-back és feed-forward szabályozás alatt állnak (OBIADALLA ALI, 2003).

A szénhidrátok folyamatosan megújuló természetes erőforrások, melyek a bioszférában gyakorlatilag korlátlan mennyiségben rendelkezésre állnak. Molekulatömegük és polimerizációs fokuk alapján alapvetően két csoportba oszthatók: a nagy molekulájú poliszacharidokra (keményítő, fruktánok, cellulóz, hemicellulóz) és a kis molekulájú mono-, di- és oligoszacharidokra (glükóz, fruktóz, szacharóz, trehalóz, galaktóz, stb.). A keményítő és egyes növénycsaládokban a fruktánok (Gramineae, Compositae, Liliaceae, Ranunculaceae) a szén és az energia tárolt formái. A cellulóz a növények sejtfalát és szilárd vázát biztosítja. A szacharóz a növényen belül a szén és az energia transzport formája, a vakuolumban raktározódhat, fontos ozmoprotektáns.

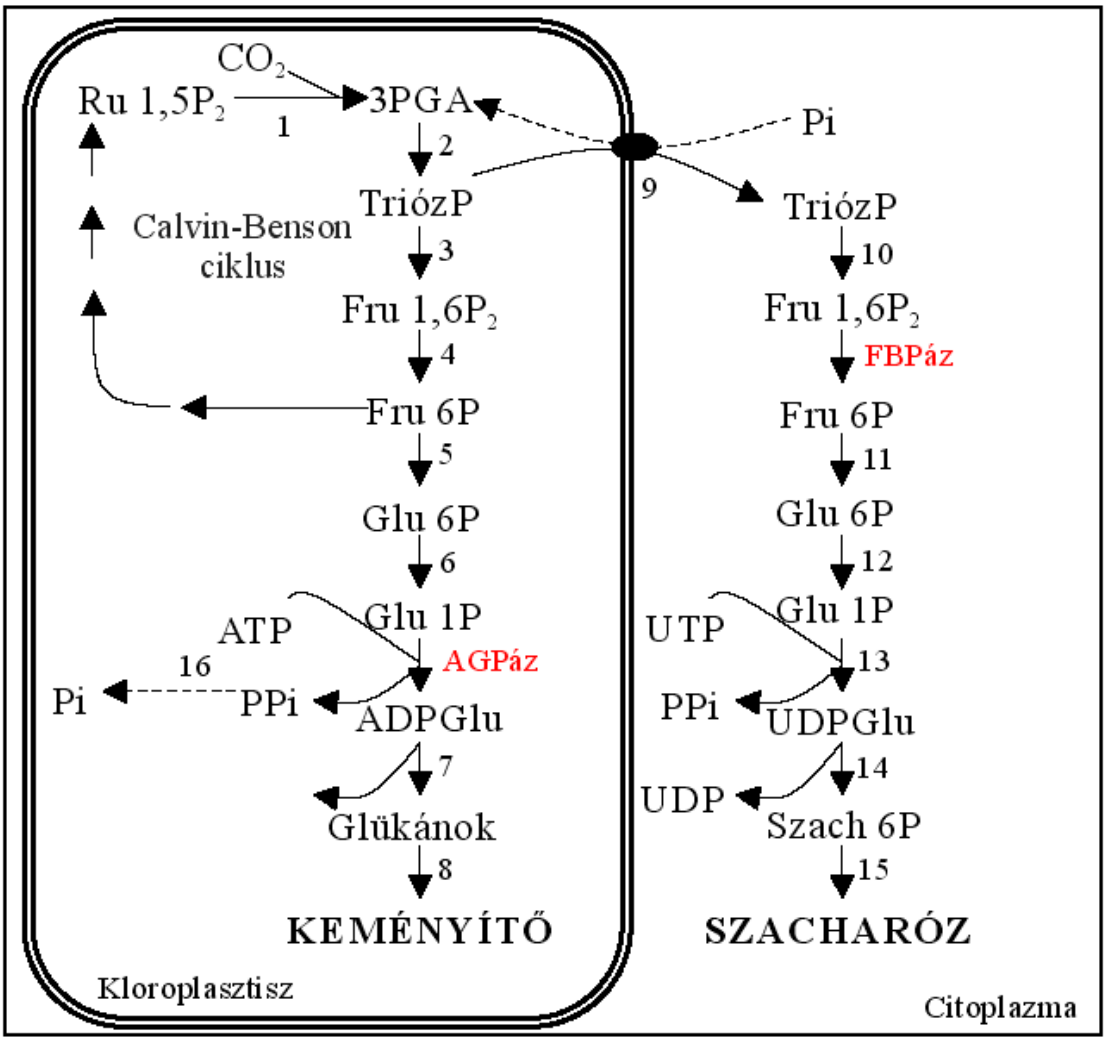
2.2. A keményítő bioszintézise és szabályozása

A legtöbb növényfajban a szén és az energia nagy része keményítő formájában raktározódik. A cellulóz után a második legnagyobb mennyiségben előforduló szénhidrátforma a bioszférában (BLENNOW et al., 2002). Polimer szerkezetének köszönhetően kevesebb vizet köt meg és kisebb az ozmotikus nyomása, mint a mono- és oligoszacharidoknak (KOLBE, 2005).

Kémiailag nem egységes, benne a glükóz egységek α-1,4 és α-1,6 kötéssel kapcsolódhatnak. A plasztiszokban 50-100 μm hosszúságú szemcséket alkotnak (GALLANT et al., 1997), melyek két

fő alkotója az amilóz és az amilopektin. Az amilopektin (növényfajtól függően a keményítő 70-75%-a) elágazó láncokból áll, a poliszacharid helikális szerkezetét biztosítja, míg az amilóz (az össz keményítő 25-30%-a) főként lineáris glükóz (~1000 db/lánc) egységekből épül fel.

A keményítő szintézise viszonylag egyszerű folyamat (KOLBE, 2005), a 1. ábrán mutatjuk be.



1. ábra: A keményítő és a szacharóz bioszintézise (Kolbe, 2005). Piros színnel jelöltük a két folyamat kulcsenzimét, amelyek aktivitását a fru 2,6P2 direkt (FBPáz) vagy indirekt (AGPáz) módon szabályozza. 1 – Rubisco, 2 – 3PGA kináz és NADP-GAPDH, 3 és 10 – fru 1,6P2 aldoláz, 4 – kloroplasztisz FBPáz, 5 és 11 – foszfoglükóz izomeráz, 6 és 12 – foszfoglükomutáz, 7 – GBSS, 8 – elágazási enzim, 9 – triózfoszfát transzlokátor, 13 – UDP-glükóz pirofoszforiláz, 14 – szacharóz-foszfát szintáz, 15 – szacharóz-foszfát foszfatáz, 16 – pirofoszfatáz.

Az elsődleges keményítő szintézis helye a kloroplasztisz, ahol nappal a Calvin ciklusban képződő trióz foszfátok egy részéből hexóz foszfátokon keresztül az ún. tranzit keményítő halmozódik fel. Ennek egy része éjszaka mobilizálódik és különböző metabolikus folyamatokban

használódik fel, illetve bizonyos szövetek amiloplasztiszában raktározó keményítő formájában akkumulálódik (GEIGER és SERVAITES, 1994; HESZKY et al., 2006).

A folyamat kiindulási lépése a glükóz 1-foszfát aktiválása ADP-glükóz pirofoszforiláz segítségével. A lánchosszabbítást a keményítő szintáz folytatja, amelynek két izoformája létezik, az oldható (SSS) és a szemcséhez kötött keményítő szintáz (GBSS). A GBSS hozza létre a következő α-1,4 kötést a glukánlánc nem redukáló vége és az ADP-glükóz glükóz egysége között. Az elágazási enzim (SBE) 20-25 glükóz egységből álló láncokat kapcsolva α-1,6 kötéssel alakítja ki az amilopektint. A keményítő szemcsék minőségét és összetételét a SBE, a GBSS és a SSS alakítja ki (KRUGER, 1997).

A keményítő lebontása hidrolízissel vagy foszforilációval történhet. A hidrolítikus lebontást az α- és ß-amilázok, míg a foszforilációval történő degradációt a keményítő foszforiláz és a glükoziltranszferáz enzimek végzik (KRUGER, 1997). A lebontási folyamat glükózt, glükóz- és trióz foszfátokat eredményez, amelyek a transzport fehérjéken keresztül a citoplazmába exportálódnak.

Több kísérlet is igazolta az AGPáz aktivitás és a keményítő akkumuláció közti szoros kapcsolatot. MÜLLER-RÖBER et al. (1992) burgonyában az AGPáz aktivitását antiszensz technikával 90-95%-ra csökkentette, amely hasonló mértékű keményítő redukciót okozott. STARK et al. (1992) mutáns *E. coli* AGPáz expressziójával 30-60%-kal növelte a keményítő tartalmat *Arabidopsis*-ban. Az AGPáz tetramer szerkezetű enzim és több izoformáját azonosították a különböző szövetekben, amelyet befolyásol a növény fejlődési fázisa is (KOLBE, 2005). Allosztérikus reguláció alatt áll, a 3-foszfoglicerinsav aktiválja, a szervetlen foszfátok gátolják (PREISS, 1988).

2.3. Szacharóz anyagcsere

A szacharóz univerzális molekula a növényekben (LUNN és MACRAE, 2003): transzport és tárolt szénhidrát, ozmolitikum és szignál molekula. A keményítő mellett a fotoszintézis fő terméke, a szén és az energia transzport formája, amely a levelekből a nem fotoszintetizáló szövetekbe szállítódik.

Nagy mennyiségben megtalálható a cukornád (*Saccharum officinarum* L) szárában, a cukorrépa (*Beta vulgaris* L) gyökerében és érés során sok gyümölcsben. A növényi sejtek gyakran halmoznak fel nagy mennyiségű szacharózt hideg- és szárazság stressz hatására (YANG et al., 2001; STRAND et al., 2003). Stabilizálják a membránokat, fehérjéket, sejtszervecskéket és a szuboptimális körülmények javulásával gyorsan metabolizálható energiaforrásként szolgálhatnak.

Szignál metabolitként szabályozza egyes gének expresszióját (SMEEKENS, 2000; KOCH, 2004), így befolyásolja a sejtek osztódását és differenciálódását (BLAZQUEZ et al., 1998), a virágfejlődést és a virágzás indukcióját (OHTO et al., 2001; KING és BEN TAL, 2001), a mag fejlődését (IRAQI és TREMBLAY, 2001), a keményítő (ROOK et al., 2001) és az olajok (DAVOREN et al., 2002) felhalmozódását.

A fotoszintézis során a kloroplasztiszban a Calvin-ciklusban a fixált CO_2 trióz-foszfátokká alakul, melynek egy része a trióz-foszfát transzlokátor fehérjén keresztül a citoplazmába szállítódik és hexóz-foszfátokon keresztül szacharózzá alakul (WINTER és HUBER, 2000). Éjszaka a keményítő lebontása során felszabaduló hexózok és hexóz foszfátok a hexóz transzporteren keresztül szállítódnak a citoplazmába és szacharózzá alakulnak (SCHLEUCHER et al.,1998). A reakciósort a 4. ábra szemlélteti. A folyamat kulcsenzimei a fruktóz 1,6-biszfoszfatáz (a fruktóz 2,6-biszfoszfát allosztérikusan gátolja) és a szacharóz-6-foszfát szintáz (legfontosabb szabályozó metabolitja az SNF-1 protein kináz).

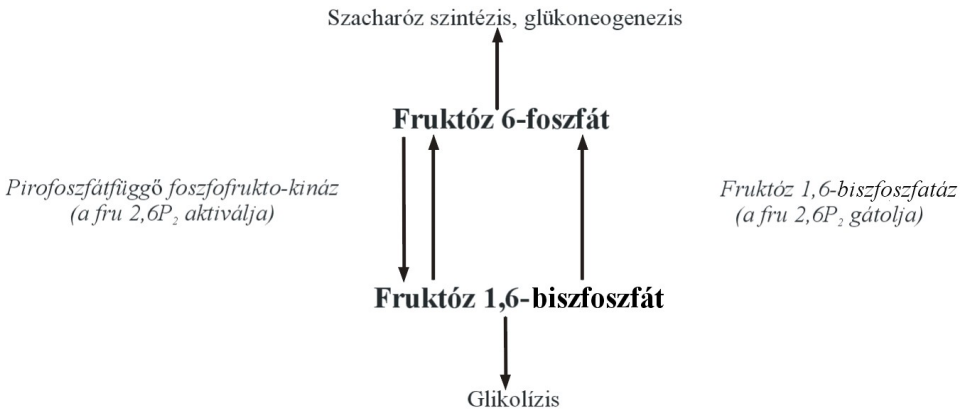
Ezeknek a géneknek az antiszensz gátlása vagy szensz szupressziója jelentős változásokat okozott a transzgénikus burgonya, sárgarépa és *Arabidopsis* fotoszintetikus szén metabolizmusában, növekedésében, morfológiájában (ZRENNER et al., 1996; TANG és STURM, 1999; GEIGENBERGER és STITT, 2000; STRAND et al., 2000; CHEN et al., 2005). A kukorica szacharóz-6-foszfát szintáz génjének expressziója paradicsomban jelentősen megnövelte a bogyók oldható cukor és szárazanyagtartalmát, terméshozamát (LAPORTE et al., 1997, 2001). Szintén paradicsomban a szacharóz-foszfát szintáz túltermeltetése 60%-kal növelte a bogyók szacharóz tartalmát (NGUYEN-QUOC et al., 1999). Transzgénikus dohányban a szacharóz export kapacitás antiszensz gátlásával nekrotikus-klorotikus elhalásokat és csökkent fotoszintézist figyeltek meg (BÜRKLE et al., 1998). Ez a néhány példa is alátámasztja a szacharóz esszenciális szerepét a növények életében.

A szacharóz lebontását a szacharóz szintáz és az invertázok végzik. Előbbi a szacharózt reverzibilisen UDP-glükózra és fruktózra, utóbbi irreverzibilisen glükózra és fruktózra hidrolizálja. A savas invertáz (TIV1) antiszensz gátlása 20-60%-kal növelte a paradicsom bogyók szacharóz tartalmát, de méretük 30%-kal csökkent (KLANN et al., 1996).

2.4. A fruktóz 2,6-biszfoszfát élettani szerepe

A fruktóz 2,6-biszfoszfát (fru 2,6P2) minden eukarióta szervezetben szignál metabolitként szabályozza az elsődleges szénhidrát metabolizmus kulcsreakcióját (VAN SCHAFTINGEN, 1987). Ez egyetlen reakció a citoplazmában: a fruktóz 6-foszfát (fru 6P) és a fruktóz 1,6-biszfoszfát (fru 1,6P2) közti reverzibilis átalakulás (2. ábra). Molekuláris adatok is megerősítették, hogy ez a

szabályozó rendszer már az eukarióták közös ősében mintegy egy milliárd évvel ezelőtt kialakult és fennmaradt (NIELSEN et al., 2004). Először 1980-ban emlősökben fedezték fel, mint a máj foszfofruktokináz aktivátorát (PILKIS et al., 1981). A májban két ellentétes folyamatot szabályoz, a glikolízist és a glükoneogenezist (VAN SCHAFTINGEN, 1987) (2. ábra). Nagy koncentrációban a fru 2,6P2 aktiválja a 6-foszfofrukto-1-kinázt (PFK), növelve a glikolítikus fluxot és gátolja a fruktóz 1,6-biszfoszfatáz (FBPáz) működését, csökkentve ezzel a glükoneogenezis sebességét. A alacsony fru 2,6P2 szint ellentétes hatással van a két folyamatra (OKAR és LANGE, 1999).



2. ábra: A fotoszintézis során megkötött szén elosztásának kulcsreakciója, és a fru 2,6P2 szabályozó szerepe

Legnagyobb koncentrációban a májban, az agyban, a szívizomban, kisebb koncentrációban a vázizomban és a vesében mutatták ki (CLAUS et al., 1984). A fru 2,6P2 szintéziséért és lebontásáért felelős enzimek közül négy izoformát azonosítottak (OKAR és LANGE, 1999). Ezek elsősorban a katalítikus helyekben különböznek egymástól, közös szekvencia jellemzőjük a protein kinázok foszforilációs helyei (RIDER et al., 2004). A fru 2,6P2 élettani szerepét emlősökben elsősorban transzgénikus egerekkel végzett kísérletekkel erősítették meg (WU et al., 2001). Koncentrációjának növelése jelentősen csökkenti a vércukor szintet.

Növényekben 1981-ben fedezték fel (SABULARSE és ANDERSON, 1981). A fotoszintézis során a fru 2,6P2 a CO_2 asszimilációs rátán keresztül szabályozza a szacharóz szintézist és a megkötött szén elosztását a szacharóz és a keményítő szintézis között (STITT et al., 1987; STITT, 1990a). Szabályozó szerepe némileg eltér az emlősökben leírtakkal. Gátolja a szacharóz szintézis egyik kulcsenzimét a FBPáz-t. Szabályozza a citoplazmában a hexóz foszfátok és a trióz foszfátok kölcsönös egymásba alakulását (KRUGER és SCOTT, 1995). A pirofoszfátfüggő foszfofrukto-kináz (PFP) aktiválásán keresztül szabályozza a glikolízist és a respirációs metabolizmust (KRUGER és SCOTT, 1995; PLAXTON, 1996) és közvetett módon fokozza a kloroplasztiszban az ADP-glükóz pirofoszforiláz (AGPáz), működését, a keményítő szintézis kulcsenzimét (KRUGER és SCOTT, 1995).

A fru 2,6P2 szabályozó szerepét eddig főként olyan növényfajokban vizsgálták, amelyek tartalék szénhidrátként a levelekben elsősorban keményítőt halmoznak fel. TREVANION (2000, 2002) kísérletei rámutattak arra, hogy a fru 2,6P2 szerepe a növényekben nem univerzális. Búzában (amely a levelében főként szacharózt halmoz fel) a fentiekben leírtaknak megfelelően a fru 2,6P2 szabályozza a szacharóz szintézist és a fotoszintézis rátát, de nem befolyásolja a megkötött szén elosztását a keményítő és a szacharóz szintézise között.

A fru 2,6P2 mennyisége a növényi szövetekben 0.05-1 nmol/g friss tömeg között változik (Nielsen et al., 2004). A nem fotoszintetikus, illetve a heterotróf (sink) szövetekben és szervekben a fru 2,6P2 koncentrációja nagyobb (NIELSEN, 1992; NIELSEN és STITT, 2001), ami a szén és az energia nagyobb mértékű importjára utalhat, bár szabályozó szerepe transzgénikus burgonya növények gumójában kevésbé kifejezett és nincs lényeges hatással a szénhidrát tartalomra (RUNG et al., 2004). Heterotróf dohány sejtekben szabályozza a trióz foszfátok és a hexóz foszfátok kölcsönös egymásba alakulását (FERNIE et al., 2001).

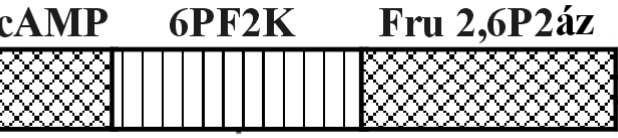
A kloroplasztiszokban a tranziens keményítő lebontásának mértékét jelentősen befolyásolja a fru 2,6P2 mennyisége. Transzgénikus dohány növényekben a fru 2,6P2 mennyiségének növelése sötétben csökkentette a keményítő mobilizációját (SCOTT és KRUGER, 1995).
Feltételezhetően a fru 2,6P2-nak fontos adaptív szerepe lehet szuboptimális körülmények átvészelésében is. Nagy sókoncentráció, vízhiány vagy víztöbblet esetén jelentősen megnő a fru 2,6P2 koncentrációja (REDDY, 1996, 2000; BANZAI et al., 2003). Oxigénhiány hatására szintén nagymértékű fru 2,6P2 növekedést figyeltek meg rizs (MERTENS et al., 1990; GIBBS et al., 2000; NOGUCHI, 2002), sárgarépa (KATO-NOGUCHI és WATADA, 1996) és *Euglena gracilis* (ENOMOTO et al., 1990) növényekben. Rizsben a fru 2,6P2 a PFP aktiválásán keresztül fenntartja a fermentatív glikolízist, ami ATP-t szolgáltat a fehérje szintézishez és a megnyúlásos növekedéshez oxigénhiányos körülmények között is (NOGUCHI, 2002).

A fru 2,6P2 fontos szerepet tölt be sok klimakterikus gyümölcs érése során (BALL és REES, 1988), ahol 2-5-szörösére is növekedhet a koncentrációja. A PFP működésén keresztül hatással van a glikolízisre és a glükoneogenezisre, ami jelentősen növeli a respirációt, a CO_2 termelést és a keményítő-szacharóz átalakulást (BEAUDRY et al. 1987, 1989).

2.5. A fruktóz 2,6-biszfoszfát szintézise és lebontása

A fru 2,6P2 szintéziséért és lebontásáért állatokban és növényekben egyaránt egy bifunkcionális enzim, a 6-foszfofrukto-2-kináz/fruktóz 2,6-biszfoszfatáz (6PF2K/fru 2,6P2áz) felelős. *E. coli*-ban végzett expressziós kísérletekkel igazolták, hogy a legtöbb növényben ezt az enzimet egyetlen gén kódolja (DRABORG et al., 1999; VILLADSEN et al., 2000; MARKHAM és

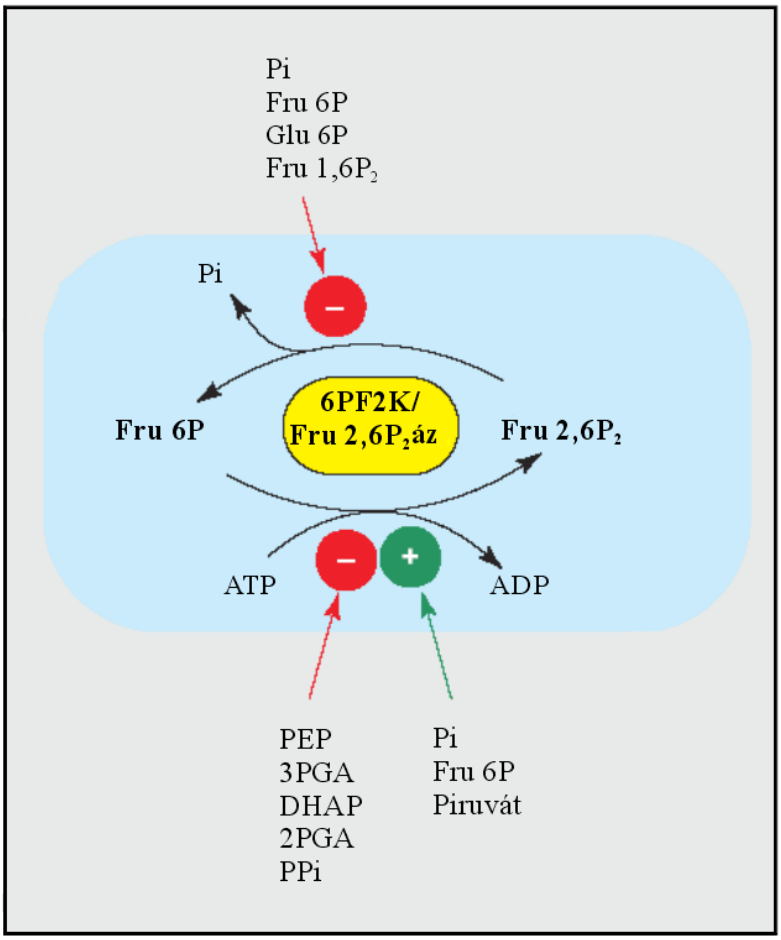
KRUGER, 2002; BANZAI et al., 2003). Ennek ellenére monofunkcionális fru 2,6P2ázt is találtak már spenótban (MACDONALD et al., 1989), mungó babban (Avigad és Bohrer, 1984), ricinusban (Kruger és Beevers, 1985), articsókában (Larondelle et al., 1989). Ezek a monofunkcionális formák mutációval alakultak ki (MICHELS ÉS RIGDEN, 2006). A kódoló domain szerkezetét a 3. ábrán mutatjuk be. A fru 2,6P2 szintéziséért 1 molekula ATP segítségével a kináz domain (6PF2K), lebontásáért a biszfoszfatáz domain (fru 2,6P2áz) a felelős:



3. ábra: A fru 2,6P2 koncentrációját meghatározó bifunkcionális enzim génje a kódoló domainekkel. A cAMP függő protein kináz foszforilációval inaktiválja a 6PF2K-t és aktiválja a fru 2,6P2ázt (DARVILLE et al., 1987).

A fru 2,6P2 koncentrációját a két enzim relatív aktivitása határozza meg. A gén különböző metabolitok allosztérikus szabályozása alatt áll (4. ábra).

Növényi szövetekben az enzim egy ~83 kDa nagyságú tetramer szerkezetű fehérje (LARONDELLE et al., 1986). A különböző fajokban a fehérje struktúrája hasonló, egy nagyon konzervált katalitikus régióból és egy variábilis N-terminális részből áll. Ez az N-terminális rész felelős az alegységek összeállításáért. A katalitikus rész homológ az állati szövetekben található bifunkcionális enzimmel (DRABORG et al., 1999). Az enzimet kódoló gén két gén fúziójából jöhetett létre, egy foszfoglicerát mutázt (jelenlegi biszfoszfatáz domain) és egy mononukleotid kötő fehérjét kódoló génből (jelenlegi kináz domain) (OKAR et al., 2001). A bifunkcionális enzim gén szabályozása a fehérje N- és C terminális végének reverzibilis foszforilációján alapul (OKAR et al., 2001). *Arabidopsis*-ban a bifunkcionális enzim N-terminális végén két foszforilációs helyet azonosítottak (Ser220 és Ser303), amelyhez a 14-3-3 szabályozó fehérje kötődik (KULMA et al., 2004).



4. ábra: A bifunkcionális enzim allosztérikus szabályozása különböző metabolitok által. A „-" jel az inhibitorokat, a „+" jel az aktivátorokat jelenti (NIELSEN et al., 2004).

2.6. A fru 2,6P2 szabályozó szerepe a szacharóz és a keményítő szintézisben

A fru 2,6P2 legfontosabb szerepe a növényi szervezetekben a kloroplasztisz és a citoplazma szénhidrát metabolizmusának integrációja. Szabályozza a szacharóz szintézisét a fotoszintézis rátán keresztül. A két folyamat szorosan összefügg egymással, ezért nagyon fontos az egyensúlyi helyzet fenntartása. Ha a szacharóz szintézis túl gyors, a ribulóz 1,5-biszfoszfát regenerációja a Calvin-cikluson keresztül gátlódik, a fotoszintázis ráta csökken. Ha a szacharóz szintézis túl lassú, a foszfátok különböző intermedierekben kötődnek meg és felhalmozódnak, ami csökkenti az ATP szintézist, a 3PGA redukcióját és a fotoszintézist (STITT, 1986; STITT et al., 1987).

A fotoszintézis ráta növekedésével a kloroplasztiszban megnő a trióz foszfátok mennyisége és a trióz foszfát transzlokátoron keresztül megindul az export a citoplazmába és a foszfátok importja a kloroplasztiszba (HELDT és FLÜGGE, 1987). Ennek következtében a citoplazmában emelkedik a trióz foszfátok koncentrációja és csökken a foszfátok mennyisége (STITT et al., 1984; GERHARDT et al,. 1987). A trióz foszfátok gátolják a 6PF2K-t és aktiválják a fru 2,6P2ázt, ami csökkenti a fru 2,6P2 szintet (3. ábra). A FBPáz felszabadul a fru 2,6P2 gátlása alól és megindul a

szacharóz szintézis (STITT, 1990a). Minél nagyobb a fotoszintézis ráta, annál nagyobb mértékű a fru 2,6P2 koncentráció csökkenése (STITT, 1997). Tehát a fru 2,6P2 szignál molekulaként meghatározza, hogy a szacharóz szintézishez mennyi fotoasszimilátum áll rendelkezésre.

Ha a szacharóz szintézis meghaladja a fotoszintézis rátáját, csökken a rendelkezésre álló trióz foszfát a citoplazmában, ami aktiválja a 6PF2K-t és gátolja a fru 2,6P2ázt, a fru 2,6P2 koncentráció emelkedik, a FBPáz működése gátlódik, a szacharóz szintézis ráta csökken (STITT, 1990a). Ennek hatására a kloroplasztiszban megnő a trióz foszfátok mennyisége és csökken a foszfátok regenerációja. A növekvő trióz foszfát koncentráció aktiválja a keményítő szintézis kulcsenzimét, az ADPglükóz pirofoszforilázt (AGPáz) (PREISS et al, 1991; STITT, 1996). Tehát a szacharóz szintézis csökkenése a keményítő szintézis stimulációjához vezet.

Sötétben a mobilizálódó keményítő egy részéből a citoplazmában szacharóz szintetizálódik. Ekkor a fru 2,6P2 szabályozó szerepe a szacharóz szintézisben kevésbé érvényesül, mivel

- a keményítő degradációjából elsősorban glükóz (TRETHEWEY és AP REES, 1994) vagy maltóz (SCHLEUCHER et al., 1998) egységek képződnek és a citoplazmába exportálódva a szacharóz-foszfát szintázon keresztül (tehát a reakciósorban az FBPáz által katalizált lépés után) alakulnak szacharózzá (GEIGER és SERVAITES, 1994)
- éjszaka a magas fru 2,6P2 szint miatt az FBPáz inaktív (STITT et al., 1985).

2.7. A kloroplasztisz és a citoplazma szénhidrát-anyagcseréjének integrációja

A növények zavartalan növekedésének és fejlődésének alapfeltétele a kloroplasztisz és a citoplazma anyagcsere-folyamatainak összehangolása. A fotoszintézis során az energia, a CO_2 megkötése és a keményítő szintézise a kloroplasztiszban, a szacharóz szintézise a citoplazmában történik. A két folyamat, illetve a két partikulum közötti kapcsolatot a kloroplasztisz kettős membránjában elhelyezkedő transzport fehérjék, a trióz foszfát transzlokátor (TPT), a hexóz transzporter (HT) és az ADP/ATP transzlokátor biztosítják (FLÜGGE és HELDT, 1991; HELDT és FLÜGGE, 1992; STITT, 1997).

A fotoszintézis során a CO_2 megkötéséhez nélkülözhetetlen a megfelelő foszfát koncentráció (EDWARDS és WALKER, 1983). Ez a trióz foszfát transzlokátoron keresztül jut be a kloroplasztiszba, cserébe azonos mennyiségű trióz foszfát exportálódik a citoplazmába, ahol szacharózzá alakulnak és a felszabaduló foszfátok ismét a kloroplasztiszba szállítódnak (FLÜGGE és HELDT, 1991). Fotoszintetizáló szövetekben ez a transzport ráta jelentősen befolyásolja a CO_2 megkötését és az ATP szintézisét. Ha a szacharóz szintézis túl gyors, a TPT több trióz foszfátot szállít a citoplazmába, átmenetileg csökken a foszfátok mennyisége a kloroplasztiszban, amely gátolja a Calvin ciklusban a ribulóz 1,5-biszfoszfát regenerációját és a CO_2 fixáció csökken. A

magas fotoszintézis rátát tehát a trióz foszfát-foszfát cserefolyamat sebessége nagyban befolyásolja. Transzgénikus burgonyában a TPT antiszensz gátlása 25-50%-kal csökkentette a szacharóz szintézisét és növelte a keményítő mennyiségét (RIESMEIER et al., 1993; HEINEKE et al., 1994).

