SZENT ISTVÁN EGYETEM

Szegfű etilénbioszintézisének antiszensz gátlása almából származó ACC szintáz génnel

Doktori értekezés

Veres Anikó

Gödöllő

2006.

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 mezőgazdaságtudomány kandidátusa
SZIE, Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar
Genetika és Növénynemesítés Tanszék

....

Az iskolavezető jóváhagyása A témavezető jóváhagyása

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke 6
1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS 9
1.1. A TÉMA AKTUALITÁSA 9
1.2. CÉLKITŰZÉSEK 11
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 13
2.1. AZ ETILÉN ÉLETTANI SZEREPE 13
2.2. AZ ETILÉN BIOSZINTÉZISE 14
2.3. ACC-SZINTÁZ MULTIGÉN CSALÁD 16
2.4. SZEGFŰ ACC-SZINTÁZ GÉNCSALÁD 17
2.5. ANTISZENSZ RNS ÉS DNS 18
2.6. RNS INTERFERENCIA 21
2.7. ETILÉNBIOSZINTÉZISÉBEN MÓDOSÍTOTT TRANSZGÉNIKUS NÖVÉNYEK 23
2.8. A GÉNTECHNOLÓGIA ALKALMAZÁSA A LÁGYSZÁRÚ DÍSZNÖVÉNYEK ÉRTÉKMÉRŐ TULAJDONSÁGAINAK JAVÍTÁSÁRA 28
2.9. A VÁZAÉLETTARTAM MEGHOSSZABBÍTÁSÁNAK MÓDSZEREI 30
2.10. A VIRÁGOK ÖREGEDÉSÉLETTANA 32
2.11. GÉNEXPRESSZIÓ AZ ÖREGEDŐ SZEGFŰ VIRÁGOKBAN 34
2.12. TRANSZGÉNIKUS SZEGFŰ ELŐÁLLÍTÁSA 37
2. 13. AZ ETILÉN GÁTLÁSÁNAK HATÁSA A HAJTÁSREGENERÁCIÓRA 40
3. ANYAG ÉS MÓDSZER 43
3.1. NÖVÉNYANYAG 43
3.1.1. Növényregenerációs kísérletekhez felhasznált szegfű fajták 43
3.12. A hajtásregeneráció összehasonlításához felhasznált növényanyag 43
3.1.3. Transzformációhoz felhasznált növényanyag 44
3.1.4. Etiléntermelés méréséhez és a vázaélettartam méréséhez felhasznált növényanyag 44
3.1.5. Törési kísérletekben felhasznált fajták 44
3.2. NÖVÉNYANYAG SZAPORÍTÁSÁNAK, FENNTARTÁSÁNAK, NEVELÉSÉNEK MÓDSZERE 45
3.2.1. A magvak fertőtlenítése 45
3.2.2 A növények mikroszaporítása 45

3.2.3. Hajtásregenerálás ... 45
3.2.4. A hajtásregeneráció hatékonyságának összehasonlítása ... 46
3.2.5. A növények nevelése üvegházban ... 47

3.3. TRANSZFORMÁCIÓRA ALKALMAZOTT VEKTOR ... 48

3.4. A MOLEKULÁRIS TRANSZFORMÁCIÓ ... 50

3.5. DNS IZOLÁLÁS ... 52

3.6. MRNS IZOLÁLÁS ... 53

3.7. PCR ... 54

3.8. RT-PCR ... 54

3.9. SOUTHERN HIBRIDIZÁCIÓ DIGOXIGENIN-JELÖLT PRÓBÁVAL ... 55

3.10. A SOUTHERN HIBRIDIZÁCIÓ RADIOAKTÍV JELÖLÉSSEL ... 57

3.11. PLAZMID-DNS IZOLÁLÁS ... 58

3.12. DNS VISSZAIZOLÁLÁSA ALACSONY OLVADÁSPONTÚ GÉLBŐL ... 59

3.13. A VÁZAÉLETTARTAM MÉRÉSE ... 60

3. 14. AZ ETILÉNTERMELÉS MÉRÉSE ... 61

3.15. A SZÁRSZILÁRDSÁG MÉRÉSE ... 62

3.16. A SZÁRTÖRÉSRE HAJLAMOSSÁG SZÖVETTANI VIZSGÁLATA ... 63

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK ... 65

4.1. NÖVÉNYREGENERÁCIÓ ... 65

4.2. NÖVÉNYTRANSZFORMÁCIÓS MÓDSZER ADAPTÁLÁSA ... 68

4.3. A TRANSZFORMÁCIÓ SIKERÉNEK BIZONYÍTÁSA ... 69
4.3.1. Szelekció kanamicin tartalmú táptalajon ... 69
4.3.2. Transzformáció sikerének bizonyítása molekuláris módszerekkel ... 70

4.4 A TRANSZGÉNIKUS NÖVÉNYEK VIZSGÁLATA ... 74
4.4.1 A transzgén hatása a növényregenerációra ... 74
4.4.2. A transzgén hatása a vázaélettartamra ... 77
4.4.3. A transzgénikus növények etilén termelésének vizsgálata ... 82
4.4.4. A virágok szártörési eredményei ... 86
4.4.5. A szárak szövettani vizsgálata ... 92

4.5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ... 93

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK ... 95

6. ÖSSZEFOGLALÁS ... 97

7. SUMMARY ... 101

8. MELLÉKLET 105
M1. IRODALOMJEGYZÉK: 105
M.2.1. MELLÉKLET 121
M.2.2. MELLÉKLET 126
M.2.3. MELLÉKLET 132
M.2.4. MELLÉKLET 136
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 141

Rövidítések jegyzéke

1-MCP	1-metilciklopropén
2,4-D	2,4-diklór fenoxiecetsav
3,3-DMCP	3,3-dimetil ciklopropén
6-PF-2-K	6-foszfofrukto-2-kináz enzim
ABA	abszcizinsav
ACC	1-aminociklopropán-1-karboxilsav
ACO	ACC-oxidáz enzim
ACS	ACC-szintáz enzim
AOA	aminooxiecetsav
AVG	aminoetoxivinilglicin
BA	benziladenin
bp	bázispár
BYMV	bab sárga mozaikvírus
CaMV 35S	karfiol mozaik vírus 35S RNS promóter
CARCACC	szegfű ACC-szintáz enzim régi neve
CAT	kloramfenikol-acetiltranszferáz enzim
CCA	antiszensz ACC-szintáz
cDNS	kópia (copy) DNS
CHS	csalkon (chalcone)-szintáz enzim
CHX	cikloheximid
CP	ciklopropén
CPase	cisztein proteináz enzim
CTAB	cetil-trimetil-ammóniumbromid
CTR1	konstitutív etilén-reagáló *Arabidopsis* mutáns (Constitutive Triple Response)
CSPD	kemilumineszcenciás szubsztrát 3-(4-metoxispiro(1,2-dioxetán-3,2'-(5'-kloro)-triciklo-(3.3,1.1^{3,7})-dekán-(4-il)-fenil foszfát
DcACS	szegfű ACC-szintáz enzim
DC-ACO	szegfű ACC oxidáz enzim
DcCP1	szegfű cisztein proteináz enzim
Dc-CPIn	szegfű CP-áz inhibitor fehérje
DcEIL-1	szegfű EIN3 szerű fehérje
DFR	dihidroflavonol reduktáz enzim
DMSO	dimetil-szulfoxid
dsRNS	kettősszálú RNS (double-stranded)
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EIN 2, EIN 3, EIN 4	etilén érzéketlen mutánsok (Ethylene INsensitive)

ERS1	etilén válasz mutáns *Arabidopsis*-ban (Ethylene Response Sense)
EtBr	etidium-bromid
ETR1	etilén érzéketlen *Arabidopsis* mutáns EThylene Resistant)
Fru-2,6-P_2-áz	fruktóz-2,6-biszfoszfatáz enzim
*Fugu*ACS	gömbhal ACC-szintáz enzim
GBSS	'Granule Bound Strach Synthase' enzim
GMO	genetikailag módosított szervezet (Genetically Modified Organism)
GUS	*E. coli* β-D-glükuronidáz enzim
HCN	hidrogén-cianid
HFL	flavonoid hidroxiláz enzim (*Petunia hybrida*)
IAA	indolecetsav
IWS	'Improved White Sim' szegfűfajta
MACC	malonil-ACC
MdACS2	alma *Malus domestica* (Borkh.) ACC-szintáz 2 enzim
MTA	5-metiltioadenozin
NAA	α-naftilecetsav
NPTII	neomicin-foszfotranszferáz II enzim
pAVOe3	avokádó ACC-szintáz enzim
pCpTi	tehénbab tripszininhibítor fehérje
PCR	polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction)
PE	pektinészteráz enzim
PG	poligalakturonáz enzim
PHACS	humán ACC-szintáz enzim
PLRV	burgonya levélsodrófvírus
PTGS	poszttranszkripciós géncsendesítés (Posttranscriptional Gene Silencing)
rRNS	riboszomális RNS
RT-PCR	reverz transzkriptáz PCR
RUBISCO	ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz-oxigenáz enzim
SAM	S-adenozil-L-metionin
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
siRNS	kis intrferáló RNS (small interference RNA)
SSC	konyhasó és nátrium-citrát oldat (Saline Sodium Citrate)
STS	ezüst tioszulfát
TE2	Tris+EDTA 20:1 arányban

TEIL	dohány EIN3-szerű fehérje
TMV	dohány mozaik vírus
Tris	Tris(hidroximetil) aminometán

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

1.1. A TÉMA AKTUALITÁSA

Transzgénikus növények előállításának többféle célja lehetséges; idegen gén bejuttatásával stressz és patogén rezisztencia alakítható ki, elérhető, hogy a növények szántóföldi "bioreaktorként" speciális termékeket állítsanak elő (pl. környezetbarát műanyagok). Horizontális rekombinációval vírus-, baktérium-, gomba-, rovar-, állat és emberi gének bevitele válik lehetővé. Regulátorgének és bioszintézisben szerepet játszó enzimek génjeinek módosításával a növények fejlődése, anyagcseréje befolyásolható.

Az etilén számos növényélettani folyamatért felelős, a növény fejlődésének jóformán minden szakaszában szabályozó szerepet tölt be a csírázástól kezdve egészen az öregedésig. Meggyorsítja a zöldségfélék, a gyümölcs és a virágok fejlődését, érését. Nagy gyakorlati jelentősége van az egyidejű virágzás és gyümölcsérés előidézésében. Az etilénbioszintézis lépéseinek tisztázása, illetve a génexpresszió gátlása antiszensz RNS-sel tette lehetővé a növényvilágban az öregedés, a gyümölcs- és termés-érés módosítását molekuláris módszerekkel.

Az antiszensz RNS-t az *Escherichia coli*-ban fedezték fel a colE1 plazmid replikációjának tanulmányozása során. Az értelmetlen RNS hibridizál az értelmes RNS szállal, és mivel ez a duplex nem képes a primer funkciót ellátni, a DNS replikáció gátlódik. Emellett az antiszensz RNS molekulák az átírást is szabályozzák nemcsak prokariótákban, hanem eukariótákban is: elvben bármilyen gén átírása gátolható antiszensz RNS molekulákkal, ennek azonban előfeltétele a biokémiai szintézis utak ismerete, illetve a megfelelő struktúrgének izolálása. Kiterjedt vizsgálatokkal megállapították azt is, hogy a különböző fajokból izolált azonos funkciójú (heterológ) gének képesek a különböző növényfajokban antiszensz gátlást előidézni.

A virágok fontos szerepet töltenek be életünkben. Mindig adódik valamilyen különleges alkalom (születésnap, névnap, vagy családi ünnep: házassági évforduló, esküvő), amelyeknek a virágok fontos kellékei. A szegfű a világ és a hazai piacon egyaránt a legkedveltebb vágott virágok egyike.

A szállítás és a hűtve tárolás technikai fejlődésének eredményeként (hűtőkamionok, repülőgép), az USA-ban az 1970-es évektől átalakult a szegfűtermesztés, addigi körzetei délre tolódtak. Ma már a vágott szegfű 95%-át Dél-Amerikából importálják. Európában hasonló tendencia figyelhető meg, mintegy 20 éves késéssel. A fejlett ipari országokban (Németország, Anglia, Franciaország) napjainkra drasztikusan visszaesett a belföldi termesztés, az igényelt mennyiség döntő részét Dél-Európából, Dél-Amerikából és Afrikából hozzák be. Magyarországon is hasonló a helyzet, sőt miután 2002-ben az importvámot teljesen eltörölték, a növényházi vágott virágok termesztése mindinkább háttérbe szorul. Ezért is fontos olyan új fajták előállítása, amelyek felvehetik a versenyt valamilyen egyedülálló tulajdonságukkal az importból származó, olcsóbb termékekkel.

Mint minden vágott virágnak, így a tipikusan etilénérzékeny növények körébe tartozó szegfűnek is az egyik legfontosabb értékmérő tulajdonsága a vázaélet hossza, amit jelentősen befolyásol az etilén.

A vázaélettartam növelésére számos módszert dolgoztak ki: alacsony -0,5 - 0°C közötti hőmérsékleten és 90-120 Pa nyomáson tárolást, vagy a vágást követő meleg vízfürdőben áztatást. A nehézfémionok közül a kobalt és a nikkel képes megakadályozni az ACC $\Rightarrow$ etilén átalakulást. Az ezüst ion, a széndioxid és káliumpermanganát megkötik az etilén receptorokat. Az 1-MCP, a 3,3-DMCP, az AVG, az AOA, és a CHX szintén gátolja az etilén bioszintézisét. A felsorolt etilén inhibitorok táptalajba adagolásával a csökkent etiléntermelés következményeként megnövekedett hajtásregenerációs képességet tapasztaltak

A szegfű másik fontos értékmérő tulajdonsága a sziromlevelek színe. A Florigene cég a vásárlói igényeknek megfelelően olyan transzgénikus szegfűt állítottak elő, amelynek kékek a virágai. A vasárlók illatos virágokat keresnek, de a viágok illata és a vázaélettartama között negatív korreláció van. Ezért fontos olyan korrelációtörő egyedek előállítása, amelyek mindkét tulajdonságot hordozzák.

A transzgénikus növények előállítása újabb nemesítési utat adhat a dísznövénytermesztés számára. A módszerrel olyan gazdaságilag jelentős értékmérő tulajdonságok javíthatók, mint a vázaélettartam és a szín. A kutatók ACC-oxidáz és szintáz antiszensz és szensz génnel transzformált szegfűt, rózsát antiszensz csalkon szintázzal transzformált petúniát, szegfűt és gerberát állítottak már elő, melyek közül a szegfűk kereskedelmi forgalomban vannak, mind az USA, mind az EU területén.

1.2. CÉLKITŰZÉSEK

A fentiek alapján célunk volt:

- olyan transzgénikus szegfű előállítása, amelynek genomjába az almából származó, az etilén termelésért felelős egyik gén, az 1-aminociklopropán-1-karboxilát (ACC) szintáz értelmetlen "antiszensz" orientációban integrálódik;
- az antiszensz génnel történő transzformáció következményeként a vágott virágok által termelt etilén mennyiségének csökkentése;
- a csökkent etiléntermelés következményeként a vázaélettartam növelése és a hajtásregenerációs képesség javítása.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. AZ ETILÉN ÉLETTANI SZEREPE

Az etilén olyan színtelen és szagtalan vízben oldódó szerves molekula, amely sokféle élettani funkcióval rendelkezik. Már az ókori Egyiptomban is használták a gyümölcsök érésének serkentésére. Az ókori Kínában is tapasztalták, hogy a tömjén égetése zárt térben a körte korábbi érését okozza. 1864-ben megfigyelték, hogy a világító gázzal megvilágított utcákon a világítótestek környékén, a fák abnormális növekedést mutattak. Csavarodott és csenevész hajtásokat hoztak, amelyekre a korai öregedés és a levél lehullása volt jellemző. 1901-ben az orosz fiziológus NELJUBOV írt először az etilén növényekre kifejtett hatásáról. Borsó növényeket vizsgálva figyelte meg, hogy az etilén gátolja a megnyúlásos növekedést, fokozza a sejtek laterális expanzióját, megakadályozza a hipokotil és az epikotil kampó kiegyenesedését. Ezeket a hatásokat nevezte KNIGHT 1910-ben 'hármas válasznak'. GANE 1934-ben szolgáltatott elsőként bizonyítékot arra, hogy a növények etilént termelnek. Az etilén gyökeresedést serkentő hatását TORREY írta le 1976-ban. Ugyanekkor számolt be VERGARA (1976) a szupernövekedésű rizsről, azaz arról, hogy az etilén a vízinövényeknél, a szárazföldikkel ellentétben nem gátolja, hanem serkenti a megnyúlásos növekedést. Arra a tapasztalatra, hogy egy darab érett alma is képes megérlelni egy egész kosár almát YANG és HOFMANN (1984) adott magyarázatot, miszerint a klimaktérikus (utóérő) gyümölcsök érését etilén termelés kíséri. Mindezek mellett fontos szerepe van még az abszcisszió és a virágok hervadásának folyamataiban. Megtöri a rügyek nyugalmi állapotát, epinasztiát idéz elő, a szex jelleget a nőivarúság felé tolja (*Cucurbitaceae*), serkenti a virágkezdemények kialakulását (*Bromeliaceae*), a terméskötést, a termés növekedését és érését, késlelteti a virágzást, serkenti a

gumófejlődést, indukálja a celluláz *de novo* szintézisét, gyorsítja az α-amiláz szekrécióját (GAÁL 1986, VAN DER STRAETEN et al. 1995, NAGY és KÖVES 2002). Etilén termelődik a biotikus és abiotikus stresszhatásokra (BOROCHOV et al. 1982, BOROCHOV és WOODSON 1989, KENDE 1993, YAKIMOVA és WOLTERING 1997, JOHNSON és ECKER 1998, SURPLUS et al. 1998, VAHALA et al. 1998, PELLINEN et al. 1999).

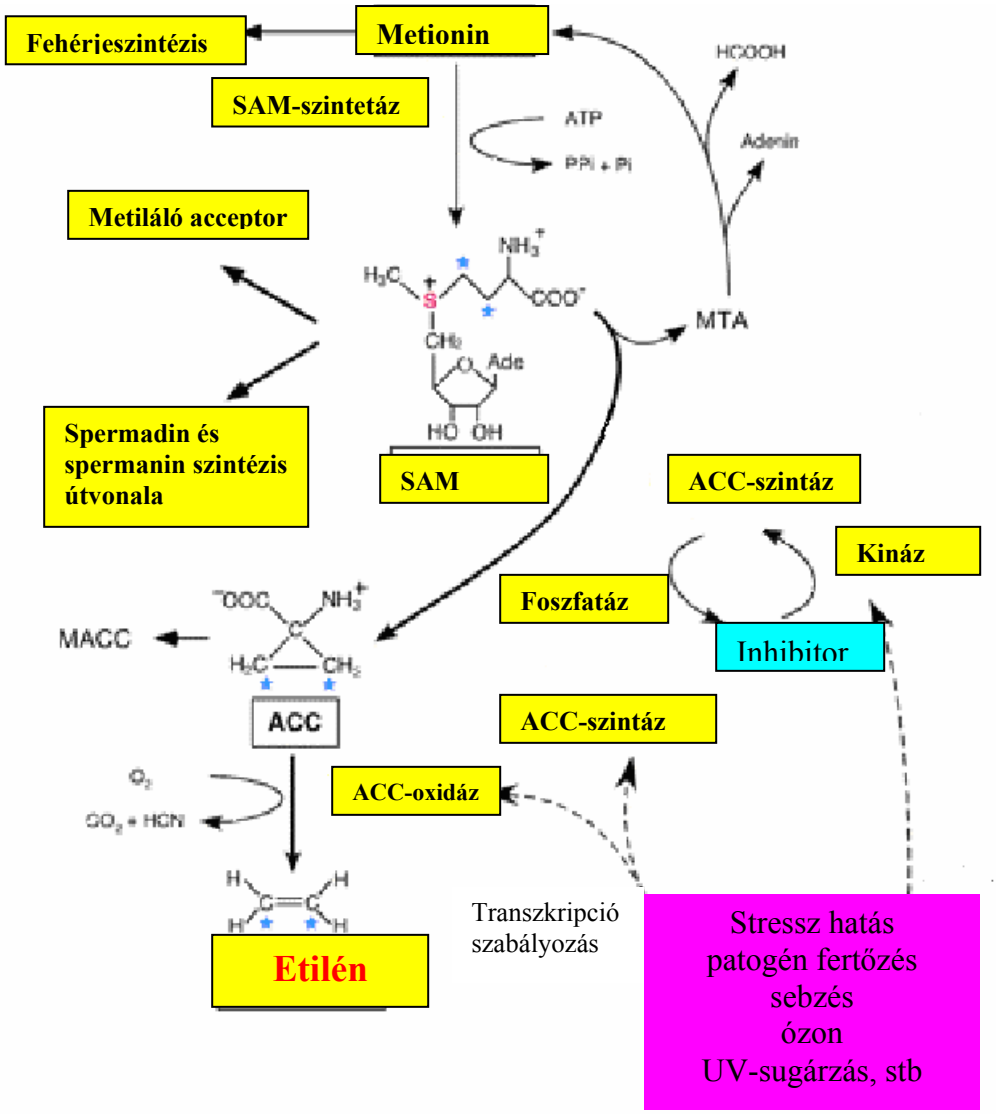
Az etilén termeléséért felelős géneket már nemcsak a növényekben, hanem állatokban és emberben is kimutatták annak ellenére, hogy funkciójuk ezekben a szervezetekben nem ismert. KRASKO és munkatársai (1999) egy szivacs fajnál (*Suberites domuncula*) figyelték meg, hogy az apoptózis csökkentésére etilén termelődött, miközben az intracelluláris kálcium koncentráció emelkedett. A gömbhalban (*Fugu rubripes*) és az emberben is azonosították az ACC-szintáz gént (KOCHA et al. 2001). Az emberi gén a *Pichia pastoris*-ban nem katalizálta az ACC szintézist.

2.2. AZ ETILÉN BIOSZINTÉZISE

Az etilénbioszintézis útjáról először 1979-ben jelent meg publikáció, amelyben ADAMS és YANG bebizonyította, hogy az 1-aminociklopropán-1-karboxilsav (ACC) az etilén prekurzora. A YANG és HOFFMAN (1984) nevéhez fűződő teljes bioszintetikus út leírását követően számos áttekintés jelent meg az etilénbioszintézisről (KENDE 1993, ZAREMBINSKI és THEOLOGIS 1994, FLUHR és MATTOO 1996, WANG et al. 2002).

Az etilén prekurzora többféle vegyület lehet (metionin, linolénsav, β-alanin, etanol, szaharóz, akrilsav, glükóz, ecetsav), de a leggyakoribb prekurzor a metionin. A metionin egy ATP segítségével S-adenozil-metioninná (SAM) alakul. A SAM nemcsak az etilénképzésben játszik szerepet, hanem prekurzora a spermidinnek, a poliaminokhoz tartozó növekedésszabályozónak is (Ravanel

et al. 1998), emellett a SAM a lipidek, fehérjék és nukleinsavak metilációs folyamataiban is szerepet játszik.