A hexóz transzporterek a glükóz, fruktóz és ribóz szállításában vesznek részt (SCHÄFER et al., 1977). Sötétben a kloroplasztiszokban a tranziens keményítő lebontása során felszabaduló glükóz monomereket szállítja a citoplazmába, ahol szacharóz szintézisére használódnak fel. A nem fotoszintetizáló plasztiszokba (pl. amiloplasztiszok) a hexóz foszfátok importját közvetíti, amelyek főként zsírsavak, aminosavak vagy keményítő szintézisére fordítódnak (FLÜGGE 1999). Az importfolyamatokkal ellentétes irányba szervetlen foszfátokat és trióz foszfátokat szállítanak.

Az ATP/ADP transzlokátor elsődlegesen ATP-t importál sötétben a citoplazmából a kloroplasztiszba, míg az ellentétes irányba ADP-t szállít.

2.8. A szénhidrát anyagcsere módosításának lehetőségei

A szénhidrát anyagcsere befolyásolására az utóbbi 15-20 évben több elméleti és gyakorlati példa látott napvilágot. Ezek a megközelítések az ún. „kulcsenzim” stratégián alapultak, azaz az adott anyagcsere folyamat kulcsenzimét célozták meg a kívánt fenotípusos hatás elérése érdekében. Több kísérlet is sikertelennek bizonyult, mivel a növényi anyagcserefolyamatok rendkívül rugalmasak, egy-egy komponens több alternatív metabolikus folyamatban is részt vehet, illetve egy-egy végtermék többféle reakció eredményeként is szintetizálódhat (REES, 1995). HERBERS és SONNEWALD (1998) szerint egyetlen enzim aktivitásának megváltoztatása sok esetben nincs hatással a metabolikus fluxusra.

A szénhidrát anyagcserében résztvevő enzimek és szabályozó mechanizmusok megismerése lehetővé teszi e bonyolult metabolikus hálózat célzott befolyásolását. A módosítás lehetőségeit alapvetően két nagy csoportra oszthatjuk (DUNWELL, 1998):

-mennyiségi és minőségi változtatások (keményítő, fruktánok, szacharóz).

-új, az adott fajra nem jellemző szénhidrátok termeltetése (fruktánok, dextránok, trehalóz).

A növényi géntechnológia sokféle lehetőséget biztosít a növényfajok transzgénikus nemesítésében. A transzformáció lehetőségei:

-vad típusú enzim túltermeltetése, koszuppressziója, vagy antiszensz gátlása

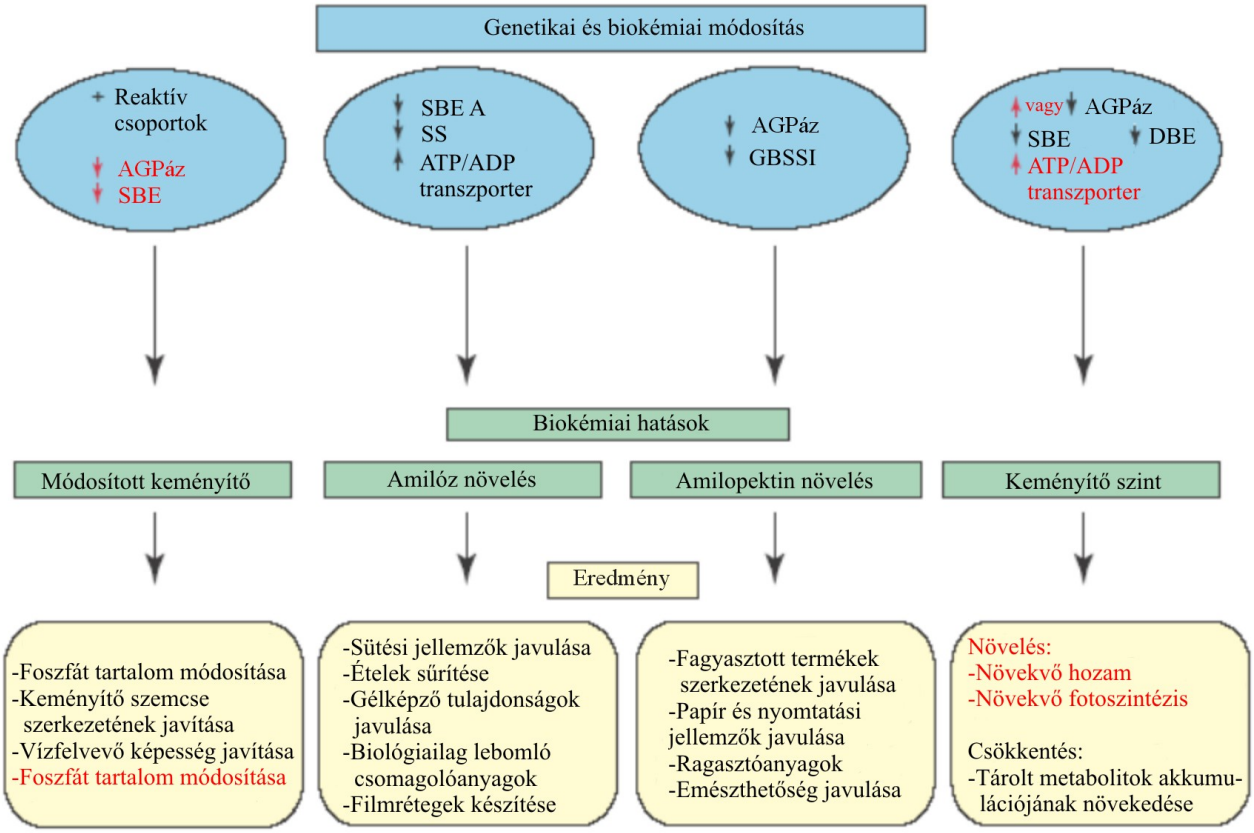
-transzformáció módosított enzim génnel

-transzformáció mutáns génnel, mely inszenzitív az allosztérikus vagy feed-back regulációra (STARK et al., 1992).

Az alábbi alfejezetekben áttekintjük a legfontosabb stratégiákat, elsősorban azokra a növényfajokra és eredményekre koncentrálva, melyek gazdasági szempontból is jelentősek lehetnek.

2.9. Keményítő módosítás

Szintézisének viszonylagos egyszerűsége ellenére a keményítő mennyiségében és összetételében jelentős eltérések figyelhetőek meg a különböző növényfajok, fajták, szövetek között. Ennek okai az egyes katalizáló enzimek különböző izoformái (MARTIN és SMITH, 1995). Az adott izoforma és a hozzá tartozó szerkezet megismerése lehetővé teszi a keményítő összetételének és szemcseméretének célzott befolyásolását. Minőségi szempontból a jelenlegi stratégia az amilóz-amilopektin arányának és a foszforiláltság mértékének megváltoztatása, ami csökkentheti a keményítő postharvest kémiai és enzimatikus módosítását. Ezen a területen a legjelentősebb modell és gazdasági növényfaj a burgonya. A legfontosabb stratégiákat és eredményeiket az 5. ábrán mutatjuk be.



5. ábra: A keményítő módosításának útjai, biokémiai hatása és a felhasználás lehetőségei (SLATTERY et al., 2000)

A keményítő mennyiségi megváltoztatásának kulcsa az AGPáz, melynek allosztérikus aktivátora a 3PGA, inhibitorai a szervetlen foszfátok (Pi). Ezeknek a metabolitoknak a megváltoztatása elsődlegesen hat a fotoszintetikus szén fixációra, így módosíthatja az AGPáz aktivitását is (PREISS et al., 1991).

Transzgénikus burgonyában az *E. coli*-ból izolált, a Pi allosztérikus gátlására inszenzitív mutáns AGPáz (*glgc16*) patatin promoter irányítása alatt 35%-kal növelte a gumó keményítő tartalmát (STARK et al., 1992). SWEETLOVE et al. (1996) ugyanezt a génkonstrukciót másik burgonya genotípusban expresszáltatta és a 200-400%-os AGPáz aktivitásnövekedés ellenére a keményítő tartalom nem változott szignifikánsan, mivel a lebontó enzimek aktivitása is megnövekedett. Egy másik *E. coli* eredetű mutáns AGPáz (*G336D*) gén expressziója transzgénikus manióka (*Manihot esculenta*, L) gyökerében a nagyobb biomassza mellett 260%-kal növelte a keményítőtartalmat (IHEMERE et al., 2006). Az *E. coli* szervetlen pirofoszfatáz génjének heterológ expressziójának hatására a burgonya gumók 20-30%-kal több keményítőt halmoztak fel (GEIGENBERGER et al., 1998). Az *SnRK1* protein kináz overexpressziója burgonya gumóban az AGPáz aktivitását 20-60%-kal, a keményítő mennyiségét 23-30%-kal növelte (MCKIBBIN et al., 2006).

Az emészthetőséget és a sütési-főzési tulajdonságokat jelentősen befolyásolja az amilóz-amilopektin arány. A természetben is előfordulnak olyan mutánsok, amelyekben a keményítő vagy csak amilózból vagy csak amilopektinből áll. A szemcséhez kötött keményítő szintáz antiszensz gátlásával VISSER et al. (1991) amilózmentes burgonyavonalakat állított elő. Szintén burgonyában az oldható keményítő szintáz két izoformájának egyidejű antiszensz gátlása csökkentette az amilopektin elágazások számát és a lánc hosszúságát, valamint csökkent a keményítő szemcsék mérete is (LLOYD et al., 1999a). A fentiekkel ellentétben burgonyában az elágazási enzim antiszensz gátlása nem befolyásolta az amilóz/amilopektin arányt (SAFFORD et al., 1998).

További kutatások bizonyították, hogy az AGPáz-nak szerepe van a keményítő szerkezetének kialakításában is. Transzgénikus burgonyában az AGPáz antiszensz gátlása csökkentette az amilóz tartalmat és növelte a rövid láncú amilopektin mennyiségét (LLOYD et al., 1999b).

Az AGPáz működéséhez ATP-re van szükség, így az energia fokozása szintén növelheti a keményítő szintézis volumenét. Az *Arabidopsis* kloroplasztisz ATP-ADP transzporterének túltermeltetése növelte a burgonya gumó keményítő és amilóz tartalmát (TJADEN et al., 1998; GEIGENBERGER et al., 2001).

A keményítő ipari felhasználásában fontos lehet a szemcsék mérete is (Burton et al., 2002). Egy módosított bakteriális tandem keményítő kötő domain (*SBD2*) expressziója burgonyagumóban jelentősen csökkentette a keményítő szemcsék méretét (JI et al., 2004). Az amiloplasztiszok méretét

meghatározó *FtsZ* fehérje túltermeltetése burgonya gumóban a szemcseméret növelése mellett csökkentette a számukat (DE PATER et al., 2006). Izoamilázok antiszensz szupressziója burgonya gumóban nagyobb számú, de kisebb méretű keményítő szemcse akkumulációjához vezetett (BUSTOS et al., 2004).

A szénhidrát-tartalom (elsősorban a tárolt) növelésének egyik alternatív útja lehet a harvest index javítása (HEYER, 2000). Itt a fő cél a szénhidrát allokáció növelése a tároló, nem fotoszintetikus szövetekbe, szervekbe. Az élesztő invertáz génjének expressziója jelentősen növelte a burgonya gumó méretét (akár 1 kg-ig is), de a hozam nem változott, mert a gumók száma viszont csökkent (SONNEWALD et al., 1997).

2.10. Fruktántermelő transzgénikus növények

A fruktánok hat növénycsaládban, a virágos növények 12-15%-ában előforduló tartalék szénhidrátok (VIJN és SMEEKENS, 1999; CAIRNS, 2003). Táplálkozástani szempontból kiemelkedő jelentőségűek, mivel az emberi szervezet nem képes lebontani őket, így nagyon alkalmasak alacsony kalóriatartalmú ételek készítésére. További pozitív hatásuk, hogy szelektíven serkentik a bélflóra bifidobaktérium fajait (GIBSON et al., 1995), melyek csökkentik a reduktív enzimek aktivitását (ROWLAND et al., 1998).

A növényekben nem egyszerűen csak tárolt szénhidrátok. Vízoldhatóságuk miatt, mint ozmoprotektánsok fontos védelmi szerepet töltenek be az abiotikus stresszek elleni védekezésben is (PILON-SMITS et al., 1995). Kémiailag nem egységesek, növényekben a fruktóz molekulák száma 10-200, baktériumokban akár 100000 is lehet. Géntechnológiai módszerekkel az egyes fruktánok olyan növényekben is előállíthatóak, amelyek eredetileg erre nem képesek.

Hasznos lehet a fruktánok termeltetése transzgénikus cukorrépában és burgonyában, melyekben a lebontó enzimek hiányoznak, így a post-harvest veszteség is csökkenthető. Articsóka, illetve csicsóka szacharóz 1-fruktoziltranszferáz génjének expressziója burgonya gumóban és cukorrépa gyökerében jelentős fruktánakkumulációt okozott (HELLWEGE et al., 1997; SÉVENIER et al., 1998). Burgonya gumó szárazanyagának 4-5%-át adták a fruktánok, miközben a keményítő mennyisége csak kismértékben csökkent (HEYER, 2000; HELLWEGE et al., 2000). Cukorrépa gyökerében a szacharóz 90%-a alakult át fruktánná (SÉVENIER et al., 1998).

Transzgénikus cukorrépában a vöröshagyma fruktoziltranszferáz expressziójának hatására a friss gyökerek 10-15%-ban tartalmaztak különböző polimerizációs fokú fruktánokat, miközben a szacharóz tartalom nem változott (WEYENS et al., 2004).

Másik stratégia a fruktántartalom növelése és összetételének módosítása lehet. Az eredetileg fruktántermelő cikóriában a vöröshagyma fruktoziltranszferázának heterológ expressziója növelte a fruktán akkumulációt és megváltoztatta annak szerkezetét (VIJN et al., 1997).

Hosszabb szénláncú fruktánok előállítására elsősorban bakteriális eredetű gének használhatók. Ezek a transzgénikus növények több fruktánt képesek előállítani, de a legtöbb esetben különböző fejlődési rendellenességeket mutatnak (CAIRNS, 2003 és hivatkozásai).

2.11. Dextrántermelő transzgénikus növények

A dextránok extracelluláris α-glükánok, melyek α-1-6 kötéssel kapcsolódó glikozil egységekből állnak α-1-2, α-1-3 vagy α-1-4 elágazásokkal. Felhasználják biológiailag lebomló gélek készítésére és gyógyszerek hordozóanyagaként (HENNINK és VAN NOSTRUM, 2002). A *Leuconostoc mesenteroides* dextránszukráz (*DsrS*) génjét expresszáló burgonya a gumó friss tömegének 1-2%-ában termelt dextránokat (KOK-JACON et al., 2005).

2.12. A fruktóz 2,6-biszfoszfát koncentrációjának módosítása

A fotoszintetikus szénhidrát metabolizmus nagyfokú szabályozottsága és konzerváltsága, valamint a metabolikus alternatívák létezése miatt a kulcsenzimek aktivitásának egyenkénti módosítása nem minden esetben vezetett eredményre. A növény akár 50-80%-os aktivitáscsökkenést is képes kompenzálni visszacsatolási rendszerei révén.

A szignál metabolitok nemcsak szimpla génexpressziós vagy enzimaktivitási szintet determinálnak, hanem komplett anyagcsereutakat szabályoznak és szinkronizálnak. Ezért endogén koncentrációjuk módosításával elvileg több esély nyílhat egy adott anyagcserefolyamat alapkutatási és gazdasági célzatú megváltoztatására, mint az ún. kulcsenzim stratégiák alkalmazása révén.

In vivo két megközelítést használnak a fru 2,6P2 szintjének módosítására. Az egyik megközelítés a natív növényi enzim aktivitásának csökkentése antiszensz gátlással vagy koszuppresszióval (DRABORG et al., 2001; RUNG et al., 2004). A másik megközelítés a transzformációra olyan helyspecifikus mutációval módosított patkány máj eredetű enzim cDNS-t használ, amely lehetővé teszi a kináz és a foszfatáz aktivitások elkülönítését (SCOTT et al., 1995, 2000; TRUESDALE et al., 1999; TOLDI et al., 2002). Így szelektíven csökkenthetjük, illetve növelhetjük a fru 2,6P2 koncentrációját. További előnye ennek a cDNS-nek, hogy csak 51%-os a homológiája a növényi bifunkcionális enzim génnel, így heterológ expressziója során a gazdanövény kevésbé képes regulálni.

Ezek a transzgénikus növények nagyban hozzájárultak a fru 2,6P2 szabályozó szerepének további megértéséhez és rávilágítottak e szignál metabolit kissé eltérő szerepére a szénhidrát

anyagcsere szabályozásában a különböző növényfajokban. Modellrendszerül különböző családokba tartozó és eltérő fotoszintézis típusú növényeket választottak ki. Dohányban és korallvirágban a fru 2,6P2 koncentrációjának növelése csökkentette a szacharóz szintézis volumenét (SCOTT et al., 1995a; TRUESDALE et al., 1999) és a PFP aktiválásán keresztül csökkentette a keményítő éjszakai mobilizációját, ami jelentős keményítő akkumulációt okozott (SCOTT et al., 1995b). *Arabidopsis*-ban (DRABORG et al., 2001), burgonyában (RUNG et al., 2004) és dohányban (SCOTT et al., 2000) a fru 2,6P2 mennyiség csökkentésének hatására a megkötött CO_2 nagyobb mértékben épült be szacharózba, mint keményítőbe. *Arabidopsis*-ban 20-30%-ban növelte a szacharóz-tartalmat és a megvilágítás kezdetén késleltette a keményítő akkumulációt. Ezzel ellentétben a transzgénikus burgonyában és dohányban ez az extra szacharóz gyorsan hidrolizált és hexózok (glükóz, fruktóz) formájában akkumulálódott. A C4-es fotoszintézis rendszerű cukornádban a fru 2,6P2 mennyiség redukciójának hatására a levelekben a szacharóz 25-55%-kal, a redukáló cukrok mennyisége 135-228%-kal növekedett, míg a nem fotoszintetizáló nóduszokban a szacharóz tartalom 10-15%-kal csökkent, ugyanakkor a redukáló cukrok mennyisége 100-260%-kal emelkedett (HITEN, 2006).

Ezekben a vizsgálatokban a fru 2,6P2 koncentrációjának módosítása a szénhidrát metabolizmus nagymértékű átrendeződése ellenére nem okozott lényeges fenotípusos változásokat. Valószínűleg ezeket a drasztikus változásokat a növények a különböző alternatív anyagcsere utak révén mégis képesek voltak kompenzálni.

Szamócában a fru 2,6P2 szint módosítása jelentős fenotíposos eltéréseket okozott (TOLDI et al., 2002). A fru 2,6P2 mennyiség csökkentése növelte a szacharóz szintézis volumenét, amelyet a fióka/inda rendszer folyamatosan felhasznált. Ennek hatására a szárazanyag felhalmozás 83%-kal nagyobb volt, 230%-kal növelte az anyanövényenkénti indák számát. A fru 2,6P2 szint növelése a szacharóz szintézis rovására nagymértékű tranziens keményítő akkumulációhoz vezetett.

Ezek az eredmények is megerősítették, hogy a fru 2,6P2 szignál metabolitként képes teljes anyagcsereutak szabályozására és a „kulcsenzim” stratégia mellett alkalmas lehet gazdaságilag fontos növényfajok szénhidrát-anyagcseréjének komplex módosítására. Nemcsak tipikusan keményítőt, illetve cukrot raktározó növények esetében érdekes a kérdés, hanem olyan fajokban is, amelyeket nem a szénhidrátok termelése céljából termesztünk, ugyanakkor szénhidrát anyagcseréjük módosítása más gazdasági értékmérő tulajdonságokra is hatással lehet. Közéjük tartoznak a vágott virágként hasznosított dísznövények is, mint amilyen a szegfű. Az irodalmi adatok azt támasztják alá, hogy a fru 2,6P2 endogén koncentrációjának módosítása a szegfű szénhidrát anyagcseréjének nagyfokú átrendeződéséhez vezethet. Arra a kérdésre, hogy ez mennyire befolyásolja a szegfű más tulajdonságait, ez az értekezés is keresi a választ.

2.13. A szegfű rendszertana és biológiája

A kerti szegfű (*Dianthus caryophyllus* L.) a *Caryophyllaceae* családba tartozó lágyszárú egyéves faj, amelyből a nemesítők olyan évelő fajtákat szelektáltak, amelyek 3-4 évig termeszthetők. A *Dianthus* nemzetségbe mintegy 300 faj tartozik, melyek között vad és termesztett fajok egyaránt előfordulnak (JUERGENS et al., 2003). Általában diploidok (2n=30), de tetraploid formák (4n=60) is előfordulnak (ANONIM, 2006). Vad formában kizárólag Európa mediterrán részein fordul elő (TUTIN et al., 1993), ahol már évszázadokkal ezelőtt termesztésbe vették elsősorban a virág méretére, a sziromlevelek számára, a szár hosszúságára és betegségellenállóságra történő szelekcióval (GALBALLY és GALBALLY, 1997).

A szegfű érzékeny a nappalhosszúságra, a fényintenzitásra és a hőmérsékletre. A virág kifejlődéséig hosszúnappalos körülmények között 8-10, rövid nappalhoszzúság mellett 16-18 levélpárt fejleszt. Az alacsonyabb hőmérséklet stimulálja a virágfejlődést, míg a magas hőmérséklet a vegetatív növekedést serkenti, az internódiumok rövidülnek, a szár gyengébb és csökken a virágok mérete, élettartama (HANZEL et al., 1955).

A növény alakja, a virágok mérete és típusa alapján a fajtákat három nagy csoportba sorolják: standard (sim), spray (mini) és midi (chinensii) (ANONIM, 2006). A fajták többsége steril vagy önmeddő, ezért a magok hiányoznak, illetve mesterséges megporzásra van szükség (GALBALLY és GALBALLY, 1997).

2.14. A szegfű nemesítése és genetikája

A szegfűnemesítés hagyományos technikái már a mendeli öröklődési szabályok felfedezése előtt kialakultak (ANONIM, 2006). Ezek a módszerek nem alkalmaztak öntermékenyítést, így a folyamatos hibridizáció miatt nagyfokú heterozigótaság alakult ki a fajtákban (HOLLEY és BAKER, 1992).

Napjainkban a legfontosabb nemesítési célok a következők (SEGERS, 1987):

-Minőség javítása

-Produktivitás növelése, korai virágzás, nagy hozam

-A piac igényeihez alkalmazkodva a fajtaválaszték folyamatos bővítése

-Rezisztencianemesítés (fuzárium)

-Törpe, cserepes fajták nemesítése (HOLLEY és BAKER, 1992)

Legfontosabb nemesítési módszer a pedigré módszer, amely magába foglalja a hibridizációt, az öntermékenyítést és a szelekciót (HOLLEY és BAKER, 1992). Az öntermékenyítést rosszul tűri, azonban a dihaploid szülői partnerek előállítása lehetővé teszi homogén F1 hibridek előállítását (SATO et al., 2000).

A legtöbb kereskedelmi forgalomban kapható hibrid steril, ezért csak vegetatív úton lehet szaporítani, amely egyben a legfontosabb eszköz a szelektált tulajdonság fenntartásában (ZUKER et al., 2002).

A genetikai variabilitás növelésének és új tulajdonságok kialakításának egyik legfontosabb forrása a vad *Dianthus* fajokkal történő keresztezés (SEGERS, 1987). A különböző vad szegfű fajok viszonylag jól keresztezhetőek egymással, azonban nem minden interspecifikus hibrid fertilis. A kínai szegfűvel (*D. chinensis* L.) alkotott hibrid szintén perspektívikus lehet a nemesítésben, mert kevésbé érzékeny a fényintenzitásra, így télen is virágzik (SPARNAAIJ és KOEHORST-VAN PUTTEN, 1990). A *D. capitatus*-sal alkotott interspecifikus hibridje nagyfokú rezisztenciát biztosított a *Pseudomonas caryophylli* ellen, azonban a virág minőségének javítására többszörös visszakeresztezésre volt szükség (ONOZAKI et al., 1998).

A szegfű termésbiztonságát több kórokozó is veszélyezteti, melyek közül a legjelentősebb a fuzárium (*Fusarium oxysporum f. sp. dianthi*). A rezisztencianemesítésben szintén alkalmasak lehetnek a vad fajok, azonban több nemkívánatos tulajdonságot is átvihetünk, így a folyamatos back-cross sok időt vesz igénybe. Ez kiküszöbölhető sejtszintű szelekcióval. THAKUR et al. (2002) kallusz sejtek *in vitro* szelekciójával fuzárium rezisztens fajtákat állítottak elő. A nemesítési munkát segítheti és meggyorsíthatja a rezisztencia génekkel szorosan kapcsolt markerek azonosítása is (SCOVEL et al., 2001; ONOZAKI et al., 2004).

Az *in vitro* szövettenyésztési, a biotechnológiai módszerek és a molekuláris technikák kialakulása és gyors fejlődése új lehetőségeket kínált a szegfű nemesítésében. Merisztéma és hajtástenyésztését már az 1950-60-as években kidolgozták, melyben Maróti Mihály úttörő munkát végzett. Az első legfontosabb gyakorlati eredmény a merisztéma izolálásával és tenyésztésével történő vírusmentesítés volt (MARÓTI et al., 1973). Az 1990-es évektől a *de novo* organo-, illetve szomatikus embriógenezis területén elért eredmények már a genetikai transzformánsok előállításának lehetőségét kínálta fel.

A szegfű nemesítésének másik nagy irányvonala a vázaélet hosszának növelése. Ez komplex kvantitatív tulajdonság, több gén additív hatásának eredménye (ANONIM, 2006). Legfontosabb tényezője a növények etiléntermelése. Az etilén szerepét a vágott szegfű postharvest viselkedésében több munka is bizonyította és mára a szegfű a virág öregedésélettani vizsgálatok egyik modellnövényévé vált (WOODSON et al., 1992; HAVE és WOLTERING, 1997; JONES, 2003). DE BENEDETTI et al., (2003) a vázaélethosszal kapcsolt RAPD markereket azonosítottak.

A fajtaválaszték folyamatos bővülése megkívánta a különböző típusok megkülönböztetését, ami morfológiai tulajdonságok alapján nem minden esetben lehetséges. SMULDERS et al. (2003) a fajták azonosítására és elkülönítésére alkalmas mikroszatellit markereket izoláltak. SCOVEL et al.,

(1998) a virágok típusával szorosan kapcsolt markereket, BAUDINETTE et al., (2000) és SCOVEL et al. (2000) pedig a virágfejlődésben résztvevő MADS-box géneket azonosítottak.

2.15. A szegfű növényregenerációs rendszere

A szegfű sikeres genetikai transzformációjának alapfeltétele a hatékony szövettenyésztési és növényregenerációs rendszer megléte. Ebből a szempontból a kerti szegfű (*D. caryophyllus*) ideális faj, mivel különböző szövetei és szervei jó regenerációs képességgel rendelkeznek. Sikeres növényregenerációt az alábbi szövetekből kaptak:

-kallusz (ENGVILD, 1972; PETRU és LANDA, 1974; EARLE és LANGHANS, 1975; KALLAK et al., 1997; JAIN et al., 2001).

-hónaljrügy (MILLER et al., 1991; BRAR et al., 1995; VAN ALTVORST et al., 1995a).

-merisztéma (SHABADE és MURASHIGE, 1977).

-levél (VAN ALTVORST et al., 1992, 1994, 1995a; MESSEGUER et al., 1993; YANTCHEVA et al., 1999; MIROSHNICHENKO és DOLGOV, 2000; KISS et al., 2000; NONTASWATSRI et al., 2002).

-nódusz (BRAR et al., 1995; VAN ALTVORST et al., 1995a; NONTASWATSRI et al., 2002, 2004).

-szár (LU et al., 1991; NUGENT et al., 1991; ZUKER et al., 1995, 1997, 1999; WATAD et al., 1996).

-sziromlevél (KAKEHI et al., 1979; GIMELLI, 1984; LU et al., 1991; NUGENT et al., 1991; FISCHER et al., 1993; MESSEGUER et al., 1993; NAKANO et al., 1994; MÁTRAI et al., 1995; VAN ALTVORST et al., 1996; MIROSHNICHENKO és DOLGOV, 2000; KISS et al., 2000).

-porzó (VILLALOBOS, 1981).

-petesejt (DEMMINK et al., 1987).

A különböző növényi részek válaszadó képességét nagyban befolyásolja a genotípus, az alkalmazott hormonok és koncentrációjuk. Különböző genotípusokban a sziromlevelek hajtásregenerációs képessége 0-100% között változott (NUGENT et al., 1991). A sziromból regenerált hajtások minősége sok esetben nem megfelelő; gyakori az *in vitro* vitrifikáció és a korai virágzás (NUGENT et al., 1991; VAN ALTVORST et al., 1992). Ennek az lehet az oka, hogy a sziromlevelek már érett szövetek és más az endogén hormonszintjük (VAN ALTVORST et al., 1996).

A levélből és a szárból történő hajtásregenerációt befolyásolja még az explantum elhelyezkedése is. A legjobb regenerációs képességgel a legfelső nóduszokon elhelyezkedő levelek és szárrészek rendelkeznek (VAN ALTVORST et al., 1996). Ezzel szemben ugyanebben a

vizsgálatban nem figyeltek meg különbségeket a hónaljrügyek regenerációs képességében. KISS et al. (2000) az etilén bioszintézis gátlásával 10%-kal növelte a levelek hajtásregenerációs képességét.

2.16. A szegfű transzformációs rendszere

Transzgénikus szegfű előállítására direkt és indirekt transzformációs módszerek egyaránt rendelkezésre állnak. A módszerek a következőkben foglalhatók össze:

-transzformáció *Agrobacterium tumefaciens* közvetítésével: levél, szirom (VAN ALTVORST et al., 1995b, 1996; MIROSHNICHENKO és DOLGOV, 2000; KISS et al., 2000), szár és szirom (LU et al., 1991), nódusz (NONTASWATSRI et al., 2004), levél (FIROOZABADY et al., 1995)

-biolisztikus transzformáció (génpuska, mikrolövedék bombázás): szár (ZUKER et al., 1995)

-kombinált módszer (sebzés mikrolövedékkel, majd fertőzés agrobaktérium szuszpenzióban): szár (ZUKER et al., 1997, 1999)

A transzformáció hatékonysága nagyon változó, befolyásolja a genotípus, a regenerációs rendszer és az alkalmazott módszer is. A legalacsonyabb hatékonyságot (0,5-1,3%) a sziromlevelek agrobaktériumos transzformációja során értek el (VAN ALTVORST et al., 1996; MIROSHNICHENKO és DOLGOV, 2000). A szár és a levél transzformációs hatékonysága a legjobb, 1,5-20% között változik (ZUKER et al., 1997). Levél agrobaktériumos transzformációjával 0-1,5%-os (VAN ALTVORST et al., 1995b), génpuskával 3%-os (ZUKER et al., 1995), a kettő kombinációjával 10-20%-os transzformációs hatékonyságot értek el (ZUKER et al., 1999). Az agrobaktériumos fertőzés további fontos tényezője az inokulációs és kokultivációs körülmények. NONTASWATSRI et al. (2004) tápanyagszegény inokulációs közeget alkalmazva egyes szegfű genotípusokban közel 100%-os hatékonyságot értek el a nóduszok transzformációjával.

2.17. Transzgénikus szegfű

Az élettani folyamatok és az adott tulajdonságot meghatározó gén(ek) megismerése és izolálása lehetővé teszi a szegfű fajták transzgénikus nemesítését, új tulajdonságok kialakítását.
Az első transzgénikus szegfű növények még csak riportergéneket (*uidA*) és szelektálható markergéneket (*nptII*, *bar*, *hpt*) hordoztak. Ezek elsősorban a transzformációs rendszerek kidolgozását szolgálták. Jelenleg a szegfű transzgénikus nemesítése két nagy területet foglal magába: az agronómiai és az esztétikai-díszítő tulajdonságok javítását (ZUKER et al., 2001b).

Agonómiai tulajdonságok: A szegfű legveszélyesebb kórokozója a fuzárium (*Fusarium oxysporum f. sp. dianthi*). Kitináz, ozmotin és PR-1 gének bevitele különböző kombinációban nagyfokú rezisztenciát biztosított a kórokozó 2. rasszával szemben a nagyon fogékony White Sim fajtában (ZUKER et al., 2001b).

Az *Agrobacterium rhizogenes rolC* gén expressziója több tulajdonság egyidejű javulásához vezetett transzgénikus szegfű vonalakban (ZUKER et al., 2001a). Ez a gén citokinin és auxin hatást mutatott a növényekben (CASANOVA et al., 2003). Anyanövényenként háromszor több virágzó hajtást növesztettek, 48%-kal nőtt a dugványok száma. Javult a dugványok gyökerező képessége, ötször nagyobb gyökértömeget fejlesztettek (ZUKER et al., 2001a). Jelentősen növekedett az *in vitro* transzformáns növények levelének és sziromlevelének hajtásregenerációs képessége (CASANOVA et al., 2004).

Esztétikai, díszítő tulajdonságok: A virágok legfontosabb díszítő értékét a sziromlevelek színe adja. Hagyományos nemesítési módszerekkel nem sikerült kék és lila szegfűfajtákat előállítani, mivel a szegfűből hiányzik a lila színt adó delfinidin szintéziséért felelős flavonoid 3',5'-hidroxiláz gén (FUKUI et al., 2003). A Florigene cég fehér fajtákat transzformálva a petúnia dihidroflavonol reduktáz és az ibolya flavonoid 3',5'-hidroxiláz génekkel állította elő a Moon™ fajtacsoportot (TANAKA, 2006, TANAKA et al., 1998; MOL et al., 1999) (6. ábra).

6. ábra: A Florigene cég virágszínben módosított transzgénikus szegfűfajtái (www.florigene.com)

Egy másik munkában ZUKER et al. (2002) a fenilpropanoid bioszintézis kulcsenzimének, a flavonon 3-hidroxiláz konstitutív antiszensz gátlása különböző mértékű (egészen a fehérig) virágszínváltozást eredményezett az eredetileg narancssárga fajtában. Ezekben a vonalakban az

illékony metilbenzoát tartalom 10-100-szorosára növekedett, így illatosabbakká váltak. Ez azért is jelentős, mert a nagyfokú szelekció miatt a legtöbb fajta elvesztette az illatát (BARLETTA, 1995). Az illatosság növelése volt a cél a *Clarkia breweri* linalol szintáz génjének konstitutív expressziójának kiváltásával is (LAVY et al., 2002). A transzgénikus növények jelentős mennyiségű linalolt és linalol oxidot (illatanyag prekurzorok) akkumuláltak, ennek ellenére nem lettek illatosabbak, mert a növények glikolizálva nem illékony formává alakították át.

A vágott virágok egyik legfontosabb értékmérő tulajdonsága a vázában való eltarthatóság (vázaélet hossz). A sziromlevelek öregedésért az etilén a felelős. A transzgénikus megközelítés célja az etiléntermelés csökkentése a szintézisben résztvevő enzimek koszupressziójával vagy antiszensz gátlásával. SAVIN et al.-nak (1995) az ACC-oxidáz antiszensz gátlásával 5-8 nappal sikerült késleltetni a virágok öregedését. Az *Arabidopsis etr1-1* allél heterológ expressziója szegfűben 6-16 nappal növelte a vázaélet hosszát (BOVY et al., 1999). KOSUGI et al. (2000) az endogén ACC oxidáz koszuppressziójával a kontrollhoz képest kétszeresére növelte a vázában való eltarthatóságot. IWAZAKI et al. (2004) a vázában való eltarthatóságot 10 nappal növelték az endogén ACC-szintáz antiszensz gátlásával. VERES et al. (2005a) eredményei szerint az alma ACC-szintáz antiszensz heterológ expressziója 6 nappal késleltette a virágok öregedését. A felhasznált fajta az illatos Bíbor (Óbuda Kertészet) szegfű volt. Ez az eredmény bizonyította, hogy genetikai módosítással a vázaélet hossz és az illatosság közti negatív korreláció legyőzhető (PRIEL, 1999). A Florigene cég a kodon optimalizált ACC-szintáz gén bevitelével 12 nappal hosszabbította meg a vázaélet hosszát.

Szintén speciális igény a virágzási idő meghosszabbítása a cserepes, nem vágott virágként használt törpe fajtáknál. KINOUCHI et al. (2006) az endogén ACC-szintáz, ACC-oxidáz szensz és antiszensz gátlásával, illetve egy mutáns szegfű etilén receptor cDNS transzformációjával kívánta a virágzási időt meghosszabbítani. Ezeknek a transzgénikus növényeknek az üvegházi tesztelése jelenleg folyamatban van.

Jelenleg kereskedelmi forgalomban csak 3 genetikailag módosított szegfűfajta kapható. Ezek a Florigene cég szabadalmai: Moondust™, Moonshadow™ és a hosszabb vázaéletű fajták, melyekbe a szulfonilurea herbicidrezisztencia géneket is beépítették (www.florigene.com).

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Növényanyag

A fru 2,6P2 koncentráció géntechnológiai módosítására és ennek hatásának tanulmányozására a kerti szegfű (*Dianthus caryophyllus*, L.) Improved White Sim (IWS) fajtáját használtuk fel, mely steril hajtástenyészeteit az Óbuda Kertészet bocsátotta rendelkezésünkre. A White Sim fajtakör tagjait gyakran használják a szegfű genetikai és élettani vizsgálataiban (SAVIN et al., 1995; ZUKER et al., 1995; 2001a) és az első sikeres transzgénikus szegfű növény is ebbe a csoportba tartozott (LU et al., 1991). A transzformációs kísérletekbe az IWS fajtán kívül a Bíbor fajtát (Óbuda Kertészet) és a kínai szegfűt (*D. chinensis,* L.) is bevontuk, azonban a részletes biokémiai és élettani vizsgálatokat csak az IWS fajtával végeztük el.

3.2. Sejtgenetikai és szövettenyésztési módszerek

A steril hajtástenyészeteket *in vitro* MS alaptáptalajon tartottuk fenn (MURASHIGE és SKOOG, 1962), amelyet 30 g/l szacharózzal egészítettünk ki és 8 g/l Oxoid agarral szilárdítottunk. A növényeket klímakamrában neveltük 200 W/m^2 fényerősség, 16 óra fény - 8 óra sötét fotoperiódus, 16-18 °C hőmérsékleten.

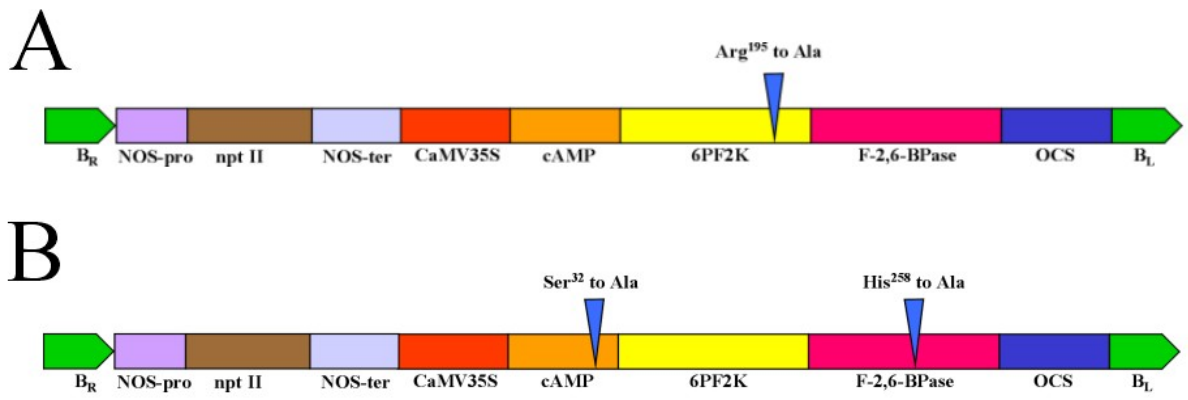
A növényregenerációra a fenti összetételű MS táptalajt használtuk fel, amelyet 1 mg/l benziladeninnel és 0,2 mg/l naftilecetsavval egészítettünk ki (RMS).

3.3. A transzformációra felhasznált gének

A transzformációra olyan patkánymáj eredetű bifunkcionális enzim cDNS-t (6PF2K/fru 2,6P2áz) használtunk fel, melyet helyspecifikus mutagenezissel módosítottak (7. ábra). Az első esetben, ha a mutáció a cAMP (Ser32 helyett Ala) kötő helyet és a fru 2,6P2áz (His 258 helyett Ala) kódoló régióját érintette, akkor az enzimnek csak a kináz aktivitása maradt meg (TAULER et al., 1991; KURLAND et al., 1992). A második esetben, ha a mutáció a 6PF2K kódoló régiójában történt (Arg195 helyett Ala), az enzimnek csak a foszfatáz aktivitása maradt meg (LI et al., 1992).
A cDNS 1860 bp hosszúságú, 470 aminosavat kódol. Az ATG start kodon előtt egy 173 bp, a TGA stop kodon után egy 271 bp hosszú át nem íródó és egy 29 nukleotidból álló polyA szekvenciát tartalmaz (DARVILLE et al., 1987).

3.4. A transzformációra felhasznált vektorok

A 3.3 alfejezetben bemutatott módosított bifunkcionális enzim cDNS-t szubklónozási lépéseken keresztül pBIN19 plazmidba építették (SCOTT et al. 1995; 2000). A vektor szelektálható markergénként az *npt*II, kanamicin rezisztencia gént hordozza. A bifunkcionális enzim cDNS-t konstitutív karfiolmozaik vírus promóter (CaMV35S) működteti (7. ábra).



7. ábra: A transzformációra felhasznált vektorkonstrukció. A: funkcionális biszfoszfatázt tartalmazó cDNS (fru 2,6P2 lebontás). B: funkcionális kinázt expresszáló cDNS (fru 2,6P2 szintézis). Rövidítések: BR: jobb oldali határszekvencia, NOS-pro: nopalin szintáz promóter, *npt*II: neomicin foszfotranszferáz, NOS-ter: nopalin szintáz terminátor, CaMV35S: karfiol mozaik vírus promóter, cAMP: ciklikus AMP kötő hely, OCS: oktopin szintáz, BL: bal oldali határszekvencia.

3.5. A szegfű transzformációja

A transzformációra az *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 törzsét használtuk fel.

3.5.1. Az Agrobacterium előkészítése

A transzformációra a -70 °C-on tárolt glicerines *Agrobacterium* törzsekből 50 mg/l kanamicin koncentrációjú szilárd LB táptalajon indítottuk a tenyészeteket. Éjszakán át 28 °C-on inkubáltuk, majd a kinőtt, különálló telepeket másnap 50 mg/l kanamicin tartalmú folyékony LB tápközegbe mostuk és 28 °C-os vízfürdőben éjszakán át rázattuk. A virulencia gének indukciójára transzformáció előtt 2-3 órával 0,1 mM acetoszíringont adtunk a szuszpenzióhoz.

3.5.2. Transzformáció

A transzformációt VAN ALTVORST et al. (1995b) módszere szerint végeztük el. A leveleket a felső négy nóduszról úgy szedtük le, hogy minél nagyobb alapi rész maradjon rajta, ami a hatékony növényregeneráció feltétele (VAN ALTVORST et al., 1994). A levágott leveleket az előkészített agrobaktérium szuzpenzióba helyeztük és 20 percig rázattuk. Ezt követően a leveleket regenerációs táptalajra (RMS) helyeztük és sötétben 3 napig együtt tenyésztettük a baktériummal.

3.5.3. Növényregeneráció és szelekció

Együttenyésztést követően az *Agrobacterium* elpusztítására a leveleket 500 mg/l cefotaximot tartalmazó steril vízben 30 percig mostuk. A kimosott leveleket RMS táptalajra helyeztük, amely 250 mg/l cefotaximot és 50 mg/l kanamicint tartalmazott. Amikor a regenerált zöld hajtások elérték a 0,5-1 cm-es nagyságot, levágtuk a levélalapról és a szelekciót 150 mg/l kanamicin tartalmú RMS táptalajon folytattuk tovább.

3.6. A növények kiültetése, nevelése

A molekuláris vizsgálatokkal bizonyítottan transzgénikus, gyökeres hajtásokat Jiffy-tápkockába ültettük és fokozatosan akklimatizáltuk. Ezt követően a növénykéket Albamix típusú virágföldbe ültettük. A vázaélet vizsgálatára a növényeket az Óbuda Kertészet üvegházában neveltük az üvegházi kontrollokkal azonos módon. A biokémiai és élettani vizsgálatokhoz a növényeket kontrollált körülmények között klímakamrában neveltük fel az *in vitro* tenyésztésnél már leírt paraméterek mellett.

3.7. Nukleinsav izolálás

PCR vizsgálatokhoz a DNS-t QIAGEN® DNeasy Plant Mini Kit-tel, a Southern hibridizációhoz szükséges nagyobb mennyiségű DNS-t pedig Shure módszere szerint vontuk ki a levelekből (SHURE et al., 1983). Az RT-PCR vizsgálatokra az RNS-t QIAGEN® RNeasy Plant Mini Kit-tel izoláltuk.

A nukleinsavak mennyiségét és minőségét Nanodrop spektrofotométerrel határoztuk meg 260 (DNS), illetve 280 nm-en (RNS).

3.8. PCR

A PCR reakciókat BioRad iCycler készülékben végeztük el. A 10 µl végtérfogatú reakcióelegy a következőket tartalmazta: 10-20 ng templát DNS, 0,6 U Taq polimeráz (WestTeam), 1x reakciópuffer, 0,25 mM $MgCl_2$, 15 µM dNTP, 0,2-0,2 µM primer. A reakciót az alábbi körülmények között hajtottuk végre: 2 perces 94 °C-os előciklus után negyven cikluson keresztül ismételve 10 másodperc 94 °C, 30 másodperc 58 °C, 1 perc 72 °C, majd a ciklusok végén 2 perc utópolimerizáció 72 °C-on. Az npt II gén 503 bp szakaszának felszaporításához az 5'-CTGAATGAACTGCAGGACGAGG-3' és a 5'-GCCAACGCTATGTCCTGATAGC-3' primereket használtuk (MAAS et al., 1997). A bifunkcionális enzim 1416 bp szakaszát az 5'-ATGTCTCGAGAGATGGGAGAACTCACTCAA-3' és az 5'-TCAGTAATGGGCAGGTACAGTGTCCAAGGA-3' összetételű primerekkel szaporítottuk fel.

3.9. RT-PCR

Az RT-PCR vizsgálatokat az Invitrogen cég SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® *Taq* DNA Polymerase kitjével végeztük el BioRad iCycler készülékben. Az 50 µl végtérfogatú reakcióelegy összetétele a következő volt: 20 ng templát RNS, 2 µl 2x reakciópuffer, 10-10 µM primer, 2 µl SuperScript™ III RT/Platinum® *Taq* Mix.

A cDNS-t 55 °C-on 30 percig szintetizáltuk. Ezt követően az amplifikációt a következő protokoll szerint hajtottuk végre: előciklus 1 perc 94 °C, majd 40 cikluson keresztül ismételve 15 másodperc 94 °C, 30 másodperc 58 °C, 1 perc 68 °C és végül 5 perc utópolimerizáció 68 °C-on.
A bifunkcionális enzim 1416 bp hosszú szakaszának amplifikálására a 3.9. fejezetben ismertetett primerpárokat használtuk fel.

3.10. Southern hibridizáció

A jelölést és a Southern hibridizációt a Boehringer-Mannheim (Roche) előírásai szerint hajtottuk végre (BOEHRINGER-MANNHEIM, 1999). A hibridizációt digoxigeninnel jelölt próbával végeztük el. A jelölésre a pBIN19 plazmidból a bifunkcionális enzim PCR-rel felszaporított 1416 bp hosszúságú szakaszát használtuk fel. A DNS templátot (5-10 µg) 10 percig vízfürdőben 95 °C-on denaturáltuk, majd jégen hozzáadtunk 2 µl hexanukleotid keveréket, 2 µl dNTP-t (benne a dig-jelölt dUTP-vel) és 1 U/µl Klenow enzimet. A reakciót 37 °C-on 20 óráig végeztük. A jelölést 0,2 M EDTA-val állítottuk le. A DNS-t előhűtött 2,5 µl 4 M-os LiCl-dal és 7,5 µl előhűtött etanollal csaptuk ki -70 °C-on 2 órán keresztül. A csapadékot 70 %-os etanollal mostuk és szárítás után 50 µl vízben oldottuk fel.

A 40 µg *Eco*RI-gyel emésztett genomi DNS-t 1%-os agaróz gélen futtattuk meg és kapilláris technikával nylon memránra blottoltuk át (SAMBROOK et al., 1989). A rögzítést UV átvilágítón végeztük el.

A membrán előhibridizációját 1 órán keresztül 56 °C-on végeztük 0,25 mg/ml denaturált hal spermát tartalmazó hibridizációs pufferben. Ezt követően az oldatot friss hibridizációs oldatra cseréltük, amely a hal sperma DNS-en kívül tartalmazta a jelölt próbát. A hibridizációt 16 órán keresztül 56 °C-on végeztük.

A hibridizációt követően a membránt 2x5 percig 2X SSC, 0,1%-os SDS (50 ml/100 cm^2 membrán) oldatban rázattuk. A mosást 0,1X SSC, 0,1% SDS oldatban folytattuk 2x15 percig 56 °C-on, végül 20 ml mosó pufferrel öblítettük 5 percig.

A detektálás első lépésében a membránt 30 percig puffer II-ben rázattuk. Ezt követően újabb 30 percig rázattuk az Anti-digoxigenin-AP és puffer II 1:10000 arányú oldatában. Az Anti-digoxigenin-AP mint antitest kötődik a DIG-jelölt DNS próbához. A nem kötődött antitesteket kétszer 15 perces mosó pufferes mosással (100 ml/100 cm^2 membrán) távolítottuk el, majd a membránt 5 percig puffer III-ban (20 ml/100 cm^2 membrán) rázattuk. A sávok előhívását sötétben végeztük 10 ml frissen készített 5-bróm-4-klór-3-indolil foszfát (BCIP), nitrokék tetrazolium (NBT) oldatban. A savas foszfatáz enzim (AP) ezeket a molekulákat hasítja és oldhatatlan liláskék csapadékot hoz létre. A színreakciót a megfelelő erősségű jel kialakulása után desztillált vízzel állítottuk le.

3.11. Biokémiai és élettani mérések

A fru 2,6P2, az enzimaktivitások, a szénhidrát komponensek és a fotoszintetikus paraméterek mérésére az előzetes Lugol (Lugol: 1 g KI, 1 g I_2 100 ml desztillált vízben) oldatos festés alapján két-két kináz és biszfoszfatáz expresszáló növényt választottunk ki. Kontrollként nem transzformált IWS növényeket alkalmaztunk. A méréseket 3 hónappal a kiültetést követően végeztük el. A mintavételt a megvilágítás megfelelő szakaszában végeztük el egy-egy egyedi növényről, a 3-5. nóduszról leszedett leveleket azonnal folyékony nitrogénbe mártottuk, homogenizáltuk, -70 °C-on tároltuk és ezekből végeztük el a biokémiai méréseket a 3. számú mellékletben (M3) feltüntetett ismétlésben.

3.11.1. Fruktóz 2,6-biszfoszfát

A fru 2,6P2 lúgos extrakcióját BALL és AP REES (1988) módszere szerint végeztük el. A fru 2,6P2 extrém sav érzékeny, a második szénatomon lévő foszfát csoport savas közegben gyorsan hidrolizál. Az extrakciót 50 mM NaOH-dal és 0,1% Triton X-100 keverékével végeztük 4 °C-on. A szuszpenziót 2 percig 13000 rpm-mel centrifugáltuk, a felülúszót 5 percig 80 °C-on tartottuk, majd gyorsan lehűtöttük 4 °C-ra. A semleges pH-t 20 mM Hepes és 1 M ecetsavval állítottuk be.

A fru 2,6P2 mérését VAN SCHAFTINGEN et al. (1982) és STITT (1990b) leírásai szerint végeztük el. A meghatározás a PFP aktiválásán keresztül történt, amelyet a 340 nm-en történő abszorpció csökkenéssel követtünk. A reakcióelegy a következő komponenseket tartalmazta: 20 µl növényi extraktum, 100 mM Tris-HCl puffer (pH 8,1), 10 mM $MgCl_2$, 120 mM Fru 6P, 15 mM NADH, 1 U aldoláz, 10 U trióz foszfát izomeráz, 17 U glicerinsav 3-foszfát dehidrogenáz, 30 mM $Na_2P_2O_7$ és 50 µl PFP. A minták értékelését standard görbe elkészítésével végeztük.

3.11.2. Enzimaktivitások

A frissen szedett leveleket azonnal eldörzsöltük folyékony nitrogénben. Az extrakciót 50 mM Hepes-KOH (pH 7,4), 5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10%(v/v) glicerin, 0.1% (v/v) Triton X-100, 5 mM DTT, 2 mM ε-amino-kapronsav, 2 mM benzamidin összetételű pufferben végeztük el TRETHEWEY et al. (1998) szerint. A mintákat 15 percig, 4 °C-on 2800 g fordulaton centrifugáltuk, az enzimaktivitások mérésére a tiszta felülúszót használtuk fel.

Fruktóz 1,6-biszfoszfatáz

A fruktóz 1,6-biszfoszfatáz mérését KRUGER és BEEVERS (1984) módszere szerint végeztük el a következő reakcióelegyben: 40 µl növényi extraktum, 20 mM Hepes-NaOH (pH 7,0), 5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM NAD^+, 1 U/ml foszfoglükóz izomeráz és 1 U/ml glükóz 6-foszfát dehidrogenáz. A reakciót 0,5 mM fruktóz 1,6-biszfoszfát hozzáadásával indítottuk.

Pirofoszfát függő foszfofrukto kináz

A pirofoszfát függő foszfofrukto kináz mérését SCOTT et al. (1995) módszere szerint végeztük el a következő reakcióelegyben: 10 µl növényi extraktum, 75 mM Hepes-NaOH (pH 7,5), 2 mM Mg-acetát, 0,15 mM NADH, 10 µM fruktóz 2,6-biszfoszfatáz, 7,5 mM fruktóz 6-foszfát, 1 U/ml aldoláz, 1,36 U/ml glycerol 3-foszfát dehidrogenáz és 2,6 U/ml trióz foszfát izomeráz. A reakciót 0,25 mM tetranátrium pirfoszfát hozzáadásával indítottuk.

ADP-glükóz pirofoszforiláz

Az ADP-glükóz pirofoszforiláz mérését MÜLLER-RÖBER et al. (1992) módszere alapján végeztük el a következő reakcióközegben: 30 µl növényi extraktum, 80 mM Hepes-NaOH (pH 7,4),

10 mM $MgCl_2$, 0,02%(w/v) BSA, 0,6 mM NAD^+, 10 µM glükóz 1,6-biszfoszfát, 10 mM 3-foszfoglicerinsav, 3 mM DTT, 1 mM ADP-glükóz, 2,5 U/ml foszfoglükomutáz és 1 U/ml glükóz 6-foszfát dehidrogenáz. A reakciót 2 mM tetranátrium pirofoszfát hozzáadásával indítottuk.

6-foszfofrukto-1-kináz

A 6-foszfofrukto-1-kináz mérését BURRELL et al. (1994) módszere alapján végeztük el a következő reakcióelegyben: 25 µl növényi extraktum, 100 mM Tris/HCl (pH 8,0), 5 mM $MgCl_2$, 0,1 mM NADH, 5mM fruktóz 6-foszfát, 1 U/ml aldoláz, 1,36 U/ml glycerol 3-foszfát dehidrogenáz és 2,6 U/ml trióz foszfát izomeráz. A reakciót 1 mM ATP hozzáadásával indítottuk.

Hexokináz

A hexokináz enzim aktivitását VERAMENDI et al. (1999) módszere szerint végeztük el a következő reakcióelegyben: 5 µl növényi extraktum, 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 4 mM $MgCl_2$, 0,33 mM NAD^+, 2 mM ATP, 2,5 U/ml glükóz 6-foszfát dehidrogenáz. A reakciót 1 mM glükóz hozzáadásával indítottuk.

3.11.3. Szénhidrátok és foszforilált intermedierek

Szacharóz

A szacharóz mennyiségi meghatározását a Boehringer Mannheim (Roche) teszt kit UV módszere szerint végeztük el (BOEHRINGER-MANNHEIM, 1984). A szacharózt 60 °C-os vízzel oldottuk ki az elporított levélmintákból. A minta tisztítását Carrez I (3,6%-os kálium-hexacianoferrát), Carrez II (7,2%-os cink-szulfát) és 100 mM NaOH elegyével végeztük, majd Whatman szűrőpapíron leszűrtük. A reakcióelegy 100 µl növényi extraktumot, 0,1 M citrát puffert (pH 4,6), 10,75 mg/ml ß-fruktozidázt, 0,23 M trietanolamin puffert, 0,36 mM NADP-t, 2,5 mM ATP-t, 4,3 mg/ml hexokinázt, 2,15 mg/ml glükóz 6-foszfát dehidrogenázt tartalmazott. A szacharóz koncentrációt 340 nm-en spektrofotometrikusan határoztuk meg.

Keményítő

A keményítő kvalitatív kimutatására lugol oldatos festést alkalmaztunk. A klorofill elbontására az 1 g levélszövetet 10 ml acetonnal mostuk. A színtelen mintát folyékony nitrogénben elporítottuk és a keményítőtt 3 ml 8 M sósavval oldottuk ki. Az oldatot 5 M NaOH-dal semlegesítettük és a színreakciót 15 µl Lugol (Lugol: 1 g KI, 1 g I_2 100 ml desztillált vízben) hozzáadásával végeztük el. A keményítő mennyiségi meghatározását a Boehringer Mannheim (Roche) teszt kit UV módszere szerint végeztük el (BOEHRINGER-MANNHEIM, 1984). A levélmintát folyékony nitrogénben elporítottuk és a keményítő oldhatóvá tételére 8 M-os sósav és dimetilszulfoxid elegyét használtuk, majd az extrakciót 30 percig 60 °C-os vízfürdőben végeztük el. Az oldatot Whatman szűrőpapíron szűrtük. Az extraktum pH-ját 5M-os NaOH-dal állítottuk be (pH 4-5). A reakcióelegy 100 µl

növényi extraktumot, 15 M citrát puffert (pH 4,6), 2,8 U/ml amiloglikozidázt, 0,23 M trietanolamin puffert, 0,36 mM NADP-t, 2,5 mM ATP-t, 5,7 U/ml hexokinázt, 2,9 U/ml glükóz 6-foszfát dehidrogenázt tartalmazott. A keményítő koncentrációját 340 nm-en spektrofotometrikusan határoztuk meg.

Glükóz, fruktóz

A glükóz és fruktóz mennyiségi meghatározását a Boehringer Mannheim (Roche) teszt kit UV módszere szerint végeztük el (BOEHRINGER-MANNHEIM, 1984). A minták előkészítése a szacharóz mérésnél leírt módszer alapján történt. A reakcióelegy 100 µl növényi extraktumot, 0,23 M trietanolamin puffert, 0,36 mM NADP-t, 2,5 mM ATP-t, 1,7 U/ml hexokinázt, 0,9 U/ml glükóz 6-foszfát dehidrogenázt, 4,3 U/ml foszfoglükóz izomerázt tartalmazott. A glükóz és a fruktóz koncentrációt 340 nm-en spektrofotometrikusan határoztuk meg.

Glükóz 6-foszfát, fruktóz 6-foszfát

A glükóz 6-foszfát és a fruktóz 6-foszfát extrakcióját és mérését MICHAL (1984a) módszere szerint hajtottuk végre. Az elporított szövetek extrakcióját 0,6 M perklórsavval végeztük. Centrifugálás után (10 perc 3000/perc) a felülúszó pH-ját 5 M kálium-karbonáttal 3,5-re állítottuk be. A reakcióelegy 1 ml növényi extraktumból, 200 mM trietanolamin hidroklorid pufferből, 0,2 mM NADP, 5 mM $MgCl_2$-ból, 0,17 U/ml glükóz 6-foszfát dehidrogenázból, 0,7 U/ml foszfoglükóz izomerázból állt.

Dihidroxiaceton foszfát, glicerinsav 3-foszfát

A dihidroxiaceton foszfát és a glicerinsav 3-foszfát extrakciója a fenti módszer szerint, a mennyiségi meghatározás MICHAL (1984b) módszere alapján történt. Az elporított szövetek extrakcióját 0,6 M perklórsavval végeztük. Centrifugálás után (10 perc 3000/perc) a felülúszó pH-ját 5 M kálium-karbonáttal 3,5-re állítottuk be. A reakcióelegy 1,5 ml növényi extraktumból, 200 mM TEA pufferből (0,4 M trietanolamin hidroklorid, 40 mM EDTA), 17 µM NADH-ból, 0,13 U/ml glicerinsav 3-foszfát dehidrogenázból, 0,83 U/ml triózfoszfát izomerázból, 0,045 U/ml aldolázból állt.

3.11.4. Gázcsere mérések

A fotoszintézis ráta, sztóma konduktancia, transpirációs ráta és intracelluláris CO_2 meghatározását LI-6400 infravörös gáz analizátorral (LICOR, Lincoln, Nebraska, USA) végeztük el 200 µmol/m^{2}s fény intenzitás mellett légköri CO_2 koncentráción, 21 °C-on (8. ábra).

8. ábra: A LICOR infravörös gáz analizátor

3.11.5. Klorofill tartalom

A fotoszintetikus pigmenttartalom meghatározását PORRA et al. (1989) módszere szerint végeztük el. Dörzsmozsárba mértünk 0,2 g apróra vágott levélmintát. A növényi anyaghoz kevés kvarchomokot és a homogenizálás során szabaddá váló savas növényi sejtnedv megkötésére csipetnyi $CaCO_3$-t adtunk. A pigmentekek 15 ml acetonnal vontuk ki. A kivonatot 6 percig 3000/perc fordulaton centrifugáltuk. A felülúszót leöntöttük és acetonnal 20 ml végtérfogatra egészítettük ki. Az így nyert tiszta kivonatot 100%-os aceton ellenében fotometráltuk 662 (klorofill-a) és 644 (klorofill-b) nm-es hullámhosszon.