1. ábra: Az etilén bioszintézis útvonala (WANG et al. 2002).

A következő lépést az ACC-szintáz enzim katalizálja. A SAM-ból egyrészt ACC szintetizálódik, másrészt pedig a Yang-ciklust fenntartva 5'-

metiltioadenozin (MTA) is, amely vissza tud alakulni metioninná. Az ACC-t végül az ACC-oxidáz enzim alakítja etilénné. Az etilénképződésnél keletkező cianid detoxifikálásában a β-ciano-alanin szintáz vesz részt (1. ábra)
A bioszintézisben kulcsszerepet játszó ACC a citoplazmában szintetizálódik (KENDE 1993), és nagy része a vakuólumban különül el. Etilénszintézis megy végbe a citoplazmatikus membránon, a plazmalemmán és a mitokondrium belső membránján is.

Az etilénbioszintézis sebesség-meghatározó lépése a SAM→ACC átalakulás, amelyet az ACC-szintáz enzim katalizál.

2.3. ACC-SZINTÁZ MULTIGÉN CSALÁD

Először SATONAK és THEOLOGISNAK sikerült 1989-ben ACC-szintáz cDNS-t izolálniuk cukkiniből. Azóta számos gazdasági növény ACC-szintáz enzimét azonosították; almában (DONG et al. 1991, KISS et al. 1995, LAY-YEE és KNIGHTON 1995, ROSENFIELD et al. 1996), *Arabidopsis*-ban (LIANG et al. 1992), avokádóban (WANG et al. 2002), burgonyában (SCHLAGNHAUFER et al. 1995), cukkiniben (HUANG et al. 1991), mungó babban (BOTELLA et al. 1992/b, 1993, KIM et al. 1997), orchideában (BUI és O'NEILL 1998), rizsben (ZAREMBINSKI és THEOLOGIS 1993), paradicsomban (NAKATSUKA et al. 1997, BARRY et al. 2000, ALEXANDER és GRIERSON 2002) rózsában (WANG et al. 2004), sütőtökben (NAKAJIMA et al. 1990) és szegfűben (PARK et al. 1992; HAVE és WOLTERING 1997) is többféle ACC-szintázt jellemeztek. Az *Arabidopsis*-ban 13 féle ACC-szintázt azonosítottak (SCHALLER és KIEBER 2002), ahol az ACS3 pszeudogén, valószínűleg az ACS1 részleges duplikációja. Az ACS1 valószínűleg a többi ACS enzim szabályozója (WANG et al. 2002). A paradicsomból izolált 9-féle (ROTTMAN et al. 1991, OETIKER et al. 1997, NAKATSUKA et al. 1998) ACC-szintáz közötti hasonlóság 58-71%-os. A

szegfűből izolált DcACS3 gén szintén részleges hasonlóságot mutat a cukkini (61%), a sütőtök (61%), a paradicsom ACC-szintáz 1 (64%), és a paradicsom ACC-szintáz 2 (60%) génjével (PARK et al. 1992), valamint az avokádó pAVOe3 szintázzal 68 % (WANG és WOODSON 1991). A szegfű ACC-szintázok közötti hasonlóság a következő: DcACS1 és DcACS2 66%, DcACS1 és DcACS3 66%, DcACS2 és DcACS3 84% (JONES és WOODSON 1999/b). A szegfű ACC-szintázok DcACS1, DcACS2, DcACS3 hasonlósága 65%, 68%, és 66% az alma MdACS2 ACC-szintázhoz viszonyítva.

2.4. SZEGFŰ ACC-SZINTÁZ GÉNCSALÁD

A szegfűből először PARK és munkatársai izoláltak ACC-szintáz cDNS-t (PARK et al. 1992), melynek a CARACC3 (DcACS3) és CARAS1 (DcACS1) nevet adták. A DcACS3 a sziromlevélben, a DcACS1 pedig a bibeszálban expresszálódott, az ováriumban viszont mindkettő transzkripciós szintje alacsony maradt (HENSKENS et al. 1994).

JONES és WOODSON (1999/b) 24 órája kinyílt szegfűt kezeltek különböző etilén inhibitorral. A 24 órás CHX kezelés hatására egyik DcACS aktivitását sem tudták kimutatni a bibeszálban. 24 órás LiCl-os kezelésre és a megtermékenyítés hatására a DcACS2 és DcACS3 is expresszálódott, viszont a DcACS1 nem. 24 órás 2,4-D kezelésre csak a DcACS3 aktivitása volt kimutatható. A természetes öregedés során a 6 napja kinyílt virágokban mindhárom DcACS expresszálódott. Az ováriumban csak a DcACS3 aktiválódott a különböző típusú kezelésre. A magbugában csak a 24 órás 2,4-D kezelés hatására expresszálódott mindhárom gén, a többi kezelés egyik gén expresszióját sem idézte elő.

A sziromlevelekben a DcACS2 gén nem működött, a DcACS3 csak 2,4-D kezelés hatására, viszont a DcACS1 2,4-D, etilén, megtermékenyítés és természetes öregedés során is expresszálódott. A levélben csak a DcACS2 gén expreszálódott

LiCl kezelésre. CHX hatására egyik szövetben sem aktiválódott az ACC-szintáz, bár más növényfajokban igen (ZAREMBINSKI és THEOLOGIS 1994).

Az auxinról mint etilénbioszintézis serkentő hormonról számos publikáció jelent meg (BOTELLA et al. 1992/a, ZAREMBINSKI és THEOLOGIS 1993, KIM et al. 1997). A szegfű esetében a serkentés csak a DcACS3-ra igaz, a többi gén esetében a hatás szövetfüggő volt.

A Li^{+}ionról régóta ismert, hogy serkenti az etilénképződést. SATONAK és THEOLOGISNAK 1989-ben LiCl-os kezeléssel sikerült izolálniuk az első ACC-szintáz cDNS-t cukkiniből. Rizsben, paradicsomban és *Arabidopsis*-ban (JONES és WOODSON 1999/b) szintén sikeres volt a lítium kezelés. A szegfűben viszont az auxinhoz hasonlóan a Li^{+} hatása is szövetfüggőnek bizonyult.

A megtermékenyítést követően először a DcACS3 gén expresszálódik. Ez egybeesik az első etiléntermelési csúccsal. A második és harmadik etiléncsúcsnál viszont a másik két ACC-szintáz gén expressziója volt bizonyítható. Az ováriumban az etilénbioszintézise és az ACC-szintáz gén expressziója nem mutatott korrelációt, valószínűleg az ACC-oxidáz az, amelyik ebben a szövetben limitálta az etilén bioszintézisét (JONES és WOODSON 1999/a).

2.5. ANTISZENSZ RNS ÉS DNS

A DNS replikációt gátló antiszensz RNS felfedezése után (TOMIZAWA et al. 1981), IZANT és WEINTRAUB (1984) megállapították, hogy a transzkripció blokkolásával elvben bármely gén működése gátolható antiszensz RNS molekulákkal.

A növények voltak az első szervezetek, amelyeknél a génexpresszió antiszensz gátlásáról először számoltak be (ECKER és DAVIS 1986, VAN DER KROL et al. 1988,). Antiszensz *cat* (kloramfenikol-acetiltranszferáz) génnel transzformáltak (előzetesen már szensz *cat* génnel transzformált) sárgarépa

protoplasztokat, mely 95%-kal csökkentette a *cat* expresszióját. A riportergének expressziójának vizsgálatával szinte egyidőben kezdődtek meg a magasabbrendű növényekben az anyagcsereutak, a keményítő, az olaj, az antocián-flavonoid bioszintézis illetve az etilénbioszintézis módosítása antiszensz génnel történő transzformációval.

Az anyagcserefolyamatok és különböző bioszintézis utak megfelelő enzimjeinek azonosítása és génjeinek izolálása kiváló lehetőséget teremt e folyamatok egyes lépéseinek antiszensz génnel történő gátlására (BLOKLAND et al. 1993). Ebbe a körbe tartozik az etiléntermelés is (KENDE 1989), amelynek csökkentése a gyümölcsérést is szabályozza (GRAY et al. 1992).

Az anyagcserefolyamatok antiszensz génekkel történő transzformációjára a növényvilágban a petúnia virágszínének módosítása, a csalkon-szintáz enzim működésének blokkolása volt az első példa (VAN DER KROL et al. 1988). Az antocián és flavonoid bioszintézisben kulcsszerepet játszó csalkon-szintáz (CHS) gén antiszensz gátlásának következménye, a virágok pigmentszintézisének csökkenése vagy hiánya, könnyen megfigyelhető volt. A transzformáció azonban nemcsak teljesen fehér, hanem különböző átmeneti pigmentáltságú virágokat is eredményezett. Ez egyrészt annak volt tulajdonítható, hogy a gátlás nem volt 100%-os, másrészt pedig, mint az később igazolódott, a virágszín kialakulására más folyamatok is − például a gibberellinsav-szintézis − hatással lehetnek (BLOKLAND et al. 1993).

A gyümölcsérés antiszensz gátlásának tanulmányozására a paradicsom a modellnövény. Az első piacra került GMO növény is egy paradicsomfajta volt (DUDITS és HESZKY 1990), a „Flavr Savr”, amelyben a poligalakturonáz (PG) enzim működését gátolták (SMITH et al. 1988). Ezzel nem sikerült a fajtában a kívánt mértékben csökkenteni a bogyók puhulását, viszont a „Flavr Savr” fertőzésekkel és sérülésekkel szemben ellenállónak bizonyult (SCHUCH et al. 1991). A másik − még jelenleg is a piacon lévő − transzgénikus fajta, a sejtfal pektin alkotórészének lebontásában résztvevő másik enzim, a pektinészteráz (PE)

antiszensz gátlásával előállított paradicsom (HALL et al. 1993). A puhulás gátlását ezzel a génnel sem sikerült elérniük, de a paradicsomból készült pürének ipari szempontból jobb a konzisztenciája, így a kereskedelemben is versenyképes. A puhulás gátlását végül antiszensz pTOM13 transzformációval sikerült elérni (HAMILTON et al. 1990), amely az ACO cDNS-t tartalmazta. Az etilén szintézis gátlását paradicsomban az antiszensz ACS enzim transzformációval sikerült elérni (OELLER et al. 1991), amely szintén a piacra került „Endless Summer" néven (DNA Plant Technology Inc.) került piacra.

Kiterjedt vizsgálatokat folytattak arra vonatkozólag is, hogy a különböző fajokból izolált azonos funkciójú ún. heterológ gének képesek-e a különböző növényfajokban antiszensz gátlást előidézni (BLOKLAND et al. 1993). A petúniában a *chs* (csalkon-szintáz) gének 8-12 génből álló családot alkotnak, amelyek közül a *chs*A és a *chs*J a sziromlevelekben nyilvánul meg (BLOKLAND et al. 1993). A *chs*A és a *chs*J a nukleotid összetételét tekintve 85%-ban hasonló. Antiszensz *chs*A génnel történő transzformáció mindkettő működését gátolta, sőt más fajokban, dohányban és burgonyában is blokkolta a csalkon-szintáz expresszióját (MOL et al. 1990). Az antiszensz technika alkalmazásával a szénhidrát anyagcserét is módosították. Burgonyából származó, a keményítő összetételét meghatározó GBSS (Granule Bound Starch Synthase) enzim génje 60%-os hasonlóság mellett kukoricában is képes volt a gátlás előidézésére (VISSER et al. 1991, BLOKLAND et al. 1993). A génexpresszió gátlásához nem volt szükség a teljes hosszúságú cDNS alkalmazására, a *chs* gén esetében 157 bp hosszúságú DNS fragmentum is elegendőnek bizonyult.

Az antiszensz technikát napjainkban is alkalmazzák a dísznövénynemesítésben, új fajták előállítására, és funkcionális genomikai célból. Ilyen javított tulajdonságú (rezisztens és különleges színű) fajták a BYMW virusköpeny fehérje antiszensz génnel transzformált kardvirág (KAMO et al. 2005), szürkepenész ellen rezisztens krizantém (TAKATSU et al. 1999), gombabetegségeknek ellenálló rózsa (DOHM et al. 2005) vagy a kék rózsa és

szegfű (FLORIGENE 1995, 2000). Funkcionális genomikai célokból állítottak elő transzgénikus gerberát (UIMARI et al. 2004), és tulipánt (WEGRZYNOWICZ-LESIAK et al. 2005).

2.6. RNS INTERFERENCIA

A gének kifejeződésében számos szabályozó mechanizmus létezik. A metiláció során DNS szintű változás következik be, a promóterek metileződnek, ennek következtében az átírás gátlódik. A génelcsendesítés során az mRNS kerül gátlás alá, amely folyamatot PTGS-nek (Posttranscriptional Gene Silencingnek) nevezzük, mivel az inaktiválás a transzkripciót követően történik meg. Az antiszensz RNS expresszió volt az első olyan módszer, amellyel PTGS-t lehett indukálni a növényben (BOURQUE 1995).

A PTGS egyik esetében egy speciális, ún. siRNS (kis interferáló RNS) képződik, amely a bázisok sorrendjét tekintve tükörképe a gátolni kívánt mRNS egy szakaszának. Az siRNS megtalálja a hozzá illő mRNS-t, "összetapad" vele és a dsRNS-re specifikus enzimek elbontják a kétszálas RNS-t. Ezt követően mRNS-ről már nem készülhet fehérje. Ezt a fajta gátlást RNS-interferenciának (RNSi) nevezik. Amennyiben az siRNS nem találja meg a tükörképét, gyorsan lebomlik a sejtben, ezért nem szaporodik föl nagy mennyiségben.

Az antiszensz konstrukciókkal transzformált növényekben a gátolni kívánt génről működik a transzkripció, csak a megjelenő antiszensz transzkriptum az mRNS-el kétszálas RNS-t képez, amely elsősorban indukálja a gén elcsendesítést. Az antiszensz gátlás esetében kétszálas siRNS molekulák jelenlétét mutatták ki (BAULCOMBE 1996, HAMILTON és BAULCOMBE 1999).

Az RNS interferencia jelenségét először COGINI és munkatársai (1996) mutatták be *Neurospora*-n. Az RNS speciális szerepét a géncsendesítésben elsőként a fonalféreg, a *Caenorhabditis elegans* esetében figyelték meg 1995-ben,

amelynek (*par*-1) génjét akarták elcsendesíteni, és ennek érdekében megfelelő szensz, illetve antiszensz RNS-molekulákat juttattak be a féregbe. Mindkét esetben génelcsendesítést tapasztaltak (GUO és KEMPHEUS 1995). Később megfigyelték azt is, hogy ha együtt juttatták be az azonos és a komplementer szekvenciákat még erősebb lett a gén elcsendesítése.

A génelcsendesítés pontos folyamata még nem ismert, de muslicán végzett kísérletek szolgáltattak olyan az eredményeket, amelyek napjaink ismereteit adják. A kísérletek során a muslicák embrióiból homogenizátumot készítettek, melyben az embrióban található összes enzim és fehérje megtalálható. Amennyiben ehhez a keverékhez hosszú, dupla szálú RNS-eket (dsRNS) adtak, akkor azok 21-23 bázispár hosszúságú fragmentumokra darabolódott szét. Az így keletkezett darabkákat nevezték el siRNS-eknek (kis interferáló RNS). Ezek szükségesek ahhoz, hogy a fehérjét kódoló RNS-t fel tudják darabolni a sejt (a kísérlet esetében az embrió-homogenizátum) enzimei.

Az siRNS-ek képződéséért egy Dicer nevű enzim a felelős, amely dupla szálú RNS hasítására képes. Miután a Dicer elvégezte a feladatát, a dupla szálú siRNS-ek beépülnek az ún. RISC-komplexbe, ez az siRNS által indukált elcsendesítő komplex. A komplexben található enzimek egyszálúvá alakítják át az siRNS-t. Ezután ez az egyszálú siRNS irányítja a komplexet a vele homológ részeket tartalmazó mRNS-ekhez, amelyeket a komplex enzimei feldarabolnak. Ily módon az embrióhomogenizátumben lévő, a muslicaembrióból származó mRNS-ek pontosan a velük homológ siRNS-eknek megfelelő darabokra vágódnak szét.

Feltételezik azt is, hogy egy ma még nem ismert mechanizmuson keresztül az siRNS-ek felszaporodnak, ez megmagyarázná a rendszer rendkívüli hatékonyságát, és azt is, hogy akár az utódokban (első generációban) is aktív maradhat. Lehetséges, hogy a dupla szálú RNS-ek sokszorozódnak meg, és ezért képződik rengeteg siRNS; a másik elképzelhető magyarázat, hogy maga az siRNS amplifikálódik, azaz szaporodik föl. Az sem kizárt, hogy a RISC-komplex képes megújulásra.

A poszttranszkripciós génelcsendesítés valószínűleg nagyon korán megjelent az evolúció során. Egyesek szerint (WATERHOUSE et al. 2001) bizonyos vírusok és transzpozonok elleni védekezésben lehetett és lehet fontos szerepe. Hibás RNS-ek lebontásában és a sejtből való eltávolításában is szerepet játszhat. Bizonyították, hogy az RNS-interferenciában szerepet játszó gének meghibásodása fejlődési rendellenességet okoz.

Több mint egy évtizeddel ezelőtt az arizonai egyetem kutatói, Jorgensen és munkatársai (NAPOLI et al. 1990) az RNS-interferencia jelenségét petúnián figyelte meg. A növénynemesítők célja az volt, hogy sötétebb színű virágot állítsanak elő, ennek érdekében a genomba a lila színért felelős csalkon-szintáz gén mellé még egy ugyanilyen gént vittek be. Meglepetésükre az egyöntetűen lila sziromlevelek mellett lila-fehér mozaikos, sőt fehér virágok is megjelentek. Erre azt a magyarázatot adták, hogy a bevitt *chs* gén elnyomta az endogén gén hatását, és a jelenséget koszupressziónak nevezték el.

Az RNS-interferencia alapján 2004 szeptemberében Larkin és munkatársai olyan mákfajtát állítottak elő, mely nem termel kodeint vagy morfint, viszont olyan alkaloidákat hoz létre, melyeket potenciális fájdalomcsillapítóként lehet alkalmazni (MILLGATE et al. 2004).

Szója növényben 95%-ban csendesítették el az izoflavin szintéziséért felelős IFS gént RNSi konstrukciót tartalmazó *Agrobacterium rhizogenes* közvetítette transzformációval (SUBRAMANIAN et al. 2005).

2.7. ETILÉNBIOSZINTÉZISÉBEN MÓDOSÍTOTT TRANSZGÉNIKUS NÖVÉNYEK

Az etilénbioszintézis módosítását géntechnológiai módszerrel már számos növényfajnál végrehajtották (1. táblázat).

1. **táblázat:** Különböző növények etilénbioszintézisének módosítása transzgénikus technikával

Transzgénikus növény	**Gén és promóter**	**Eredmények**	**Irodalom**
Paradicsom	Paradicsom ACC oxidáz szensz orientációban	87%-ban csökkent etiléntermelés az érő gyümölcsben, 68%-ban csökkent etiléntermelés az öregedő levelekben.	HAMILTON et al. 1990
	ACC deamináz a *P. chlorapis*-ból CaMV 35S promóter	Fenotípus változás nincs, az etiléntermelés csúcsa 3 nappal eltolódott, 90%-ban csökkent az etiléntermelés.	KLEE et al. 1991
	SAM hidroláz bacterofág T3-ból paradicsomból származó érés specifikus E8 promóter	A magas SAM hidroláz koncentráció törpe fenotípust eredményezett.	GOOD et al. 1994
	ACC deamináz a *P. chlorapis*-ból CaMV 35S a 8838 és 5673 vonalakban	Zöld és naranscsárga érési stádiumban maradtak a gyümölcsök. A 8838-as vonalban a piros érési stádiumú gyümölcsök 77-97%-ban csökkentek, míg a 5673-as vonalban 50-90%-ban. A piros érési stádium eléréséhez 2,2-szer hosszabb idő kellett.	REED et al. 1995

	Gén és promóter	**Eredmények**	**Irodalom**
Paradicsom	*E. cloacea* UW4 ACC deamináz CaMV 35S vagy *rol*D, illetve PRB-1b promóter	Fokozottt fém akkumuláció, amely a gyökérben és a hajtásban halmozódott fel.	GRICHKO et al. 2000
	E. cloacea UW4 ACC deamináz CaMV 35 S vagy *rolD*, illetve *PRB-1b* promóter	70%-ban csökkent etiléntermelés, *rol*D promóter esetében túlöntözés elleni rezisztencia.	GRICHKO és GLICK 2001
	E. cloacea UW4 ACC deamináz CaMV 35S vagy *rol*D, illetve *PRB-1b* promóter	*Rol*D és *PRB-1b* promóter esetében gombás betegségek tüneteinek csökkenése, de a fogékonyság nem változott. A CaMV 35S esetében a fertőzési tünetek azonosak voltak a kontroll növénnyel.	ROBINSON et al. 2001 a,b
Szegfű	Antiszensz szegfű ACC-oxidáz MAC promóter	90%-ban csökkent etiléntermelés, 3 nappal hosszabb vázaélettartam.	SAVIN et al. 1995
	Antiszensz szegfű ACC-szintáz	Csökkent etiléntermelés, 12 nappal hosszabb vázaélettartam.	FLORIGENE (1995)
	Antiszensz alma ACC-szintáz CaMV 35S promóter	Levélből kiinduló hajtásregenerációs képesség növekedése.	KISS et al. 2000
	Antiszensz alma ACC-szintáz CaMV 35S promóter	20-55%-ban csökkent etiléntermelés, 6 nappal hosszabb vázaélettartam, szilárdabb, szár.	VERES et al. 2002, 2004

	Eredmények	**Irodalom**	**Gén és promóter**
szegfű	Szensz és antiszensz szegfű ACC-szintáz CaMV 35S promóter	Csökkent etiléntermelés, csökkent hajtásregenerációs képesség a transzformációt követően.	IWAZAKI et al. 2004
Sárgadinnye	Antiszensz MEL1 (sárgadinnyeACC oxidáz) CaMV 35S promóter	99%-ban csökkent etiléntermelés az érő gyümölcsben, 68%-ban csökkent etiléntermelés az öregedő levelekben.	AUYB et al. 1996
	Antiszensz sárgadinnye ACC-oxidáz (promóter nem publiált)	A gyümölcs héjának klorofil és karotin tartalma csökkent, a héj cukor és savtartalma megnőtt.	FLORES et al. 2001
	Alma antiszensz ACC-oxidáz	30%-al csökkent etiléntermelés.	ROMBALDI et al. 2002
	Antiszensz ACC oxidase és CP4 syn (glifozát tolerancia) gén (promóter nem publikált)	A transzgénikus növények levelei több etilént termeltek, mint a kontroll, de a gyümölcsnél ezt fordítva tapasztalták.	NUÑEZ-PALENIUS et al. 2004
Burgonya	Antiszensz SAM dekarboxiláz CaMV 35S és tet promóter	Törpe fenotípus, rövid internóduszok, sok elágazás, gyenge gyökérzet.	KUMAR et al. 1996
Brokkoli	Paradicsom antiszensz ACC-oxidáz	91%-al csökkent etilén termelés.	HENZI et al. 1999

Transzgénikus növény	**Gén és promóter**	**Eredmények**	**Irodalom**
Dohány	Antiszensz és szensz dohány ACC szintáz, és szensz és antiszensz cEFE26 (patogén indukálta ACC oxidáz) CaMV 35S promóter	30-70%-al csökkent etilén termelés	KNOESTER et al. 1997
	Szensz ACC oxidáz CaMV 35 S promóter és antiszensz 690 bp hosszú 3'fragmentum petúnia bibe specifikus S3 promóter	Kicsi virágok és a maghozó képesség hiánya.	DE MARTINIS és MARIANI 1999
dohány	*P. syringae* pv. *Phaseolicola* PK2 ACC oxidáz és GUS NtADH promóter	Csak a gyökérben jelentkező csökkent etiléntermelés, törpe fenotípus.	ARAKI et al. 2001
Brokkoli	Paradicsom antiszensz ACC-oxidáz	91%-al csökkent etilén termelés.	HENZI et al. 1999
Repce	*E. cloacea* UW4 ACC deamináz kettős CaMV 35S promóter	40%-al megnövekedett csírázás, megduplázódott biomassza mennyiség.	NIE et al. 2002

Transzgénikus növény	Gén és promóter	Eredmények	Irodalom
Alma	Szensz és antiszens alma ACC szintáz CaMBV 35S promóter	99%-al csökkent etilén termelés, csökkent gyümölcsméret, de koncentrált beltartalmi értékek a legkevesebb etilént termelő vonalakban.	GALLI et al. 2003
	Alma antiszensz ACS1, ACS2, ACO	95%-ban csökkentett etiléntermelés, a transzgénikus gyümölcsök aroma összetétele (észterek) negváltozott.	DEFILIPPI et al. 2005
Körte	Szensz és antiszensz körte ACC-oxidáz (LF-ACO1)	Csökkent ACC szint a transzgénikus hajtásokban.	MURAYAMA et al. 2003

2.8. A GÉNTECHNOLÓGIA ALKALMAZÁSA A LÁGYSZÁRÚ DÍSZNÖVÉNYEK ÉRTÉKMÉRŐ TULAJDONSÁGAINAK JAVÍTÁSÁRA

A szegfű vilárgszerte igen népszerű vágott virág. Világviszonylatban a harmadik legkedveltebb (10 milliárd szálat adnak el évente). Hazánkban 1998-ban kb. 180 ha-on termesztettek vágott virágot, ebből 72 ha-on szegfűt. 2003-ban a virágtermesztés területe 220-240 ha volt, ebből 60-65 ha-t foglalt el a szegfű (SZTOLÁR 2004).