3.11.6. A vázaélettartam mérése

A vázaélettartam vizsgálatát az Óbuda Kertészet üvegházába kiültetett növényeken végeztük el. Az értékelésre 50 cm szárhosszúságú, azonos virágzási fázisú (a sziromlevél 90°-os szöget zár be a csészelevelekkel) hajtásokat szedtünk. A transzgénikus és kontroll virágokhoz mindig azonos virágzási fázisú kertészeti kontroll növényt párosítottunk. A vázaélettartam számításánál a szedett állapot volt az első nap, az utolsó pedig amikor a sziromlevelek 50%-a elhervadt. Az év különböző időszakában a környezeti feltételek eltérőek voltak, ezért a vázaélettartamot relatív értékként adtuk meg; a transzgénikus és a hozzá párosított kertészeti kontroll növény vázaélethossza közötti különbséget vettük figyelembe (VERES et al., 2005a). A párosított virágokat 0,5 l csapvizet tartalmazó üvegedénybe helyeztük, amely sem gombaölő sem konzerváló szereket nem tartalmazott.

3.12. A szárszilárdság mérése

A szárszilárdság meghatározását üvegházban nevelt virágzó hajtásokon végeztük el. A kertészeti gyakorlatban a szártörést úgy vizsgálják, hogy fejjel lefelé megrázzák a virágokat (Tóth Endre, szóbeli közlés). A szárszilárdság objektív értékelését Veres et al. (2005b) alapján a SZIE Gépészmérnöki Karának Mechanika Tanszékén végeztük el egy FM-250 típusú szakítószilárdságot mérő készülékkel.

3.13. Statisztikai értékelés

A mérési adatok statisztikai értékelésére a Microsoft® Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, Seattle, USA) Student t-tesztjét használtuk fel. Az adatok közötti szignifikáns eltéréseket $P<0,05$ megbízhatóság mellett értékeltük.

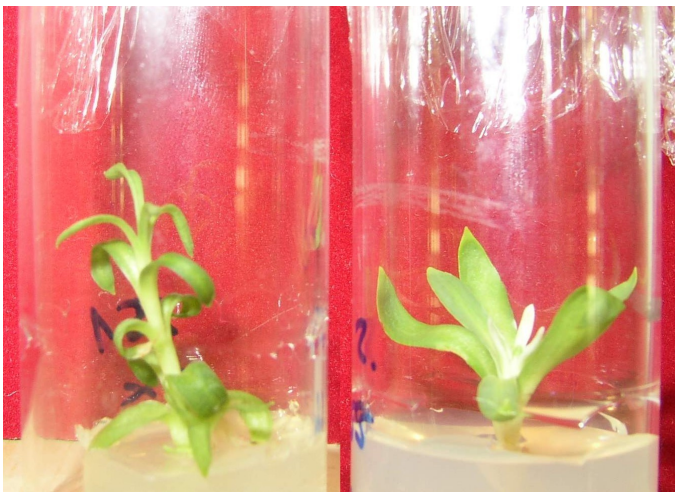
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

4.1. Növénytranszformáció, szelekció

A transzformációra VAN ALTVORST et al. (1995b) módszerét használtuk fel. A transzformációt követően első lépésben a fejlődő hajtásokat 50 mg/l kanamicin-tartalmú táptalajon szelektáltuk. Az antibiotikum rezisztencia gént nem tartalmazó hajtások kifehéredtek (9. ábra).

9. ábra: Transzformációt követő hajtásregeneráció 50 mg/l kanamicint tartalmazó táptalajon. A nem transzformáns hajtások kifehérednek és elpusztulnak. A zöld hajtások transzgénikus jelöltek.

Az előszelekciót követően a zöld hajtásokat levágtuk a levélről (ne zavarja az antibiotikum diffúzióját). Mivel a szegfű viszonylag nagy dózisban (50-100 mg/l) is képes elviselni a kanamicint (ESTOPÁ et al., 2001), ezért a regenerált hajtások további szelekcióját 150 mg/l kanamicint tartalmazó táptalajon folytattuk tovább. Ebben a szelekciós szakaszban is kaptunk kifehéredő, nem transzgénikus hajtásokat (10. ábra).



10. ábra: A regenerált hajtások további szelekciója 150 mg/l kanamicin koncentrációjú táptalajon. A bal oldali növény a magasabb antibiotikum tartalmú táptalajon is növekszik és zöld marad, míg a jobb oldali hajtás a rezisztenciagén hiányában kifehéredik.

4.2. Transzformációs hatékonyság

A transzfomációs kísérletekbe a jó regenerációs képességű kerti szegfűfajták (IWS, Bíbor) (KISS et al., 2000) mellett a kínai szegfűt használtuk fel. Ismert, hogy a szegfű transzformációjának sikerét a növényi explantum és az alkalmazott módszerek mellett jelentősen befolyásolja a genotípus is. Ennek vizsgálatára mindhárom genotípusból 150-150 levelet fertőztünk *A. tumefaciens*-szel. A regenerált és a transzgénikus hajtások számát és százalékos értékeiket az 1. táblázatban mutatjuk be.

1. táblázat: A genotípus és a vektor típus hatása a regenerációs és transzformációs hatékonyságra

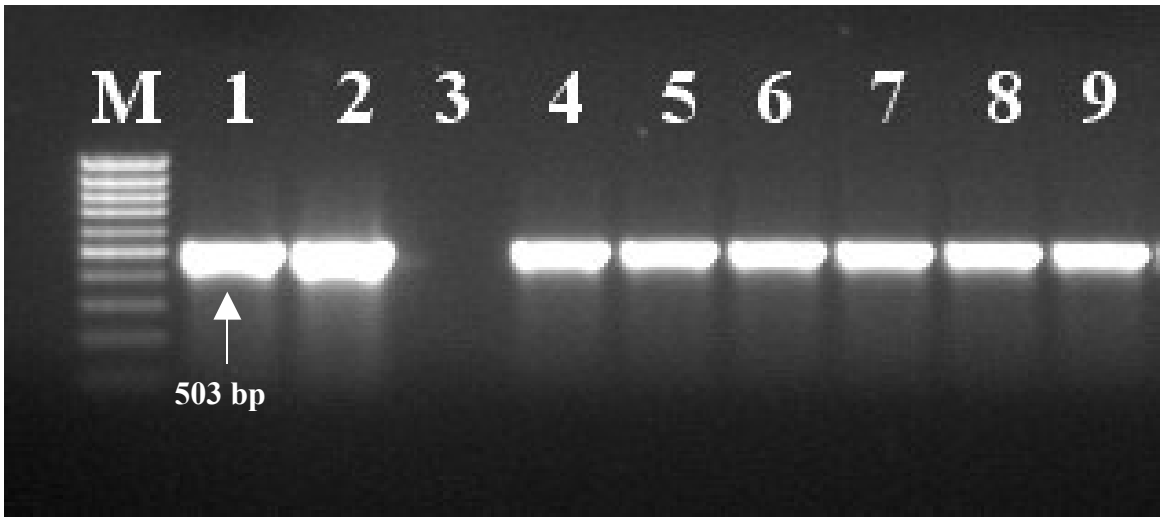
	Regenerációs és transzformációs hatékonyság					
Genotípus/vektor típus	Transzformált levelek száma (db)	Regenerált explantumok száma (db)	Regenerált explantumok száma (%)	Regenerált hajtások száma (db)	Transzgénikus hajtások száma (db)	Transzgénikus hajtások száma (%)
D. chinensis						
6PF2K	150	10	6,7	16	1	6,3
Fru 2,6P2áz	150	16	10,7	22	2	9,1
D. caryophyllus, IWS						
6PF2K	150	27	18	31	5	16,1
Fru 2,6P2áz	150	33	22	45	8	17,7
D. caryophyllus, Bíbor						
6PF2K	150	22	14,7	26	4	15,4
Fru 2,6P2áz	150	19	12,7	23	3	13

Mint a táblázatból is látható a két szegfűfaj transzfomációs hatékonysága jelentősen függött a genotípustól, kerti szegfűben 13-17,7%, kínai szegfűben 6,3-9,1% között változott. A kerti szegfűben kapott értékek meghaladták az eredeti VAN ALTVORST módszer eredményeit (1,5-12%), de nem érték el NONTASWATSRI et al (2004) munkájában leírt 20-93%-os hatékonyságot. A regenerált hajtások száma a kínai szegfűben kisebb volt, mint a kerti szegfűben kapott értékek. Ennek oka, hogy a kínai szegfű leveleinek alapi része – amely a hajtásregeneráció helye – kisebb, mint a kerti szegfűé (VAN ALTVORST et al., 1995a).

4.3. A transzgén integrációjának és működésének bizonyítása

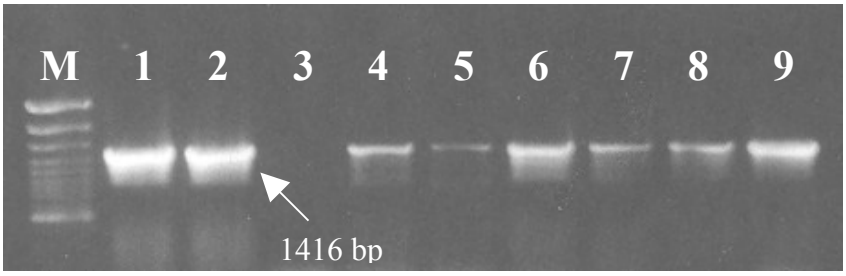
A transzgén sikeres integrációját első lépésben PCR reakcióval bizonyítottuk. A szelekciót túlélő növényekből DNS-t izoláltunk és az nptII-re, valamint a bifunkcionális enzim cDNS-ére tervezett génspecifikus primerekkel végeztük el a reakciót. A két primerpár alkalmazása megbízhatóbbá teheti a vizsgálatot, mivel nem minden esetben épül be a teljes hosszúságú tDNS (head to head, head to tail).

Az nptII specifikus primerek a transzgénikus növényekben és a pozitív plazmid kontrollban egyaránt felszaporítottak egy 503 bp hosszúságú DNS szakaszt, amely a kontroll nem transzformált növényben hiányzott (11. ábra)



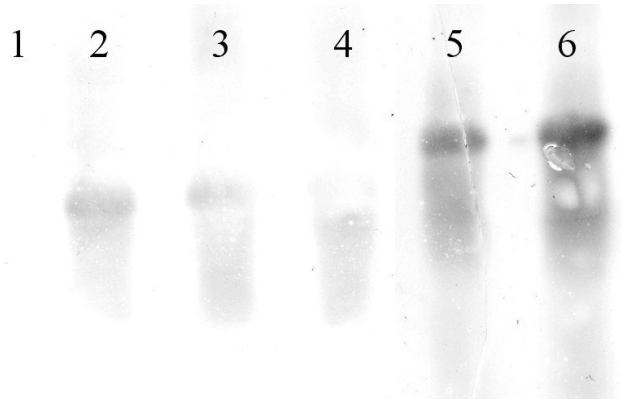
11. ábra: A transzgén integrációjának bizonyítása nptII specifikus primerekkel elvégzett PCR-rel. A transzgén jelenlétét az 503 bp hosszúságú DNS szakasz felszaporodása jelezte, amely hiányzott a negatív kontrollból. 1-2: pozitív kontroll, 3: negatív kontroll, 4-9: transzgénikus növények, M: molekulatömeg marker (Fermentas GeneRuler 100 bp ladder/ 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 100).

A bifunkcionális enzim cDNS-re tervezett primerekkel a teljes 1416 bp DNS szakaszt sikerült felszaporítanunk a transzgénikus vonalakban és a pozitív kontrollokban (12. ábra).



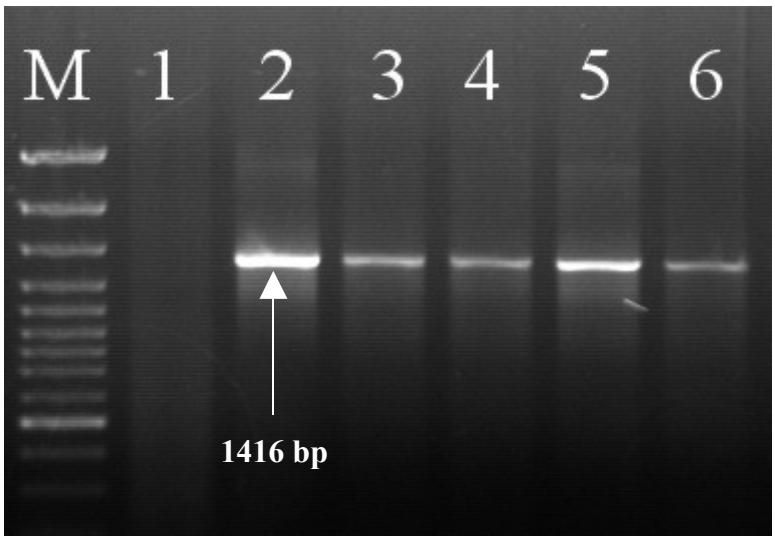
12. ábra: A transzgén integrációjának bizonyítása a bifunkcionális enzim cDNS specifikus primerekkel elvégzett PCR-rel. A transzgén jelenlétét az 1416 bp hosszúságú DNS szakasz felszaporodása jelezte, amely hiányzott a negatív kontrollból. 1-2: pozitív kontroll, 3: negatív kontroll, 4-9: transzgénikus növények, M: molekulatömeg marker (Fermentas GeneRuler 100 bp ladder / 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, bp).

A transzgén integrációjának további bizonyítására Southern hibridizációt végeztünk. Ez a módszer a PCR reakciónál pontosabb, azonban sorozatvizsgálatokra hosszabb időt vesz igénybe. A teljes hosszúságú bifunkcionális cDNS-t digoxigeninnel jelöltük és a hibridizációt 56 °C-on végeztük el (13. ábra). A kontroll, nem transzformált növényben nem kaptunk hibridizáló fragmentumot (1). A transzgénikus vonalakban (2-6) a transzgén különböző kópiaszámban integrálódott, a kópiaszámot azonban nem határoztuk meg.



13. ábra: Southern hibridizáció digoxigeninnel jelölt próba DNS-sel. 1: negatív kontroll, 2-6: transzgénikus vonalak (F406, F407, F406, P207, P228).

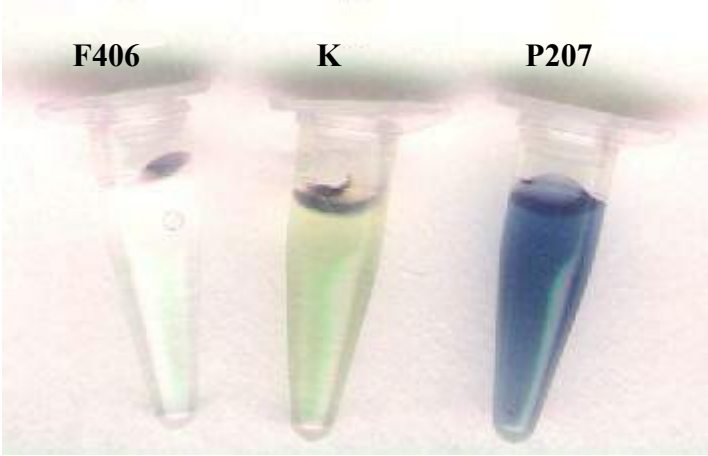
A beépült transzgén működésének bizonyítására a cDNS-re specifikus primerekkel RT-PCR-t végeztük. A transzgénikus növényekben a várt méretű DNS szakasz (1416 bp) jelezte a gén expresszióját (14. ábra). A fragmentumok intenzitásbeli eltérései eltérő mértékű génexpresszióra utalnak.



14. ábra: Az integrálódott bifunkcionális enzim működésének bizonyítása RT-PCR-rel. A transzformáns egyedekben egy 1416 hosszúságú termék szaporodott fel. 1: nem transzformált kontroll, 2-6: transzformáns vonalak (F401, F406, F407, P207, P228). M: molekulatömeg marker (Fermentas GeneRuler 100 bp ladder / 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, bp).

4.4. A transzgénikus növények biokémiai és élettani vizsgálata

A transzgén integrációjának és működésének bizonyítását követően megkezdtük a növények részletes biokémiai és élettani jellemzését. A fru 2,6P2 szénhidrát anyagcserében betöltött szerepének megerősítésére (szabályozza a szén elosztását a keményítő és a szacharóz szintézise között) első lépésben a keményítő tartalom kvalitatív kimutatását végeztük el. A növényi extraktumot Lugol oldattal való kék festődés alapján is meg lehet különböztetni a kontrollt és az egyes transzgénikus vonalakat (15. ábra).



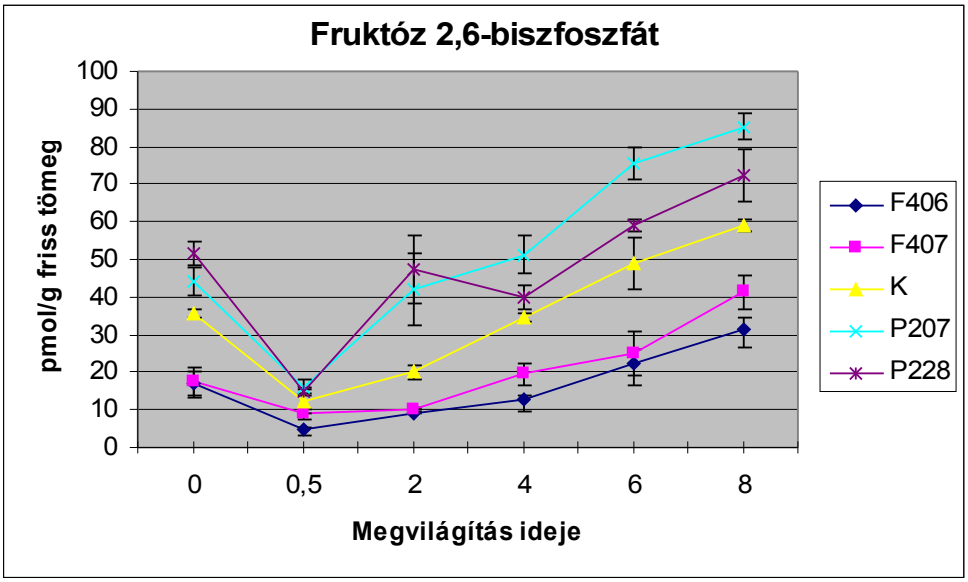
15. ábra: A keményítő tartalom Lugol oldatos kimutatása. A biszfoszfatázt expresszáló növényi extraktum színtelen (F406), míg a kinázt expresszáló növényi kivonatban (P207) Lugol oldat hatására a kontrollhoz képest (K) erős kék színeződés utal a keményítő túltermelésre.

A jód keményítő próba alapján a további vizsgálatokra az F406, F407 (biszfoszfatáz expresszáló vonalak) és a P207, P228 (kináz expresszáló vonalak) transzgénikus növényeket választottuk ki.

A fru 2,6P2 és a fotoszintetikus gázcsere paraméterek mérését 8 órás fény periódusban végeztük el. Mivel a fotoszintézis ráta a megvilágítás 4. órájában érte el a maximumát (20/A ábra), az enzimaktivitásokat és a szénhidrát komponensek meghatározását erre az időpontra időzítettük.

4.4.1. Fruktóz 2,6-biszfoszfát

A növényekben a fru 2,6P2 koncentrációját jelentősen befolyásolja a fény és annak intenzitása. Ezért a méréseket a megvilágítás különböző szakaszaiban végeztük el. Megvilágítás hatására a kontroll és valamennyi transzgénikus növényben jelentősen lecsökkent a fru 2,6P2 mennyisége (16. ábra). Ennek az oka a következő: fény hatására megindul a növények fotoszintézise, amely növeli a trióz foszfátok koncentrációját a citoplazmában. Az irodalmi áttekintésben láthattuk, hogy a trióz foszfátok gátolják a bifunkcionális enzim fru 2,6 P2 szintéziséért felelős kináz aktivitását, az FBPáz felszabadul a gátlás alól és megindul a szacharóz szintézise. Később, amikor a fotoszintézis ráta meghaladja a szacharóz szintézis kapacitását, a trióz foszfátok mennyisége csökken a citoplazmában. Ez aktiválja a bifunkcionális enzim kináz és gátolja a biszfoszfatáz aktivitását, így a fény periódusban növekedni fog a fru 2,6P2 mennyisége (NIELSEN et al., 2004).



16. ábra: A fru 2,6P2 szint alakulása a funkcionális biszfoszfatázt (F406, F407), a kinázt (P207, P228) expresszáló transzgénikus és nem transzformált kontroll (K) vonalakban a fényperiódus során.

A 16. ábrán láthatjuk, hogy a fényszakasz első félórájában a kontroll és transzgénikus vonalak fru 2,6P2 tartalma szignifikánsan nem tért el egymástól. A következő félórában megindult a fru 2,6P2 szint növekedése, azonban a biszfoszfatázt expresszáló vonalakban (F406, F407) szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll, nem transzformált növényhez képest. A kinázt expresszáló vonalakban (P207, P228) a fru 2,6P2 koncentrációja négy-ötszörösére növekedett a kontroll, valamint az F406 és az F407 vonalakhoz képest.

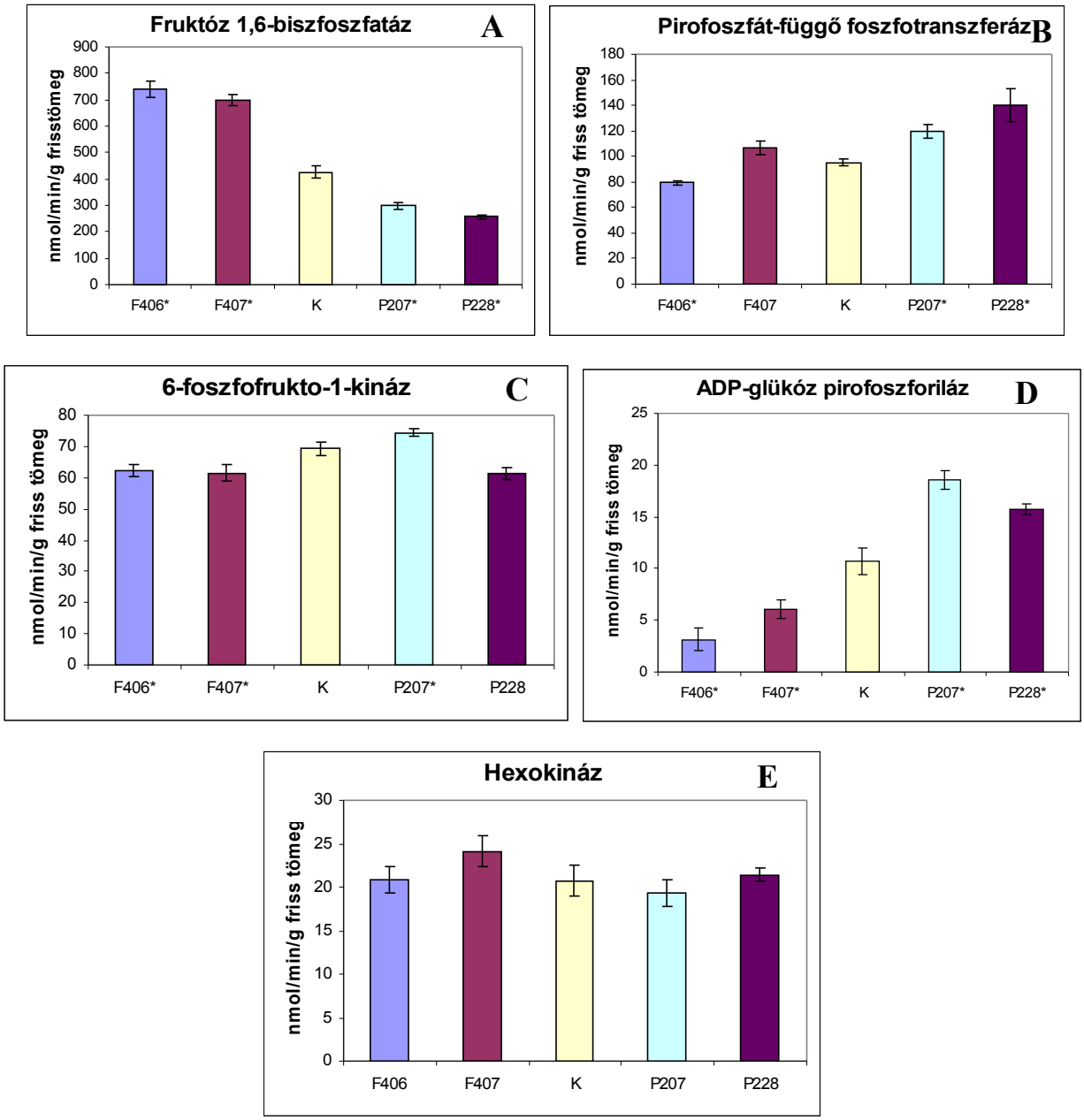
A fény periódus további szakaszában a fru 2,6P2 koncentrációja tovább emelkedett és a negyedik órában a kontroll szignifikánsan különbözött a F406, F407 vonalaktól.

A fru 2,6P2 szabályozó szerepét a szénhidrát anyagcserében már több transzgénikus modell növényben is megvizsgálták az általunk használt emlős eredetű módosított bifunkcionális cDNS alkalmazásával (SCOTT et al., 1995, 2000; TRUESDALE et al., 1999; TOLDI et al., 2002). Dohányban a funkcionális biszfoszfatáz (fru 2,6P2áz) expressziója 54-80%-kal csökkentette, a funkcionális kináz (6PF2K) expressziója pedig 104-230%-kal növelte a fru 2,6P2 koncentrációját a nem transzformált kontrollhoz képest (SCOTT et al., 1995, 2000). Korallvirágban (*Kalanchöe daigremontiana*) – egy CAM fotoszintézis típusú fajban – a kináz enzim bevitele 228-350%-kal növelte a fru 2,6P2 mennyiségét a kontrollhoz viszonyítva (TRUESDALE et al., 1999). Szamócában a biszfoszfatáz enzim expressziójának hatására a fru 2,6P2 mennyisége a kontroll növényekhez képest 12-90%-kal csökkent, míg a kináz cDNS tartalmazó transzgénikus vonalakban 120-510%-kal növekedett (TOLDI et al., 2002). Cukornádban a biszfoszfatáz forma expressziója levélben 11-18%-kal csökkentette, a nem fotoszintetizáló nóduszban pedig 30-96%-kal növelte a fru 2,6P2 mennyiségét a kontrollhoz viszonyítva (HITEN, 2006). Ugyanebben a munkában a kináz enzim gén heterológ expressziója nem okozott szignifikáns változást a fru 2,6P2 mennyiségében. Ez az emlős eredetű módosított rekombináns enzim ezekben a fajokban - a szegfűhöz hasonlóan - lehetővé tette, hogy „elnyomjuk” a növény saját bifunkcionális enzimét és szelektíven csökkentsük vagy növeljük a fru 2,6P2 koncentrációját.

A fru 2,6P2 élettani szerepének vizsgálatára egy másik alternatíva is lehetséges. *Arabidosis*-ban és burgonyában a saját, izolált bifunkcionális enzim gén antiszensz szupressziója nagymértékű, 90-95%-os redukciót okozott a fru 2,6P2 mennyiségében (DRABORG et al., 2001; RUNG et al., 2004). Ez a megközelítés azonban nem teszi lehetővé az enzim két aktivitásának elválasztását.

4.4.2. Enzimaktivitások

A transzgénikus vonalakban a fru 2,6P2 mennyiségének módosítása szignifikáns változásokat okozott a kulcsenzimek aktivitásában. A fru 2,6P2 szintjének növekedése a P207 és P228 vonalakban a kontrollhoz képest 30-40%-kal gátolta a FBPázt és 28-40%-kal aktiválta a PFP-t (17/A, B ábra).



17. **ábra:** A fruktóz 1,6-biszfoszfatáz (**A**), a pirofoszfát-függő foszfotranszferáz (**B**), a 6-foszfofrukto-1-kináz (**C**), az ADP-glükóz pirofoszforiláz (**D**) és a hexokináz (**E**) enzimek aktivitása a fényperiódus negyedik órájában a funkcionális biszfoszfatázt (F406, F407), a kinázt (P207, P228) expresszáló transzgénikus és nem transzformált kontroll (K) vonalakban. A szignifikáns eltéréseket csillaggal (*) jelöltük.

Az FBPáz katalizálja a szacharóz szintézis egyik kulcsreakcióját, a fru 1,6P2 irreverzibilis hidrolízisét fru 6P-tá. A PFP enzimnek eltérő a szerepe. A fru 1,6P2 és a fru 6P reverzibilis egymásba alakulását katalizálva szabályozza a glikolízis és a glükoneogenezis környezetfüggő fenntartását. A reakció irányát elsősorban a szubsztrátok és a reakció végtermékeinek mennyisége határozza meg (STITT, 1990a), bár egyes esetekben megfigyelték, hogy a PFP glikolítikus aktivitása nagyobb, mint a glükoneogenetikus (BLACK et al., 1987; TRIPODI és PODESTA, 1997).

A fru 2,6P2 koncentrációjának csökkentése az F406, F407 vonalakban a kontrollhoz képest 64-74%-os aktivitásnövekedést okozott a FBPáz enzimben és az F406 vonalban szignifikánsan csökkentette a PFP aktivitását (17/A, B ábra). Eredményeinktől eltérően transzgénikus dohányban és *Arabidopsis*-ban a fru 2,6P2 mennyiségének csökkentése a kontrollhoz képest nem okozott szignifikáns enzimaktivitásbeli eltéréseket (SCOTT et al., 2000; DRABORG et al., 2001), míg a fru 2,6P2 növelése transzgénikus dohánynövényekben - a szegfűben mért értékekhez hasonlóan - jelentős enzimaktivitás változásokat idézett elő (SCOTT et al., 1995). Ezek az eltérések is rámutathatnak az egyes fajok közötti élettani különbségekre.

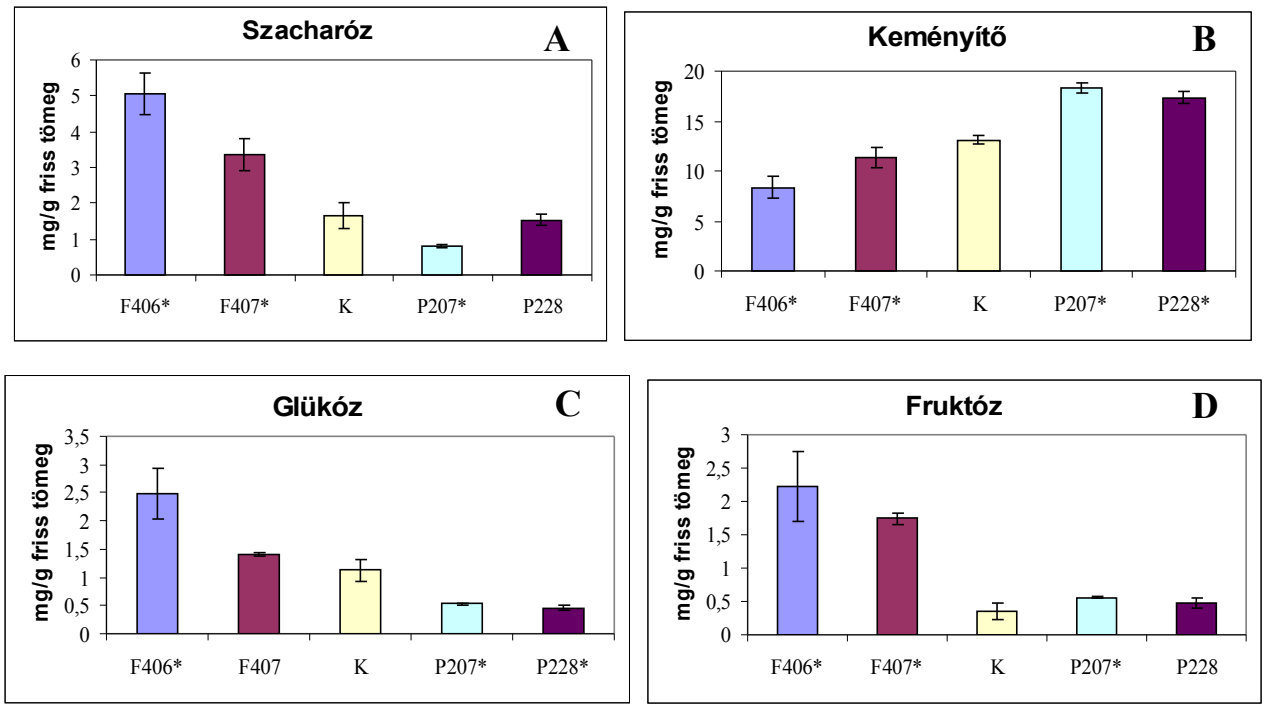
A nem-növény szervezetekben a fru 2,6P2 aktiválja a PFK enzimet, mely a fru 6P irreverzibilis átalakulását katalizálja fru 1,6P2-tá (VAN SCHAFTINGEN, 1987). Növényekben azonban a PFK inszenzitív a fru 2,6P2 szabályozására (STITT, 1990a). Ezzel szemben szegfűben a fru 2,6P2 csökkentése 10-14%-os redukciót okozott a PFK aktivitásában (F406, F407 vonalak), míg a P207 vonalban a fru 2,6P2 szint növelése kismértékben (8%) aktiválta a PFK-t (17/C ábra), bár ezek az eltérések nem utalnak egyértelműen a fru 2,6P2 szabályozó szerepére.