A szegfű szaporítása meriklónos módszerrel történik. Számos vírusa ismert, amelyek a termés biztonságát veszélyeztetik, ráadásul a szegfű szaporítása során hiányzik a víruseliminálló mag életciklus. A szegfű mikroszaporításának technológiájának korai, 1957-73 közötti kidolgozását a következő tulajdonságok tették lehetővé: merisztémája jól preparálható, hajtása gyors növekedésű, járulékos gyökérfejlődésre hajlamos, ezért kiváló modellnövény a merisztématenyésztéses

vírusmentesítés és mikroszaporítás tanulmányozására (MARÓTI 1976, JÁMBORNÉ 1993, 2005).

A szegfű termesztésénél 15%-os veszteséggel lehet számolni, amiből nagy hányadot a tárolási veszteség tesz ki. Tárolási veszteséget okoz a bimbók idő előtti kinyílása, amit a tároló helyiségben feldúsuló etilén gáz is előidézhet. A szegfű tipikusan etilénérzékeny növény, ezért az etilén mennyiségének csökkentése a virágok környezetében mérsékli a tárolási veszteséget.

A vágott virágok nemesítői elsősorban a sziromlevelek színváltozataira, a virágok szerkezetére és a vázaélethossz növelésére koncentráltak. A szegfű tradicionálisan illatos virág, amelyet az eugenol nevű vegyület határoz meg (PRIEL 1999). A régi, köztermesztésben lévő fajták illatanyagainak 85%-át eugenol alkotja. Ugyanakkor a modern fajták eugenol tartalma nagyon kicsi, ezért nincs illatuk (CLERY et al. 1999). A vázaélettartam növelését célzó nemesítés e fontos illatkomponens mennyiségének csökkenését vonta maga után, mert az illat és a vázaélettartam között negatív korreláció van. Ezt a megállapítást támasztja alá az, hogy a virágokban az illatanyag összetételében, így az eugenol tartalom meghatározásában szerepet játszik a jázminsav és a metil-jázmonát, amelyek indukálják a virágok öregedési folyamatait (PORAT et al. 1995).

A géntechnológia újabb nemesítési utakat nyitott meg a dísznövénytermesztésben is. Olyan egygénes módosításokat tett lehetővé, amelyekkel a virágok értékmérő és esztétilai tulajdonságait célzottan javították. A vázaélettartam növelése céljából transzformálták a szegfűt ACC-oxidáz és szintáz antiszensz és szensz génnel (SAVIN et al. 1995, IWAZAKI et al. 2004, FLORIGENE 1995). Különleges színváltozatokat állítottak elő antiszensz csalkon-szintázzal transzformált petúnia (NAPOLI et al. 1990, BLOKLAND et al. 1993), gerbera (ELOMAA et al. 1993), és a rózsa (DOHM et al. 2005) esetében. Egyéb értékmérő tulajdonságokat javítottak tulipánnál (WILMINK et al. 1995), muskátlinál (U.S. Pat. No. 5.824.875), krizantémnál (DOLGOV és MITIOUCHKINA 1995, DOLGOV et al. 1997, TAKATSU et al. 1999,

MITIOUCHKINA és IVANOVA 2000, CUI et al. 2003), liliomnál (HOSHI et al. 2004, BYUNGJOON et al. 2004), és kardvirágnál (KAMO et al. 2001, 2005) transzgén technikával.

2.9. A VÁZAÉLETTARTAM MEGHOSSZABBÍTÁSÁNAK MÓDSZEREI

A vágott virágok legfontosabb értékmérő tulajdonsága a vázában való eltarthatóság idejének hossza (vázaélettartam), amelynek javítására számos módszert dolgoztak ki. A háziasszonyok kedvelt gyakorlata a cukros vízben tartás, de a kereskedők is alkalmaznak különböző kezeléseket. Ezek közé tartozik az alacsony, -0,5 - 0°C közötti hőmérsékleten és 90-120 Pa nyomáson való tárolás, a vágást követő meleg vízfürdőben áztatás, vagy kémiai szereket adagolása. PARKER és SMITH már 1966-ban megfigyelte, hogy a széndioxid késlelteti az öregedést, azóta is számos tanulmány jelent meg a témával kapcsolatban (BUESCHER 1979, CHAVES és TOMAS 1984, GORNY és KADER 1994, MATHOOKO 1996). Az ezüst tioszulfátos kezelés megelőzi az etilén felhalmozódást (VEEN 1979, REID et al. 1980), és így lassítja a hervadást. A nehézfémionok közül a kobalt és a nikkel képes megakadályozni az ACC ⇒ etilén átalakulást. Az ezüst ion, a széndioxid és kálium-permanganát megkötik az etilén receptorokat, vagy gátolják az etilén reakciót. Az 1-metilciklopropén (1-MCP) és a 3,3-dimetil ciklopropén (3,3-DMCP) az etilén receptorokhoz kapcsolódva gátolják a jelátviteli mechanizmust (SISLER et al. 1996, ICHIMURA et al. 2002). Az aminoetoxivinilglicin (AVG) és az amino-oxálecetsav (AOA) (FUJINO et al. 1980), az ACC-szintáz enzim működését gátolja, és így blokkolja a SAM ⇒ ACC átalakulást (BEYER 1976). A cikloheximid (CHX) fehérjeszintézis gátló kezeléssel szintén csökkenthető a termelt etilén mennyisége (LIANG et al. 1996).

2. táblázat: Az etilén mennyiségének és hatásának csökkentésére irányuló módszerek szegfűnél, és ezek hatékonysága a vázaélettartamra számított relatív értékek alapján

Az etilénmennyiség csökkentésének módszere	**Relatív érték**		**Hivatkozás**
	22°C	**4°C**	
Transzformáció szegfű antiszensz ACC-oxidáz génnel	**3-4**		SAVIN et al. 1995
Transzformáció szegfű antiszensz ACC-szintáz génnel		**12**	Florigene Pty Ltd 1995
Aminooxál ecetsav		**3,3**	BOVY et al. 1999
Ezüst tioszulfát		**7,2**	BOVY et al. 1999
Transzformáció Arabidopsis *etr 1-1* alléllal		**16**	BOVY et al. 1999
Keresztezés és szelekció		**13**	ONAZAKI et al. 2001
1-MCP	**5**		HASSAN és GERZSON 2002
Transzformáció szegfű ACC szintáz szensz és antiszensz génnel	**5-7**		IWAZAKI et al. 2004
Transzformáció alma antiszensz ACC-szintáz génnel	**6**		VERES et al. 2005

A kezelések hatására bekövetkező vázaélettartam változás irodalmi adatai nem voltak összevethetők, mert egyes esetekben azt adták meg, hogy hány nappal virágzott hosszabb ideig a vizsgált virág, más esetekben pedig, azt, hogy a kontroll és a kezelt növény mennyi ideig virágzott. Ezért bevezettük a relatív értéket, amit a

kontroll és a kezelt virág virágzása közötti nap különbözete ad meg. Ezen relatív érték alapján szegfű virágoknál AOA kezeléssel 3 nappal (BOVY et al. 1999), 1-MCP hatására 5 nappal (HASSAN és GERZSON 2002), ezüst-tioszulfát kezelésre 7 nappal növekedett a vázaélettartam (BOVY et al. 1999).

A kémiai anyagok használata terheli a környezetet, ezért más módszerek alkalmazása célszerű. ONAZAKI és munkatársai (2001) keresztezésen alapuló hagyományos nemesítési módszerekkel 13 nappal megnövekedett vázaélettartamú növényeket szelektáltak.

Környezetkímélő módszernek tekinthető a géntechnológiai megközelítés. Az antiszensz ACC-oxidáz gén (SAVIN et al. 1995, CHANDLER és CORNISH 1995) 3-4 nappal, *etr1-1* gén (BOVY és munkatársai 1999) 14 nappal, az antiszensz DcACS1 gén (FLORIGENE) 12 nappal hosszabb vázaélettartamú szegfűt eredményezett. IWAZAKI és munkatársai szensz és antiszensz szegfű ACC szintáz génnel transzformáltak szegfű növényeket, melynek eredményeként 5-7 nappal hosszabb vázaéletet tapasztaltak (IWAZAKI et al. 2004) (2. táblázat).

2.10. A VIRÁGOK ÖREGEDÉSÉLETTANA

A *Dianthus caryophyllus* fajt hosszú évek óta használják modellnövényként a virágok öregedés élettanának tanulmányozására (COOK és VAN STADEN 1988; REID és WU 1992). A szegfű sziromlevelének öregedése aktív folyamat, amely sok biokémiai és élettani változást foglal magába. A folyamatokat az etilén szabályozza. A sziromlevelek jellegzetes bepöndörödést mutatnak az öregedés során, ezt a bepöndörödést késleltetni lehet, vagy meg lehet előzni, ha molekuláris módszerekkel gátoljuk az etilénszintézis prekurzorának (ACC) átalakulását etilénné (SAVIN et al. 1995).

A legtöbb növényfajnál az etilén gyorsítja a virág és a virágzat öregedését. Az öregedés két folyamatot jelent. Az egyik az abszcisszió, amikor nem következik be

hervadás, hanem a még duzzadt növényi részeket a növény ledobja a megtermékenyítést követően. A másik folyamat a hervadás, amikor passzív vízvesztés következik be, ezáltal elhervadnak a virágok. A dísznövények öregedés kutatásában fontos, hogy melyik növény tartozik az abszcissziót, és melyik a hervadási tendenciát mutató csoportba. Az abszcisszióra hajlamos fajok (szarkaláb, szellőrózsa, begónia, egyes rózsa típusok), sokkal kevésbé etilén érzékenyek, mint amelyek hervadnak. Az etilén inhibitorok, mint az STS gátolják az etilén indukálta párta abszcissziót (WOLTERING 1987, WOLTERING és VAN DOOR 1988). Az endogén szabályozza az öregedést azokban a növényekben (petúnia, gyűszűvirág, muskátli, szegfű, alma és cseresznye), amelyek virágfejlődéskor vagy a megtermékenyítést követően fokozódó etilén termelést mutatnak (WHITEHEAD et al. 1984, EVENSEN 1991).

A meg nem termékenyített virágszerkezetek esetében nincs egyértelmű korreláció az etiléntermelődés és az abszcisszió között. Magról szaporított muskátli (P. x *hortorium)* esetében csak alacsony szintű etilén termelést mértek a sziromlevelek hervadása során, ezzel ellentétben a (P. x *domesticum*)-nál fokozott etiléntermelést tapasztaltak (BROWN 1997). A megtermékenyítetlen ciklámen virágok nem érzékenyek az etilénre, és végül vizet veszítve elhervadnak, ugyanakkor a megtermékenyült virágok etilén érzékenyek, ezért abszcisszióval válik le a még duzzadt párta (HALEVY et. al 1984).

A levelekhez és a gyümölcsökhöz hasonlóan a virágpártában az abszcissziós zónát olyan sejtek alkotják, amelyek kicsik, citoplazmatikusak és hosszanti irányban megnyúltak. A szabályozás mégis eltér ezekben a szövetekben. A levelek és gyümölcsök abszcissziója 12-48 órán át is tarthat. Míg a paradicsom gyümölcsé 4, (ROBERTS et al. 1984), addig a pártáé 1-2, a muskátli virágé pedig, 1 óra (EVENSEN et al. 1993).

2.11. GÉNEXPRESSZIÓ AZ ÖREGEDŐ SZEGFŰ VIRÁGOKBAN

Az etilén az elsődleges növényi hormon, amiely a vágott szegfűvirágok öregedését okozza (REID és WU 1992). Nagy mennyiségű etilén termelődik pár nappal a teljes virágzást követően (MANNING 1986), pár órával a megtermékenyítés után (HAVE és WOLTERING 1997, JONES és WOODSON 1997, 1999/b), és azonnal külső etilén kezelés hatására (BOROCHOV ÉS WOODSON 1989).

A megtermékenyítés által kiváltott öregedési folyamat rendkívül összetett. Azt már tisztázták, hogy a termékenyítést követően jelmolekula koordinálja az etilén termelődését, ami a bibéből szállítódik át az ováriumba és a sziromlevelekbe. Az ACC és etilénszint növekedése a következő sorrendben megy végbe a megtermékenyítést követően: először a bibeszálban, majd az ováriumban és végül a sziromlevelekben. Az etilén mennyisége és az ACC szint kezdetben a bibeszáj területén, de 24 órával a megtermékenyítés után az alapi részen lesz a legnagyobb. Az ACC-szintáz mennyisége korrelációban van az etilén termeléssel a bibében és a sziromlevelekben, de érdekes módon ez nem mutatható ki az ováriumban, ahol felhalmozódik az ACC, így magas a szintje. ACC-szintáz hiánya a megtermékenyített ováriumban, magas ACC szinttel párosulva azt mutatja, hogy az ACC a gynoeciumon keresztül a sziromlevelekbe transzlokálódott és ott alakult át az etilénné.

A bibe fontos szerepet játszik a jelátviteli rendszerben (HAVE és WOLTERING 1997, JONES és WOODSON 1997, 1999/a). A megtermékenyítést követően vizsgálták az ACC-szintáz és ACC-oxidáz gén expresszióját. Etilén termelésekor mind az ACC-szintáz mind az ACC-oxidáz expresszálódott. Génspecifikus próbával kimutatták, hogy a megtermékenyített bibeszálban először az ACS3 aktivitását lehetett detektálni és a közvetlen 1-MCP kezelés nem gátolta az aktivitást.

Az öregedés alatt az ACC mennyisége és az etilén szintje a termőtájban előbb kezd növekedni, mint a sziromlevélben. HAVE és WOLTERING (1997) mutatott rá arra, hogyha a sziromleveleket még az etilén termelés beindulása előtt eltávolítjuk, akkor az eltávolított sziromlevél élete meghosszabbodik. Ennek ellenére jelentek meg olyan publikációk, amelyek szerint a termőtáj eltávolítása nem előzte meg a sziromlevelek öregedését a vízben tartott vágott virágoknál (WOODSON és BRANDT 1991), és a vázaélettartam azonos volt azokban a növényekben, mint amelyekből nem távolították el. Ezt az ellentmondást KOSUGI és OHASI (2000) oldották fel. A termőtáj eltávolítása után egyes virágoknál hosszabb, másoknál rövidebb vázaéletet tapasztaltak. Azoknál a virágoknál, amelyekből csipesszel távolították el a termőtájat, az ovárium és a magbuga illeszkedésénél, a vázaélet hosszában nem tapasztaltak különbséget. Azoknál a virágoknál azonban, ahol kézzel távolították el a termőtájat az egész ovárium szövettel együtt, 10 nappal hosszabb vázaéletet kaptak a kontrollhoz képest. A 10 nap eltelte után a sziromlevelek beköndörödés nélkül megbarnultak és elszáradtak. A kezelt virágok alig érték el a 14%-os tömegcsökkenést, míg a kontrollnál ez 59% volt, tehát maga a természetes öregedési folyamat, a vízvesztéses hervadás a beköndörödött szirmokkal elmaradt. Sem etilén termelést, sem DcACS1 és DcACO1 aktivitást sem tudtak kimutatni. Az ABA, IAA és ACC kezelés hatására sem jelentkeztek az öregedés tünetei, annak ellenére, hogy ezek a hormonok stimulálják az etilén termelését (MAYAK és DILLEY 1976, RONEN és MAYAk 1981). Etilén kezelés hatására mind az ACC-szintáz, mind az ACC-oxidáz gén expresszálódott, és megindult az autokatalítikus etilén termelés (SHIBUYA et al. 2000).

A sziromlevél hervadása szoros összefüggést mutat a cisztein-proteináz (*CPase*) gén expressziójával. A *CPase* egyike azoknak az enzimeknek, amelyek a sejtösszetevők hidrolíziséért, ezáltal a sejt haláláért felelősek az öregedő sziromlevélben. A *CPase* gén működése, a természetes és a megtermékenyítéssel kiváltott vagy a külsőleg adagolt etilén indukálta sziromlevél öregedés alatt, végig

szabályozva van (JONES et al. 1995). Exogén etilén adagolás esetében a *CPase* transzkriptum felhalmozódik és bekövetkezik a hervadás. A proteináz aktivitás már a sziromlevelek teljes kinyílása előtt kimutatható, az etilén termelés megindulásakor minimálisan visszaesik, majd az etilén szint intenzív növekedését követve meredeken emelkedik. A DC-CPIn (*CPase* inhibitorgén) megakadályozza a DC-CP1 megnyilvánulását (KOSUGI et al. 2000). KOSUGI és munkatársai (2000) azt is bebizonyították, hogy az ACC-szintáz és ACC oxidáz expressziója máshol szabályozott, mint a *CPase*-é (KOSUGI et al. 2000). Teljes virágzásban a DC-CPIn mRNS a levélben és a hajtásban is kimutatható, de az mRNS szint jóval magasabb volt a sziromlevélben és a bibeszálban, mint a többi szövetben (SUGAWARA et al. 2002). Exogén etilén adagolás hatására a sziromlevél öregedése folyamán a DC-CPIn folyamatosan csökkent, míg a DC-CP1 a hervadás kezdetéig ugrásszerűn nőtt, majd kissé csökkent, ezután végig jóval magasabb szinten maradt, mint a DC-CPIn. Az ováriumban és a bibeszálban nem volt szignifikáns szintváltozás, sem a DC-CP1 sem a DC-CPIn esetében, ami arra utal, hogy a DC-CPIn-nek védő szerepe van a DC-CP1 káros hatásával szemben, az ovárium és a bibeszál szövetek épségét biztosítja az öregedés folyamata alatt. A *CPase* mellett lipáz enzim is részt vesz a sziromlevelek hervadásának folyamatában (HONG et al. 2000).

Etilénre nem érzékeny *Arabidopsis* mutánsokat vizsgálva azonosítottak olyan géneket, amelyeknek szintén szerepe van az öregedés és a hervadás szabályozásában (MÜLLER és STUMMAN 2003). Ezek a mutáns növények etilén kezelés hatására sem mutatták az egyébként jellemző „hármas választ”. Napjainkig vélhetőleg 5 etilén receptor géncsaládot azonosítottak az *Arabidopsis*-ban, amelyekhez két alcsalád tartozik. Az 1-es alcsalád tagja az ETR1 és ERS1, míg a 2-es alcsaládot az ETR2, EIN4, és ERS2 alkotja (CHANG et al. 1993). Számos molekulát azonosítottak melyek részt vesznek az etilénválasz szabályozásában. Ilyen molekula a CTR1, amely negatívan szabályozza az etilén-válasz útvonalat. Az EIN3 (Ethylene-Insensitive3) gén episztatikus az ETRI a CTR1 és az EIN2-vel

szemben. Az ETR1 és EIN3 mutánsok csökkent etilén-választ mutatnak (CHAO et al. 1997). Szegfűből is izoláltak egy EIN3 fehérjeszerű molekulát, amelyet DC-EIL1-nek neveztek el. Az aminosav szekvenciája 49, illetve 52%-os hasonlóságot mutatott az *Arabidopdis* EIN3-hoz és a dohány TEIL-hez (WAKI et al. 2001, IORDACHESCU és VERLINDEN 2005). A sziromlevelek öregedése közben, exogén etilén adagolás hatására vagy abszcizinsavas kezelésre, a sziromlevelekben csökken a DC-EIL1 transzkripciója. Ez ellentétes folyamat az *Arabidopsis* EIN3-nál (Chao et al. 1997) és a dohány TEIL-nél tapasztaltakhoz (KOSUGI és OHASI 2000) képest.

2.12. TRANSZGÉNIKUS SZEGFŰ ELŐÁLLÍTÁSA

A transzgénikus növények előállításának alapfeltétele hatékony regenerációs rendszer megléte. A szegfűre kidolgozott regenerációs rendszerek különböző explantumokon alapulnak. A kiindulási növényrész lehet hónaljrügy (MILLER et al. 1991), kallusz (ENGVILD 1972, PETRU és LANDA 1974, EARLE és LANGHANS 1975, KALLAK et al. 1997), levél (VAN ALTVORST et al. 1992, 1994, 1995, MESSEGUER et al. 1993, NONTASWATSRI et al. 2002), merisztéma (SHABDE ÉS MURASHIGE 1977), nódusz (NONTASWATSRI et al. 2002, 2004), szár (LU et al. 1991, NUGENT et al. 1991, ZUKER et al. 1995, 1997, 1999), és sziromlevél (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).

Transzgénikus szegfű előállítása céljából nóduszokból kindulva ’Improved White Sim’ fajta esetében ZUKER et al. (1995) 83-86%-os hajtásregenerációs eredményt kapott. *Agrobacterium*-os transzformációt követően sziromlevélből 2-79%, internóduszból 8-64%, levélből pedig, 41-97%-os regenerációs hatékonyságról számolt be MIROSHICHENKO és DOLGOV (1999, 2000). VAN

ALTVORST et al. (1995) levélből kiinduló transzformációt követően 'Improved White Sim' (IWS) fajta esetében 15,8±1,9 % hajtásregenerációs eredményt kapott. 5 szegfűfajta regenerációs eredményeit vizsgálva megállapítható volt, hogy 4 fajta köztük az IWS eredményei azonosnak tekinthetők, de egy fajtának a Diantininak csak 4,7% volt a regenerációja.

Eleinte elsősorban marker- és riporter géneket hordozó transzgénikus szegfűt állítottak elő (LU et al. 1991, VAN ALTVORST et al. 1995, 1996, ZUKER et al. 1995, 1999, MIROSHINCHENKO és DOLGOV 2000). Hasznos gén bevitelére eddig 6 esetben került sor (3. táblázat). Szegfű antiszensz ACC-oxidáz (SAVIN et al. 1995, CHANDLER és CORNISH 1995), szegfű antiszensz ACC-szintáz (Florigene 1995 PR-19), szegfű ACC szintáz szensz és antiszensz (IWAZAKI et al. 2004) és *Arabidopsis etr1-1* (BOVY et al. 1999) génnel a vázaélet meghosszabbítása volt a cél. A virágszín kialakításáért kétféle pigment felelős, a flavonoidok és a karotinoidok. A karotinoidok adják a sárga és a narancssárga különböző árnyalatait. A flavonoidok közé tartoznak az antocianinok (kék), a cianidok (piros és rózsaszín) és a pelargonidok (narancsárga és téglavörös) (HELARIUTTAY et al. 1993). Petúnia DFR (dihidroflavonol-reduktáz) génnel transzformált szegfű (Florigene PR-28) esetében lila, ibolya, és mályvaszínű sziromleveleket kaptak. Gombabetegségekkel szemben rezisztens szegfűket is előállítottak (Florigene 1999 PR-84), de az adatokat még nem publikálták, csak a szabadalmat (PR-84).

A Florigene vállalat fő célja a kék szín különböző változatainak előállítása. A transzgénikus növényeket több éven keresztül tesztelték a környezeti rizikótényezők szempontjából. A transzgén genetikailag stabilnak bizonyult, a mikroszaporítás során sem veszett el. A pollen közvetítette átkereszteződés más fajokkal szinte kizárható. A termesztett szegfű gyakorlatilag hímsteril, ha mégsem, akkor is nagyon kevés pollent termel. Ezt a kevés pollent rovarok vihetnék át egyik növényről a másikra, de rovarháló használatával a zárt térben termesztett szegfűnél, ez kiküszöbölhető. A szegfű 6 hét alatt érleli meg a magját, mivel azonban a vágott

szegfű élettartama maximum 4 hét, így maggal sem „szökhet meg” a gén. Még sosem tapasztaltak vadon élő *Dianthus* fajok közötti átkereszteződést (www.Florigene.com).

3. táblázat: A szegfű transzformációja során elért eddigi eredmények

Transzgén	Promóter	Markergén	Promóter	Tulajdonság	Hivatkozás
DCACS	CaMV 35S	*surB*	CaMV 35S	Hosszabb vázaélet Herbicid tolerancia	FLORIGENE PR-19
Dfr	Mac-1	*surB*	CaMV 35S	színváltozat Herbicid tolerancia	FLORIGENE PR-28
hfl	psCHS	*surB*	CaMV 35S	színváltozat Herbicid tolerancia	FLORIGENE PR-28
?	?	?	CaMV 35S	Gomba rezisztencia	FLORIGINE PR-84
ACO	Mac-1	*nptII*	CaMV 35S	Hosszabb vázaélet	SAVIN et al. 1995
etr 1-1	CaMV 35S és FBP1	GUS-A	FBP1	Hosszabb vázaélet	BOVY et al. 1999
DCACS	CaMV 35S	*nptII*	CaMV 35S	Hosszabb vázaélet	IWAZAKI et al. 2004

surB = acetolaktát-szintáz (klorszulfuron toleráns *Nicotiana tabacum*), **dfr** = dihidroflavon-reduktáz (*Petunia hybrida*), **DCACS** = antiszensz ACC-szintáz (*Dianthus caryophyllus*), **CaMV 35S** = karfiol mozaikvírus 35S konstitutív promóter, **mac-1**= konstitutív promóter (*Agrobacterium tumefaciens*), **ACO** = antiszensz ACC-oxidáz (*Dianthus caryophyllus*), ***nptII*** = neomicin foszfotranszferáz (kanamicin rezisztencia *E. coli),* **FBP1** = virágspecifikus promóter, (*Petunia hybrida)* ***etr 1-1*** = mutáns (etilén közömbös) allél (*Arabidopsis thaliana*), ***hfl*** = flavonoid hidroxiláz (*Petunia hibrida*), **psCHS** = sziromlevél specifikus csalkon-szintáz promóter (*Anthirrhinum majus*), **GUS-A** = β-D-glükuronidáz gén (*E. coli*)

2. 13. AZ ETILÉN GÁTLÁSÁNAK HATÁSA A HAJTÁSREGENERÁCIÓRA

Megfigyelték, hogy az ezüst nitrát adagolása a táptalajban fokozza a hajtásfejlődést burgonyában (TURHAN 2004), a növekedés mértéke erősen genotípus függő volt. A golgotavirág hajtásregenerációját is vizsgálták, hogyan változik ezüstnitrát hatására (TREVISON és MENDES 2005). Azt az eredményt kapták, hogy BA (benziladenin) és ezüstnitrát együttes adagolása a táptalajba nem okozott szignifikáns változást fejlődött hajtások számában, de ha TDZ-vel (tidiazuron) együtt adagolták az ezüstnitrátot, akkor 20%-ról 35%-ra nőtt a hajtások regenerációs hatékonysága. FARIA és SEGURA (1997) szintén a hatásregeneráció javulását tapasztalták a golgotavirágnál, de ők nem vizsgálták, hogy a különböző hormonok és az adagolt ezüstnitrát hajtásregenerációt gátló hatása között milyen kapcsolat van. Az uborka hajtásregenerációjának növekedését MOHIUDDIN és munkatársai (1997) is tapasztalták ezüstnitrát és kobaltklorid táptalajba adagolásával. Édesburgonya növényeken végzett hajtásregenerációs kísérleteik során GONG és munkatársai (2005) szintén tapasztalták az ezüstnitrát hajtásregenerációt növelő hatását, amit 73,3%-ra sikerült növelniük levélből kiindulva. Megállapították, hogy az etiléninhibítor használata erősen szövetfüggő, mert a legjobb regenerációs eredményt szárból kiinduló hajtásregenerációnál értek el (86%), amikor csak NAA-t alkalmaztak ezüstnitrát nélkül. Ezüstnitrát, aminoethoxyvinylglycine hajtásregenerációt fokozó hatásának szövetfüggését mutatták ki NAIK és CHAND (2003) gránátalmában (*Punica granatum*), ahol a sziklevélből kiinduló hajtásregenerációnál tapasztalták a megnövekedett regenerációt, míg a hipokotilból kiinduló regenerációnál nem volt szignifikáns különbség. Kínai kel *(Brassica rapa* ssp *pekinensis*) hajtásregenerációs kísérletek során a különböző hormonkombinációkat (BA, NAA) és az ezüstnitrát hatását vizsgálták a sziklevél és a hipokotil explantumoknál. Hormonmentes táptalajon 4,5 mg/l ezüstnitrát adagolásakor 18% volt a regeneráció, míg 5 mg/l BA és 0,5 mg/l

NAA hormonkombinációval, ezürtnitrát adagolása nélkül kapták a legjobb regenerációs eredményt (40%)(YANG et al. 2004).

Transzgénikus krizantém internódiumokból kiinduló hajtásregenerációs rendszerének kidolgozásakor is az ezüstnitrátot tartalmazó regenerációs táptalajnál tapasztalták a legjobb regenerációs százalékot (XIAOHAN et al. 2003). Ezüstnitrátos táptalajkiegészítés hatására bekövetkező hajtásregeneráció növekedését tapasztalták még gyapotnál (OUMA et al. 2004), karfiolnál (ZOBAYED et al. 1999), a papajánál (LAI et al. 1998), és Virginiai földimogyorónál (AYLIN et al. 2005). ORLIKOWSKA és munkatársai (1996) arról is beszámoltak, hogy nemcsak a hajtásregenerációt növelte a táptalajhoz adagolt ezüstnitrát, hanem a rózsa (*Rosa indica*) transzformációját követően az *Agrobacterium* felülfertőzését is csökkentette, így javaslatuk alapján a gyakran fitotoxikus cefotaximot vagy carbenicillint ezzel a módszerrel ki lehet váltani (ORLIKOWSKA 1996).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. NÖVÉNYANYAG

3.1.1. Növényregenerációs kísérletekhez felhasznált szegfű fajták

Steril hajtástenyészetekben a következő fajtákat kaptuk az Óbuda Kertészettől (1039 Budapest Királyok útja 226)
'Bíbor®' Óbuda Kertészet (*Dianthus caryophyllus*), bíbor
'Improved White Sim' (*Dianthus caryophyllus*), fehér

A következő, a kereskedelemben, mag formájában kapható szegfű fajtákat használtuk fel:
Dianthus chinensis, színkeverék
Dianthus chabaud szegfű, rózsaszín (*Dianthus caryophyllus*)
Chabaud szegfű (Reine rose vit.), sötétrózsaszín (*Dianthus caryophyllus*)
Grenadin szegfű ('Grenadin nelke'), színkeverék (*Dianthus caryophyllus*)
Chabaud szegfű (Marie chabaud), sárga (*Dianthus caryophyllus*)
Nizzai szegfű ('Nizzaer Kind Nelke'), fehér (*Dianthus caryophyllus*)

3.12. A hajtásregeneráció összehasonlításához felhasznált növényanyag

'Bíbor®' Óbuda Kertészet

- ACC-szintáz antiszensz génnel transzformált növények (**CCA**)
- GUS gént tartalmazó vektorral transzformált növények (**GUS**);
- Az *Agrobacterium*-os fertőzést kivéve a transzformáció lépésein átesett kontroll növények (**K**)

- Tehénbab tripszininhibítor gént tartalmazó vektorral transzformált növények (**pCpTi**) (előállította Vizér Orsolya, 2000)
- Szénhidrát-bioszintézisben módosított transzgénikus növények (**Fru-2,6-P_2-áz, 6-PF-2-K**) (előállította Szőke Antal, 2000)

3.1.3. Transzformációhoz felhasznált növényanyag
'Bíbor®' Óbuda Kertészet *in vitro* hajtások levelei

3.1.4. Etiléntermelés méréséhez és a vázaélettartam méréséhez felhasznált növényanyag

'Bíbor®' Óbuda Kertészet:

- ACC-szintáz antiszensz gént tartalmazó transzgénikus növények (**CCA**)
- GUS gént tartalmazó transzgénikus növények (**GUS**)
- Az Óbuda Kertészetben szaporított és nevelt kertészeti kontroll növények (**KK**)
- Az *Agrobacterium*-os fertőzést kivéve a transzformáció lépésein átesett kontroll növények (**K**)

3.1.5. Törési kísérletekben felhasznált fajták

'Bíbor®' Óbuda Kertészet:

- ACC-szintáz antiszensz gént tartalmazó transzgénikus növények (**CCA**)
- Az Óbuda Kertészetben szaporított és nevelt kertészeti kontroll növények (**KK**)

'Improved White Sim':

- Az Óbuda Kertészetben nevelt és szaporított kertészeti kontroll növények (**IWS)**

3.2. NÖVÉNYANYAG SZAPORÍTÁSÁNAK, FENNTARTÁSÁNAK, NEVELÉSÉNEK MÓDSZERE

3.2.1. A magvak fertőtlenítése

A növényregenerációs kísérletekhez kereskedelmi forgalomban kapható vetőmagokból (3.1.1 fejezet) indítottunk tenyészeteket. A magvakat 70%-os alkoholban 1 percig áztattuk, majd 3:1 arányú víz:Na-hyipoklorit (HYPO) oldatban 30 perces rázatás után steril vízben háromszor 2 percig mostuk. A steril magvakat MS (MURASHIGE és SKOOG 1962) táptalajra helyeztük.
Az Óbuda Kertészet saját nemesítésű, illetve hajtástenyészetekben fenntartott fajtáit bocsátotta rendelkezésünkre. Az 'Improved White Sim' gyakran alkalmazott modellnövény, míg a 'Bíbor®' illatos, de törésre hajlamos szegfűfajta.

3.2.2 A növények mikroszaporítása

A fejlődő hajtásokat 4 hetente szikével úgy daraboltuk fel, hogy minden darabhoz 3 levélpár tartozzon, a szárszegmentumokat fiolába, szilárd MS táptalajra (7 ml) helyeztük. A tenyészeteket fényszobában 22±2°C-on inkubáltuk „cool-white" fluoreszcens fényben (40 W-os Tungsram fénycsövek) 16 órás fotóperiódus és 40 μEm^2s^{-1} fényintenzítás mellett.

3.2.3. Hajtásregenerálás

A növényregeneráció kiindulási explantuma levél és sziromlevél volt. A levélből kiindulva VAN ALTVORST és munkatársai (1994), míg a sziromlevélből NAKANO és munkatársai (1994) módszerével regeneráltunk növényeket.

A hajtásregeneráció 4 hetes *in vitro* fenntartott, steril növények leveléből indult ki. A leveleket a szárról csipesszel úgy távolítottuk el, hogy az alapi rész egy darabja is rajta maradjon. A leveleket 1 mg/l BA, 0,2 mg/l NAA hormont

tartalmazó szilárd MS táptalajra (20 ml) petricsészébe helyeztük. A 4-5 hét múlva fejlődő hajtásokat hormon nélküli MS táptalajra raktuk át.

A sziromleveleket zárt bimbókból preparáltuk ki. A bimbók felszínét Tween 20-at (5 ml/l) tartalmazó steril vízben mostuk, majd 1 perces 70%-os alkoholos mosással fertőtlenítettük, amit 3:1 arányú víz:Na-hipoklorit oldatban történő 20 perces rázatás követett, ezután háromszor steril vízben átmostuk az explantumokat. A bimbók sterilezését követően csipesszel eltávolítottuk a lepelleveleket és a külső virágszirmokat. Petricsészébe az 1 mg/l BA-t és 0,2 mg/l NAA-t és tartalmazó szilárd MS táptalajra (20 ml) a belső, ekkor még fehér vagy színtelen sziromleveleket helyeztük rá.

3.2.4. A hajtásregeneráció hatékonyságának összehasonlítása

A hajtásregenerációt más, az etilénbioszintézis szempontjából semleges génekkel (Fru-2,6-P_2-áz, 6-PF-2-K, pCpTi) transzformált ’Bíbor’ növényeknél is megvizsgáltuk. Minden egyes típusból (CCA, GUS, pCpTi, Fru-2,6-P_2-áz, 6-PF-2-K, K) 200 levelet helyeztünk rá a hormont tartalmazó (1 mg/l BA+0,2 mg/l NAA) MS táptalajra (4. táblázat).

Hormonmentes MS táptalajon is elvégeztük a hajtásregeneráció összehasonlítását. Ebben az esetben a kontroll, nem transzformált szegfűk szárairól 300 db, az ACC antiszensz génnel transzformált ’Bíbor’ szegfűkből, pedig 900 levelet gyűjtöttünk a hajtásregenerálás módszerében leírtak szerint.

Minden vegboxba 10 transzformált és 10 nem transzformált levelet helyeztünk, hogy a táptalajhatást kiküszöböljük az értékelés során. A kísérletet 3 ismétlésben végeztük el.

4. táblázat: A hajtásregeneráció összehasonlításához, a különböző táptalajokra helyezett növényminták (CCA, GUS, pCpTi, Fru-2,6-P_2-áz, 6-PF-2-K, KK)

Növényminta	MS táptalaj Hormonmentes	MS táptalaj+ 1mg/l BA+0,2 mg/l NAA
ACC antiszensz génnel tarnszformált 'Bíbor' (CCA)	900	200
GUS génnel transzformált 'Bíbor' (GUS)		200
Tehénbab tripszininhibítor génnel transzformált 'Bíbor' (pCpTi)		200
Szacharóz termelésben módosított transzgénikus 'Bíbor' (Fru-2,6-P_2-áz)		200
Keményítő termelésben módosított transzgénikus 'Bíbor' (6-PF-2-K)		200
Nem transzformált kontroll 'Bíbor' (K)	300	200

3.2.5. A növények nevelése üvegházban

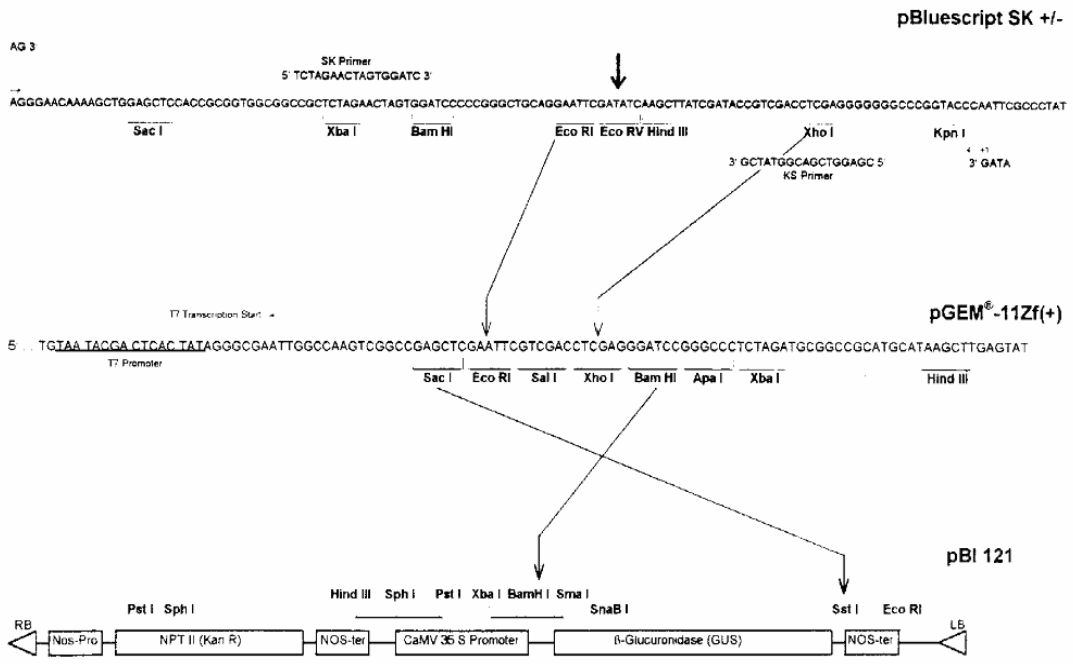
A 8 hetes hajtások gyökerei közül vízzel kimostuk a táptalaj maradványait. Mivel a növények gyökerei egyrészt még túl gyengék voltak, másrészt a kimosás során megsérültek, a szegfűket talajba ültetés előtt 3 hétre vízkultúrába helyeztük. A gyökér fejlődésének serkentésére hormonkészítménybe (Incit-2 Bioplant, Szentendre) mártottuk. A gyökeres növényeket kezdetben 1:2 arányban perlitet és tőzeget tartalmazó földkeverékbe ültettük. A megfelelő tápanyagellátás érdekében lassan lebomló műtrágyát adtunk, majd a talaj kémhatását (5,7-6,5 pH) Futorral (Bioplant, Szentendre) állítottuk be. A növényeket fényszobában neveltük 20°C -on, napi 16 órás megvilágításban. Az üvegházba kerülés előtt újból átültettük a növényeket vízben áztatott Jiffy-7 (perlit+tőzeg) tápkockába, 2-3 hét múlva a tápkockákat üvegházban földbe ültettük ki (2. ábra).

2. ábra: Az Óbuda Kertészet üvegházába kiültetett növények (2001. aug. 21.).

3.3. TRANSZFORMÁCIÓRA ALKALMAZOTT VEKTOR

A transzformációra használt ACS cDNS-t KISS és munkatársai (1995) izolálták McIntosh almából (MdACS2 – génbanki száma: U73815). RNS izolálás és cDNS szintézis után a cDNS templátot olyan ACC-specifikus degenerált primereket (BOTELLA et al. 1993) alkalmazva amplifikáltak PCR technikával, amelyek több növényfajban konzervatív régiónak bizonyultak. A PCR egy 1,1 kb nagyságú DNS-t eredményezett, amelyet klónoztak, majd az inszertet szekvenálták. Azt, hogy a kapott cDNS valóban az ACC-szintáz géncsalád tagja további szekvenálással bizonyították. Transzformációra alkalmas vektort (4. ábra) szintén KISS és munkatársai (1995) állítottak elő, az inszertet szubklónózási lépésekkel pBI121-es vektorba építették be antiszensz orientációban (3. ábra).

Transzformációs kísérleteinkben LBA4404-es *Agrobacterium tumefaciens* törzset használtuk fel, amelybe 'triparental mating' módszerrel juttattuk be a vektort.



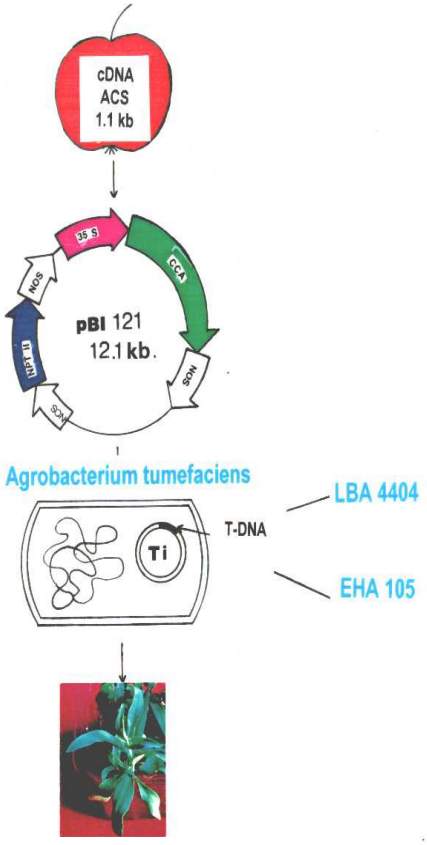
3. ábra Az ACC-szintáz cDNS fragmentum antiszensz orientációjú klónozása a pBI 121 bináris vektorba.