A fru 2,6P2 indirekt módon a FBPáz enzimen keresztül hat a kloroplasztiszban a keményítő szintézis kulcsenzimére az AGPáz-ra. A fru 2,6P2 koncentrációjának növelése gátolja az FBPáz enzimet, így csökken a trióz foszfát export a citoplazmába, és a kloroplasztiszban akkumulálódó trióz foszfátok aktiválják az AGPázt. A fru 2,6P2 szintjének növelése a P207 és P228 vonalakban gátolta a FBPázt (17/A ábra), csökkentette a trióz foszfát exportját a citoplazmába, ami 47-74%-kal serkentette az AGPáz működését (17/D ábra). A fru 2,6P2 citoszolikus koncentrációjának csökkentése 43-71%-os redukciót okozott az AGPáz aktivitásában.

A hexózokat hexóz monofoszfátokká foszforiláló hexokináz enzim aktivitásában nem figyeltünk meg szignifikáns különbségeket a transzgénikus és a vad típus között (17/E ábra).

4.4.3. Szénhidrátok és foszforilált intermedierek

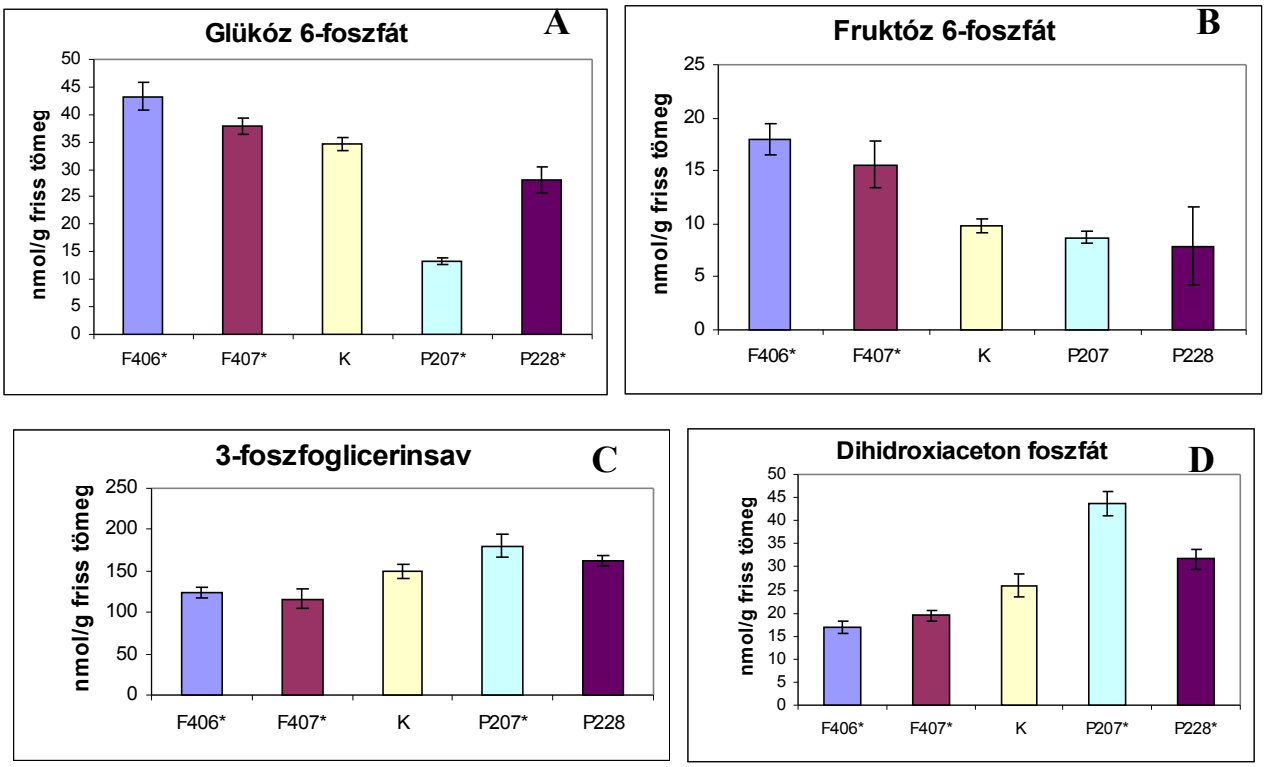
A fru 2,6P2 szint csökkentésének hatása: A biszfoszfatázt expresszáló növényekben (F406, F407) a fru 2,6P2 mennyiségének csökkentése a FBPáz aktiválásán keresztül két-háromszorosára növelte a szacharóz tartalmat (18/A ábra).



18. ábra: A fru 2,6P2 koncentrációjának hatása a szacharóz (**A**), a keményítő (**B**), a glükóz (**C**) és a fruktóz (**D**) tartalomra. (F406, F407: redukált fru 2,6P2 szint; P207, P228: növelt fru 2,6P2 szint). A szignifikáns eltéréseket csillaggal (*) jelöltük.

Transzgénikus *Arabidopsis*-ban és dohányban rádióaktívan jelölt $^{14}CO_2$-dal végzett kísérletekkel szintén alátámasztották, hogy a fru 2,6P2 koncentrációjának csökkentése a szénhidrát-anyagcserét a szacharóz szintézis irányába tolja el (DRABORG et al., 2001; SCOTT et al., 2000). Transzgénikus dohány és burgonya levelében ez a többlet szacharóz a fényperiódusban az alkotó monoszacharidokra hidrolizált és glükóz, fruktóz formájában akkumulálódott (SCOTT et al., 2000; RUNG et al., 2004).

A biszfoszfatázt túltermelő transzgénikus vonalainkban 20-38%-os növekedést figyeltünk meg a hexóz foszfátok (glu 6P, fru 6P) mennyiségében is (19/A, B ábra).



19. ábra: A fru 2,6P2 koncentrációjának hatása a glükóz 6-foszfát (**A**) a fruktóz 6-foszfát (**B**), a 3-foszfoglicerinsav (**C**) és a dihidroxiaceton foszfát (**D**) tartalomra. (F406, F407: redukált fru 2,6P2 szint; P207, P228: növelt fru 2,6P2 szint). A szignifikáns eltéréseket csillaggal (*) jelöltük.

Ez a növekedés azonban nem a hexokináz aktivitás változásának eredménye (16/E ábra). Ennek két lehetséges magyarázata lehet:

-A fru 2,6P2 koncentráció csökkentésével a FBPáz felszabadul a gátlás alól, és ez eredményezi a hexóz foszfátok akkumulációját (RUNG et al., 2004).

-A FBPáz „szuper optimális" aktivációja növeli a trióz foszfátok exportját a kloroplasztiszból a citoplazmába (SCOTT et al., 2000), és ez meggyorsíthatja trióz foszfátok átalakulását hexóz foszfátokká.

A glu 6P a szacharóz-foszfát szintáz aktivátora (DOEHLERT és HUBER, 1983). Ezért feltételezzük, hogy a glu 6P szintjének növelése tovább stimulálhatja a szacharóz szintézist.

A fenti adatoknak megfelelően a fru 2,6P2 szint redukciójának hatására csökkent a trióz foszfátok (3PGA, DHAP) mennyisége (19/C, D ábra).

A trióz foszfátok mennyiségének csökkentése a citoplazmában stimulálhatja a szén exportját a kloroplasztiszból a trióz foszfát transzlokátoron keresztül, ami elvonja a szubsztrátot az AGPáz-tól, illetve a keményítő szintézistől (Scott et al., 2000). Ennek megfelelően a keményítő akkumulációja 14-37%-kal csökkent a kontrollhoz képest (18/B ábra). Ez a különbség azonban nem volt olyan nagymértékű, mint a szacharóz esetében.

A transzgénikus dohányban kapott eredményekkel összhangban a biszfoszfatázt expresszáló növényeinkben a fru 2,6P2 szintjének csökkentése jelentősen növelte a glükóz akkumulációját (18/C ábra). Ezt a keményítő hidrolízisével magyarázták (SCOTT et al., 2000). Mivel a trióz foszfátok alacsonyabb szintje korlátozta az AGPáz aktivitását, a növények nem voltak képesek ezt a glükóz felesleget újra keményítővé alakítani.

Az élesztő savas invertázt expresszáló növényekben a szacharóz szintézis stimulációja hasonló glükóz koncentrációnövekedést okozott (SONNEWALD et al., 1991, 1997). Itt a szacharóz hidrolízise olyan mértékű volt, ami meghaladta a növény glükóz foszforilációs kapacitását.

A kontrollhoz képest ugyancsak jelentős fruktóz koncentrációnövekedést figyeltünk meg ezekben a vonalakban (18/D ábra).

A fru 2,6P2 szint növelésének hatása: A kináz konstrukciót expresszáló transzgénikus növényekben (P207, P228) a fru 2,6P2 növelése általában ellentétes hatással volt a különböző szénhidrátok és foszforilált intermedierek szintjére, mint a funkcionális foszfatázt tartalmazó vonalakban.

Ezekben a transzgénikus növényekben jelentős trióz foszfát többletet mértünk (19/C, D ábra). A trióz foszfát koncentráció emelkedése csökkenti a szervetlen foszfátok mennyiségét a citoplazmában (STITT, 1990a), a növekvő 3PGA:Pi arány közvetett módon az AGPáz aktiválásán keresztül serkenti a keményítő szintézisét a kloroplasztiszban (SCOTT és KRUGER, 1995). Az AGPáz stimulációján keresztül (16/D ábra) a P207 és P228 transzgénikus vonalak 32-40%-kal több keményítőt halmoztak fel, mint a kontroll (18/B ábra). Transzgénikus dohánylevélben a fru 2,6P2 koncentrációjának növelése szintén jelentős keményítő akkumulációt okozott (SCOTT és KRUGER, 1995). Ezt a növekedés azonban elsősorban a sötétben történő keményítő lebontás csökkenésének tulajdonították, nem pedig a keményítő szintézis intenzitásának növekedésével a fényszakaszban. A transzgénikus szegfű növényekben ezt a lehetőséget nem vizsgáltuk.

A fru 2,6P2 koncentráció növelése csökkentette a szacharóz, glükóz és hexóz foszfátok mennyiségét (18/A, C; 19/A, B ábra). A fru 2,6P2 gátolta az FBPáz működését (16/A ábra), ami csökkentette a trióz foszfátok átalakulását hexóz foszfátokká és a szacharóz szintézis a kontroll növények 32-40%-ra csökkent (18/A ábra).

Minden olyan esetben, ahol a szacharóz szintézis valamilyen módon gátolt (HEINEKE et at., 1994; SHARKEY et al., 1992; ZRENNER et al., 1996), a szénhidrát anyagcserében olyan változások történnek, amelyek kedveznek a keményítő szintézisének (STRAND et al., 2000).

Nem várt hatásként, a foszfatázt expresszáló transzgénikus növényekhez (F406, F407) hasonlóan növekedést figyeltünk meg a fruktóz tartalomban (18/D ábra). Ennek az oka egyelőre ismeretlen, kiderítése további vizsgálatokat igényel.

Az FBPáz antiszensz gátlása hasonló változásokat okozott a szénhidráttartalomban, mint szegfűben a fru 2,6P2 koncentrációjának növelése. Burgonya növényekben az FBPáz aktivitás 45-90%-os redukciója 40-50%-kal csökkentette a szacharóz tartalmat és háromszorosára növelte a keményítő akkumulációt (ZRENNER et al., 1996).

Arabidopsis-ban az FBPáz antiszensz gátlása 30-50%-kal csökkentette az enzim aktivitását, amelynek hatására a szacharóz szintézis a felére, glükóz és a fruktóz tartalom felére-tizedére csökkent, a keményítő pedig 2,5-szeresére nőtt a kontrollhoz képest (STRAND et al., 2000).

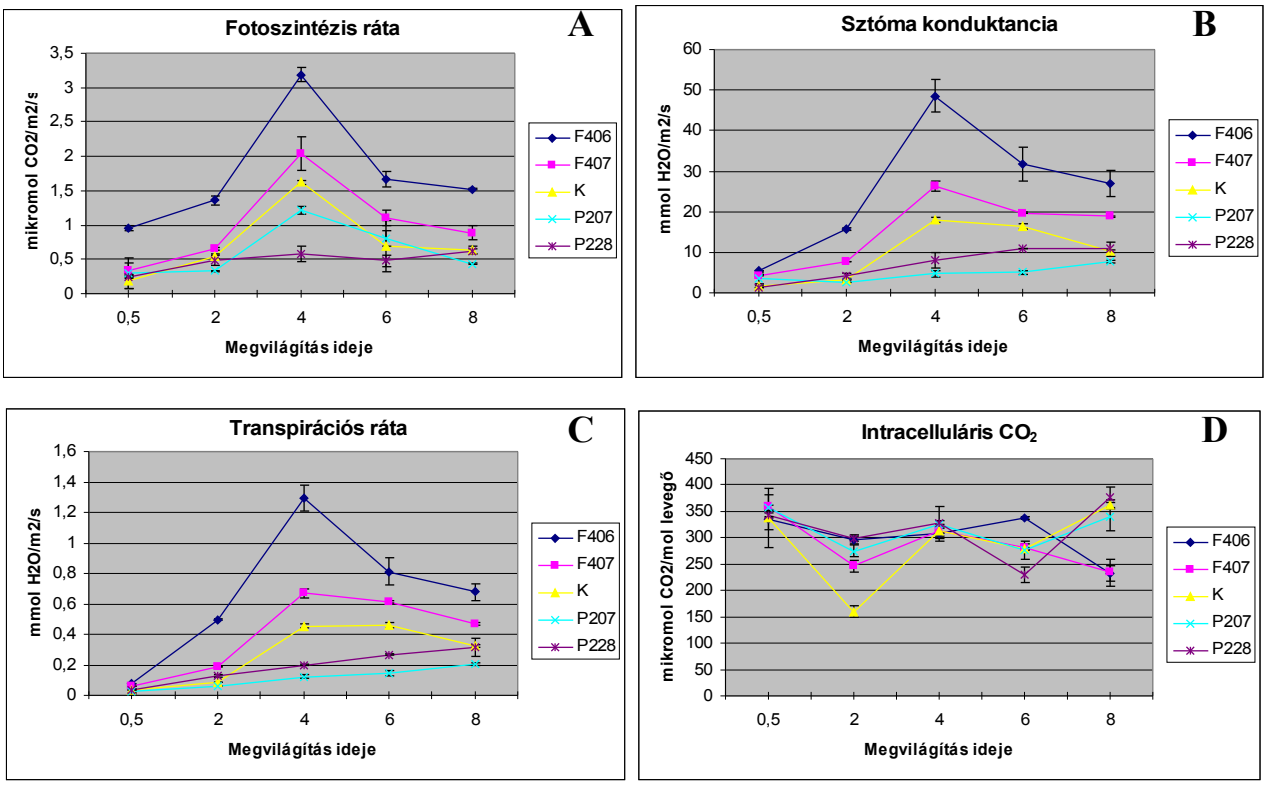
4.4.4. Fotoszintézis

A magasabbrendű növények növekedését és terméshozamát leginkább meghatározó faktor a fotoszintetikus szén metabolizmus. A fru 2,6P2 egyik legfontosabb szerepe növényekben a fotoszintézis ráta szabályozása a fényperiódusban (STITT, 1990a). A módosított fru 2,6P2 koncentráció fotoszintézis rátára, sztóma konduktanciára, transpirációs rátára és intracelluláris CO_2 koncentrációra gyakorolt hatását az alábbiakban foglaljuk össze.

Megvilágítás hatására a fotoszintézis ráta mindegyik növényvonalban eltérő mértékben ugyan, de emelkedni kezdett és a negyedik órában érte el a maximális értéket (20/A ábra). Eddig az időpontig a fru 2,6P2 koncentráció és a fotoszintézis ráta között fordított kapcsolat figyelhető meg. A fru 2,6P2 koncentrációjának csökkentése növelte a F406 és F407 transzgénikus vonalak fotoszintézis rátáját (20/A ábra). Ez különösen az F406 vonalban volt igen erőteljes, már a megvilágítás első fél órájában duplájára nőtt, mint a kontroll és a többi transzgénikus vonalban. Ez a jelentős különbség a későbbiekben is megmaradt. Az F407 vonal fotoszintézis rátája csak a negyedik órától nőtt szignifikánsan a kontrollhoz képest. A keményítő akkumuláló vonalak (P207, P228) fotoszintézis rátája a megvilágítás második órájától a 6. órájáig tért el szignifikánsan a nem transzformált kontroll növényekétől.

Eredményeinktől eltérően SCOTT et al. (2000) és RUNG et al. (2004) dohányban és burgonyában a fru 2,6P2 mennyisége és a fotoszintézis ráta között pozitív összefüggést mutatott ki, azaz a fru 2,6P2 redukciója csökkentette a transzgénikus vonalak fotoszintetikus kapacitását. Dohányban ezt azzal magyarázták, hogy megszűnt a citoplazma és a kloroplasztisz szénmetabolizmusa közötti egyensúly. Az alacsonyabb fru 2,6P2 koncentráció növelte a trióz foszfátok exportját a kloroplasztiszból, így gátolta a szervetlen foszfátok (Pi) regenerációját, amely korlátozta az ATP szintézist és a Calvin-ciklus normális működését (SCOTT et al., 2000). Ezzel szemben burgonyában a fru 2,6P2 mennyiség csökkentésének hatására a trióz foszfátok mennyisége a kontrollhoz képest változatlan maradt (RUNG et al., 2004). Itt a fotoszintézis intenzitás csökkenését azzal magyarázták, hogy a szacharóz nagymértékű akkumulációja gátolta a

fotoszintetikus enzim gének működését, amelynek lehetőségét más tanulmányok szintén igazoltak (PEGO et al., 2000; KOCH et al., 2004).



20. ábra: A funkcionális biszfoszfatázt (F406, F407), a kinázt (P207, P228) expresszáló transzgénikus és nem transzformált kontroll (K) vonalak fotoszintézis rátája (**A**), sztóma konduktanciája (**B**), transpirációs rátája (**C**) és intracelluláris CO_2 koncentrációja (**D**) a fény periódus során.

Az F406 és F407 vonalakban a nagyobb mértékű szacharóz szintézis hatására növekedhetett a szacharóz exportja a cukrot importáló szövetek felé, így a fotoszintézis kulcsenzimei nem gátlódtak.

A szegfűben kapott eredeményeinkhez hasonlóan transzgénikus *Arabidopsis*-ban, melyben a bifunkcionális enzim antiszensz gátlásával csökkentették a fru 2,6P2 mennyiségét, bizonyos fényintenzitások mellett a fotoszintézis ráta szintén növekedett (DRABORG et al., 2001).

Szegfűben a fru 2,6P2 növelése (P207, P228 vonalak) az FBPáz gátlásán keresztül csökkentette a fotoszintézis rátát. A megfelelő fotoszintetikus CO_2 fixáció fenntartásában a fru 2,6P2 mellett nélkülözhetetlen szerepet tulajdonítanak az FBPáz aktivitásának és a szervetlen foszfátok mennyiségének is (ZRENNER et al., 1996; LEEGOOD, 1996; STRAND et al., 2000; HOLBROOK és KEYS, 2003). Transzgénikus *Arabidopsis*-ban és burgonyában az FBPáz antiszensz gátlása 25-35, illetve 40-50%-kal csökkentette a fotoszintézis rátát (ZRENNER et al., 1999; STRAND et al., 2000).

A szervetlen foszfátok túl nagy, vagy túl kicsi koncentrációja egyaránt képes gátolni a fotoszintézist. A foszfátok a kloroplasztiszból trióz foszfátok formájában távoznak a trióz foszfát transzlokátoron keresztül és a citoplazmában a szacharóz szintézis során szabadulnak fel és jutnak vissza a plasztiszba (STITT, 1997; FLÜGGE, 1998). Ha a szacharóz szintézis túl gyors, a nagy citoplazmás foszfát koncentráció gátolja a ribulóz 1,5-biszfoszfát (ru 1,5P2) regenerációját. Ha a szacharóz szintézis túl lassú, a foszfát koncentráció a kloroplasztiszban túl kicsi lesz, ami gátolja az ATP szintézist (STITT, 1991. 1996). Tehát a növények akkor képesek a fotoszintézis rátájukat magas szinten tartani, ha a foszfátok és a trióz foszfátok kicserélődése a kloroplasztisz és a citoplazma között megfelelően kontrollált, ami biztosítja a megfelelő mennyiségű foszfátot az ATP szintéziséhez és a ru 1,5P2 regenerációjához (STITT, 1997). Feltételezhetően ez lehet a magyarázata annak, hogy az egyes növényfajok eltérően reagálnak a fru 2,6P2 koncentrációjának csökkentésére.

A fru 2,6P2 és a fotoszintézis ráta változása hatással volt a sztómazáró sejtek működésére is (20/B ábra). A sztómák nyitottságának jellemzésére a sztóma konduktanciát használtuk, amely a sztóma ellenállás reciproka. A legszembetűnőbb változást az F406 vonalban figyeltük meg, ahol a fru 2,6P2 szint csökkenése a fény szakaszban két-háromszorosára növelte a sztómák nyitottságát. A P207 és P228 vonalak sztóma konduktanciája csak a negyedik órától kezdve különbözött a kontrolltól, szignifikánsan kisebb volt.

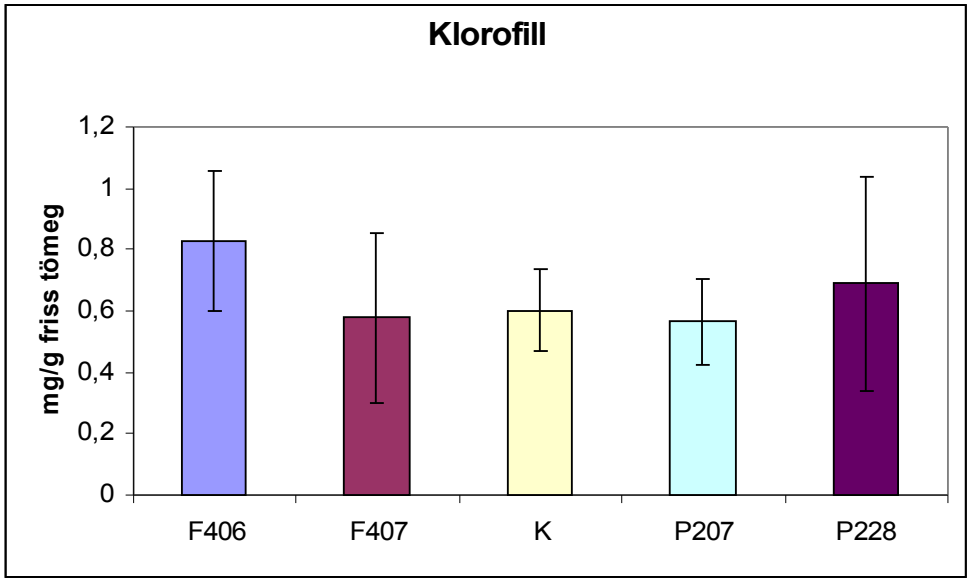
A sztóma nyitottsága és a növények transpirációs rátája egyenes arányban áll egymással. A sztómák nyílásával nő a transpirációs ráta, azaz a növények nagyobb mennyiségű vizet párologtatnak el. A 20/B, C ábrákon is jól megfigyelhető, hogy a transpirációs rátát jellemző görbék a sztóma konduktanciával azonos lefutásúak.

Stressz körülmények között a magasabb fru 2,6P2 szint adaptív előnyt jelenthet a növények számára. Bizonyos növényfajokban vízhiány és alacsony hőmérséklet hatására a fru 2,6P2 koncentráció növelése lehetővé teheti a fotoszintézis hatékony fenntartását (REDDY, 1996; STITT, 1997). Ezt eredményeink is alátámasztják, mivel az alacsonyabb fru 2,6P2 szinttel rendelkező vonalakban a nyitottabb sztómák miatt a transpiráció is megemelkedett. Optimális vízellátottság mellett azonban az intenzívebb fotoszintézis kedvezőbb lehet a növények számára.

Az intracelluláris CO_2 mennyiség és a fru 2,6P2 koncentrációja között nem tudtuk egyértelmű összefüggéseket megállapítani (20/D ábra).

4.4.5. Klorofill tartalom meghatározása

Az 4.3.4. fejezetben bemutattuk, hogy a fru 2,6P2 koncentráció változása hatással volt a növények fotoszintetikus aktivitására, ezért megvizsgáltuk a növények klorofill tartalmát is (21. ábra).

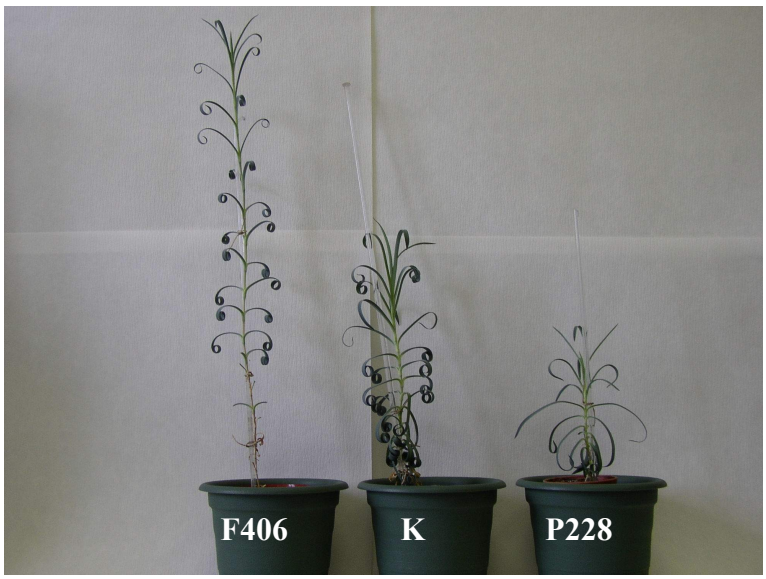


21. ábra: A funkcionális biszfoszfatázt (F406, F407), a kinázt (P207, P228) expresszáló transzgénikus és nem transzformált kontroll (K) vonalak levelének klorofill tartalma. A kapott értékek nem térnek el szignifikánsan egymástól.

A 21. ábrán látható, hogy a klorofill tartalomnak nagy a szórása, a transzgénikus vonalak és a kontroll növény klorofill tartalma között nincs szignifikáns különbség. Az eltérő fotoszintézis ráta tehát nem az eltérő fotoszintetikus pigment mennyiségének az eredménye, hanem a fotoszintetikus enzimek eltérő aktivitásáé.

4.4.6. Növekedés, fejlődés

A fru 2,6P2 koncentrációjának módosítása, illetve az ennek hatására történt szénhidrát összetétel változás, növekedés- és fejlődésbeli eltéréseket okozott a transzgénikus vonalakban a kontroll növényekhez képest. Az első legfeltűnőbb változás az eltérő növekedési intenzitás volt (22. ábra).



22. ábra: Növekedési különbségek három hónappal a kiültetést követően a transzgénikus és a nem transzformált kontroll (K) növények között (F406: fru 2,6P2 szint csökkentés; P228: fru 2,6P2 szint növelés)

Az egyedfejlődés kezdetén fru 2,6P2 koncentráció csökkentésének hatására a transzgénikus vonalak (F406, F407) gyorsabban fejlődtek, és átlagosan két héttel korábban virágoztak, mint a kontroll növények. Ennek magyarázata a fotoszintetikus kapacitás növekedése és a nagyobb mértékű szacharóz akkumuláció. Ez a szacharóz többlet közvetlenül ATP szintézisére fordítódhat, amely többlet energiaként szolgálhat a növekedéshez és fejlődéshez. Bár ezeknek a növényeknek a párologtatása nagyobb mértékű volt (20/C ábra), a gyorsabb egyedfejlődés és korai virágzás miatt megfelelő vízellátottság mellett gazdasági szempontból mégis jelentősek lehetnek a szegfű termesztésében. A szacharóznak a növekedésben betöltött esszenciális szerepét BAXTER et al. (2003) is bizonyította. Transzgénikus dohányban a szacharóz akkumuláció növelése a kukorica szacharóz-foszfát szintáz gén heterológ expressziójával szintén intenzívebb növekedést és korai virágzást eredményezett.

Transzgénikus dohányban és burgonyában a fru 2,6P2 koncentrációjának csökkentése nem okozott növekedés- fejlődésbeli változásokat (SCOTT et al., 2000; RUNG et al., 2004). Ezekben a növényekben – a szegfűben kapott eredményeinktől eltérően – az FBPáz enzim aktivitása nem változott és a szacharóz akkumuláció csak a fény szakasz első órájában volt nagyobb, mint a kontroll növényekben. A növekedésükhöz, fejlődésükhöz hiányzó cukrokat a keményítő intenzívebb lebontásából képesek voltak pótolni. *Arabidopsis*-ban a fru 2,6P2 szint csökkentése kismértékű fenotípusos változásokat okozott (DRABORG et al., 2001). A transzgénikus növények levelei keskenyebbek voltak és több klorofillt tartalmaztak.

Az intenzívebb növekedésre más magyarázat is lehetséges. A szacharóz szintézis aktivációja növelheti a transzport rátát, így az osztódó, nem fotoszintetizáló (heterotróf) szövetek szén és energiaellátása is növekedhet. Ezt az érvet támaszhatják alá RIESMEIER et al., 1994 és BÜRKLE

et al. (1998) eredményei is. Transzgénikus burgonyában és dohányban a szacharóz export kapacitás gátlása késleltette a növekedést és a virágzást. Szegfűben a szacharóz export kapacitás vizsgálatát rádioaktiv laboratórium hiányában nem végeztük el.