LB nos-pro nptII nos-ter CaMV 35S CCA nos-ter RB

4. ábra: A transzformációhoz alkalmazott bináris vektor felépítése (LB: baloldali határszekvencia, *nos*-pro: nopalin-szintáz promóter, *npt*II: neomicin-foszfotranszferáz markergén, *nos*-ter: nopalin-szintáz gén 3'régiója, CaMV35S: karfiol mozaik vírus 35S RNS promótere, CCA: antiszensz MdACS2 cDNS, RB: jobboldali határszekvencia).

3.4. A MOLEKULÁRIS TRANSZFORMÁCIÓ

Kísérleteink során két, *Agrobacterium tumefaciens* közvetítette, transzformációs módszert hasonlítottunk össze. A transzformációt megelőzően 3-4 nappal, a –70°C-on tárolt *Agrobacterium* törzseket szilárd LB táptalajra (10 g/l trypton, 5 g/l élesztő, NaCl 5 g/l agar 18g/l) szélesztettük, amely 50 mg/l kanamicint tartalmazott, majd 28ºC -on inkubáltuk 24 órán keresztül. A kinőtt telepekből Erlenmeyer-lombikokban 28ºC-os vízfürdőben folyékony tenyészeteket indítottunk. A YEP táptalaj (10 g/l élesztő extraktum, 10 g/l pepton, 5 g/l NaCl, pH 7,0) szintén 50 mg/l kanamicint tartalmazott. Transzformációra az OD600=0,5 denzitási értéket elért baktérium tenyészeteket alkalmaztunk.



5. ábra: A transzformáció vázlata

A transzformáció előtt 5 órával a szuszpenzióhoz 0,1 mM acetosziringont (100 mM törzsoldat DMSO-ban oldva) adtunk. Az acetosziringon a természetben is előforduló olyan jelmolekula, amely a sebzéskor keletkezik és elősegíti az *Agrobacterium* sejtbe jutását (MELCHERS 1989).

A transzformációhoz mindkét esetben 3-4 hetes hajtások leveleit használtuk ugyanúgy, ahogyan a hajtásregenerációs kísérletekben (3.2.2 fejezet). A leveleket a fertőzés elősegítése érdekében több helyen megsértettük, majd 25 ml folyékony

MS táptalajt tartalmazó Erlenmeyer-lombikokba (20 db/lombik) helyeztük és 5 ml baktérium szuszpenziót (OD600=0,5) adtunk hozzá (5. ábra).

HORSCH et al. (1988) módszere alapján a lombikokat sötétben 3 napon keresztül rázattuk, majd a leveleket 3-szor steril 500 mg/l cefotaximot tartalmazó desztillált vízben kimostuk és szilárd 1 mg/l BA-t, 0,2 mg/l NAA-t, 50 mg/l kanamicint és 500 mg/l cefotaximot tartalmazó MS táptalajra helyeztük.

VAN ALTVORST et al. (1995) módszere alapján a lombikokat 30 percen keresztül rázattuk, majd szilárd 1 mg/l BA-t, 0,2 mg/l NAA-t és 0,1 mM acetosziringont tartalmazó MS táptalajra helyeztük a leveleket. A fertőzés 10 napon keresztül folytatódott, majd a leveleket 500 mg/l koncentrációjú cefotaximos mosást követően szelektív MS táptalajra helyeztük át, ami 1 mg/l BA-t, 0,2 mg/l NAA-t, 150 mg/l kanamicint és 500 mg/l cefotaximot tartalmazott.

A leveleken megjelenő hajtásokat (4-5 hét) levágtuk, majd 3 hetente hormont (1 mg/l BA és 0,2 mg/l NAA) és kanamicint (150 mg/l) tartalmazó, MS táptalajra helyeztük át. Felszaporítást követően a 8 hetes hajtásokat gyökereztettük, majd Jiffy-7 tápkockába ültettük.

Az ACC antiszensz génnel történő transzformáláson kívül, GUS gént tartalmazó vektorral is elvégeztük a transzformációt a fent leírt módon. Kontroll növényeknél a transzformáció minden lépését végrehajtottuk, de *Agrobacterium*-os szuszpenzió helyett folyékony MS táptalajt alkalmaztunk a rázatásnál, és a leveleket nem szelektív, hanem antibiotikum mentes, 1 mg/l BA-t, 0,2 mg/l NAA-t tartalmazó szilárd MS táptalajra helyeztük.

Hasonló módon történt a Fru-2,6-P_2-áz, a 6-PF-2-K és a pCpTi géneket hordozó *Agrobacterium tumefaciens* törzsekkel a transzformáció.

3.5. DNS IZOLÁLÁS

A kontroll növények 3-4 hetes hajtásainak leveléből, illetve a 150 mg/l kanamicint tartalmazó táptalajon is zöld hajtásokat hozó növények leveleiből izoláltuk a DNS-t.

A DNS izoláláshoz AITCHITT et al. (1993) módosított módszerét alkalmaztuk. Röviden, dörzsmozsárban 1-3 g (maximum 5 g) friss levelet cseppfolyós nitrogénnel finoman elporítottunk. Az elporított anyagot centrifugacsövekbe adagoltuk, 10-15 ml 20%-os CTAB puffert adunk hozzá. A csöveket 65°C-on 1-2 órán át inkubáltuk, miközben 10 percenként a csövek föl-le forgatásával óvatosan összekevertük a mintákat. Azonos térfogatú fenolt adagoltunk a csövekbe, és a fázisok összekeverése érdekében 10 percig rázóasztalon rázattuk. Ezután a mintákat 12.000 percenkénti fordulatszámmal 10 percig centrifugáltuk. A felső vizes fázist óvatosan leöntöttük vagy 10 ml-es levágott végű pipettaheggyel leszívtuk tiszta centrifugacsőbe. Ugyanezeket a lépéseket ismételtük meg először fenol kloroform 1:1 arányú keverékével, majd kloroformmal. Mindkét esetben a vizes fázissal megegyező térfogatot alkalmaztunk. A vizes fázisból azonos térfogatú izopropanollal kicsaptuk a DNS-t, közben óvatos mozdulatokkal kevertük össze az oldatot. Ezt követően 30 percig -20°C-ra helyeztük a csöveket. A mintákat 12.000 percenkénti fordulatszámmal 10 percig centrifugáltuk. A csapadékot 200 µl ionmentes vízben oldottuk.

A feloldott csapadékot 1,5 ml-es centrifugacsőbe vittük át, és 4 µl RNáz (10 mg/ml) oldattal 30 percig 37°C-on inkubáltuk a mintákat. A DNS-t 0,1 térfogat 3 M-os nátriumacetát és kétszeres térfogatú 96%-os etanollal csaptuk ki és 10 percig centrifugáltuk 12.000 percenkénti fordulatszámmal. A csapadékot kétszer 70%-os etanollal mostuk, száradni hagytuk, majd a teljes beszáradás előtt a DNS-t 200-400 µl ionmentes vízben feloldottuk.

3.6. mRNS IZOLÁLÁS

Az izolálást 3-4 hetes hajtások leveleiből a Dynal® előírása szerint hajtottuk végre (DYNAL kézikönyv 1998). 100 mg levelet folyékony nitrogénben megfagyasztottunk. A fagyott leveleket 100 µl lízis pufferben (100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 500 mM LiCl; 10 mM EDTA, pH 8,0; 1% LiDS; 5 mM dithiothreitol) olvasztottuk ki, majd mozsárban őröltük addig, míg a teljes lízis be nem következett (1-2 perc). A gyors lizálás kritikus pontja az izolálás sikerének. Az elroncsolt sejteket 1 perces centrifugálással (12.000 percenkénti fordulatszámmal) távolítottuk el, és 100 µl előkészített növényi lizátumhoz 20 µl előmosott gyöngyöt (Dynabeads Oligo (dT)25) adtunk. Az elegyet pipettával fel-le szívtuk 10 másodpercig. A centrifuga csöveket rázóasztalra helyeztük 5 percre, míg a gyöngyökhöz kapcsolódott az mRNS. Ezután a csöveket a mágneses készülékbe helyeztük, majd a felülúszót eltávolítottuk. A mágneses készülékből kivettük a csöveket és 100 µl mosópufferben (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,15 mM LiCl; 1 mM EDTA, pH 8,0; 0,1% LiDS), szuszpendáltuk a komplexet. Ismét visszaraktuk a mágneses készülékbe, és a keletkező felülúszót eltávolítottuk. Ezt az utóbbi lépést 6-7 alkalommal megismételtük. Ezután 100 µl mosópufferben (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,15 mM LiCl; 1 mM EDTA, pH 8,0) szuszpendáltuk fel a komplexet. A szuszpenziót új centrifugacsőbe helyeztük, amit ismét a mágneses készülékbe tettünk, a felülúszót eltávolítottuk. Ezt kétszer ismételtük. A következő lépésben 100 µl jégben tartott 10 mM-os Tris-HCl-t (pH 7,5) adtunk az elegyhez, és az RT-PCR indításáig jégen tartottuk. Az RT-PCR mix hozzáadása előtt a mintát újból a mágneses készülékbe helyeztük és a felülúszót eltávolítottuk.

3.7. PCR

A PCR reakciókat GeneAmp 9700 (Perkin-Elmer) és iCycler (BIO-RAD) készülékekben végeztük 20 µl végtérfogatban. A reakcióelegy a következő összetevőket tartalmazta: 10-20 ng templát DNS, 2µl 10 x reakció puffer, 2 µl dNTP (25 mM törzs oldat), 1,5 µl $MgCl_2$ (25 mM törzs oldat), 4 µl PCR primer-pár (10 µM törzs oldat), 1,5 Unit Red-*Taq* DNS polimeráz (Sigma).

A PCR készülék programja 94°C-on indult, amely hőmérsékletet a minták behelyezését követően 2 percig tartott, majd 40-szer megismételte a következő lépésekből álló ciklust: 20 másodperc 94°C-on, 20 másodperc 48°C-on, majd 1 perc 30 másodperc 72°C-on. Az utolsó ciklust követően még egy 5 perces 72°C-os polimerizációs lépés következett, majd a minták kivételéig 4°C-ra állt be a készülék.

A PCR reakció során a 35 S CaMV promóter és az antiszensz ACC-szintáz kb 450 bp méretű szakaszának felszaporításához az 5'-TTG AAG ATG CCT CTG CCG AC-3' és a 5'-CAT TGA AGA GTA ATG CTG GAC AC-3'összetételű primereket, (GALLI 2004), az *nptII* 503 bp hosszúságú fragmentumának amplifikálásához pedig, az 5'-CTG AAT GAA CTG CAG GAC GAG G-3' és a 5'-GCC AAC GCT ATG TCC TGA TAG C-3' primereket (MAAS et al. 1997) használtuk.

3.8. RT-PCR

A PCR reakciókat GeneAmp 9700 (Perkin-Elmer) és iCycler (BIO-RAD) készülékekben végeztük 50 µl végtérfogatban. A reakcióelegy a következő összetevőket tartalmazta: 10-20 ng templát RNS, 25 µl 2 x reakció puffer, 1-1 µl PCR primer-pár 10 µM törzsoldatból, 1 µl SUPERSCRIPT II RT/ *Taq* Mix (GIBCO). Az *nptII* 503 bp hosszúságú fragmentumának amplifikálásához a 5'-CTG

AAT GAA CTG CAG GAC GAG G-3' és a 5'-GCC AAC GCT ATG TCC TGA TAG C-3' primereket (MAAS et al. 1997), a 35 S CaMV promóter és az antiszensz ACC-szintáz kb 450 bp méretű szakaszának felszaporításához az 5'-TTG AAG ATG CCT CTG CCG AC-3' és a 5'-CAT TGA AGA GTA ATG CTG GAC AC-3'összetételű primereket (GALLI 2004) használtuk.

A PCR készülék programja: 50°C 2 percig cDNS szintézis, majd 94°C-on 2 perc, ezután 40 cikluson keresztül: 94°C 15 másodperc, 55°C 30 másodperc, 72°C 1 perc, végül 72°C 10 perc (KISS et al. 2000).

3.9. SOUTHERN HIBRIDIZÁCIÓ DIGOXIGENIN-JELÖLT PRÓBÁVAL

A hibridizációhoz a próbát a pBI121-es plazmid *nptII* génje szolgáltatta (4. ábra). Ehhez a pBI 121-es plazmidból *Pst*I enzimmel vágtuk ki a gént (3. ábra). Az ilyen módon megemésztett DNS mintákat alacsony olvadáspontú gélen futtattuk meg, majd a kívánt 1100 bp nagyságú DNS fragmentumot kivágtuk a gélből, és kitisztítottuk (3.11 fejezet).

A jelölést Boehringer-Mannheim (ROCHE) előírása szerint hajtottuk végre, a módszer nem-radioaktív digoxigenin jelölésen alapul (BOEHRINGER-MANNHEIM PROTOKOLL 1999). A jelölni kívánt DNS mintákat (5-10 μg) forrásban lévő vízben 10 percig denaturáltuk, majd rögtön jégre tettük. (A jeget NaCl-al összekevertük a megfelelően alacsony hőmérséklet biztosítása érdekében). A jégen adtunk hozzá 2 μl hexanukleotid keveréket, 2 μl dNTP-t amely tartalmazta a digoxigeninnel jelölt dUTP-t is, steril vízzel feltöltöttük 19 μl-re, végül 1 μl Klenow enzimet pipettáztunk hozzá. Centrifugával összekevertük és 37°C-on inkubáltuk 20 órán át. A reakciót 0,2 M EDTA (pH 8,0) hozzáadásával állítottuk le. Ezután a jelölt DNS-t 2,5 μl 4 M-os LiCl-al és 7,5 μl előhűtött (-20°C) etanollal csaptuk ki, a keveréket 2 órára -70°C-ra tettük. 4°C-on 12.000 fordulatszámmal centrifugáltuk, és a fölülúszót leöntöttük. A csapadékot 500 μl hideg 70%-os

etanollal kimostuk és újból 5 percig centrifugáltuk, majd megszárítottuk és 50 µl TE1 pufferben (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) oldottuk fel.

A hibridizációval azonosítani kívánt DNS mintákat (30-40 ng) az 1%-os agaróz gélről Southern blot technikával vittük fel a membránra (SAMBROOK et al. 1989), 15-16 órán keresztül folytattuk a kapilláris transzfert. A blottoláshoz az ACC antiszensz génnel transzformált szegfű DNS-ek *npt*II-specifikus primerekkel kapott PCR termékeivel megfuttatott gélt használtuk fel. A nylon membrán megszáradása után 5 perc UV-vel rögzítettük a DNS-t.

Az előhibridizációhoz a membránokat 0,25 mg/ml denaturált heringspermát tartalmazó hibridizációs pufferrel (10x-es SSC 500 ml; 10%-os BSS: 10%-os blokkoló reagens 0,1 M malein sav, 0,15 M NaCl, pufferben (pH 7,0) oldva 100 ml 10%-os SDS, 2 ml 10%-os Na-lauroylsarcosine 2 ml (20 ml/100 cm^2) feltöltött dobozokba helyeztük és 68°C-on 1 órán keresztül rázattuk ügyelve, hogy a membrán ne ragadjon föl a doboz falára. Ezután előhibridizációs puffert kicseréltük a jelzett DNS-t tartalmazó hibridizációs pufferrel (26 ng/ml), és 68°C-on 6 órán át inkubáltuk a membránokat.

A filtereket 2 X SSC, 0,1%-os SDS (50 ml/100 cm^2 membrán) oldatban 5 percig szobahőmérsékleten rázattuk, mindezt kétszer megismételtük. A membrán mosását 0,1 X SSC; 0,1 %-os SDS oldatban folytattuk 68°C-on kétszer 15 percig. Végül szűrőpapíron megszárítottuk.

A detektáláshoz 20 ml mosó pufferes (0,1 M malein sav; 0,15 M NaCl; pH 7,5 + Tween 20 (0,3 térf.%) mosást alkalmaztunk 5 percen keresztül, majd (100 ml/100 cm^2 membrán) puffer II.-ben (BSS:10 térf.%-os blokkoló reagens 0,1 M malein sav; 0,15 M NaCl; pufferben (pH 7,0) oldva + 0,1 M malein sav; 0,15 M NaCl; pH: 7,5 1:10 arányban) 30 percig rázattuk, majd Boehringer Mainnheim DIG Luminescent Detection Kit-jéből az Anti-digoxigenin-AP-t és puffer II-t 1:10000 arányban tartalmazó oldatban 30 percig rázattuk. Kétszer 15 percig (100 ml/100 cm^2 membrán) mosó pufferben mostuk, ezután (20 ml/100 cm^2 membrán) puffer

III.-ban (0,1 M Tris-HCl; 0,1M NaCl; 0,05 M MgCl2; pH 9,5; 20 °C-on tárolható) 5 percig rázattuk. A membránokat hibridizációs zacskóba helyeztük és (2 ml/100 cm^2 membrán) Boehringer-Mainnheim DIG Luminescent Detection Kit-jéből CSPD®-t és puffer III.-at 1:100 arányban tartalmazó oldatban 5 percig inkubáltuk. Szűrőpapíron lecsepegtettük és még nedves állapotban 15 percre 37°C-ra helyeztük a membránokat zacskóval együtt. 15-20 percig exponáltuk szobahőmérsékleten a filmet.

3.10. A SOUTHERN HIBRIDIZÁCIÓ RADIOAKTÍV JELÖLÉSSEL

A restrikciós emésztés és a PCR reakció során keletkező DNS fragmentumokat 2%-os agaróz gélben választottuk el 1 mg/l etídium-bromidot tartalmazó 1xTBE (90 mM Tris-HCl, 90 mM bórsav, 20 mM EDTA) pufferben és UV fényben tettük láthatóvá. A kívánt DNS fragmentumokat az agaróz gélből szikével kivágtuk és a QIAEX II Gel Extraction Kittel illetve MinElute Gel Extraction Kittel (QIAGEN) izoláltuk.

A Southern hibridizáció során a növényi DNS mintákból 20-20 μg-ot emésztettünk *Hind*III és *Eco*RI enzimekkel, majd 0,8%-os agaróz gélben, alacsony feszültség mellett, egy éjszakán keresztül elválasztottuk, utána 0,25 M HCl-ban rázattuk 10 percig, majd kétszer 15 percig 0,4 M-os NaOH-ban rázatva neutralizáltuk. A DNS-t 0,4 M NaOH oldattal Hybond N+ (Amersham) membránra blottoltuk (SAMBROOK et al. 1989) és egyben fixáltuk is.

A Southern hibridizációhoz [α-32P]-dCTP-vel jelölt, tisztított DNS fragmentumokat használtunk. A jelölést „random priming” módszerrel (Feinberg és Vogelstein 1983) és polimeráz láncreakcióval 2 pmol primer és 100 ng templát DNS jelenlétében [α-32P]-dCTP (0,8MBq) izotóp beépítésével Promega Taq polimeráz felhasználásával végeztük. A próbát a CaMV35S promóter és antiszensz MdACS2 szekvenciákra tervezett, következő primerekkel szaporítottunk fel: 5’-

TTG AAG ATG CCT CTG CCG AC-3' és a 5'-CAT TGA AGA GTA ATG CTG GAC AC-3' (GALLI 2004).

A DNS fragmentumokat a be nem épült izotóptól Sephadex G-25 oszlopon kromatográfiával választottuk el, majd denaturálás után a hibridizációs pufferhez adtuk.

A jelölt próbát a CHURCH és GILBERT (1984) által leírt pufferben (0,5 M Na_2HPO_4, 7% SDS, 1 mM EDTA, 1% BSA, pH 7,2), forgó hibridizációs tégelyben, 65°C-on, 20 órán át inkubáltuk a membránnal. Utána a nem specifikusan megtapadt próbát 0,1% SDS + 2xSSC oldatban, 65°C-on, kétszer 20 percig, 0,1% SDS + 0,2x SSC oldattal 15 percig tartó mosással távolítottuk el. Röntgen filmet tettünk a filterre és -70°C-on exponáltuk.

3.11. PLAZMID-DNS IZOLÁLÁS

Az egy kolóniából indított tenyészeteket 37°C-on 50 mg/l kanamicint tartalmazó LB táptalajban egész éjszakán át rázattuk. A megfelelő levegőztetés végett a folyadék térfogata a lombikban nem haladta meg az össztérfogat ¼-ét. A szuszpenziót másnap 1,5 ml-es részletekben centrifugáltuk 12000 fordulat/perccel. A felülúszó kiöntése után a baktérium csapadékot 200 µl GTE pufferben felszuszpendáltuk pipettával. A szuszpenzióhoz 300 µl frissen készített 0,2 M NaOH és 1% SDS oldatot adtunk hozzá. A csövek tartalmát óvatos fel-le fordítással összekevertük. Ezután jégen 5 percig inkubáltuk a mintákat. Az oldatot 300 µl 5 M-os kálium-acetát oldattal (pH 4,8) semlegesítettük, majd ismét jégre tettük a csöveket 5 percre. Az elroncsolt baktériumsejteket centrifugálással (szobahőmérséklet, 12000 fordulat/perc, 10 perc) távolítottuk el. A felülúszót tiszta centrifugacsövekbe töltöttük, 10 mg/ml koncentrációjú RNáz törzsoldatból 20 µg/ml koncentrációnak megfelelő térfogatot adagoltunk a centrifugacsövekbe, majd 37°C-on 20 percig inkubáltuk. Az RNázos kezelés után az oldatokat kétszer

400 µl kloroformmal extraháltuk. A fázisokat kézzel 30 másodpercig kevertük majd centrifugáltuk (szobahőmérséklet, 12.000 fordulat/perc, 1 perc). A fázist tiszta centrifugacsőbe pipettáztuk. A DNS-t azonos térfogatú izopropanollal csaptuk ki. Szobahőmérsékleten 12000 fordulat/perccel 10 percig centrifugáltuk. A csapadékot 500 µl 70%-os etanollal mostuk és vákuum alatt szárítottuk. A csapadékot 32 µl desztillált vízben oldottuk és 8 µl NaCl hozzáadása után 40 µl autoklávozott 13%-os polietilénglikol 8000 oldattal csaptuk ki. Összekeverés után a mintákat 20 percig jégen inkubáltuk, majd a plazmid DNS-t centrifugálással ülepítettük (12000 fordulat/perc, 15 perc, 4°C). A csapadékot 500 µl 70%-os etanollal mostuk. Száradás után 20 µl ionmentes vízben oldottuk.

3.12. DNS VISSZAIZOLÁLÁSA ALACSONY OLVADÁSPONTÚ GÉLBŐL

A PCR amplifikátumokat vagy a plazmid DNS-t 1%-os alacsony olvadáspontú (LMP) gélen (Sigma) futattuk meg. A kívánt fragmentumot tartalmazó gél-szelet kivágása után a gél-szelethez 5 x térfogatú 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH:8,0) oldatot adtunk. A centrifugacsövet 65°C-on 5 percig inkubáltuk. Az oldat szobahőmérsékletre hűlése után azonos térfogatú fenolt adagoltunk, amelyet 0,1 M Tris oldattal ekvilibráltunk, így pH-ja 8,0 lett. A keveréket 20 másodpercig vortexeltük, majd 10 percig 4000 fordulat/perc-cel 20°C -on centrifugáltuk. A vizes fázist újra extraháltuk azonos térfogatú fenol-kloroform 1:1 arányú keverékkel, majd ismét azonos térfogatú kloroformmal. A vizes fázist tiszta centrifugacsövekbe pippettáztuk és 0,2 térfogat 10 M ammóniumacetátot és 2x térfogat 4°C-os 96%-os etanolt adtunk hozzá. A keveréket 10 percig szobahőmérsékleten tartottuk és a DNS-t 20 percig 4°C-on 5000 fordulat/perc fordulatszámmal centrifugáltuk. A csapadékot 500 µl 70%-os etanollal mostuk, majd 5 percig centrifugáltuk. A megszáradt csapadékot steril, ionmentes vízben oldottuk (max. 10 µl) (SAMBROOK et al. 1989).

3.13. A VÁZAÉLETTARTAM MÉRÉSE

Az ACC antiszensz és a GUS gént tartalmazó transzgénikus, valamint az *Agrobacterium*-os fertőzést kivéve a transzformációs lépéseken átesett kontroll 'Bíbor' növényeket ültettük az Óbuda Kertészet üvegházába. Emellett kertészeti kontrollként (KK) az Óbuda Kertészetben szaporított és nevelt növényeket is ültettünk, amelyeket normál üvegházi körülmények között neveltünk. Az öntözést csepegtető öntözéssel végeztük. Az első évben több időpontban kiültetett állományt a harmadik évben frissítettük az azonos nagyságú hajtásokat egyidőben dugványoztuk.

6. ábra: Vázaélettartam vizsgálata a szedést követően (2002. jún. 22.).

A vázaélettartam összehasonlítására azonos (a sziromlevél 90º-os szöget zárt be a csészelevelekkel) virágzási fázisú, azonos (50 cm) szárhosszúságú mintákat szedtünk. A transzgénikus és kontroll virágokhoz mindig azonos virágzási fázisú kertészeti kontroll (KK) növényt párosítottunk. Az év különböző szakában más és más környezeti feltételek voltak, a virágzási idő hossza éppen ezért

különbözőképpen alakult. Ezért a vázaélettartamot relatív értékben adtuk meg azaz, a transzgénikus és a hozzá párosított kertészeti kontroll növény vázaélethossza közötti különbséget vettük figyelembe. A napokban kifejezett relatív értékekre a szignifikanciát t-, illetve Z-próbával számítottuk.

A vázaélettartam számításánál a szedett állapot volt az első nap, az utolsó pedig az, amelyen a sziromlevelek 50%-a elhervadt.

A vázaélettartamot 1999. júniusától 2004. márciusáig 22°C-on vizsgáltuk. Azért ezt a hőmérsékletet választottuk, mert a virágárusok és a vásárlók is ezen a hőmérsékleten tartják a virágokat. A párosított virágokat speciálisan a vázaélettartam összehasonlítására kidolgozott keretbe helyeztük, amelybe 0,5 l csapvizet töltöttünk (6. ábra). Minden egyes virágról több virágzási ciklusban is gyűjtöttünk virágokat. Egy anyatövön egy virágzási ciklusban egy vagy két virágot hagytunk meg, a többit eltávolítottuk. Virágzás után a töveket visszatörtük, ezáltal az újabb virágzási ciklust beindítva. A különböző években az időjárástól függően alakult a virágzási ciklusok száma. 2000-ben már február elején kezdődött az első virágzást míg 2003-ban csak március közepén.

3. 14. AZ ETILÉNTERMELÉS MÉRÉSE

A termelt etilén mennyiségének mérését a Szent István Egyetem Kertészettudományi Karának Kémia Tanszékén végeztük (ma Budapesti Corvinus Egyetem). A virágokat a vázaélettartam mérésénél leírt virágzási stádiumban 8 cm-es szárral vágtuk le. Miután a mintavétel és a mérés helye különbözött, a leszedés és a szállítás okozta termelt stresszetilént először ki kellett zárni a vizsgálatból, ezért a növényeket 24 órán át a mérés helyén vízben tartottuk, majd speciális mérőedényekbe tettük át őket (7. ábra). Az edények záró gumiszeptumot tartalmaztak, amelyeken keresztül adagoltunk 1% exogén etilént, illetve vettünk gázmintát. 24 órás kezelés után a virágokat kivettük, 24 órán keresztül

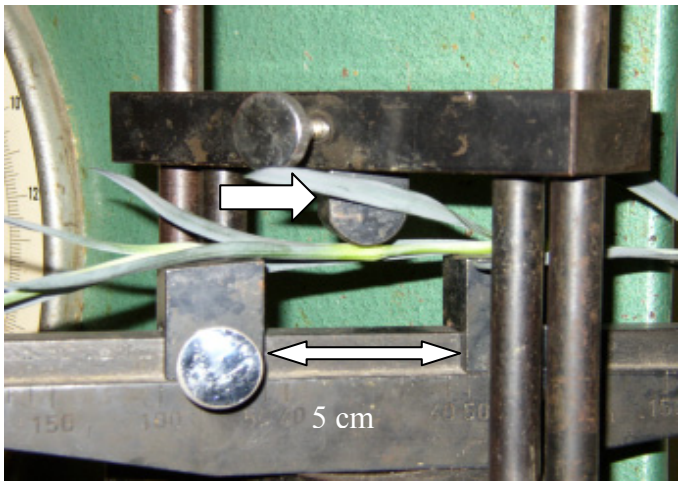
szellőztettük, és ismét visszahelyeztük az edényekbe. Újabb 24 óra elteltével vettünk gázmintákat. A termelt etilén mennyiségét GC 6000-es gázkromatográf készülékkel alumínium kolonnával mértük. A különböző időpontokban mért adatok a szegfű virágzásának különböző időpontjai miatt a külső környezeti hatásoktól függtek (hőmérséklet, fényviszonyok), ezért az eredményeket egy kezelésen belül a kontroll nem transzgénikus szegfűkhöz viszonyított százalékos értékekből fejeztük ki. A kontroll növény által termelt etilén mennyisége volt a 100%, ehhez viszonyítva állapítottuk meg, hogy kevesebb, vagy több etilént termelt-e a növény.

7. ábra: Az etilén méréséhez használt, gumiszeptummal ellátott üveg.

3.15. A SZÁRSZILÁRDSÁG MÉRÉSE

A virágokat a vázaélettartam mérésénél leírt virágzási stádiumban a 8. nódusznál vágtuk le. A törés érzékenységére egy módosított FM-250 típusú (az egykori NDK-ban) gyártott szakítószilárdságot mérő készüléket használtunk fel. A módosítást, ami egy adapter cseréjét jelentette a 8. ábrán nyílall jelöltük meg. Minden egyes nódusznál mértük azt a merőlegesen ható erőt Newtonban, amely ahhoz szükséges, hogy a szegfű szára az 5 cm fesztávolságban alátámasztott nódusznál eltörjön. Az első nódusz túl közel volt a fejhez, így a második nódusztól

mértük az értékeket. Az erőhatás sebessége 30 mm/sec -ra volt beállítva. A készülék felépítését a 8. ábra mutatja be.



8. ábra: A szártörésre használt, módosított szakítószilárdság mérő készülék (Dr. Csapó Gyula, SZIE Gépészmérnöki Kar)

⇨ Módosított adapter ⇔ a szár alátámasztása 5 cm fesztávolságban

A szártörésre kapott adatok kiértékeléséhez a nóduszok törésekor kapott értékeket összeadtuk és elosztottuk az eltört nóduszok számával. Az így kapott szártörési mutatókkal jellemeztük a növényeket.

3.16. A SZÁRTÖRÉSRE HAJLAMOSSÁG SZÖVETTANI VIZSGÁLATA

A tapasztalt, majd mérési adatokkal is alátámasztott szártörés javulásának szövettani okát is megvizsgáltuk. Ehhez a szártörésnél említett virágzási stádiumban lévő szegfűket a 6. nódusznál vágtuk le. A vizsgálatokat az ELTE Természettudományi Karának Növénytani Tanszékén végezték. A metszeteket kézi metszéssel készítették, amelyeket derítés után toulidin kékkel festettek meg. A

metszési sík mediális hosszmetszet volt, mely a két levél síkjával párhuzamosan, valamint arra merőlegesen állt. A metszeteket fénymikroszkóppal vizsgálták

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

4.1. NÖVÉNYREGENERÁCIÓ

A transzgénikus növények előállításának alapfeltétele a hatékony növényregenerálási rendszer. A szegfű előállítása a mikroszaporítás módszerén alapul, így a köztermesztésben lévő fajták az in vitro körülményekhez tökéletesen alkalmazkodtak. A szegfű több részéből (szár, levél, sziromlevél, rügy) is eredményesen regeneráltak növényeket. Mi a levél és a sziromlevélből kiinduló regenerációt választottuk, mert az in vitro körülmények között nevelt és szaporított növényekről átlagosan 14 levelet lehet leszedni, míg szárdarabból 5-6 szegmentumot, rügyből 6-8 darabot lehet izolálni. A sziromlevélből kiinduló regenerációnak nagy előnye, hogy nem kell *in vitro* tenyészetekből kiindulni, és egy bimbóból 20-25 virágszirmot is izolálhatunk. Hajtásregenerációs kísérleteink célja az volt, hogy a kereskedelemben magként kapható vagy az Óbuda Kertészetben *in vitro* hajtástenyészetekben rendelkezésre álló, fajták közül a transzformáció során alkalmazni kívánt táptalajon jól regenerálódó genotípust válasszunk ki. A levélből történő regenerációról több szerző (VAN ALTVORST et al. 1992, 1994, 1995, MESSEGUER et al. 1993, NONTASWATSRI et al. 2002) számolt be. Mi VAN ALTVORST et al. 1995 módszere szerint végeztük a levélből kiinduló hajtásregenerációs kísérleteinket, mert a transzformációt követően az általuk leírt táptalajon kívántuk regenerálni a növényeket.

A steril tenyészetekről származó, 1 mg/l BA és 0,2 mg/l NAA-t tartalmazó MS táptalajra helyezett leveleken 4-5 hét múlva jelentek meg a hajtások (9. ábra), amelyeket 3-4 hét alatt már továbbszaporíthattunk. Voltak olyan fajták amelyek levelein gyökérfejlődés indult meg, ezeken később sem jelentek meg hajtások. Azokon a levél explantumokon, amelyeken kalluszosodás volt megfigyelhető 14-15 hét múlva fejlődtek hajtások. Ezek azonban vitrifikáltak voltak, és egészséges növényt nem kaptunk belőlük.

9. ábra: Az 1 mg/l BA, 0,2 mg/l NAA tartalmú MS táptalajra helyezett 'Nizzai fehér' szegfű levelek, a táptalajra helyezést követő 6. héten. A leveleken megindult, a gyökér-, hajtás- és kalluszfejlődés.

10. ábra: Az 1 mg/l BA, 0,2 mg/l NAA tartalmú MS táptalajra helyezett 'Bíbor' sziromlevél a 14. héten. Az antociános elszíneződést követően megindult a hajtásfejlődés.

5. táblázat: A *Dianthus chinensis* és különböző *Dianthus caryophyllus* fajták regenerációja levélből 1 mg/l BA, 0,2 mg/l NAA tartalmú MS táptalajon

Növényanyag	Levél explantum db	Regenerált hajtás %	Szórás
'Bíbor' (1)	200	**22**	1,7
'Improved White Sim' (2)	200	**25**	2,6
Dianthus chinensis (3)	200	**6**	0,7
Chabaud szegfű rózsaszín (4)	200	**3**	1
Chabaud szegfű Reine Rose (5)	200	**2**	1,4
Grenadin színkeverék (6)	200	**5**	0,7
Chabaud Marie chabaud (7)	200	**5**	1,2
Nizzai fehér szegfű (8)	200	**7**	2,2

6. táblázat A *Dianthus chinensis* és különböző *Dianthus caryophyllus* fajták regenerációs eredményeinek statisztikai kiértékelése, két mintás Z próba alapján. (Z*=1,96) Az 1,96-t meghaladó Z értékek 95 %-os valószínűséggel szignifikáns különbséget mutatnak. A számok az 5. táblázatban található fajták számozását jelentik.

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

Az 5. táblázatban bemutatott eredmények alapján, a ’Bíbor’ és az ’Improved White Sim’ levéleredetű hajtásregenerációja volt a legnagyobb (22% és 25%), ami statisztikai próbával is alátámasztható (6. táblázat). E két fajta közül, amelyeket *in vitro* hajtástenyészetekben tartanak fenn az Óbuda Kertészetben az illatos ‘Bíbor’ fajtát választottuk ki a transzformációs kísérletekhez. A vetőmaggal szaporított kereskedelmi forgalomban kapható többi fajta és a *Dianthus chinensis* hajtásregenerációja 2-7 % közé esett.

A kapott regenerációs eredményeket a irodalomi adatokkall csak az ’Improved White Sim’ fajta esetén lehet összehasonlítani, a többi fajta esetén nincsenek szakirodalmi adatok. Az ’Improved White Sim’ fajta regenerációs eredményei 16-29% közé estek (VAN ALTVORST et al. 1995, ZUKER et al. 1999), amelyek azonosnak tekinthetők az általunk elért 25%-al.

Mivel több szerző (NUGENT et al. 1991, LU et al. 1991, FISCHER et al. 1993, MESSEGUER et al. 1993, NAKANO et al. 1994, MÁTRAI et al. 1995, VAN ALTVORST et al. 1996) is hatékonynak tartotta a sziromlevélből kiinduló hajtásregenerációt, sőt ’Improved White Sim’ fajta esetében NUGENT et al. (1991) 65-100%-os regenerációs eredményről számolt be, ezért a ‘Bíbor’ és IWS fajtákon

ezt a módszert is megvizsgáltuk. Az 1 mg/l BA, 0,2 mg/l NAA tartalmú MS táptalajra helyezett 300-300 darab ’Bíbor’ és ’Improved White Sim’ sziromlevelek a táptalajra helyezést követően három nap múlva megduzzadtak és antociános elszíneződést mutattak, majd ezután jelentek meg a zöld hajtások. A regenerált növények száma 2 volt (‘Bíbor’), azaz még az 0,1%-ot sem érte el. Ráadásul a regenerációs idő 14 hétig tartott (10. ábra), míg a levélből kiindulva 4-5 hét volt. NUGENT et al. (1991) eredményei erős genotípus függést mutattak. Voltak fajták, amelyek nem regeneráltak hajtásokat, de az általuk legjobb regenerációs eredményt adó IWS szegfű kísérleteink során nem regenerált hajtásokat, annak ellenére, hogy ugyanazon a táptalajon végeztük a regenerációs kísérleteket, mint NUGENT et al. (1991).

A kapott eredmények alapján a transzformációs rendszert levél explantumból kiindulva a jól regenerálódó ’Bíbor’ fajtára alkalmaztuk. A sziromlevélre alapozott transzformációt a gyenge regeneráció miatt nem végeztük el. Választásunk a két jól regenerálódó fajta közül azért esett a ’Bíborra’, mert ez magyar nemesítésű illatos fajta, mely a kísérletek indításakor köztermesztésben volt és a szakemberek (Tóth Endre Óbuda Kertészet) perspektívikusnak tartották.

4.2. NÖVÉNYTRANSZFORMÁCIÓS MÓDSZER ADAPTÁLÁSA

A transzformációra VAN ALTVORST et al. (1995) módszerét választottuk, de kipróbáltunk HORSCH et al. (1988) dohányra leírt módszerét is

Mindkét esetben 200-200 levelet használtunk fel és három ismétlésben hajtottuk végre az *Agrobacterium* fertőzést. A két transzformációs módszer között a különbség a fertőzési időben és az alkalmazott táptalajokban volt. A szegfű a HORSCH (1988) módszerében javasolt hosszú ideig tartó folyékony tápközegben való tenyésztést nem jól viselte, így ezt a módszert nem alkalmaztuk a

továbbiakban. Az eredmények a 7. táblázatban láthatóak. A két módszer hatékonysága közötti különbség Z próba alapján is szignifikáns (7. táblázat).

A két módszer közül VAN ALTVORST et al. (1995) módszerével mindhárom ismétlésben 3-szor annyi hajtást regeneráltunk a transzformációt követően, mint a HORSCH et al. (1988) által leírt protokollal. Az eredményekből az is kitűnt, hogy az antiszensz ACC konstrukcióval történő transzformációt követően a regeneráció hatékonysága 22%-ról (5. táblázat) 48 %-ra (7. táblázat) nőtt.

7. táblázat: A kétféle transzformációs módszer összehasonlítása: Az 1 mg/l BA és 0,2 mg/l NAA tartalmú MS táptalajra helyezett levelekből a fejlődő hajtások, gyökerek és kalluszok alapján és az eredmények statisztikai kiértékelése kétmintás Z próbával. Z*=1,96

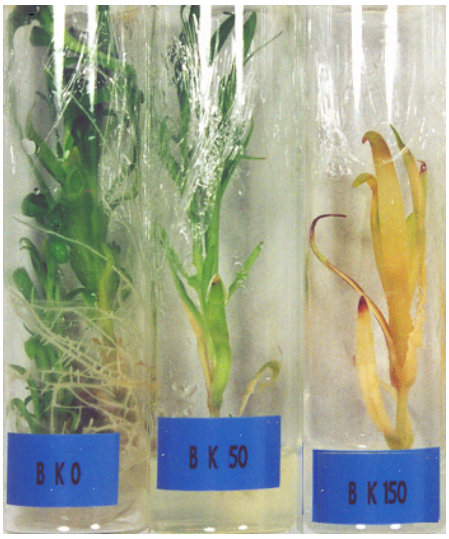
	Van Altvorst et al. (1995) módszere			Hoersch et al. (1988) módszere		
'Bíbor' levél	Gyökér (db)	Hajtás (db)	Kallusz (db)	Gyökér (db)	Hajtás (db)	Kallusz (db)
1 ismétlés (200 db)	30	82	42	2	24	22
2 ismétlés (200 db)	26	101	32	4	30	20
3 ismétlés (200 db)	30	105	34	4	24	24
Összes (600 db)	86	288	108	10	78	22
Regeneráció (%)	14	**48**	18	2	**13**	11
Szórás		**0,02**			**0,01**	
Z próba	**133,3**					

4.3. A TRANSZFORMÁCIÓ SIKERÉNEK BIZONYÍTÁSA

4.3.1. Szelekció kanamicin tartalmú táptalajon

Irodalmi adatok is bizonyítják (ESTOPÁ et al. 2001), hogy a szegfű más növényekhez képest nagyobb koncentrációban is elviseli a kanamicint, ezért koncentráció sorozatban a kezdeti 50 mg/l koncentrációt 150 mg/l-re növeltük (11.

ábra). Ez a kanamicin koncentráció a kontroll nem transzformáns egyedeknél már letálisnak bizonyult. A transzformációt követően kezdetben a stresszhatás csökkentése végett kevesebb, 50 mg/l koncentrációt alkalmaztunk, de a fejlődő hajtásokat 4 hetes koruktól már a végső, 150 mg/l kanamicin tartalmú táptalajon neveltük (12. ábra).



11. ábra: A transzgénikus növények szelekciójára alkalmazott letális kanamicin koncentráció megállípítása. A 150 mg/l kanamicin koncentráció már letálisnak bizonyult a kontroll növényekre.

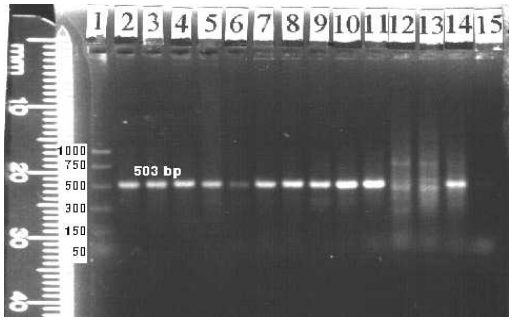
12. ábra: A 150 mg/l kanamicin koncentrációjú MS hajtásregeneráló táptalajon a nem transzformáns, az *npt* II gént nem hordozó 'Bíbor' növények zöld hajtásai kifehéredtek, míg a vélhetően transzformáns regeneránsok hajtásai zöldek maradtak.

4.3.2. Transzformáció sikerének bizonyítása molekuláris módszerekkel

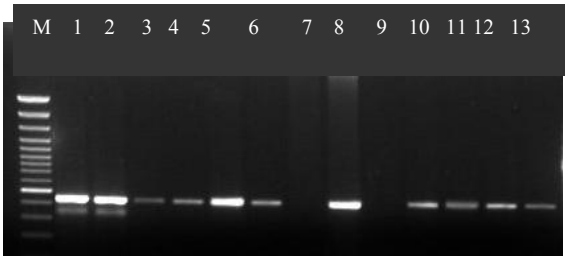
A transzgén integrációjának kimutatása céljából a transzgénikus, 150 mg/l kanamicin koncentrációjú szelektív táptalajon fejlődő zöld növények leveleiből izoláltunk DNS-t, majd az izolálást követően PCR reakciót indítottunk az *nptII* szekvenciára tervezett primerekkel, amely reakcióban az 503 bp méretű fragmentum jelezte a transzgén beépülését (13. ábra). A CaMV 35S promóter-

ACS-specifikus primerkombinációval végzett PCR reakció a vektor felépítése alapján egy 550 bp méretű fragmentumot szaporított fel (14. ábra). A kontroll és nem transzformáns növények esetében ezek a fragmentumok hiányoztak.