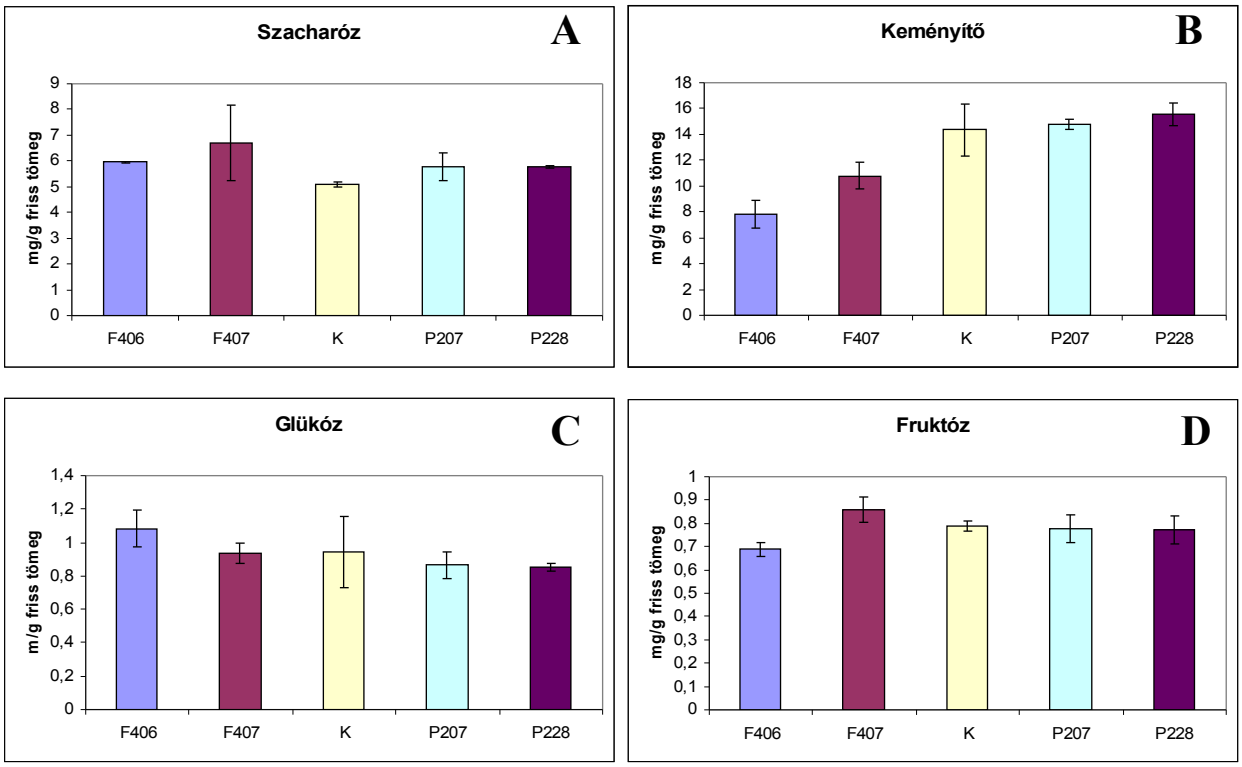
A több fru 2,6P2-ot tartalmazó növényeknél (P207, P228) növekedésbeli eltéréseket csak az egyedfejlődés kezdeti szakaszában figyeltünk meg (22. ábra). Ezekben a növényekben az FBPáz aktivitása csökkent és kevesebb szacharózt akkumuláltak. A növekedés későbbi fázisában azonban ezeket a változásokat képesek voltak kompenzálni és a virágzási idejük megegyezett a kontrolléval.

A szegfűvel szemben a transzgénikus dohányban és korallvirágban a fru 2,6P2 szint növelése egyáltalán nem befolyásolta a növények növekedési rátáját (SCOTT et al., 1995; TRUESDALE et al., 1999).

A szegfű mellett szamócában írták le eddig, hogy a fru 2,6P2 szint módosítása lényeges hatással van a transzgénikus növények egyedfejlődésére (TOLDI et al., 2002). Szamócában a fru 2,6P2, illetve a szénhidrát anyagcsere módosítása hatással volt a növekedésre, az indásodásra, a virágok morfológiájára. A fru 2,6P2 növelése gátolta a növekedést, az indafejlődést és abnormális virágfejlődést idézett elő (TOLDI, szóbeli közlés).

Az FBPáz a szacharóz és a fotoszintézis rátára gyakorolt hatásán keresztül befolyásolhatja a növények fejlődését is. Transzgénikus *Arabidopsis*-ban az FBPáz antiszensz gátlása több mint 50%-os növekedés ráta csökkenést okozott (STRAND et al., 2000). Ezzel szemben transzgénikus burgonya levelekben az FBPáz antiszensz gátlása nem volt hatással az egyedfejlődésre, mivel a hiányzó szacharózt a növények képesek voltak kompenzálni a szintetizált keményítő nagyobb mértékű lebontásával (SHARKEY et al., 1992; HEINEKE et al., 1994; ZRENNER et al., 1996, 1999).

Ennek alátámasztására meghatároztuk a virágzó szegfű növények főbb szénhidrát komponenseit (23. ábra). A virágzó növényekben a szacharóz mennyisége mind a biszfoszfatáz (F406, F407) mind a kináz expresszáló (P207, P228) növényekben meghaladta a kontroll értékét (23/A ábra). A keményítőtartalom a három hónapos növényektől eltérően a kinázt expresszáló növényekben nem tért el szignifikánsan a kontrolltól (18/B és 23/B ábra). A glükóz koncentráció egyik vonalban sem tért el szignifikánsan (23/C ábra), míg az F406-os vonalban alacsonyabb fruktóz tartalmat mértünk (23/D ábra).Ezek a bemutatott eredmények is jelzik, hogy a növények anyagcseréje rendkívül rugalmas, eltérően reagálhatnak a szénhidrát elosztás és a szénhidrát összetétel megváltoztatására. Attól függően, hogy az adott reakciósor mely enzimének módosítjuk az aktivitását, a növények alternatív anyagcserefolyamatokon keresztül képesek kompenzálni az őket ért esetleges negatív hatásokat.



23. ábra: A virágzó növények szacharóz (**A**), a keményítő (**B**), a glükóz (**C**) és a fruktóz (**D**) tartalma. (F406, F407: redukált fru 2,6P2 szint; P207, P228: növelt fru 2,6P2 szint).

Feltűnő különbség volt 3 hónapos növényeknél az internódiumok hosszának változása (24. ábra). A kevesebb fru 2,6P2-ot tartalmazó növények átlagos internódium hossza 4-5 cm volt a 2-3 cm-es kontrolhoz viszonyítva. A magasabb fru 2,6P2 szinttel rendelkező transzgénikus vonalak átlagos internódium hossza 1,5-2 cm volt.

24. ábra: Az internódiumok közötti hosszúság különbségek három hónappal a kiültetést követően a transzgénikus és a nem transzformált kontroll (K) növények között (F406: fru 2,6P2 szint csökkentés; P228: fru 2,6P2 szint növelés)

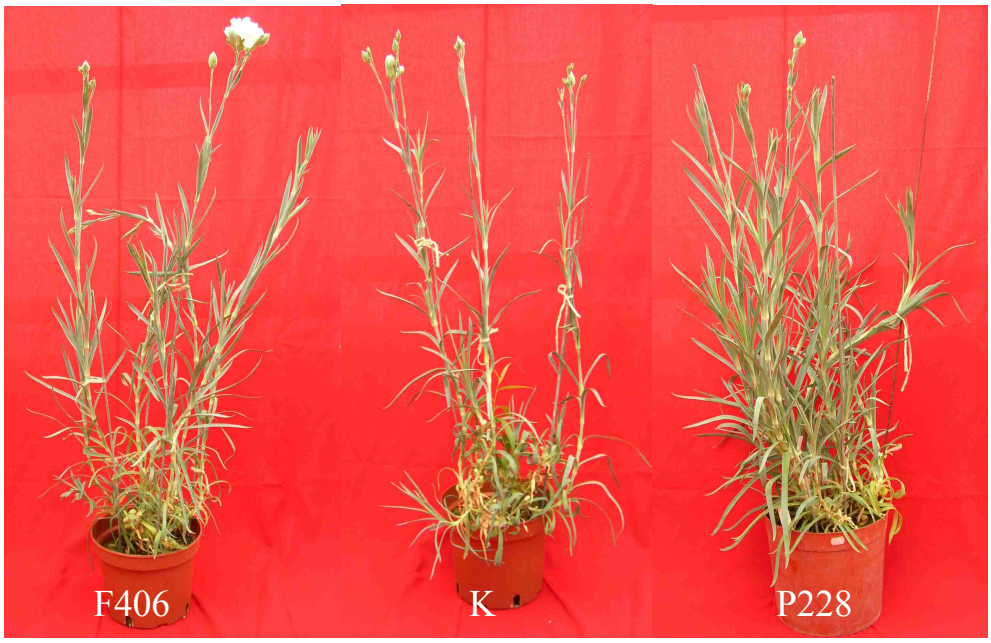
4.5. Gazdasági értékmérő tulajdonságok

A fontosabb gazdasági értékmérő tulajdonságok vizsgálatát az Óbuda Kertészet üvegházában végeztük el. A transzgénikus növényeket a kertészeti kontroll növényekkel azonos körülmények között termesztettük és velük összehasonlítva értékeltük.

4.5.1. Virágzás, virágszín, virágmorfológia

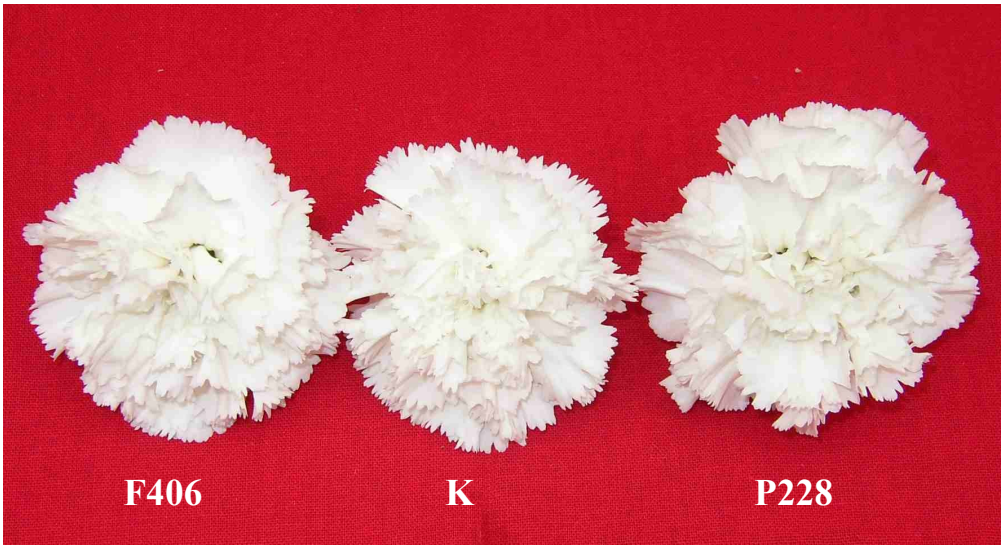
Üvegházi termesztési viszonyok között az alacsonyabb fru 2,6P2 szinttel rendelkező növények az intenzívebb növekedés hatására 4 éves megfigyelés alapján átlagosan 2 héttel korábban virágoztak, mint a kertészeti kontroll növények. Ez a tulajdonság technológiai szempontból fontos lehet, mivel így egységnyi területről évente több virágzó hajtást kaphatunk. A 4.4.6 fejezetben bemutattuk, hogy az alacsonyabb fru 2,6P2 hatására az intenzívebb növekedésű növények internódium hosszúsága is megnövekedett. EU szabvány határozza meg a virág feje és az 5. nódusz távolságát és a kereskedelemben szintén előnyben részesítik a hosszú szárat.

A több fru 2,6P2-ot tartalmazó növények virágzási ideje megegyezett a kertészeti kontrolléval. Virágzó állapotban azonban semmilyen fenotípusos különbséget nem figyeltünk meg a különböző transzgénikus vonalak és a kontroll között (25. ábra).



25. ábra: A teljesen kifejlett transzgénikus (F406, P228) és kontroll vonalak (K)

A sziromlevelek növekedését és fejlődését befolyásolja a rendelkezésre álló szacharóz mennyisége (YAKIMOVA et al., 1997), azonban szegfűben a transzformáció, illetve a szénhidrát anyagcsere módosítása nem befolyásolta a virágok színét, illatát és morfológiai tulajdonságait sem (26. ábra). Ezeket a vizsgálatokat szubjektív módon bíráltuk el.



26. ábra: A szénhidrát összetétel módosítása nem volt hatással a virágok színére és morfológiájára (F406: fru 2,6P2 szint csökkentés; P228: fru 2,6P2 szint növelés).

4.5.2. Vázaélettartam

A virágok postharvest élettartamát jelentősen befolyásolja metabolizálható szénhidrát tartalmuk (YAKIMOVA et al., 1997). A vágott virágok képesek a vízbe adagolt egyszerű cukrokat felvenni és a respiráció során felhasználni (ICHIMURA, 1998). Ha gombaölő szereket is alkalmazunk, a vázaélettartam néhány nappal meghosszabbítható.

A transzgénikus és kontroll szegfű növényeket összehasonlítva megvizsgáltuk annak lehetőségét, hogy a szénhidrát összetétel módosítása okozhat-e eltéréseket a vágott virágok vázaélettartamában.

A transzgénikus növények vázaélettartamának hosszát az azonos virágzási fázisban levő kontrollhoz viszonyítva relatív értékként a 2. táblázatban mutatjuk be. A táblázat adatait összehasonlítva a 23. ábra adataival, megállapíthatjuk, hogy a növények szénhidrát összetétele és mennyisége nem befolyásolta szignifikánsan a transzgénikus vonalak vázaélettartamát a kontrollhoz viszonyítva. A kapott értékek ugyanazon a vonalon belül is változnak, amit befolyásolhat a szár átmérője is.

2. táblázat: A transzgénikus vonalak vázaélettartamának relatív értéke. Ezt az értéket a transzgénikus és a hozzá párosított a kertészeti kontroll növény vázaélethossza közötti különbség alapján határoztuk meg.

Vonal	Vázaélettartam (relatív érték) A kontrolltól való eltérés (nap)							
F401	+1	0	-3	+2	-1	0	-1	+2
F402	+3	+1	0	-2	+3	-2		
F406	+2	+1	-1	-2	-1	+2	-2	
F407	-1	+2	0	-1	0	+4		
F431	+1	+3	+1	+1				
P201	+3	-1	+1	-1	-1	-2	+1	
P205	0	-1	0	-1				
P207	-1	-2	+2	+1	-1	0		
P228	+1	+2	+2	+1	0	-1	+2	

4.5.3. Szárszilárdság

A vágott szegfű szárszilárdsága a szállíthatóság és a tárolhatóság miatt rendkívül fontos. Az etiléntermelés antiszensz gátlásával sikerült a szártörésre hajlamos Bíbor fajta szárszilárdságát növelni (VERES et al., 2005b). Az általunk felhasznált IWS fajta azonban nem hajlamos a szártörésre és a szénhidráttartalom módosítása nem befolyásolta ezt a tulajdonságot. Az átalakított mechanikai szakítószilárdságot mérő készülékkel a legtöbb nóduszt nem sikerült eltörnünk (27.ábra).

27. ábra: Az IWS szegfű szártörésvizsgálata a mechanikai szakítószilárdságot mérő készülékkel

4.6. Új tudományos eredmények

-Transzgénikus szegfű vonalakat állítottunk elő azzal a céllal, hogy meghatározzuk a fru 2,6P2 mennyiségi változtatása hogyan hat a szegfű szénhidrát anyagcseréjére.

-Bizonyítottuk, hogy szegfűben a fru 2,6P2 mennyiségének csökkentése a szénhidrát anyagcserét a szacharóz szintézis irányába tolja el és a nagyobb mértékű szacharóz felhalmozás hatására a növények 2-3 héttel korábban virágoznak, ami növelheti termesztési értéküket.

-Bizonyítottuk, hogy a fru 2,6P2 koncentráció növelése pedig nagymértékű keményítő akkumulációhoz vezet.

-Megállapítottuk, hogy szegfűben a szacharóz-tartalom és a növekedési ráta egyenes arányban áll egymással.

-Kimutattuk, hogy szegfűben a fru 2,6P2 koncentráció és a fotoszintézis ráta, valamint növények párologtatása között fordított kapcsolat áll fenn.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A fru 2,6P2 szabályozó szerepének vizsgálatára transzgénikus szegfű vonalakat állítottunk elő az emlős eredetű 6PF2K/fru 2,6Páz cDNS beépítésével. Az enzimaktivitás (FBPáz, PFP, AGPáz) mérési eredményeink azt bizonyítják, hogy a fru 2,6P2 koncentrációjának géntechnológiai úton történő változtatása lehetővé tette a szegfű szénhidrát anyagcseréjének komplex módosítását.
A fru 2,6P2 mennyiségének redukciója aktiválta a szacharóz szintézist és egyidejűleg gátolta a keményítő felhalmozódását. Mivel a szacharóz a szén és az energia transzport formája, a növények ezt a többletet a növekedésükre és a fejlődésükre használták fel és ennek következtében 2-3 héttel korábban virágoztak, mint a kontroll nem transzformált növények. Ezzel párhuzamosan nőtt a fotoszintézis ráta és a sztómák nyitottsága is. A párologtatás növekedése szárazabb ökológiai körülmények között hátrányos lehet, azonban megfelelő vízellátottság esetén az intenzívebb fotoszintézis, a gyorsabb növekedés és a gyorsabb virágzás mint új tulajdonság előnyös lehet a termesztésben, mivel évente egységnyi felületről több virágzó hajtást kaphatunk.

A fru 2,6P2 koncentrációjának növelése serkentette a keményítő felhalmozódását és csökkentette a szacharóz szintézis mértékét. Ezek a transzgénikus növények egyedfejlődésük kezdetén az alacsonyabb szacharóz szint miatt a kontrollhoz képest lassabban növekedtek. Ezzel szemben a virágzási idejükben már nem figyeltünk meg különbségeket, aminek oka feltehetően az lehet, hogy a nagymértékű keményítő felhalmozódás aktiválta a lebontó enzimeket, növelve a könnyen metabolizálható mono- és oligoszacharidok mennyiségét, amelyet növekedésükre, fejlődésükre fordítottak.

Korábban már leírták, hogy a vágott virágok szárának szénhidrát tartalma és a vázában való eltarthatóság pozitív korrelációban áll egymással. A transzgénikus vonalak vázaélettartama azonban szignifikánsan nem tért el a kontroll növényekétől. Ennek két oka lehet:

1. az eltérő fotoszintézis ráta ellenére a respirációra felhasználható összes szénhidrát mennyisége változatlan.
2. a csökkentett mennyiségű fru 2,6P2 tartalmazó növények a nagyobb mértékű párologtatás miatt gyorsabban elhasználják az intenzívebb fotoszintézis során megkötött többlet szenet.

A megfigyelt és leírt biokémiai és élettani változások nem voltak hatással a virágok esztétikai és díszítő tulajdonságaira: virágszín, illatosság, szárszilárdság.

Eredményeinket a dohányban, *Arabidopsis*-ban és burgonyában kapott eredményekkel összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy a fru 2,6P2 koncentrációjának módosítása hatékony eszköze lehet az agronómiailag fontos növényfajok szénhidrát metabolizmusának befolyásolására. Javasoljuk olyan új vektorkonstrukciók előállítását, amelyekben

1. A konstitutív CaMV35S promotert lecserélését szövet- és szervspecifikus promoterekre;

2. A CaMV35S, illetve a szövet- vagy szervspecifius promotert tartalmazó bifunkcionális enzim cDNS konstrukcióhoz a szénhidrát transzportban szerepet játszó gének hozzákapcsolását annak meghatározására, hogy a levelekben megtermelt többlet szénhidrát eljuttatható-e a raktározó szövetekbe, szervekbe.

Ezekkel a vektorkonstrukciókkal transzformált növények elemzései elősegíthetik a fotoszintetikus szénhidrát metabolizmus mélyrehatóbb megismerését.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A fruktóz 2,6-biszfoszfát, mint szignál metabolit koordinálja a növények CO_2 asszimilációs rátáját, és a megkötött szén elosztását a szacharóz és a keményítő szintézis között. Munkánk célja a fru 2,6P2 szabályozó szerepének meghatározása volt a szegfű (*Dianthus caryophyllus* L.) szénhidrát anyagcseréjében, a metabolit koncentrációjának genetikai módosításával. Erre a célra két, módosított patkánymáj eredetű bifunkcionális enzim cDNS (6PF2K/fru2,6P2áz) bevitelével transzgénikus szegfű vonalakat állítottunk elő. A regenerált hajtások szelekcióját követően a transzgén integrációját és működését PCR-rel, Southern hibridizációval és RT-PCR-rel bizonyítottuk.

A funkcionális kinázt (6PF2K) expresszáló növényekben a fru 2,6P2 koncentrációja 45-85%-kal növekedett a nem transzformált kontrollhoz képest. A funkcionális biszfoszfatázzal (fru 2,6P2áz) transzformált növényekben a fru 2,6P2 tartalom 45-70%-kal csökkent. Ezek a változások a fru 2,6P2 mennyiségében hatással voltak a kulcsenzimek aktivitására, valamint a szacharóz és a keményítő metabolizmusra.

A fru 2,6P2 koncentrációjának redukciója – a fruktóz 1,6-biszfoszfatáz (FBPáz) aktivációján keresztül – két-háromszorosára növelte a szacharóz mennyiségét. Ennek hatására a trióz foszfátok (3-foszfoglicerinsav, dihidroxiaceton foszfát) mennyisége csökkent, míg a hexóz foszfátoké (fruktóz 6-foszfát, glükóz 6-foszfát) növekedett. A keményítő akkumulációja 14-37%-kal volt alacsonyabb, mint a kontroll növényekben.

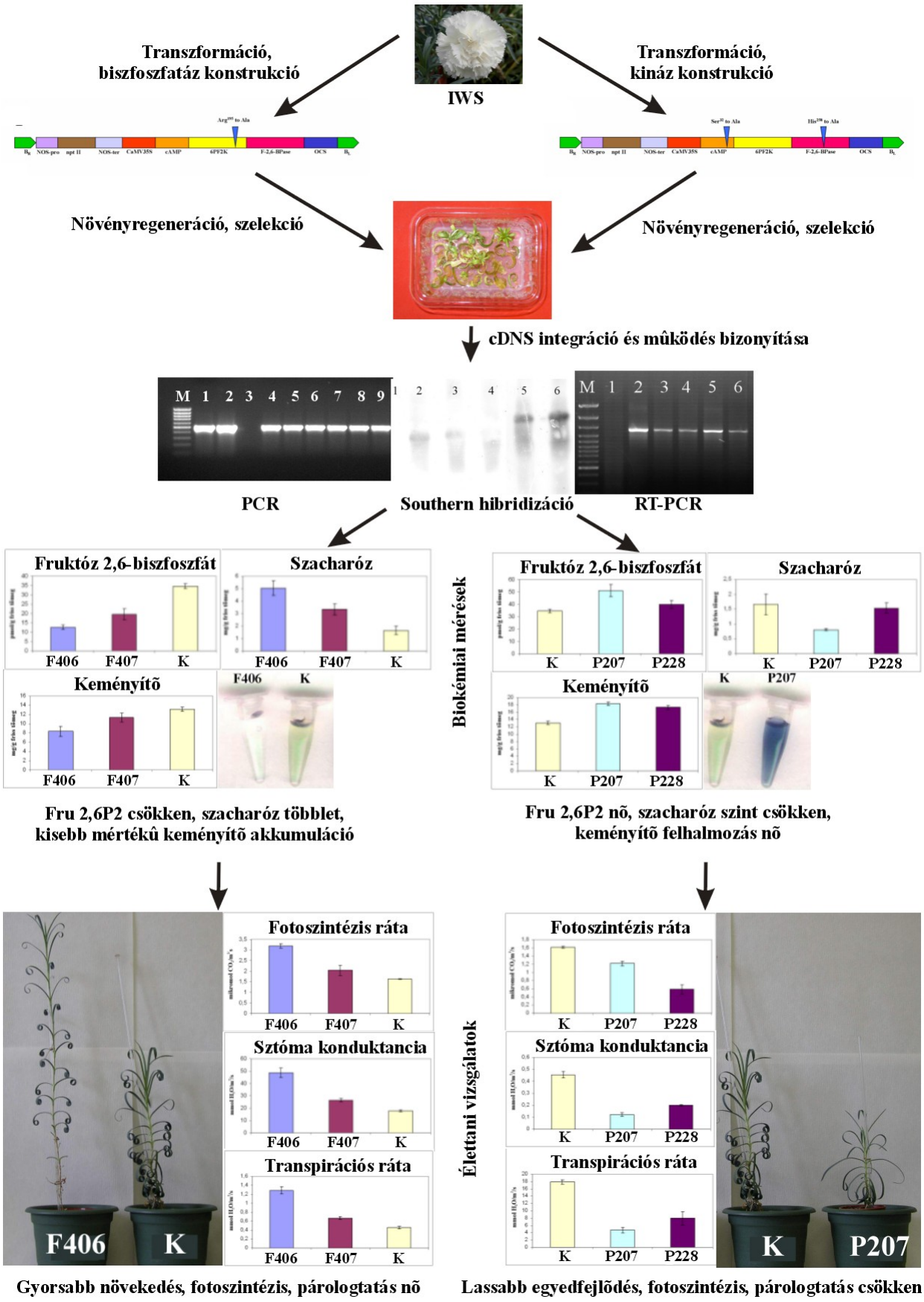
Ezzel szemben a magasabb fru 2,6P2 szinttel rendelkező növényekben általában ellentétes hatást figyeltünk meg az enzim aktivitásokban, a szénhidrát és foszforilált intermedierek koncentrációjában, mint a redukált fru 2,6P2 tartalmú növényekben. A fru 2,6P2 koncentrációjának növelése gátolta az FBPáz aktivitását és stimulálta az ADP-glükóz pirofoszforilázt, amely 30-40%-kal csökkentette a szacharóz és 32-40%-kal növelte a keményítő mennyiségét a nem transzformált kontrollhoz viszonyítva.

A fru 2,6P2 módosítása hatással volt a növényi gázcserére, a fotoszintézis rátára, a sztóma konduktanciára és a transpirációs rátára. A transzgénikus szegfűkben közvetlen kapcsolatot figyeltünk meg a fru 2,6P2 mennyiség és a fotoszintézis ráta között. A fru 2,6P2 csökkenésének hatására a növények maximális fotoszintézis rátája 26-97%-kal nagyobb volt a nem transzformált kontrollénál, míg a fru 2,6P2 szint növelése 25-64%-kos csökkenést okozott.

A fotoszintézis ráta változása befolyásolta a sztómák nyitottságát és a transpirációs rátát. Az alacsonyabb fru 2,6P2 tartalommal rendelkező növények sztóma konduktanciája nagyobb volt, ami a kontrollhoz képest növelte a párologtatást. Ezzel szemben a fru 2,6P2 koncentrációjának növelése alacsonyabb konduktancia értéket és kisebb mértékű párologtatást eredményezett.

A módosított fru 2,6P2 tartalom jól látható fenotípusos változásokat okozott a kontrollhoz képest a növények növekedésében és fejlődésében. A fru 2,6P2 koncentráció csökkentésének hatására a transzgénikus növények gyorsabban növekedtek és két héttel korábban virágoztak, mint a kontrollok. Az egyedfejlődés kezdetén a többlet fru 2,6P2-t tartalmazó vonalak lassabban nőttek a nem transzformált kontrollnál, hat hónap elteltével azonban ezek a különbségek megszűntek. Eltéréseket figyeltünk meg az internódiumok hosszában is. A kevesebb fru 2,6P2-ot tartalmazó növények átlagos internódium hossza 4-5 cm volt a 2-3 cm-es kontrollhoz viszonyítva. A magasabb fru 2,6P2 szinttel rendelkező transzgénikus vonalak átlagos internódium hossza 1,5-2 cm volt. A szénhidrát összetétel módosítása ellenére a virágok morfológiájában, színében és vázaélet hosszában nem figyeltünk meg változásokat.

A vizsgálatok során kapott adataink megerősítették a fru 2,6P2 központi szerepét a szénhidrát metabolizmusban. A szignál metabolit módosítása szegfűben és a gazdaságilag jelentős növényfajokban egyik fontos eszköz lehet a szénhidrát összetétel komplex befolyásolására. A disszertációban ismertetett kísérletek lépéseit és főbb eredményeit a 26. ábrán foglaljuk össze.



28. ábra: Szénhidrát anyagcserében módosított szegfű (IWS) géntechnológiai előállítása és biokémiai-élettani jellemzése.

SUMMARY

In plants, fructose 2,6-bisphosphate as signal metabolite coordinates the rate of CO_2 assimilation and the partitioning of the fixed carbon between sucrose and starch synthesis. The aim of our work was to examine the regulatory role of fructose 2,6-bisphosphate in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). For this purpose the carbohydrate metabolism was genetically modified. Transgenic plants harbouring two modified bifunctional enzyme complementary DNAs (6PF2K/fru 2,6Páz) of rat liver origin were generated. After selection of regenerated shoots, the integration and functioning of the transgenes were verified by PCR, Southern hybridization and RT-PCR.

In plants expressing the functional kinase enzyme (6PF2K) gene the concentration of fru 2,6P2 increased 45% to 85% compared with the untransformed control. On the other hand transformation with the functional bisphosphatase gene the fru 2,6P2 content was reduced to 45% and 70%. These alterations in fru 2,6P2 amounts affected the key enzyme activities of sucrose and starch metabolism.

The reduced fru 2,6P2 concentration - *via* activation of fructose 1,6-bisphosphatase (FBPase) - caused 2-3 fold increase in the amount of sucrose. At the same time the decreased levels of fru 2,6P2 reduced the amounts of triose phosphates (3-phosphoglycerate and dihydroxyacetone phosphate) and increased the hexose phosphates (fructose 6-phosphate and glucose 6-phosphate). The starch accumulations were 14-37% lower than in control plants.

Different results were obtained in plants having higher fru 2,6P2 levels with regard to enzyme activities, carbohydrate and phosphorylated intermediate concentrations than in plants with reduced fru 2,6P2 levels. The elevated fru 2,6P2 inhibited the activity of FBPáz and stimulated the ADP-glucose pyrophosphorylase. As a result, the sucrose content decreased by 30-40% and the amount of starch increased by 32-40% compared to the untransformed control.

The effect of altered amount of fru 2,6P2 on gas exchange features, the rate of photosynthesis, stomatal conductance and transpiration rate could be also observed.

Carnation plants having lower fru 2,6P2 contents showed 26-97% higher maximum photosynthetic rates than the untransformed controls. Plants with elevated fru 2,6P2 possessed 25-64% reduction in photosynthesis compared to the control. Direct proportionality was found between the fru 2,6P2 concentration and the photosynthetic rate in the transgenic plants. Plants with the lowest fru 2,6P2 content demonstrated the highest photosynthetic rate. Conversely, plant containing the highest amount of fru 2,6P2 exhibited the lowest photosynthetic capacity.

Changes in the rate of photosynthesis reflected in the alterations of stomatal opening and transpiration rates. Plants containing lower fru 2,6P2 had higher stomatal conductances and these

resulted in elevated transpiration rates compared to the control. In contrast, plants with increased fru 2,6P2 content possessed a lower conductance value and transpiration rate than the control.

Phenotypic effect of the altered fru 2,6P2 content manifested itself in observable differences in growth and development of transgenic and untransformed control plants. Plants with decreased fru 2,6P2 grew faster and generally flowered 2 weeks earlier than the untransformed control. At an early stage of growth the plants having higher fru 2,6P2 levels grew slower than controls but after 6 months this difference appeared to be insignificant. There were differences in the length of internodes, too. Internodes of decreased fru 2,6P2 containing plants were 4 cm on average compared to the 2.5-3 cm length in control and 1.5-2 cm in plants with higher fru 2,6P2 content. Despite of the altered carbohydrate composition differences in flower morphology, colour and vase life were not observed.

Data presented here, indicate the central role of fru 2,6P2 carbohydrate metabolism. Modifications of this signal metabolite in carnation and the agronomically important plant species provide a powerful tool to learn the photosynthetic carbohydrate metabolism.

7. MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

ANONIM. (2006): The biology and ecology of *Dianthus caryophyllus* L. (carnation): www.ogtr.gov.au/pdf/ir/bioeco-carnation.pdf.

AVIGAD G, BOHRER PJ. (1984): 6-phosphofructo-2-kinase and D-fructose-2,6-bisphosphatase activities in mung bean seedlings. *Biochimica and Biophysica Acta*, 798: 317-324.

BALL KL, AP REES T. (1988): Fructose 2,6-bisphosphate and the climacteric in bananas. *European Journal of Biochemistry*, 177: 637-641.

BANZAI T, HANAGATA N, DUBINSKY Z, KARUBE I. (2003): Fructose-2,6-bisphosphate contents were increased in response to salt, water and osmotic stress in leaves of *Bruguiera gymnorrhiza* by differential changes in the activity of the bifunctional enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphate 2-phosphatase. *Plant Molecular Biology*, 53: 51-59.

BARLETTA A. (1995): Scent makes a comeback. *Floraculture*, 5: 23-25.

BAUDINETTE SC, STEVENSON TW, SAVIN KW. (2000): Isolation and characterisation of the carnation floral-specific MADS box gene, CMB2. *Plant Science*, 155: 123-131.

BAXTER CJ, FOYER CH, TURNER J, ROLFE SA, QUICK WP. (2003): Elevated sucrose-phosphate synthase activity in transgenic tobacco sustains photosynthesis in older leaves and alters development. *Journal of Experimental Botany*, 54: 1813-1820.

BEAUDRY RM, PAZ N, BLACK CC, KAYS SJ. (1987): Banana ripening: Implications of the changes in internal ethylene and CO_2 concentrations, pulp fructose 2,6-bisphosphate concentration, and activity of some glycolytic enzymes. *Plant Physiology*, 85: 277-282.

BEAUDRY RM, SEVERSON RF, BLACK CC, KAYS SJ. (1989): Banana ripening: Implications of the changes in glycolytic intermediate concentrations, glycolytic and gluconeogenic carbon flux, and fructose 2,6-bisphosphate concentration. *Plant Physiology*, 91: 1436-1444.

BLACK CC, MUSTARDY L, SUNG SS, KORMANIK PP, XU DP, PAZ N. (1987): Regulation and roles for alternative pathways of hexose metabolism in plants. *Physiologia Plantarum*, 69: 387-394.

BLAZQUEZ MA, GREEN R, NILSSON O, SUSSMANN MR, WEIGEL D. (1998): Gibberelins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the LEAFY promoter. *The Plant Cell*, 10: 791-800.

BLENNOW A, ENGELSEN SB, NIELSEN TH, BAUNSGAARD L, MIKKELSEN R. (2002): Starch phosphorylation: a new front line in starch research. *Trends in Plant Science*, 7: 445-450.

BOEHRINGER-MANNHEIM (1984): Methods of enzymatic food analysis.

BOEHRINGER-MANNHEIM (Roche) (1999): DIG hibridizációs protokoll.

BOVY AG, ANGENENT GC, DONS HJM, VAN ALTVORST AC. (1999): Heterologous expression of the *Arabidopsis etr1-1* allele inhibits the senescence of carnation flowers. *Molecular Breeding*, 5: 301-308.

BRAR MS, ALKHAYRI JM, KLINGAMAN GL. (1995): *In vitro* shoot multiplication of carnation axillary buds and nodes. *In Vitro* 31 (3, part 2): 61A.

BURRELL MM, MOONEY PJ, BLUNDY M, CARTER D, WILSON F, GREEN J, BLUNDY KS AP REES, T. (1994): Genetic manipulation of 6-phosphofructokinase in potato tubers. *Planta*, 194: 95-101.

BURTON RA, JENNER H, CARRANGIS L, FAHY B, FINCHER GB, HYLTON C, LAURIE DA, PARKER N, WAITE D, VAN WEGEN S, VERHOEVEN T, DENYER K. (2002): Starch granule initiation and growth are altered in barley mutants that lack isoamylase activity. *Plant Journal*, 31: 97-112.

BUSTOS R, FAHY B, HYLTON CM, SEALE R, NEBANE NM, EDWARDS A, MARTIN C, SMITH AM. (2004): Starch granule initiation is controlled by a heteromultimeric isoamylase in potato tubers. *Proceedings of the National Academy Sciences of the USA*, 101: 2215-2220.

BÜRKLE L, HIBBERD JM, QUICK WP, KÜHN C, HIRNER B, FROMMER WB. (1998): The H^+-sucrose cotransporter *NtSUT1* is essential for sugar export from tobacco leaves. *Plant Physiology*, 118: 59-68.

CAIRNS AJ. (2003): Fructan biosynthesis in transgenic plants. *Journal of Experimental Botany*, 54: 549-567.

CASANOVA E, ZUKER A, TRILLAS MI, MOYSSET L, VAINSTEIN A. (2003): The *rolC* gene in carnation exhibits cytokinin- and auxin-like activities. *Scientia Horticulturae*, 97: 321-331.

CASANOVA E, VALDES AE, ZUKER A, FERNANDEZ B, VAINSTEIN A, TRILLAS MI, MOYSSET L. (2004): *rolC*-transgenic carnation plants: adventitious organogenesis and levels of endogenous auxin and cytokinins. *Plant Science*, 167: 551-560.

CHEN S, HAJIREZAEI M, PEISKER M, TSCHIERSCH H, SONNEWALD U, BÖRNKE F. (2005): Decreased sucrose-6-phosphate phosphatase level in transgenic tobacco inhibits photosynthesis, alters carbohydrate partitioning, and reduces growth. *Planta*, 221: 479-492.

CLAUS TH, EL-MAGHRABI MR, REGEN DM, STEWART HB, MCGRANE M, KOUNTZ PD, NYFELER Y, PILKIS J. (1984): The role of fructose 2,6-bisphosphate in the regulation of carbohydrate metabolism. *Current Topics in Cellular Regulation*, 23: 57-86.

DARVILLE MI, CREPIN KM, VANDEKERCKHOVE J, VAN DAMME J, OCTAVE JN, RIDER MH, MARCHAND MJ, HUE L, ROUSSEAU GG. (1987): Complete nucleotide sequence coding for rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase derived from a cDNA clone. *FEBS Letters,*, 224: 317-321.

DAVOREN JD, NYKIFORUK CL, LAROCHE A, WESELAKE RJ. (2002): Sucrose-induced changes in the transcriptome of cell suspension cultures of oilseed rape reveal genes associated with lipid biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40: 719-725.

DE BENEDETTI L, BURCHI G, BRUNA S, MERCURI A, SCHIVA T. (2003): Use of molecular markers to improve cut flowers longevity in carnation. *ISHS Acta Horticulturae*, 624: 343-348.

DE PATER S, CASPERS M, KOTTENHAGEN M, MEIMA H, TER STEGE R, DE VETTEN N. (2006): Manipulation of starch granule size distribution in potato tubers by modulation of plastid divison. *Plant Biotechnology Journal*, 4: 123-134.

DEMMINK JF, CUSTERS JBM, BERGERVOET JHW. (1987): Gynogenesis to bypass crossing barriers between diploid and tetraploid *Dianthus* species. *ISHS Acta Horticulturae*, 216: 343-344.

DENNIS DT, LAYZELL DB, LEFEBRE DD, TURPIN DH. (1997): Plant Metabolism (Essex, England: Addison Wesley Longman).

DOEHLERT DC, HUBER SC. (1983): Spinach leaf sucrose phosphate synthase. Activation by glucose 6 phosphate and inactivation with inorganic phosphate. *FEBS Letters*, 153: 293-298.

DRABORG H, VILLADSEN D, NIELSEN TH. (1999): Cloning, characterization and expression of a bifunctional fructose-6-phosphate,2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from potato. *Plant Molecular Biology*, 39: 709-720.

DRABORG H, VILLADSEN D, NIELSEN TH. (2001): Transgenic *Arabidopsis* plants with decreased activity of fructose-6-phosphate,2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase have altered carbon partitioning. *Plant Physiology*, 126: 750-758.

DUNWELL JM. (1998): Novel food products from genetically modified crop plants: methods and future prospects. *International Journal of Food Science and Technology*, 33: 205-213.

EARLE ED, LANGHANS RW. (1975): Carnation propagation from shoot tips cultured in liquid medium. *HortScience*, 10: 608-610.

EDWARDS GE, WALKER DA. (1983): C3 C4: Mechanisms, and cellular and environmental regulation of photosynthesis. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp 1-542.

ENGVILD KC. (1972): Callus and cell suspension cultures of carnation. *Physiologia Plantarum*, 26: 62-66.

ENOMOTO T, OHYAMA H, INUI H, MIYATAKE K, NAKANO Y, KITAOKA S. (1990): Roles of pyrophosphate: D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and fructose-2,6-bisphosphate in the regulation of glycolysis during acclimation of aerobic *Euglena gracilis* to anaerobiosis. *Plant Science*, 67: 161-167.

ESTOPÁ M, MARFÁ V, MELÉ E, MESSEGUER J. (2001): Study of different antibiotic combinations for use in the elimination of *Agrobacterium* with kanamycin selection in carnation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 65: 211-220.

FERNIE AR, ROSCHER A, RATCLIFFE RG, KRUGER NJ. (2001): Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: Fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta,* 212: 250-263.

FIROOZABADY E, MOY Y, TUCKER W, ROBINSON K, GUTTERSON N. (1995): Efficient transformation and regeneration of carnation cultivars using *Agrobacterium*. *Molecular Breeding*, 1: 283-293.

FISHER M, ZIV M, VAINSTEIN A. (1993): An efficient method for adventitious shoot regeneration from cultured carnation petals. *Scientia Horticulturae*, 53: 231-237.

FLÜGGE, UI, HELDT HW. (1991): Metabolite translocator of the chloroplast envelope. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 129-144.

FLÜGGE UI. (1998): Metabolite transporters in plastids. *Current Opinion in Plant Biology*, 1: 201-206.

FLÜGGE, UI. (1999): Phosphate translocators in plastids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 27-45.

FUKUI Y, TANAKA Y, KUSUMI T, IWASHITA T, NOMOTO K. (2003): A rationale for the shift in colour towards blue in transgenic carnation flowers expressing the flavonoid 3',5'-hydroxylase gene. *Phytochemistry*, 63: 15-23.

GALBALLY J, GALBALLY E. (1997): Carnations and pinks for garden and greenhouse. Timber Press, Portland, Oregon, USA. pp 1-310.

GALLANT DJ, BOUCHET B, BALDWIN PM. (1997): Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydrate Polymers*, 32: 177-191.

GEIGENBERGER P, HAJIREZAEI M, GEIGER M, DEITING U, SONNEWALD U, STITT M. (1998): Overexpression of pyrophosphatase leads to increased sucrose degradation and starch synthesis, increased activities of enzymes for sucrose-starch interconversions, and increased levels of nuleotides in growing potato tubers. *Planta*, 205: 428-437.

GEIGENBERGER P, STAMME C, TJADEN J, SCHULZ A, QUICK PW, BETSCHE T, KERSTING HJ, NEUHAUS E. (2001): Tuber physiology and properties of starch from tubers of transgenic poato plants with altered plastidic adenylate transporter activity. *Plant Physiology*, 125: 1667-1678.

GEIGENBERGER P, STITT M. (2000): Diurnal changes in sucrose, nucleotides, starch synthesis and AGPS transcript in growing potato tubers that are suppressed by decreased expression of sucrose phosphate synthase. *Plant Journal*, 23: 795-806.

GEIGER DR, SERVAITES JC. (1994): Diurnal regulation of photosynthetic carbon metabolism in C3 plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45: 235-256.

GERHARDT R, STITT M, HELDT HW. (1987): Subcellular metabolite levels in spinach leaves: Regulation of sucrose synthesis during diurnal alteration in photosynthetic partitioning. *Plant Physiol*ogy, 83: 399-407.

GIBBS J, MORELL S, VALDEZ A, SETTER TL, GREENWAY H. (2000): Regulation of alcoholic fermentation in coleoptiles of two rice cultivars differing in tolerance to anoxia. *Journal of Experimental Botany*, 51: 785-796.

GIBSON GR, BEATTY ER, WANG X, CUMMINGS JH. (1995): Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology,* 108: 975-982.

GIMELLI F, GINATTA G, VENTURO R, POSITANO S, BUIATTI M. (1984): Plantlet regeneration from petals and floral induction *in vitro* in the Mediterranean carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Riv. Ortoflorofrutt. It*. 68: 107-121.

HANZEL J, NELSON KS, KIPLINGER DC. (1955): Floral initiation and development in the carnation var. Northland. *Proceedings of the American Society for Horticulture Science*, 65: 455-462.

HAVE A, WOLTERING EJ. (1997): Ethylene biosynthetic genes are differentially expressed during carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flower senescence. *Plant Molecular Biology*, 34: 89-97.

HEINEKE D, KRUSE A, FLÜGGE UI, FROMMER WB, RIESMEIER JW, WILLMITZER L, HELDT HW. (1994): Effect of antisense repression of the chloroplast triose-phosphate translocator on photosynthetic metabolism in transgenic potato plants. *Planta*, 193: 174-180.

HELDT HW, FLÜGGE UI. (1987): Subcellular transport of metabolites in a plant cell. In: The Biochemistry of Plants. STUMPF PK and CONN EE (eds.). Academic Press Incorporated, San Diego. 12, pp 49-85.

HELDT HW, FLÜGGE UI. (1992): Metabolite transport in plant cells. In Society for Experimental Biology Seminar Series 50, Plant Organelles, ed. Tobin AK. Cambridge University Press, Cambridge.

HELLWEGE EM, GRITSCHER D, WILLMITZER L, HEYER AG. (1997): Transgenic potato tubers accumulate high levels of 1-kestose and nystose: functional identification of a sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase of artichoke (*Cynara scolymus*) blossom discs. *Plant Journal,*. 12: 1057-1065.

HELLWEGE EM, CZAPLA S, JAHNKE A, WILLMITZER L, HEYER AG. (2000): Transgenic potato (*Solanum tuberosum*) tubers synthesize the full spectrum of inulin molecules naturally occuring in globe artichoke (*Cynara scolymus*) roots. *Proceedings of the National Academy Sciences of the USA*, 97: 8699-8704.

HENNINK WE, NOSTRUM CF. (2002): Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54: 13-36.

HERBERS K, SONNEWALD U. (1998): Molecular determinants of sink strength. *Current Opinion in Plant Biology,* 1: 207-216.

HESZKY L. (2006): Szénhidrát anyagcsere módosítása. Mezőgazdasági Biotechnológia. Szerk: HESZKYL, FÉSÜS L, HORNOK L. Agroinform Kiadó, pp 174-175.

HEYER AG. (2000): Production of modified carbohydrates in transgenic plants. *Bundesgesundheitsbl-Gesungheitsforsch-Gesundheitschutz*, 43: 94-98.

HITEN NF. (2006): The manipulation of fructose 2,6-bisphosphate levels in sugarcane. Master of Science dissertation.

HOLBROOK GP, KEYS AJ. (2003): Evidence for recycling of inorganic phosphate by wheat chloroplasts during photosynthesis at air levels of CO_2 and O_2. *Journal of Plant Physiology*, 160: 1351-1360.

HOLLEY WD, BAKER R. (1992): Breeding for better varieties. Chapter 3. In Holley WD, Baker R, eds. Carnation production II. Colorado State University. pp 21-30.

ICHIMURA K. (1998): Improvement of postharvest life in several cut flowers by the addition of sucrose. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 32: 275-280.

IHEMERE U, ARIAS-GARZON D, LAWRENCE S, SAYRE R. (2006): Genetic modification of cassava for enhanced starch production. *Plant Biotechnology Journa,l* 4: 453-465.

IRAQI D, TREMBLAY FM. (2001): Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. *Journal of Experimental Botany*, 52: 2301-2311.

IWAZAKI Y, KOSUGI Y, WAKI K, YOSHIOKA T, SATOH S. (2004): Generation and ethylene production of transgenic carnation harboring ACC synthase cDNA in sense or antisense orientation. *Journal of Applied Horticulture*, 6: 67-71.

JAIN A, KANTIA A, KOTHARI SL. (2001): *De novo* differentiation of shoot buds from leaf-callus of *Dianthus caryophyllus* L. and control of hyperhydricity. *Scientia Horticulturae*, 87: 319-326.

JI Q, OOMEN RJFJ, VINCKEN JP, BOLAM DN, GILBERT HJ, SUURS LCJM, VISSER RGF. (2004): Reduction of starch granule size by expression of an engineered tandem starch-binding domain in potato plants. *Plant Biotechnology Journal*, 2: 251-260.

JONES, M. L. (2003): Ethylene biosynthetic genes are differentially regulated by ethylene and ACC in carnation styles. *Plant Growth and Regulation*, 40: 129-138.

JUERGENS A, WITT T, GOTTSBERGER G. (2003): Flower scent composition in *Dianthus* and *Saponaria* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31: 345-357.

KAKEHI M. (1979): Studies on the tissue culture of carnation. V. Induction of redifferentiated plants from the petal tissue. *Bulletin of the Hiroshima Agricultural College*, 6: 159-166.

KALLAK H, REIDLA M, HILPUS I, VIRUMEA K. (1997): Effect of genotype, explant source and growth regulators on organogenesis in carnation callus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 51: 127-135.

KATO-NOGUCHI H, WATADA AE. (1996): Low-oxygen atmosphere increases fructose 2,6-bisphosphate in fresh-cut carrots. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121: 307-309.

KING RW, BEN-TAL Y. (2001): A florigenic effect of sucrose in *Fuschia hybrida* is blocked by gibberelin-induced assimilate competition. *Plant Physiology,* 125: 488-496.

KINOUCHI T, ENDO R, YAMASHITA A, SATOH S. (2006): Transformation of carnation with genes related to ethylene production and perception: towards generation of potted carnations with a longer display time. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 86: 27-35.

KISS E, VERES A, GALLI ZS, NAGY N, TÓTH E, VARGA Á, HRAZDINA G, HESZKY L. (2000): Production of transgenic carnation with antisense ACS (1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase) gene. *International Journal of Horticultural Science*, 6: 103-107.

KLANN EM, HALL B, BENNETT AB. (1996): Antisense acid invertase (*TIV1*) gene alters soluble sugar composition and size in transgenic tomato fruit. *Plant Physiology*, 112: 1321-1330.

KOCH K. (2004): Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 235-246.

KOLBE A. (2005): Redox-regulation of starch and lipid synthesis in leaves. PhD dissertation, Universität Potsdam, http://deposit.ddb.de/ep/dissonline/frontpool/978968.htm.

KOK-JACON GA, VINCKEN JP, SUURS LCJM, WANG D, LIU S, VISSER RGF. (2005): Production of dextran in transgenic potato plants. *Transgenic Research*, 14: 385-395.

KOSUGI Y, SHIBUYA K, TSURUNO N, IWAZAKI Y, MOCHIZUKI A, YOSHIOKA T, HASHIBA T, SATOH S. (2000): Expression of genes responsible for ethylene production and wilting are differently regulated in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) petals. *Plant Science*, 158: 139-145.

KRUGER NJ, BEEVERS H. (1984): Effect of fructose 2,6-bisphosphate on the kinetic properties of cytoplasmic fructose 1,6-bisphosphate in germinating castor bean endosperm. *Plant Physiology*, 76: 49-54.

KRUGER NJ, BEEVERS H. (1985): Synthesis and degradation of fructose 2,6-bisphosphate in endosperm of castor bean seedlings. *Plant Physiology*, 77: 358-364.

KRUGER NJ, SCOTT P. (1995): Manipulation of fructose 2,6-bisphosphate levels in transgenic plants. *Biochemical Society Transactions*, 22: 904-909.

KRUGER NJ. (1997): Carbohydrate synthesis and degradation. In: DENNIS DT, TURPIN DH, LEFEBRE DD, LAYZELL DB (eds) Plant metabolism. Longman, Harlow, UK, pp 83-104.

KULMA A, VILLADSEN D, CAMPBELL DG, MEEK SEM, HARTHILL JE, NIELSEN TH, MACKINTOSH C. (2004): Phosphorylation and 14-3-3 binding of *Arabidopsis* 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Plant Journal*, 37: 654-667.

KURLAND IJ, EL-MAGHRABI MR, CORREIRA JJ, PILKIS SJ. (1992): Rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. Properties of phospho - and dephospho forms of two mutants in which ser32 has been changed by site directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry,* 267: 4416-4423.

LAPORTE MM, GALAGAN JA, SHAPIRO JA, BOERSIG MR, SHEWMAKER CK, SHARKEY TD. (1997): Sucrose-phosphate synthase activity and yield analysis of tomato plants transformed with maize sucrose-phosphate synthase. *Planta*, 203: 253-259.

LAPORTE MM, GALAGAN JA, PRASCH AL, VANDERVEER PJ, HANSON DT, SHEWMAKER CK, SHARKEY TD. (2001): Promoter strenght and tissue specificity effects on growth on tomato plants transformed with maize sucrose-phosphate synthase. *Planta*, 212: 817-822.

LARONDELLE Y, MERTENS E, VAN SCHAFTINGEN, HERS HG. (1986): Purification and properties of spinach leaf phosphofructokinase 2/fructose 2,6-bisphosphatase. *European Journal of Biochemistry*, 161: 351-357.

LARONDELLE Y, MERTENS E, VAN SCHAFTINGEN, HERS HG. (1989): Fructose-2,6-bisphosphate hydrolysing enzymes in higher plants. *Plant Physiology*, 90: 827-834.

LAVY M, ZUKER A, LEWINSOHN E, LARKOV O, RAVID U, VAINSTEIN A, WEISS D. (2002): Linalool and linalool oxide production in transgenic carnation flowers expressing the *Clarkia breweri* linalool synthase gene. *Molecular Breeding*, 9: 103-111.

LEEGOOD RC. (1996): Primary photosynthate production: Physiology and metabolism; In: Photoassimilate distribution in plants and crops, source-sink relationships (ZAMSKI, E. and SCHAFFER, AA., eds.), Marcel Dekker Inc., New York, pp.21-41.

LI L, LIN K, KURLAND IJ, CORREIA JJ, PILKIS SJ. (1992): Site-directed mutagenesis in the rat liver 6-phosphofructo-2-kinase. Mutation at the fructose 6-phosphate binding site affects phosphate activation. *Journal of Biological Chemistry*, 267: 4386-4393.

LLOYD JR, LANDSCHÜTZE V, KOSSMANN J. (1999a): Simultaneous antisense inhibition of two starch-synthase isoforms in potato tubers leads to accumulation of grossly modified amylopectin. *Biochemistry Journal*, 338: 515-521.

LLOYD JR, SPRINGER F, BULÉON A, MÜLLER-RÖBER B, WILLMITZER L, KOSSMANN J. (1999b): The influence of alterations in ADP-glucose pyrophosphorylase activities on starch structure and composition in potato tubers. *Planta*, 209: 230-238.

LU CY, NUGENT G, WARDLEY-RICHARDSON T, CHANDLER SF, YOUNG R, DALLING MJ. (1991): *Agrobacterium*-mediated transformation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Bio/Technology*, 9: 864-868.

LUNN JE, MACRAE E. (2003): New complexities in the synthesis of sucrose. *Current Opinion in Plant Biology,* 6: 208-214.

MAAS C, SIMPSON CG, ECKES P, SCHICLER H, BROWN JWS, REISS B, SALCHERT K, CHET I, SCHELL J, REICHEL C. (1997): Expression of intron modified NPT II genes in monocotyledonous and dicotyledonous plant cells. *Molecular Breeding*, 3: 15-28.

MACDONALD FD, CHOU Q, BUCHANAN BB, STITT M. (1989): Purification and characterization of fructose-2,6-bisphosphatase, a substrate-specific cytosolic enzyme from leaves. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 5540-5544.

MARKHAM JE, KRUGER NJ. (2002): Kinetic properties of bifunctional 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from spinach leaves. *European Journal of Biochemistry*, 269: 1267-1277.

MARÓTI M, GERBÁR J, NATTÁN Á. (1973): Kísérletek vírusmentes szegfű előállítására. *Botanikai Közlemények*, 60: 265-268.

MARTIN C, SMITH AM (1995): Starch biosynthesis. *The Plant Cell*, 7: 971-985.

MÁTRAI Z, CSÁNYI Á, JENES B, TÓTH E. (1995): Regenerációs és transzformációs kísérletek *Dianthus* fajokkal. I. Növénynemesítési Tudományos Napok. MTA Budapest. p. 104.

MCKIBBIN RS, MUTTUCUMARU N, PAUL MJ, POWERS SJ, BURRELL MM, COATES S, PURCELL PC, TIESSEN A, GEIGENBERGER P, HALFORD NG. (2006): Production of high-starch, low-glucose potatoes through over-expression of the metabolic regulator *SnRK1*. *Plant Biotechnology Journal,* 4: 409-418.

MERTENS E, LARONDELLE Y, HERS HG. (1990): Induction of pyrophosphate:fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase by anoxia in rice seedlings. *Plant Physiology*, 93: 584-587.

MESSEGUER J, ARCONADA MS, MELE E. (1993): Adventious shoot regeneration in carnation (*Dianthus caryphyllus* L.). *Scientia Horticulturae*, 54: 153-163.

MICHAL G. (1984a): D-glucose 6-phosphate and D-fructose 6-phosphate. Methods of Enzymatic Analysis. Szerk. BERGMEYER HU, Verlag-Chemie, Weinheim, Germany, Vol. 6. pp 191-198.

MICHAL G. (1984a): D-fructose 1,6-bisphosphate, dihydroxyacetone phosphate and D-glycerate 3-phosphate. Methods of Enzymatic Analysis. Szerk. BERGMEYER HU, Verlag-Chemie, Weinheim, Germany, Vol. 6. pp 342-350.

MICHELS PAM, RIGDEN DJ. (2006): Evolutionary analysis of fructose 2,6-bisphosphate metabolism. *IUBMB Life*, 58(3): 133-144.

MILLER RM, KAUL V, HUTCHINSON JF, RICHARDS D. (1991): Adventitious shoot regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) from axillary bud explants. *Annals of Botany*, 67: 35-42.

MIROSHNICHENKO DN, DOLGOV SV. (2000): Production of transgenic hygromycin resistant carnation (*Dianthus caryophyllus* L) plants after cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. *ISHS Acta Horticulturae*, 508: 255-258.

MOL J, CORNISH E, MASON J, KOES R. (1999): Novel colored flowers. *Current Opinion in Biotechnology,* 10: 198-201.

MURASHIGE T, SKOOG F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.

MÜLLER-RÖBER B, SONNEWALD U, WILLMITZER L. (1992): Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO Journal*, 11: 1229-1238.

NAKANO M, HOSHINO Y, MII M. (1994): Adventitious shoot regeneration from cultured petal explants of carnation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 36: 15-19.

NGUYEN-QUOC B, N'TCHOBO H, FOYER C, YELLE S. (1999): Overexpression of sucrose phosphate synthase increases sucrose unloading in transformed tomato fruit. *Journal of Experimental Botany,* 50: 785-791.

NIELSEN TH. (1992): Differences in fructose-2,6-bisphosphate metabolism between sections of developing barley leaves. *Physiologia Plantarum*, 84: 577-583.

NIELSEN TH, STITT M. (2001): Tobacco transformants with strongly decreased expression of pyrophosphate:fructose-6-phosphate expression in the base of their young growing leaves contain much higher levels of fructose-2,6-bisphosphate but no major changes in fluxes. *Planta*, 214: 106-116.

NIELSEN TH, RUNG JH, VILLADSEN D. (2004): Fructose-2,6-bisphosphate: a traffic signal in plant metabolism. *Trends in Plant Science*, 9: 556-563.

NOGUCHI HK. (2002): The catalytic direction of pyrophosphate:fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase in rice coleoptiles in anoxia. *Physiologia Plantarum*, 116: 345-350.

NONTASWATSRI C, FUKAI S, TOMA T, GOI M. (2002): Comparison of adventitious shoot formation from node and leaf explants of various carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) genotypes. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 77: 520-525.

NONTASWATSRI C, FUKAI S, GOI M. (2004): Revised cocultivation conditions produce effective *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Plant Science*, 166: 59-68.

NUGENT G, RICHARDSON TW, LU CY. (1991): Plant regeneration from stem and petal of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Plant Cell Reports*, 10: 477-480.

OBIADALLA ALI HAR. (2003): Understanding of carbon partitioning in tomato fruit. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin. http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/ali-harem-abd-el-rahman-obiadalla-2003-06-10/PDF/Ali.pdf.

OHTO M, ONAI K, FURKAWA Y, AOKI E, ARAKI T, NAKAMURA K. (2001): Effects of sugar on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 127: 252-261.

OKAR DA, LANGE AJ. (1999): Fructose-2,6-bisphosphate and control of carbohydrate metabolism in eukaryotes. *Biofactors*, 10: 1-14.

OKAR DA, MANZANO A, NAVARRO-SABATE A, RIERA L, BARTRONS R, LANGE AJ. (2001): PFK-2/FbPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trends in Biochemical Science*, 26: 30-35.

ONOZAKI T, IKEDA H, YAMAGUCHI T, HIMENO M. (1998): Introduction of bacterial wilt (*Pseudomonas caryophylli*) resistance in *Dianthus* wild species to carnation. *ISHS Acta Horticulturae*, 127-132.

ONOZAKI T, TANIKAWA N, TANEYA M, KUDO K, FUNAYAMA T, IKEDA H, SHIBATA M. (2004): A RAPD-derived STS marker is linked to a bacterial wilt (*Burkholderia caryophylli*) resistance gene in carnation. *Euphytica*, 138: 255-262.

PEGO JV, KORTSTEE AJ, HUIJSER G, SMEEKENS SGM. (2000): Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. *Journal of Experimental Botany*, 51: 407-416.

PETRU E, LANDA Z. (1974): Organogenesis in isolated carnation plant callus tissue cultivated *in vitro*. *Biologia Plantarum,* 16: 450-453.

PILKIS SJ, EL-MAGHRABI MR, PILKIS J, CLAUS TH, CUMMING DA. (1981): Fructose-2,6-bisphosphate. A new activator of phosphofructokinase. *Journal of Biological Chemistry*, 256 : 3171-3174.

PILON-SMITS EAH, EBSKAMP MJM, PAUL MJ, JEUKEN JW, WEISBEEK PJ, SMEEKENS SCM. (1995): Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiology*, 107: 125-130.

PLAXTON WC. (1996): The organization and regulation of plant glycolysis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47: 185-214.

PORRA RJ, THOMPSON WA, KRIEDEMANN PE. (1989): Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 975: 384-394.

PREISS J. (1988): Biosynthesis of starch and its regulation. In: The Biochemistry of plants. PREISS J. (ed) Academic Press, San Diego, 14, pp 181-254.

PREISS J. (1991): Biology and molecular biology of starch synthesis and its regulation. In Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology, ed B MIFLIN, Oxford University Press. Vol 7: 59-114.

PREISS J, BALL K, SMITH-WHITE B, IGLESIAS A, KAKEFUDA G, LI L. (1991): Starch biosynthesis and its regulation. *Biochemical Society Transactions*, 19: 539-547.