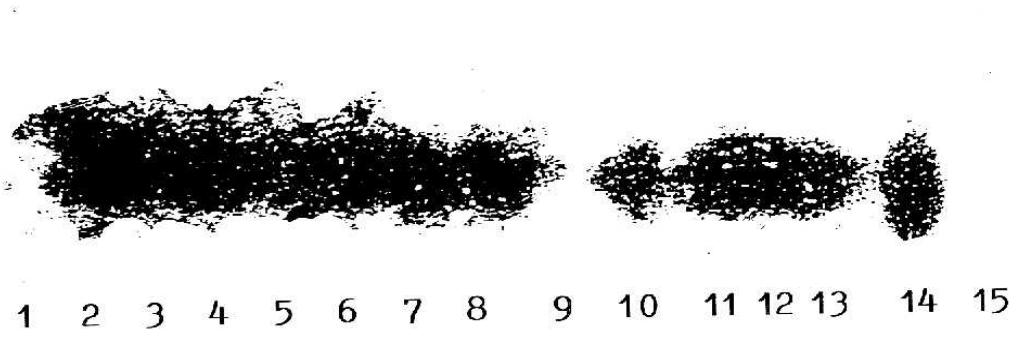
A PCR reakcióban pozitív eredményt adó egyedeket Southern hibridizációval teszteltük. A nem radioaktív (Digoxigenin) jelölésű, szigorú körülmények (68ºC) között végzett hibridizáció eredményét a 15. ábra mutatja. Az ábrán jól látható, hogy a 9. minta, bár PCR alapján pozitív eredményt adott (13. ábra), a hibridizáció alapján már nem tekinthető transzgénikus növénynek.



13. ábra: *npt*II specifikus primerekkel végzett PCR 1. molekulatömeg marker (PCR Markers, Promega) 2-14. antiszensz ACC-szintáz génnel transzformált Bíbor szegfű (353, 358, 359, 322, 316, 53, 34, 5, 320, 335, 57, 342, 65) 15. kontroll nem transzformált ’Bíbor’ (85) virág

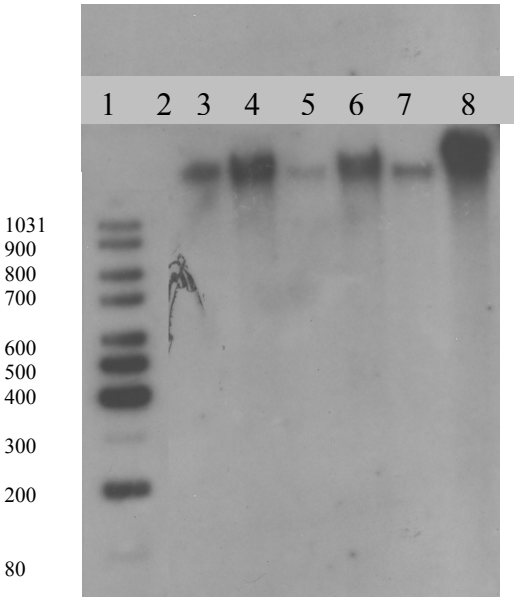


14. ábra: A CaMV 35S promóter ACS-specifikus primerkombinációval végzett PCR egy 450 bp méretű fragmentumot szaporított fel a (3-6, 8, 10-13 zsebekben), amelyekben az ACC antiszensz gént tartalmazó növényminták voltak (30, 359, 353, 29, 39, 57, 635, 345, 311), valamint a kontroll transzformációra használt plazmidban (1, 2 zseb). A kontroll nem transzgénikus egyedekben (10, 49), a (7,9 zsebekben) a fragmentum nem jelent meg. 1, 13 zsebekben, M: molekulatömeg marker (100- 3000 bp GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus, Fermentas) volt.



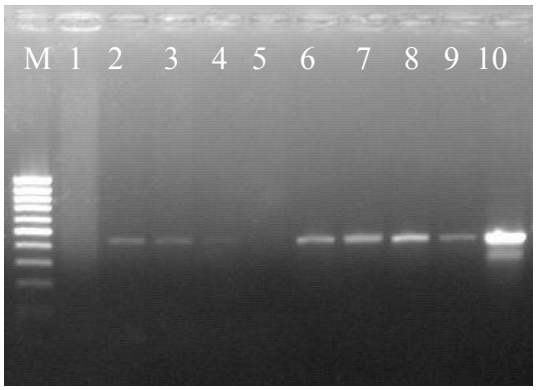
15. ábra: Southern hibridizáció nem radioaktív digoxigenin (DIG-UTP) jelöléssel. A próba DNS a pBI 121-es plazmidból emésztett *npt*II gén volt, a membránra Southern blottal az *npt*II specifikus próbával végzett PCR terméket vittük fel (13. ábra).

A radioaktív jelöléssel végzett hibridizáció eredményét a 16. ábra mutatja. A próba DNS-t a plazmiddal a CaMV 35S promóter- valamint ACS-specifikus primerekkel végzett PCR reakció terméke adta, a membránra a *Hind*III és *EcoR*I emésztett növényi DNS-eket vittük fel. A vektor felépítése és a hasítóhelyek alapján (3. ábra) egy 2500 bp méretű fragmentum adott hibridizációs jelet.

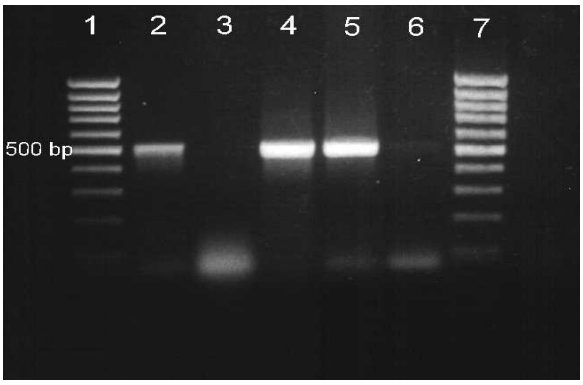


16.ábra: Növényminták emésztését (*Hind*III+ *EcoR*1) követő, radioaktív jelölésen alapuló genomiális Southern hibridizáció. 1: molekulatömeg marker (80-1031 bp GeneRuler™ 100 bp DNA ladder, Fermentas), 2. nem transzformált kontroll (KK) növény, 3-7: transzgénikus növények (358, 359, 53, 28, 322) 8: a transzformáció során alkalmazott plazmid (4. ábra).

Azt is vizsgáltuk, hogy a transzgénről történik-e átírás, tehát a gén RNS-szintű expressziója kimutatható-e. Ehhez RT-PCR módszert (3.7 fejezet) alkalmaztunk. Az mRNS-t levélből izoláltuk a DYNAL leírása alapján (3.6 fejezet). A 18. ábrán látható az *nptII* gén transzkripcióját bizonyító 503 bp méretű fragmentum felszaporodása. Az is látszik, hogy a PCR reakcióval és hibridizációval pozitív eredményt adó transzgénikus egyedek (2, 6) nem azonos mértékű génexpressziót mutatnak. Az RT-PCR reakciót elvégeztük ACC és CaMV 35S specifikus primerekkel is, amely során a várt 450 kb méretű fragmentum felszaporodott (17. ábra)



17. ábra: RT-PCR transzgénikus ’Bíbor’ szegfűből izolált mRNS-el. M: molekulatömeg marker (80-1031 bp GeneRuler™ 100 bp DNA ladder, Fermentas), 1-9 ’Bíbor’ szegfű minták (53, 29, 30, 72, 14, 322, 535, 358, 359 a 2. melléklet alapján),10: pBI 121-es plazmid DNS CaMV 35S promóter és ACC génspecifikus primerekkel végzett reakció terméke



18. ábra: RT-PCR transzgénikus ’Bíbor’ szegfűből izolált mRNS-el. 1,7. DNS molekulatömeg marker (80-1031 bp GeneRuler™ 100 bp DNA ladder, Fermentas). 2,6 transzformált ’Bíbor’ szegfű (312, 359) 3. kontroll (nem transzformált) szegfű, 4,5. a pBI 121-es plazmid DNS *nptII* génspecifikus primerekkel végzett reakció terméke

A molekuláris módszerekkel bizonyítottan transzgénikus egyedeket az Óbuda Kertészet üvegházába ültettük ki. Az akklimatizálást a növények jól tűrték, a kihalt növények aránya 1 %-nál kevesebb volt.

4.4 A TRANSZGÉNIKUS NÖVÉNYEK VIZSGÁLATA

4.4.1 A transzgén hatása a növényregenerációra

A fajtakiválasztásra irányuló hajtásregenerációs kísérletek eredményeinek és a 'Bíbor' fajta ACC-szintáz antiszensz konstrukcióval transzformált növények regenerációs adatainak összehasonlítása során kitűnt, hogy az utóbbiak 2-szer nagyobb hatékonysággal regeneráltak hajtásokat (7. táblázat).

Hogy a hajtásregeneráció hatékonyságának növekedése és az etilénbioszintézis gátlása közötti összefüggést bizonyítsuk, a hajtásregeneráló képesség vizsgálatához az antiszensz ACC-szintáz génnel transzformált növényeken kívül, más konstrukciókkal transzformált 'Bíbor' növényeket is bevontunk. Az eredményeket a 8. táblázat szemlélteti. Az ábrán látható, hogy a transzformációt követően a 1 mg/l BA-t és 0,2 mg/l NAA-t tartalmazó MS táptalajon, a tanszéken előállított szénhidrát bioszintézisében módosított transzgénikus szegfű (Fru-2,6-P2-áz, 6-PF-2-K), a tehénbab tripszininhibítorral (pCpTi), és az *E. coli* β-D-glükuronidáz génnel (GUS) transzformált szegfű növények hajtásregenerációja a kontroll nem transzformált növényekével azonos volt (22-25,5 %), míg az antiszensz ACC-szintáz génnel transzformáltak (mintaszámok az 2.1 melléklet alapján: 6, 53, 68, 322, 334, 357, 358, 359, 633, 635) szignifikánsan nagyobb, 49% volt a regenerált hajtások száma (9. táblázat).

Az ACC antiszensz gén egyik megfigyelhető hatása tehát a hajtásregenerációs százalék növekedése volt, ami összhangban van azokkal az eredményekkel, amelyek szerint az etilén inhibítorok alkalmazásával csökkentve az etilén mennyiségét (PURNHAUSER et al. 1987, ENG-CHONG és LEE 1994) nő a

hajtásregeneráció. AMOR et al. (1998) antiszensz ACC-oxidáz génnel transzformált sárgadinnye növényeknél szintén tapasztalta a transzgénikus egyedek hajtásregenerációjának javulását, ami 10%-ról 55%-ra nőtt. Az eredményeink viszont ellentmondanak IWAZAKI és munkatársai (2004) megfigyeléseinek. Az általuk antiszensz és szensz ACC szintáz génnel transzformált szegfű növényeknél a hajtásregeneráció csökkenését tapasztalták. A transzformációt követő regeneráció esetükben nagyon alacsony, 0,4% volt. Etilén inhibítorként az ezüst tioszulfát táptalajba adagolásával szintén megnövekedett hajtásregenerációt kaptak különböző növényeknél (ORLIKOWSKA et al. 1996, ORLIKOWSKA 1996, FARIA és SEGURA 1997, MOHIUDDIN et al. 1997, LAI et al. 1998, ZOBAYED et al. 1999, NAIK és CHAND 2003, XIAOHAN et al. 2003, OUMA et al. 2004, TURHAN 2004, YANG et al. 2004, AYLIN et al. 2005, GONG et al. 2005, TREVISON et al. 2005).

Az *in vitro* tenyészetekben nem mértük ugyan az etilén termelését, de a későbbiekben a már virágzó növények esetében tapasztaltuk, hogy a transzgén sok egyedben redukált etilén termelést okozott. GALLI (2004) kimutatta, hogy ugyanezzel a konstrukcióval transzformált McIntosh alma gyümölcsökben detektált csökkent etiléntermelés korrelációban volt a regenerált transzgénikus hajtások etiléntermelésével.

A hajtásregeneráció növekedése lerövidíti a kereskedelmi értékesítésre alkalmas növények előállításának idejét.

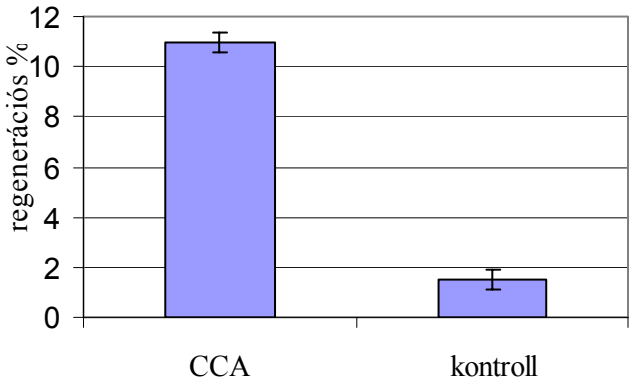
A mikroszaporítás során hormonmentes táptalajon a hormon okozta vitrifikáció kiküszöbölhető és egészségesebb hajtások fejlődnek. Ezért megvizsgáltuk a regeneráció alakulását hormonmentes MS táptalajon is, amelyen a regenerációs különbség hétszeres volt a kontroll és az antiszensz ACC-szintáz génnel transzformált növények között (19. ábra).

8. táblázat: A transzformáció hatása a levélexplantumokból kiinduló hajtásregenerációra 8 héttel az 1mg/l BA-t és 0,2 mg/l NAA-t tartalmazó MS táptalajra helyezést követően.
(CCA= ACC antiszensz, GUS= *E. coli* β-D-glükuronidáz, pCpTi = tehénbab tripszininhibítor génnel transzformált növények, Fru-2,6-P2-áz = fruktóz termelésben módosított transzgénikus, 6-PF-2-K= keményítő termelésben módosított transzgénikus 'Bíbor', növények

Minta	**Regeneráció %**	Szórás
CCA	**49**	7,2
GUS	**25**	2,6
Kontroll	**24**	2,5
pCpTi	**22**	2,3
Fru-2,6-P2-áz	**23**	2,7
6-PF-2-K	**26**	2,2

9. táblázat: A hajtásregeneráció statisztikai kiértékelése kétmintás Z próbával Z*=1,96
(CCA= ACC antiszensz, GUS= *E. coli* β-D-glükuronidáz, pCpTi = tehénbab tripszininhibítor génnel transzformált növények, Fru-2,6-P2-áz = fruktóz termelésben módosított transzgénikus, 6-PF-2-K= keményítő termelésben módosított transzgénikus 'Bíbor', növények

	CCA	GUS	kontroll	pCpTi	Fru-2.6-P2-áz	6-PF-2-K
CCA		5,43	5,69	6,19	5,86	5,41
GUS			0,49	1,50	0,92	0,25
Kontroll				1,02	0,47	0,41
pCpTi					0,49	1,09
Fru-2,6-P2-áz						1,24
6-PF-2-K						



	Transz génikus	kontroll
levél (db)	900	300
regenerációs %	11	1,5

SZD1%=6,4

19. ábra: A transzgénikus és a kontroll növények hajtásregenerációjának eredménye hormonmentes MS táptalajon.

4.4.2. A transzgén hatása a vázaélettartamra

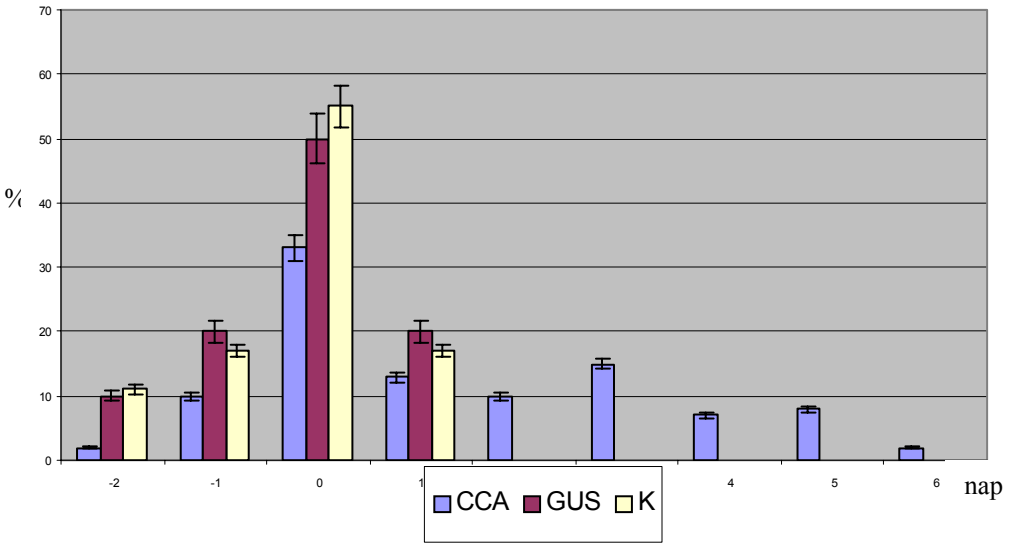
Az üvegházban nevelt növények tömeges virágzási ideje június, július augusztus hónap volt, amikor 4 hetente újabb virágzási ciklus követte egymást. Az utolsó virágzási ciklus október végén volt. A transzgénikus virágok szerkezete, mérete színe és illata a kertészeti kontrollal (KK) megegyező volt (20. ábra).

Minden növényt egyedileg bíráltunk (22., 23. ábra) és minden egyes növényre legalább 3 vázaélettartamot mértünk. Azokat a növényeket, amelyeknek nem volt legalább 3 mért virágzási adata kizártuk az értékelésből. Az adatokat növényekre külön lebontva a 2.1 melléklet tartalmazza.

20. ábra: Az Óbuda Kertészet üvegházába kiültetett transzgénikus (a) 'Bíbor' virágok fenotípusa azonos a kertészeti kontrolléval (b).

A vázaélettartamot reprezentáló relatív értékeket a 21. ábra szemlélteti. A 'K' oszlopban azok a növények szerepelnek, amelyek az *Agrobacterium* fertőzést kivéve minden transzformációs lépésen átestek (K). Ebben a csoportban a növények 55 %-ának vázaélettartama azonos volt a kertészeti kontrolléval (KK), 18%-ának 1 nappal meghosszabbodott a vázaélettartama, 18%-a illetve 9%-a 1 illetve 2 nappal előbb elhervadt, mint a kertészeti kontroll.

A 'GUS' oszlopban azoknak a növényeknek a relatív értékei vannak, amelyek *E. coli* β-D-glükuronidáz gént tartalmazó vektorral lettek transzformálva. Ebben a csoportban a vázaélettartam ugyanúgy és ugyanolyan százalékos megoszlásban alakult, mint a 'K' csoportnál, az eloszlás azonos volt, amit a „t" próba is igazolt (21. ábra).



	egyedszám	átlag	szórás
CCAa	62	-0,03	0,69
CCAb	41	3,38	1,01
GUS	21	-0,13	0,77
K	17	-0,17	0,84

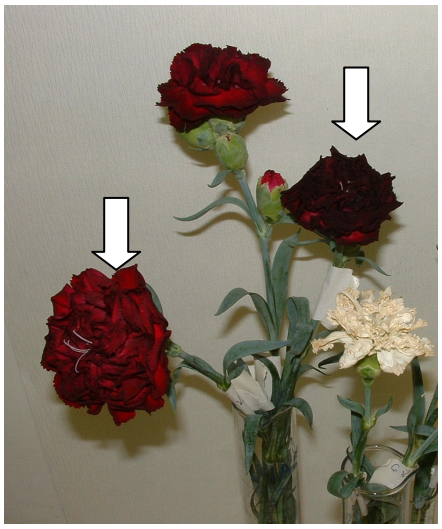
t*=2,326 t(K,GUS)= 1,98 ; t(K,CCAa)=0,927; t(K,CCAb)=23,08

21. ábra: A 'Bíbor' szegfű növények vázaélettartamának eredményei, és statisztikai kiértékelése kétmintás t próba alapján.
A 'K' oszlop az *Agrobacterium*-os fertőzést kivéve a transzformáció lépésein átesett növények vázaélettartamának relatív értékét, a 'CCA' oszlop az ACC-szintáz génnel transzformált, a 'GUS' oszlop, pedig a *E. coli* β-D-glükuronidáz génnel transzformált szegfűk relatív értékeit mutatja . A 'CCAa' a vázaélettartamban nem módosult, a 'CCAb' a vázaélettartamban meghosszabbodott transzgénikus növények csoportja.

A 'CCA' oszlopban az ACC antiszensz génnel transzformált növények eredménye figyelhető meg. Itt a 103 vizsgált növény átlaga látható. Két különböző csoport különíthető el: a 'CCAa' csoport vázaélettartama megegyezik a 'K' és 'GUS' csoportéval a 'CCAb' csoportba tartozó virágok vázaélettartama 2 naptól 6

napig is meghosszabbodott. Nem volt olyan virágot, amely 2 nappal előbb hervadt volna el, viszont 2 olyan virágot azonosítottunk, amelynek vázaélettartama 6 nappal hosszabb volt (21. ábra). A CCA transzgénikus növényeknél két fő átlagot kaptunk (21. ábra). Az első megegyezik az ’K’ és ’GUS’ csoport átlagával és az eloszlásuk is hasonló. A statisztikai t próba alapján a ’CCAa’ csoport nem különbözik a ’K’ és ’GUS’ csoporttól, a ’CCAb’ csoport viszont eltér (21. ábra), miután csak a ’K’ és a ’CCAb’ csoport közötti statisztikai t érték haladta meg a szignifikáns t* értéket (2,326). Ebben a csoportban találhatóak, azok a transzgénikus növények, amelyekben a transzgén beépülése és működése a vázaélettartamot befolyásolta.

A kérdést, hogy a megnövekedett vázaélettartam valóban a csökkentett etiléntermelésnek köszönhető-e, az etilén-termelés mérésével lehetett megválaszolni (4.4.3 fejezet).



22. ábra: A vázaélettartam vizsgálata:
A nem transzformált virágok a 10. napon már elhervadtak, de a transzgénikusak még nem mutatják a hervadás tüneteit

23. ábra: A virágok hervadásának összehasonlítása a 9. napon
Az 1,2,3, kontroll (KK), 4,5 GUS génnel transzformált növények virágai, 6,7 CCA génnel transzformált növények virágai.