PRIEL A. (1999): Restoring flower scent with genetic engineering. *FlowerTechnology*, 2(2): 28-29.

REDDY AR. (1996): Fructose 2,6-bisphosphate-modulated photosynthesis in *Sorghum* leaves grown under low water regimes. *Phytochemistry*, 43: 319-322.

REDDY AR. (2000): Photosynthesis and fructose 2,6-bisphosphate content in water stressed wheat leaves. *Cereal Research Communications*, 28: 131-137.

REES TA. (1995): Prospects of manipulating plant metabolism. *Trends in Biotechnology*, 1: 375-378.

RIDER MH, BERTRAND L, VERTOMMEN D, MICHELS PA,ROUSSEAU GG, HUE L. (2004): 6-phophofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase: head-to head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochemical Journal*, 381: 561-579.

RIESMEIER JW, FLÜGGE UI, SCHULZ B, HEINEKE D, HELDT HW, WILLMITZER L, FROMMER WD. (1993): Antisense repression of the chloroplast triose-phosphate translocator effects carbon partitioning in transgenic potato plants. *Proceedings of the National Academy Sciences of the USA*, 90: 6161-6164.

RIESMEIER JW, WILLMITZER L, FROMMER WB. (1994): Antisense repression of the sucrose transporter affects assimilate partitioning in transgenic potato plants. *EMBO J*, 13: 1-7.

ROOK F, CORKE F, CARD R, MUNZ G, SMITH C, BEVAN MW. (2001): Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. *Plant Journal*, 26: 421-433.

ROWLAND IR, RUMNEY CJ, COUTTS JT, LIEVENSE LC. (1998): Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis,* 19: 281-285.

RUNG HJ, DRABORG HH, JÖRGENSEN K, NIELSEN TH. (2004): Carbon partitioning in leaves and tubers of transgenic potato plants with reduced activity of fructose-6-phosphate,2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Physiologia Plantarum*, 121: 204-214.

SABULARSE DC, ANDERSON RL. (1981): D-fructose 2,6-bisphosphate. A naturally-occuring activator for inorganic pyrophosphate: D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase in plants. *Biochemical and Biophysical Reseaech Communications*, 103: 848-855.

SAFFORD R, JOBLING SA, SIDEBOTTOM CM, WESTCOTT RJ, COOKE D, TOBER KJ, STRONGITHARM BH, RUSSEL AL, GIDLEY MJ. (1998): Consequences of antisense RNA inhibition of starch branching enzyme activity on properties of potato starch. *Carbohydrate Polymers*, 35: 155-168.

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. (1989): Molecular cloning: A laboratory manual; 2. edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, pp 9-31.

SATO S, KATOH N, YOSHIDA H, IWAI S, HAGIMORI M. (2000): Production of doubled haploid plants of carnation (*Dianthus caryophyllus* L) by pseudofertilized ovule culture. *Scientia Horticulturae*, 83: 301-310.

SAVIN KW, BAUDINETTE SC, GRAHAM MW, MICHAEL MZ, NUGENT GD, LU CY, CHANDLER SF, CORNISH EC. (1995): Antisence ACC oxidase RNA delays carnation petal senescence. *HortScience*, 30: 970-972.

SCHÄFER G, HEBER U, HELDT HW. (1977): Glucose transport into spinach chloroplast. *Plant Physiology*, 60: 286-289.

SCHLEUCHER J, VANDERVEER PJ, SHARKEY TD. (1998): Export of carbon from the chloroplast at night. *Plant Physiology*, 118: 1439-1445.

SCOTT P, KRUGER NJ. (1995): Influence of elevated fructose-2,6-bisphosphate levels on starch mobilization in transgenic tobacco leaves in the dark. *Plant Physiology*, 108: 1569-1577.

SCOTT P, LANGE AJ, PILKIS SJ, KRUGER NJ. (1995): Carbon metabolism in leaves of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) containing elevated fructose-2,6-bisphosphate levels. *Plant Journal*, 7: 461-469.

SCOTT P, LANGE AJ, KRUGER NJ. (2000): Photosynthetic carbon metabolism in leaves of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) containing decreased amounts of fructose 2,6-bisphosphate. *Planta*, 211: 864-873.

SCOVEL G, BEN-MEIR H., OVADIS M., ITZHAKI H., VAINSTEIN A. (1998): RAPD and RFLP markers tightly linked to the locus controlling carnation (*Dianthus caryophyllus*) flower type. *Theoretical and Applied Genetics,* 96: 117-122.

SCOVEL G, ALTSHULER T, LIU Z, VAINSTEIN A. (2000): The evergreen gene is essential for flower initiation in carnation. *Journal of Heredity*, 91: 487-491.

SCOVEL G, OVADIS M, VAINSTEIN A, REUVEN M, BEN-YEPHET Y. (2001): Marker assisted selection for resistance to *Fusarium oxysporum* in the greenhouse carnation. *ISHS Acta Horticulturae,* 552: 151-156.

SEGERS A. (1987): The development of interspecific carnation hybrids. *ISHS Acta Horticulturae*, 216: 373-375.

SÉVENIER R, HALL RD, VAN DER MEER IM, HAKKERT HJC, VAN TUNEN AJ, KOOPS AJ. (1998): High level fructan accumulation in a transgenic sugarbeet. *Nature Biotechnology*, 16: 843-846.

SHABADE M, MURASHIGE T. (1977): Hormonal requirements of excised *Dianthus caryophyllus* L. shoot apical meristem *in vitro*. *American Journal of Botany*, 64: 443-448.

SHARKEY TD, SAVITCH LV, VANDERVEER PJ, MICALEFF BJ. (1992): Carbon partitioning in a *Flaveria linearis* mutant with reduced cytosolic fructose bisphosphatase. *Plant Physiology*, 100: 210-215.

SHURE M, WESSLER S, FEDOROFF N. (1983): Molecular identification and isolation of the *Waxy* locus in maize. *Cell*, 35: 225-233.

SLATTERY CJ, KAVAKLI IH, OKITA TV. (2000): Engineering starch for increased quantity and quality. *Trends in Plant Science*, 5: 291-298.

SMEEKENS S. (2000): Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,* 51: 79-81.

SMULDERS MJM, NOORDIJK Y, RUS-KORTEKAAS W, BREDEMEIJER GMM, VOSMAN B. (2003): Microsatellite genotyping of carnation varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 1191-1195.

SONNEWALD U, BRAUER M, VON SCHAEWEN A, STITT M, WILLMITZER L. (1991): Transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase in either the cytosol or apoplast: a powerful tool for studying sucrose metabolism and sink/source interactions. *Plant Journal*, 1: 95-106.

SONNEWALD U, HAJIREZAEI MR, KOSSMANN J, HEYER A, TRETHEWEY RN, WILLMITZER L. (1997): Increased potato tuber size resulting from apoplastic expression of a yeast invertase. *Nature Biotechnology*, 15: 794-797.

SPARNAAIJ LD, KOEHORST-VAN PUTTEN HJJ. (1990): Selection for early flowering in progenies of interspecific crosses of ten species in the genus *Dianthus*. *Euphytica*, 22: 211-220.

STARK D, TIMMERMANN K, BARRY G, PREISS J, KISHORE G. (1992): Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP-glucose pyrophosphorylase. *Science*, 258: 287-292.

STITT M, KURZEL B, HELDT HW. (1984): Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose 2,6 bisphosphate. II Partitioning between sucrose and starch. *Plant Physiology*, 75: 554-560.

STITT M, WIRTZ W, GERHARDT R, HELDT HW, SPENCER C, WALKER D, FOYER C. (1985): A comparative study of metabolite levels in plant leaf material in the dark. *Planta*, 166: 354-364.

STITT M. (1986): Limitation of photosynthesis by carbon metabolism: I. Evidence for excess electron transport capacity in leaves carrying out photosynthesis in saturating light and CO_2. *Plant Physiology*, 81: 1115-1122.

STITT M, HUBER SC, KERR P. (1987): Control of photosynthetic sucrose synthesis. In Biochemistry of plants, Vol. 10 (HATCH MD and BOARDMAN NK eds). London: Academic Press, 327-409.

STITT M. (1990a): Fructose 2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,* 41: 153-185.

STITT M. (1990b): Fructose 2,6-bisphosphate. *Methods in Biochemistry*, 3: 87-92.

STITT M. (1991): Rising CO_2 levels and their significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant Cell and Environmental*, 14: 741-762.

STITT M. (1996): Metabolic regulation of photosynthesis. In Advances in Photosynthesis, Vol. 3: Environmental stress and photosynthesis (BAKER N. ed.) London: Academic Press, 151-190.

STITT M. (1997): The flux of carbon between the chloroplast and the cytoplasm. In Plant Metabolism. 2. edition, DENNIS DT, TURPIN DH, LEFEBVRE DD, LAYZEL, DB (eds). Longman, London, pp 382-400.

STRAND A, ZRENNER R, TREVANION S, STITT M, GUSTAFSSON P, GARDESTRÖM P. (2000). Decreased expression of two key enzymes in the sucrose biosynthesis pathway, cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase and sucrose phosphate synthase, has remarkably different consequences for photosynthetic carbon metabolism in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 23: 759-770.

STRAND A, FOYER CH, GUSTAFSSON P, GARDESTRÖM P, HURRY V. (2003): Altering flux through the sucrose biosynthesis pathway in transgenic *Arabidopsis thaliana* modifies photosynthetic acclimation at low temperatures and the development of freezing tolerance. *Plant Cell and Environmental,* 26: 523-535.

SWEETLOVE LJ, BURRELL MM, REES T. (1996): Starch metabolism in tubers of transgenic potato (*Solanum tuberosum*) with increased ADPglucose pyrophosphorylase. *Biochemistry Journal*, 320: 493-498.

TANAKA Y, TSUDA S, KUSUMI T. (1998): Metabolic engineering to modify flower color. *Plant* and *Cell Physiology*, 39: 1119-1126.

TANAKA, Y. (2006): Flower colour and cytochromes P450. *Phytochemistry Reviews,* 5: 283-291.

TANG GQ, STURM A. (1999): Antisense repression of sucrose synthase in carrot (*Daucus carota* L.) affects growth rather than sucrose partitioning. *Plant Molecular Biology*, 41: 465-479.

TAULER A, LIN K, PILKIS SJ. (1991): Hepatic 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. Use of site directed mutagenesis to evaluate the roles of His-258 and His-392 catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 265: 15617-15622.

THAKUR M, SHARMA DR, SHARMA SK. (2002): *In vitro* selection and regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) plants resistant to culture filtrate of *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi*. *Plant Cell Reports*, 20: 825-828.

TJADEN J, MÖHLMANN T, KAMPFENKEL K, HENRICHS G, NEUHAUS HE. (1998): Altered plastidic ATP/ADP-transporter activity influences potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber morphology, yield and composition of tuber starch. *Plant Journal*, 16: 531-540.

TOLDI O, KOVÁCS G, KISS E, SORVARI S, SCOTT P. (2002): Altered fructose-2,6-bisphosphatase levels cause phenotypic chandges and shift development in plants. *Acta Biologica Szegediensis,* 46(3-4): 15-16.

TRETHEWEY RN, AP REES T. (1994): A mutant of *Arabidopsis thaliana* lacking the ability to transport glucose across the chloroplast envelope. *Biochemistry Journal*, 301: 449-454.

TRETHEWEY RN, GEIGENBERGER P, RIEDEL K, HAJIREZAEI MR, SONNEWALD U, STITT M, RIESMEIER JW, WILLMITZER L. (1998): Combined expression of glucokinase and invertase in potato tubers leads to a dramatic reduction in starch accumulation and a stimulation of glycolysis. *Plant Journal*, 15: 109-118.

TREVANION SJ. (2000): Photosynthetic carbohydrate metabolism in wheat (*Triticum aestivum* L) leaves: optimization of methods for determination of fructose 2,6-bisphosphate. *Journal of Experimental Botany*, 51: 1037-1045.

TREVANION SJ. (2002): Regulation of sucrose and starch synthesis in wheat (*Triticum aestivum* L) leaves: role of fructose 2,6-bisphosphate. *Planta,* 215: 653-665.

TRIPODI KEJ, PODESTÁ FE. (1997): Purification and structural and kinetic characterization of the pyrophosphate:fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase from the crassulacean acid metabolism plant, pineapple. *Plant Physiology*, 113: 779-786.

TRUESDALE MR, TOLDI O, SCOTT P. (1999): The effect of elevated concentrations of fructose 2,6-bisphosphate on carbon metabolism during deacidification in the Crassulacean acid metabolism plant *Kalanchöe daigremontiana. Plant Physiol,* 121: 957-964.

TUTIN TG, BURGES NA, CHATER AO, EDMONDSON JR, HEYWOOD VH, MOORE DM, VALENTINE DH, WALTERS SM, WEBB DA. (1993): Flora Europea. Cambridge University Press, Cambridge. pp 227-246.

VAN ALTVORST AC, KOEHORST HJJ, BRUINSMA T, JANSEN J, CUSTERS JBM, JONG J, DONS JJM. (1992): Adventitious shoot formation from in vitro leaf explants of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Scientia Horticulturae*, 51: 223-235.

VAN ALTVORST AC, KOEHORST HJJ, BRUINSMA T, DONS JJM. (1994): Improvement of adventitious shoot formation from carnation leaf explants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 37: 87-90.

VAN ALTVORST AC, YANCHEVA S, DONS J. (1995a): Cells within the nodal region of carnation shoot exhibit a high potential for adventitious shoot formation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 40: 151-157.

VAN ALTVORST AC, RIKSEN T, KOEHORST H, DONS HJM. (1995b): Transgenic carnations obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of leaf explants. *Transgenic Research*, 4: 105-113.

VAN ALTVORST AC, KOEHORST H, DE JONG J, DONS HJM. (1996): Transgenic carnation plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of petal explants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 169: 169-173.

VAN SCHAFTINGEN E, LEDERER B, BARTRONS R, HERS HG. (1982): A kinetic study of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase from potato tubers. Application to a microassay of fructose 2,6-bisphosphate. *European Journal of Biochemistry*, 129: 191-195.

VAN SCHAFTINGEN E. (1987): Fructose 2,6-bisphosphate. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 59: 315-395.

VERAMENDI J, ROESSNER U, RENZ A. (1999): Antisense repression of hexokinase 1 leads to an over accumulation of starch in leaves of transgenic potato plants but not to significant changes in tuber carbohydrate metabolism. *Plant Physiology*, 121: 123-133.

VERES A, KISS E, TÓTH E, TÓTH Á, HESZKY L. (2005a): Down-regulation of ethylene production in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by an apple derived ACC-cDNA. *International Journal of Horticultural Science*, 11(1): 101-104.

VERES A., KISS E., TÓTH Á., TÓTH E., HESZKY L. (2005b): Az etiléntermelés gátlásának hatása a szegfű (*Dianthus caryophyllus*) néhány gazdaságilag fontos tulajdonságára. *Kertgazdaság,* 37(4): 53-61.

VIJN I, VAN DIJKEN A, SPRENGER N, VAN DUN K, WEISBEEK P, WIEMKEN A, SMEEKENS S. (1997): Fructan of the inulin neoseries is synthesized in transgenic chicory plants (*Cichorium intybus* L.) harbouring onion (*Allium cepa* L.) fructan:fructan 6G-fructosyltransferase. *Plant Journal*, 11: 387-398.

VIJN I, SMEEKENS S. (1999): Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiology*, 120: 351-359.

VILLADSEN D, RUNG JH, DRABORG H, NIELSEN TH. (2000): Structure and heterologous expression of a gene encoding fructose-6-phosphate,2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from *Arabidopsis thaliana. Biochimica et Biophysica Acta,* 1492: 406-413.

VILLALOBOS V. (1981): Floral differentiation in carnation (*Dianthus caryophyll*us L.) from anthers cultured *in vitro*. *Phyton*, 41: 71-75.

VISSER RGF, SOMHORST I, KUIPERS GJ, RUYS NJ, FEENSTRA WJ, JACOBSEN E. (1991): Inhibition of the expression of the gene for granule-bound starch synthase in potato by antisense constructs. *Molecular General Genetics*, 225: 289-296.

WATAD AA, AHRONI A, ZUKER A, SHEJTMAN H, NISSIM A, VAINSTEIN A. (1996): Adventitious shoot formation from carnation stem segments: a comparison of different culture procedures. *Scientia Horticulturae*, 65: 313-320.

WEYENS G, RITSEMA T, VAN DUN K, MEYER D, LOMMEL M, LATHOUWERS J, ROSQUIN I, DENYS P, TOSSENS A, NIJS M, TURK S, GERRITS N, BINK S, WALRAVEN B, LEFÉBVRE M, SMEEKENS S. (2004): Production of tailor-made fructans in sugar beet by expression of onion fructosyltransferase genes. *Plant Biotechnology Journal*, 2: 321-327.

WINTER H, HUBER S. (2000): Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 253-289.

WOODSON, W. R., PARK, K. Y., DRORY, A., LARSEN, P. B., WANG, H. (1992): Expression of ethylene biosynthetic pathway transcripts in senescing carnation flowers. *Plant Physiology*, 99: 526-532.

WU C, OKAR DA, NEWGARD CB, LANGE AJ. (2001): Overexpression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in mouse liver lowers blood glucose by suppressing hapatic glucose production. *The Journal of Clinical Investigation*, 107: 91-98.

YAKIMOVA E, ATANASSOVA B, KAPCHINA-TOTEVA V. (1997): Longevity and some metabolic events in postharvest spray-carnation (*D. caryophyllus F. spray*, hort.) flowers. *Bulgarien Journal of Plant Physiology,* 23(3-4): 57-65.

YANG J, ZHANG J, WANG Z, ZHU Q. (2001): Activities of starch hydrolytic enzymes and sucrose-phosphate synthase in the stems of rice subjected to water stress during grain filling. *Journal of Experimental Botany*, 52: 2169-2179.

YANTCHEVA A, VLAHOVA M, ANTANASSOV A. (1999): Direct somatic embryogenesis and plant regeneration of carnation. *Plant Cell Reports*, 18: 148-153.

ZRENNER R, KRAUSE KP, APEL P, SONNEWALD U. (1996): Reduction of the cytosolic fructose-1,6-bisphophatase in transgenic potato plants limits photosynthetic sucrose biosynthesis with no impact on plant growth and tuber yield. *Plant Journal*, 9: 671-681.

ZUKER A, CHANG PFL, AHRONI A, CHEAH K, WOODSON WR, BRESSAN RA, WATAD AA, HASEGAWA PM, VAINSTEIN A. (1995): Transformation of carnation by microprojectile bombardment. *Scientia Horticulturae*, 64: 177-185.

ZUKER A, AHRONI A, VAINSTEIN A. (1997): A highly efficient method for carnation transformation. *ISHS Acta Horticulturae*, 467: 373-375.

ZUKER A, AHRONI A, TZFIRA T, BEN-MEIR H, VAINSTEIN A. (1999): Wounding by bombardment yields highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Molecular Breeding*, 5: 367-375.

ZUKER A, TZFIRA T, SCOVEL G, OVADIS M, SHKLARMAN E, ITZHAKI H, VAINSTEIN A. (2001a): *rolC*-transgenic carnation with improved agronomic traits: quantitative and qualitative analyses of greenhouse-grown plants. *Journal of the American Society for Horticultural Science,* 126: 13-18.

ZUKER A, SHKLARMAN E, SCOVEL G, BEN-MEIR H, OVADIS M, NETA-SHARIR I, BEN-YEPHET Y, WEISS D, WATAD D, VAINSTEIN A. (2001b): Genetic engineering of agronomic and ornamental traits in carnation. *ISHS Acta Horticulturae*, 560: 91-94.

ZUKER A, TZFIRA T, BEN-MEIR H, OVADIS M, SHKLARMAN E, ITZHAKI H, FORKMANN G, MARTENS S, NETA-SHARIR I, WEISS D, VAINSTEIN A. (2002): Modification of flower color and fragrance by antisense suppression of the flavonone 3-hydroxylase gene. *Molecular Breeding*, 9: 33-41.

M2. Hibridizációs oldatok

Az összes hibridizációs oldat készítéséhez bideszt vizet használunk!

Blocking Stock Solution (BSS):

WU 10%-os legyen (100 ml):blokkoló reagens (10 g) Puffer I-ben oldva

Mikróban kell felodani→ sterilezés→ 4 °C-on kell tárolni

Mosó puffer:

Puffer I + Tween20

Puffer I:

0,1 M maleinsav

0,15 M NaCl

bidesztvízzel oldjuk

autoklávozni kell

pH: 7,5 csak NaOH tablettával

(11,61 g/l; 8,76 g/l)

Puffer II:

BSS + Puffer I (1:10)

Mindig frissen kell készíteni!!!!

Puffer III:

0,1 M TrisHCl (15,76 g/l)

0,1 M NaCl (5,844 g/l)

0,05 M $MgCl_2$ (10,15 g/l)

pH: 9,5 NaOH tablettával

Nem kell autoklávozni

Puffer IV:

0,01 M Tris-HCl

0,00 1 M EDTA

pH: 8,0

RNS munkához vagy a kontroll reakcióhoz szükséges

Hibridizációs puffer:

250 ml 10xSSC

50 ml 10%-os BSS

1 ml 10%-os SDS

1 ml 10%-os Na-laurosarcosine

Kimosó puffer:

I. 2xSSC+SDS 0.1% (ha szobahőmérsékleten billegtetem)

II. 0,1SSC+SDS 0.1% (68 °C-os vízfűrdő esetében használom)

M3. Alapadatok

I. táblázat: A szacharóz mérések alapadatai (mg/g friss tömeg) (18/A ábra)

F406	F407	Kontroll	P207	P228
6,314	2,421	2,201	0,814	1,358
3,996	4,209	0,873	0,756	1,687
4,704	3,433	1,901	0,873	1,581

II. táblázat: A keményítő mérések alapadatai (mg/g friss tömeg) (18/B ábra)

F406	F407	Kontroll	P207	P228
7,134	12,28	13,618	19,849	17,94
9,365	10,405	12,65	17,823	16,833

III. táblázat: A glükóz mérések alapadatai (mg/g friss tömeg) (18/C ábra)

F406	F407	Kontroll	P207	P228
3,355	1,468	1,569	0,504	0,439
1,548	1,526	1,036	0,583	0,496
2,498	1,519	0,792	0,504	0,439

IV. táblázat: A fruktóz mérések alapadatai (mg/g friss tömeg) (18/D ábra)

F406	F407	Kontroll	P207	P228
3,362	1,554	0,489	0,532	0,388
1,26	1,878	0,042	0,576	0,547
2,059	1,792	0,525	0,568	0,475

V. táblázat: A glükóz 6-foszfát mérések alapadatai (nmol/g friss tömeg) (19/A ábra)

F406	F407	Kontroll	P207	P228
48,46	36,852	33,366	11,952	29,88
38,18	38,844	35,856	14,442	26,394

VI. táblázat: A fruktóz 6-foszfát mérések alapadatai (nmol/g friss tömeg) (19/B ábra)

F406	F407	Kontroll	P207	P228
15,075	21,105	8,542	9,96	10,5
21	10,05	11,055	7,47	5,25

VII. táblázat: A 3-foszfoglicerinsav mérések alapadatai (nmol/g friss tömeg) (19/C ábra)

F406	F407	Kontroll	P207	P228
128,98	125,58	157,96	167,2	168,25
119,32	96,6	138,64	195,48	157,96

VIII. táblázat: A dihidroxiaceton-foszfát mérések alapadatai (nmol/g friss tömeg) (19/D ábra)

F406	F407	Kontroll	P207	P228
19,32	14,625	24,15	48,75	29,25
14,49	24,375	33,81	38,64	34,125

IX. táblázat: A fruktóz 1,6-biszfoszfatáz mérések alapadatai (mg/g friss tömeg/min) (17/A ábra)

F406	F407	Kontroll	P207	P228
770	410	448	288,1	266,8
731	676	401	309,5	249,7

X. táblázat: Pirofoszfát-függő foszfotranszferáz mérések alapadatai (mg/g friss tömeg/min) (17/B ábra)

F406	F407	Kontroll	P207	P228
80,2	111,1	97,3	114	153,5
77,6	101,7	92,7	125	128,2

XI. táblázat: Az ADP-glükóz pirofoszforiláz mérések alapadatai (mg/g friss tömeg/min) (17/D ábra)

F406	F407	Kontroll	P207	P228
4,2	5,3	12,1	17,7	14,5
1,9	7,1	9,4	19,8	16,3

XII. táblázat: A 6-foszfofrukto-1-kináz mérések alapadatai (mg/g friss tömeg/min) (17/C ábra)

F406	F407	Kontroll	P207	P228
59,8	58,2	71,5	75,6	63,4
63,9	64,1	67,3	73,2	59,6

XIII. táblázat: A hexokináz mérések alapadatai (mg/g friss tömeg/min) (17/E ábra)

F406	F407	Kontroll	P207	P228
18,4	26,1	18,9	17,8	22,2
22,4	22,3	23,5	20,7	20,6

XIV. táblázat: A fruktóz 2,6-biszfoszfát mérések alapadatai (pmol/g friss tömeg) (16. ábra)

	0 h	0,5 h	2 h	4 h	6 h	8 h
F406	19,5	3,9	7,4	14,4	26,3	35,1
	12,9	5,9	10,5	11	18	29,25
F407	13,4	7,9	8,9	21,1	19,6	35,8
	21,1	10,5	10	15,7	29,3	46,7
Kontroll	34,1	14,4	14,9	30,2	43,8	63,3
	35,9	10,5	12,8	23,1	53,7	55,8
P207	10,8	18	33,4	55,2	80,4	82,8
	46,7	14,5	50,8	48,8	72,4	88,6
P228	49,3	15,1	39	43,3	55,3	78
	53,6	14,4	55,2	37,7	60,3	67,6

XV. táblázat: A fotoszintézis ráta mérések alapadatai (mikromol $CO_2/m^2/s$) (20/A ábra)

	0,5 h	2 h	4 h	6 h	8 h
F406	0,981	1,31	3,12	1,58	1,53
	0,927	1,41	3,26	1,7	1,52
F407	0,409	0,671	1,87	1,03	0,81
	0,256	0,636	2,21	1,19	0,965
Kontroll	0,249	0,573	1,23	0,954	0,683
	0,112	0,517	1,2	0,429	0,592
P207	0,141	0,336	1,57	0,889	0,424
	0,452	0,328	1,66	0,729	0,442
P228	0,239	0,541	0,645	0,423	0,508
	0,256	0,449	0,586	0,535	0,661

XVI. táblázat: A sztóma konduktancia mérések alapadatai (mmol $H_2O/m^2/s$) (20/B ábra)

	0,5 h	2 h	4 h	6 h	8 h
F406	5,4	25,9	61,4	44,8	39,3
	5,37	25,6	55,8	38,7	34,6
F407	4,2	7,78	27,3	19,5	18,8
	4,46	7,78	25,3	19,7	19
Kontroll	1,8	3,2	17,4	16,8	10,5
	1,41	3,25	18,3	15,8	10,1
P207	4,4	2,57	5,28	5,38	7,96
	2,44	2,69	4,2	4,62	7,51
P228	1,4	4,56	9,26	10,9	12
	1,3	3,81	6,66	10,8	9,62

XVII. táblázat: A transpirációs ráta mérések alapadatai (mmol $H_2O/m^2/s$) (20/C ábra)

	0,5 h	2 h	4 h	6 h	8 h
F406	0,0757	0,598	1,35	1,17	0,916
	0,07	0,594	1,22	1,05	0,84
F407	0,0603	0,188	0,691	0,602	0,467
	0,0632	0,187	0,651	0,621	0,468
Kontroll	0,034	0,0783	0,44	0,475	0,338
	0,0259	0,0844	0,471	0,436	0,314
P207	0,035	0,0624	0,133	0,154	0,207
	0,0139	0,0629	0,112	0,13	0,197
P228	0,0361	0,137	0,233	0,263	0,356
	0,0368	0,125	0,165	0,271	0,27

XVIII. táblázat: Az intracelluláris CO_2 mérések alapadatai (mikromol CO_2/mol levegő) (20/D ábra)

	0,5 h	2 h	4 h	6 h	8 h
F406	347	290	310	339	243
	321	302	304	335	222
F407	375	254	312	286	253
	343	239	313	278	216
Kontroll	359	169	318	280	369
	322	152	310	279	358
P207	360	267	321	290	359
	353	284	331	285	322
P228	359	296	304	240	390
	320	303	350	219	363

XIX. táblázat: A klorofill tartalom mérések alapadatai (mg/g friss tömeg) (21. ábra)

F406	F407	Kontroll	P207	P228
0,8034	0,5751	0,6117	0,5388	0,6286
0,8555	0,5551	0,5944	0,6166	0,7502

XX. táblázat: A szacharóz mérések alapadatai virágzó szegfűben (mg/g friss tömeg) (23/A ábra)

F406	F407	Kontroll	P207	P228
5,976	5,681	5,16	5,39	5,73
5,92	7,731	5,005	6,15	5,819

XXI. táblázat: A glükóz mérések alapadatai virágzó szegfűben (mg/g friss tömeg) (23/C ábra)

F406	F407	Kontroll	P207	P228
1,16	0,976	0,792	0,92	0,838
1,004	0,893	1,094	0,81	0,866

XXII. táblázat: A fruktóz mérések alapadatai virágzó szegfűben (mg/g friss tömeg) (23/D ábra)

F406	F407	Kontroll	P207	P228
0,672	0,82	0,777	0,736	0,728
0,708	0,896	0,799	0,82	0,812

XXIII táblázat: A keményítő mérések alapadatai virágzó szegfűben (mg/g friss tömeg) (23/B ábra)

F406	F407	Kontroll	P207	P228
7,035	10,05	12,95	15,08	16,14
8,54	11,55	15,75	14,49	14,95

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Kiss Erzsébetnek folyamatos támogatásáért, bizalmáért, szakmai és gyakorlati tanácsaiért, az idegennyelvű publikációk elkészítésében nyújtott áldozatos segítségéért. Köszönöm Dr. Heszky László akadémikus, tanszékvezető úrnak, hogy a Genetika és Növénynemesítés Tanszéken lehetőséget biztosított disszertációm elkészítésére, köszönöm továbbá hasznos szakmai tanácsait.

Köszönettel tartozom Dr. Kerepesi Ildikónak és Dr. Toldi Ottónak a szénhidrát metabolitok és enzimaktivitások mérésében nyújtott nélkülözhetetlen segítségükért. Köszönetem fejezem ki Horváth Eszternek és Dr. Páldy Emilnek a gázcsere mérésekben, Dr. Csapó Gyulának a szártörésben nyújtott segítségeikért.

Köszönöm Dr. Galli Zsolt elméleti és gyakorlati szakmai tanácsait, Ádám Zoltánné - Stefi néni – sokrétű segítségét és biztató szavait.

Köszönöm a Tanszék kollektívájának segítségét: Dr. Veres Anikónak, Mázikné Dr. Tőkei Katalinnak, Hajósné Dr. Novák Mártának, Dr. Bucherna Nándornak, Dr. Kiss Józsefnek, Dr. Gyulai Gábornak, Katona Melindának, Bellusné Daniek Ágnesnek, Ócsai Sándornénak, Bakos Györgynének, Tóth Péternének, Tisza Viktóriának, valamint a jelenlegi és volt PhD. hallgatóknak.

Végül köszönöm családom támogatását, a nyugodt hátteret, a kitartást, mely nélkül ez a disszertáció nem készülhetett volna el.