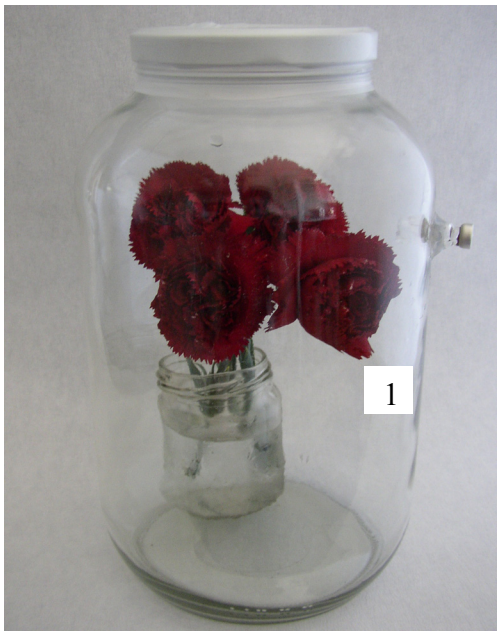
A vázaélettartam növelésére kapott maximum 6 nap az irodalmi adatokkal összevetve, a relatív értékek alapján azonos szintű az antiszensz ACC-oxidáz génnel transzformált szegfűkével (SAVIN et al. 1995), HASSAN és GERZSON (2002) 1-MCP kezeléssel, és antiszensz és szensz ACC szintáz génnel transzformált növényeknél (IWAZAKI et al. 2004) elért eredményeivel. A vázaélettartam adatok összehasonlításánál fontos körülmény az alkalmazott hőmérséklet. HASSAN és GERZSON (2002), IWAZAKI et al. (2004) és SAVIN et al. (1995) szobahőmérsékleten vizsgálta a virágzási időket. BOVY et al. (1999) eredményei nem teljesen egyértelműek. Ugyanolyan koncentrációjú 1-MCP kezelésre, mint HASSAN és GERZSON (2002), jóval hosszabb vázaélettartamot kaptak, ráadásul a kontroll növények virágzása is nagyon hosszú ideig tartott (20nap). Mi a 4 év alatt egyszer sem tapasztaltunk ilyen hosszú vázaélettartamot. A kontroll növények vázában való eltarthatósága február, március és október hónapban volt a leghosszabb, ami 12-13 napot jelentett. BOVY et al. (1999) kísérletében az *Arabidopsis* etr 1-1 allélal végzett transzformáció után a transzformánsok 13 nappal hosszabb ideig virágoztak, mint a kontroll, ami azt jelenti hogy 26 napig nem hervadtak el. Ilyen hosszú idő alatt már a szegfű szára is elrohadt a mi kísérleteinkben. BOVY et al. 1999 az azonos stádiumban szedett virágok esetében kapta ezt a hosszú vázaélettartamot, amit csak akkor lehet tapasztalni, ha hűtve tároljuk a virágokat. Ugyanez vonatkozik ONAZAKI et al. (2001) eredményeire is.

A 2. táblázatban különböző az etilén hatásának csökkentésére irányuló módszerek és az így kapott vázaélettartam adatok vannak összefoglalva. Az adatok bizonyítják, hogy az 1-MCP kezeléshez, a szegfű ACC-oxidázzal történő és a szegfű szensz és antiszensz ACC szintáz génnel történő transzformációhoz hasonló az általunk alkalmazott az etilén gátlását célzó módszer. A Florigen nem közölt adatokat arra vonatkozólag, hogy a szabadalomban leírt 12 nappal hosszabb vázaéletű szegfűt milyen körülmények között vizsgálták, és milyen állapotban szedték a virágokat. Így nem lehet egyértelműen összehasonlítani a mi

eredményeinkkel. A tapasztalataink alapján valószínűleg hűtve tárolva vizsgálták a vázaélettartamot.

4.4.3. A transzgénikus növények etilén termelésének vizsgálata

Az etiléntermelés mennyiségi meghatározására olyan tövekről szedtünk virágokat, amelyeknek a vázaélettartam mérési adatai rendelkezésre álltak (K, CCAa, CCAb, GUS csoportok). A kezdeti mérések alapján nagyon csekély mennyiségű pl/g/h etilént tudtunk kimutatni, emiatt az eredményeket nem lehetett megbízhatóan kiértékelni.



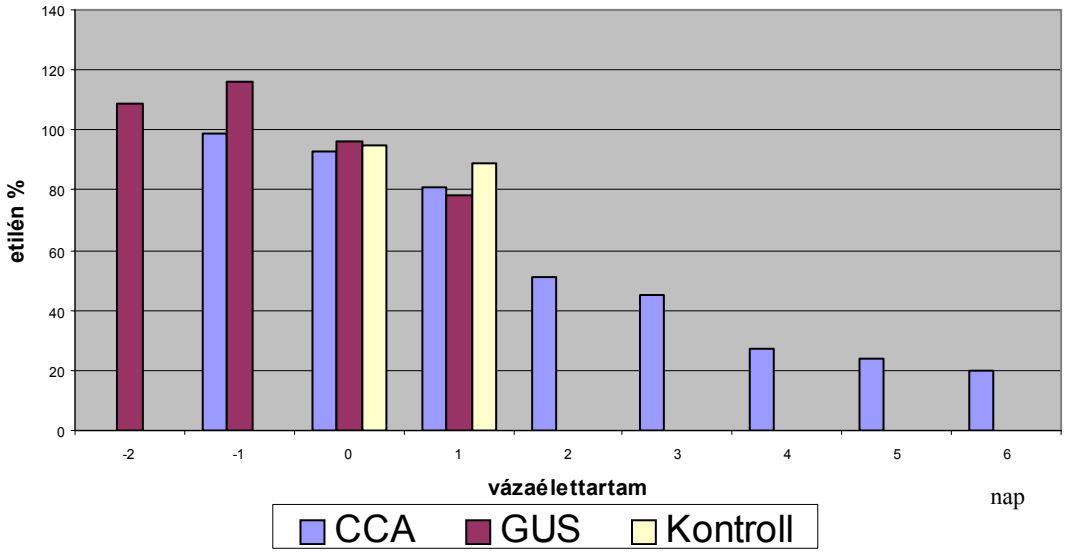
24. ábra: Speciális gumiszeptummal ellátott edényekbe helyezett 'Bíbor' növények. Az etilént injekciós tűvel a gumiszelepen keresztül fecskendeztük be az edénybe. A képen a befecskendezés előtti állapotban láthatók a virágok.

25. ábra: Bíbor virágok a 24 órás etilénes inkubáció után. Látható, hogy a nem transzgénikus virágok hervadni kezdenek (1,2).

Irodalmi adatok szerint (JONES és WOODSON 1999/b, MANNING 1985) 1-MCP, metionin, ACC vagy etilén gáz adagolás hatására már nl/g/h tartományban mérhető a termelt etilén gáz a szegfű esetében. Ezért a kísérletek során a speciális edényekbe (24. ábra) 1% etilén gázt adagoltunk Az exogén etilén hatására megindult az autokatalitikus etilén gáz termelés. Ezt követően szemmel láthatóan felgyorsult a virágok öregedése, és megfigyelhető volt, hogy a transzgénikus növények hervadása nem, vagy csak kisebb mértékben következett be (25. ábra).

A mérés több éven keresztül tartott a szegfűk virágzási periódusainak megfelelően. Emiatt a méréshez nem tudtunk standard körülményeket biztosítani, így a termelt etilén mennyisége a külső környezeti tényezők miatt (hőmérséklet, fényviszonyok) eltérő volt, így különböző mérési időpontok adatait nem lehetett egymással összevetni. Az értékek számításánál a kertészeti kontroll (KK) által termelt etilén mennyiségét vettük 100%-nak, és ehhez számítottuk a többi minta termelt etilénmennyiségét (2.2 melléklet). Minden egyes mérési eseménynél az abban az időpontban mért kertészeti kontroll (KK) értéke volt a viszonyítási alap. Az eredményeket a vázaélettartam mérések során kialakított csoportok (K, CCA, GUS) szerint is értékeltük. A termelt etilén mennyiség megoszlását a vázaélettartam alapján a 26. ábra mutatja.

A vázaélettartamuk alapján ’K’ csoportba tartozó virágok etiléntermelése a kontroll (KK) virágokhoz képest átlagosan 92±6,9%, a ’GUS’ csoporté 99±16,9%, a ’CCA’ csoporté 55±27% (26. ábra). A 4.4.3/3. ábrán látható, hogy a termelt etilén mennyiség alapján is két részre bontható a ’CCA’ csoport, amit a statisztikai értékelés (10. táblázat) is bizonyít. Azok a virágok, amelyek vázaélettartama 6 nap csak átlagosan 20% etilént termeltek.



Csoportok a vázaélettartam alapján	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	Átlag	Minta-szám	Szórás
CCA		99	93	81	51	45	27	24	20	55	111	27,0
GUS	109	116	96	78						99	10	16,9
Kontroll			95	89						92	8	6,9
$Z_{K, CCA}$=10.45	$Z_{K,GUS}$=1.32			$Z_{K,GUS}$=7.5								

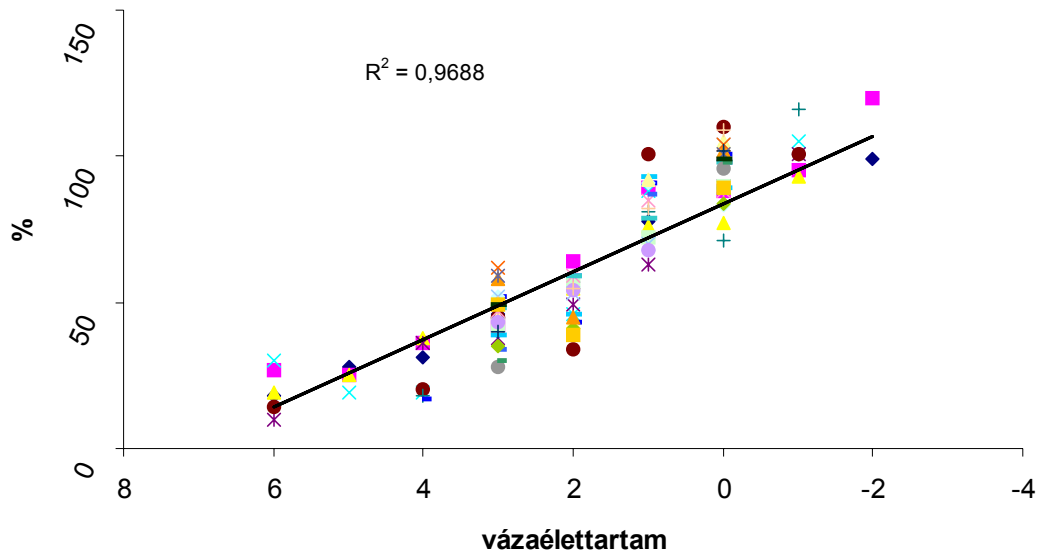
26. ábra: A különböző vázaélettartam alapján kialakított csoportok (CCA, GUS, K) etiléntermelése a kertészeti kontroll (KK) %-ban, statisztikai kiértékekléssel. Z*=1,96
Kontroll= Az *Agrobacterium*-os fertőzést kívéve a transzformáció lépésein átesett növények
CCA= Antiszensz ACC-szintáz gént tartalmazó transzgénikus növények

10. táblázat: Az etiléntermelés statisztikai kiértékelése a különböző vázaélettartamokhoz tartozó átlagos etilén termelés a kontroll (KK) %-ában és a vázaélettartam alapján Z próbával. Z*=1,96

Vázaélettartam	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6
Átlagos etiléntermelés a kontroll (KK) %-ában	109	102	95	83	51	45	27	24	20
Szórás	14,8	6,5	9,5	10	7,9	8,2	8,9	3,8	7,6
n	2	7	27	18	21	27	8	4	6

	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6
6	8,2	20,7	20,8	16,2	8,7	7,2	1,6	1,1	
5	19,2	25,1	26,9	19,5	10,5	8,5	0,8		
4	7,5	18,8	18,7	14,2	6,7	5,1			
3	6,0	19,5	20,7	13,4	2,57				
2	5,5	17,0	17,5	10,9					
1	2,4	5,6	4,0						
0	1,3	2,2							
-1	0,65								
-2									

A 27. ábra a vázaélettartam és a termelt etilén mennyisége közötti korrelációt mutatja. Az ábra is alátámasztja, hogy a csökkent etiléntermelés hosszabb vázaélettartammal jár, és hogy minél kevesebb etilént termelt a virág, annál hosszabb volt a vázaélettartama.



27. ábra: A különböző relatív vázaélettartam (-2-től 6-ig) és a kertészeti kontroll (KK) százalékában kiszámított etilén termelés közötti korreláció. (Az értékek a 2.1 és 2.2 mellékletből származnak.)

4.4.4. A virágok szártörési eredményei

A szegfű nevelése, ápolása és szállítása során sokszor van kitéve olyan mechanikai hatásoknak, amelyek a nóduszoknál törést okozva csökkentik a virághozamot. Ezért a szegfűk egyik fontos értékmérő tulajdonsága hogy a növények szártörésre ne legyenek hajlamosak. E tulajdonság objektív értékelésére nem áll rendelkezésre módszer. A szártörést úgy vizsgálják, hogy fejjel lefele megrázzák a virágokat (Tóth Endre szóbeli közlés). Ha a szára eltört, akkor törésre hajlamos a fajta. A 'Bíbor' is ilyen szártörésre hajlamos fajta.

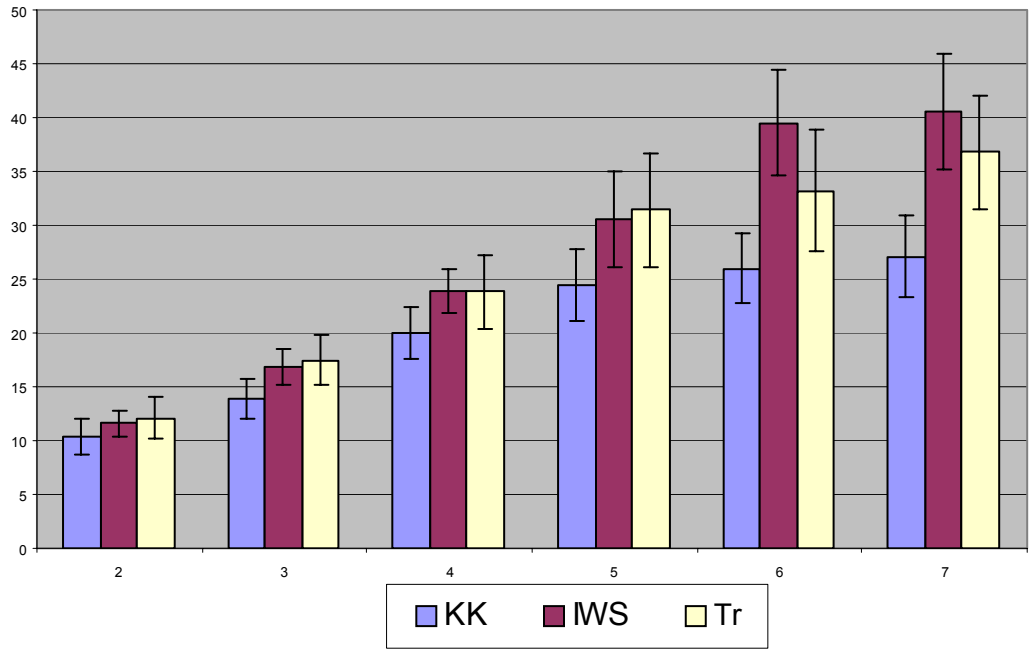
A szegfű növényeink ápolása és a mintavételek közben azt tapasztaltuk, hogy az etilénbioszintézisben módosított transzgénikus növények szára kevésbé törik, mint a nem transzformált növényeké. Ezért törési próbát végeztünk a

növényeken a Szent István Egyetem Gépészmérnöki Karának Mechanika Tanszékén. Egy eredetileg mechanikai szakítószilárdságot mérő gépet alakítottak át a szártörés mérésére. Az EU által előírt szabvány meghatározza a virág feje és az 5. nódusz távolságát. Ez azért fontos, mert a virágokat a 6. nódusz táján vágják le. A kereskedők a hosszú szárat részesítik előnyben, így ha rövidek az íztagok, akkor a távolság is kicsi, vagyis a vágott virág szára túl rövid lesz. Arra sem találtunk információt, hogy az egyes nóduszok törési tulajdonságai különböznek-e. Tapasztalataink alapján a 3., 4. és 5. nódusznál törtek a növények az ápolása és a mintavétel során. Ezért a minták törését a 2. nódusztól kezdtük és a 6. nóduszig folytattuk. Minden egyes nódusznál megmértük azt az erőt Newtonban, ami ahhoz kell, hogy a nóduszra kifejtett merőleges erő eltörje a szárat. A nódusz átmérője és a törésre való hajlamosság között nem tudtunk korrelációt kimutatni. A vastagabb nódusz jobban tűrte a törést, de a túl vastag már törékenyebbnek bizonyult.

A törési kísérletekben a törésre nem hajlamos 'Improved White Sim' fajtát (IWS), az ACC-szintáz antiszensz génnel transzformált (CCA), és a kertészeti kontroll (KK) fajtát vizsgáltuk. Az eredmények a 28. ábrán láthatók.

11. táblázat: A szártörési adatok statisztikai kiértékelése.
Minden egyes nódusznál kiszámítottuk a Z értékeket, mindhárom minta (KK= 'Bíbor' kertészeti kontroll. IWS= 'Improved White Sim' kertészeti kontroll, TR= 'Bíbor' antiszensz ACC génnel transzformált növények) alapján

Minta	2. nódusz			3. nódusz			4. nódusz			5. nódusz			6. nódusz			7. nódusz		
	KK	IWS	TR	KK	IWS	TR	KK	IWS	TR	KK	IWS	TR	KK	IWS	TR	KK	IWS	TR
(KK)		1,3	2,3		2,1	4,1		2,1	2,9		8,5	3,9		4,0	3,9		3,6	4,9
IWS			0,5			0,6			0,3			0,3			1,8			1,0
TR																		
Z*=1,96																		



	2.nódusz			3.nódusz			4.nódusz			5.nódusz			6.nódusz			7.nódusz		
	X	n	s	X	n	s	X	n	s	X	n	s	X	n	s	X	n	s
Kontroll (KK)	10,3	28	3,3	13,9	28	3,6	20,0	26	4,9	24,4	28	6,6	26,0	28	6,4	27,1	28	7,6
IWS	11,6	10	2,5	16,8	10	3,3	23,4	10	4,0	30,5	10	8,9	39,5	10	9,8	40,5	10	10,8
Transzgé-nikus	12,1	67	3,8	17,5	66	4,5	23,8	65	7,1	31,4	66	10,6	33,2	65	11,2	36,8	59	10,6

28. ábra: A szártörés eredményei a különböző szegfűk (KK= ‘Bíbor’ kertészeti kontroll. IWS= ‘Improved White Sim’ kertészeti kontroll, Tr= ‘Bíbor’ antiszensz ACC-szintázzal transzformált transzgénikus növények) 2-7 nóduszainál. (X= átlagos szártörés Newtonban, n= eltört nódusz sorszáma, s=szórás)

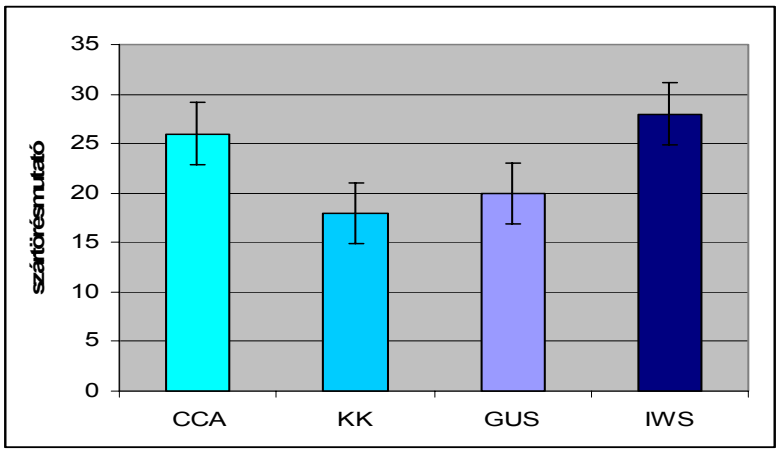
Az ACC- szintáz antiszensz génnel transzformált szegfűk szártörése minden nódusznál szignifikánsan meghaladta a kertészeti kontroll (KK) 'Bíbor' virágokét (13. táblázat), vagyis az ACC génnel történő transzformáció eredményekén az egyébként szártörésre hajlamos fajta szárszilárdsága javult. A törésre nem hajlamos IWS szegfűk szártörése és az antiszensz ACC- szintáz génnel transzformált szegfűk szártörése között szignifikáns különbség nem mutatható ki egyik nódusznál sem (11. táblázat).

13 olyan növényt azonosítottunk, amelyek minden egyes nódusznál meghaladták a transzgénikus növények átlagát. 14 olyan növény volt, amelyek nem mindegyik nódusznál érték el a transzgénikus átlagot, de a kontroll átlagát meghaladták. 7 olyan növényt azonosítottunk, amelyek egyik nódusznál sem érték el a kertészeti kontroll átlagát (2.3 melléklet).

Az eredmények összehasonlíthatóságáért bevezettünk egy úgynevezett szártörés mutatót. A szártörés mutatót a növény minden egyes nóduszánál mért törési értékek átlaga adta. Az antiszensz ACC szintáz génnel transzformált növények (CCA), a Kertészeti kontroll növények (KK), a GUS génnel transzformált növények (GUS) és a törésre nem hajlamos 'Improved White Sim' (IWS) növények szártörésmutatóinak átlagát összehasonlítva (29. ábra) statisztikailag kimutatható a CCA növények fölénye a KK és GUS csoporttal szemben, míg az IWS és CCA növények között nincs szignifikáns különbség. A CCA transzgénikus 'Bíbor' és az IWS a szártörésmutató mutató alapján is azonosnak tekinthető, ugyanúgy, mint azt nóduszonkénti eredmények is mutatják (28. ábra).

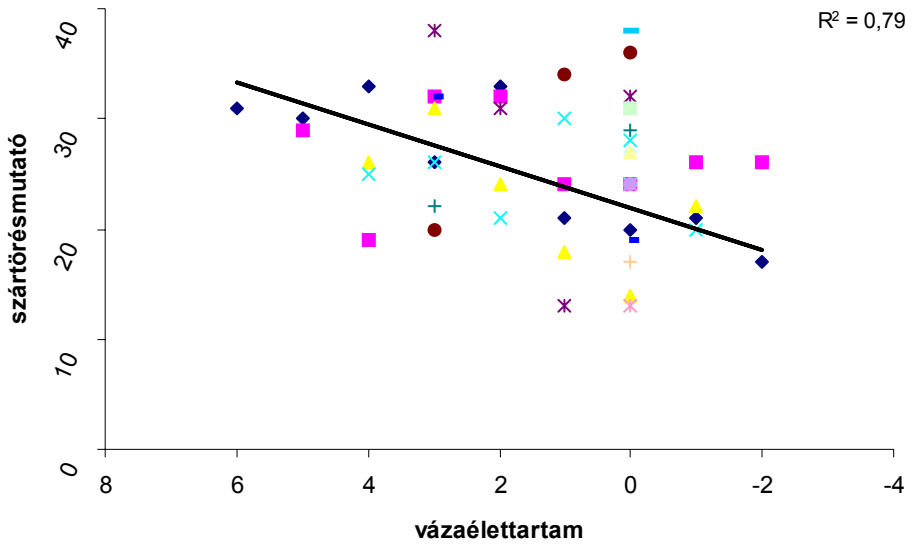
Megvizsgáltuk a vázaélettartam és a szártörés közötti összefüggést (30. ábra). Az eredmények alapján a szártörésmutató és a vázaélettartam között a korreláció: R^2= 0,79. A szártörésmutató és az etiléntermelés között a korreláció: R^2= 0,45 (31. ábra).

Három olyan növényt azonosítottunk, amelyek mind a három vizsgált tulajdonság alapján (vázaélettartam, etiléntermelés, szártörésmutató) kiemelkedő eredményt értek el (12. táblázat).

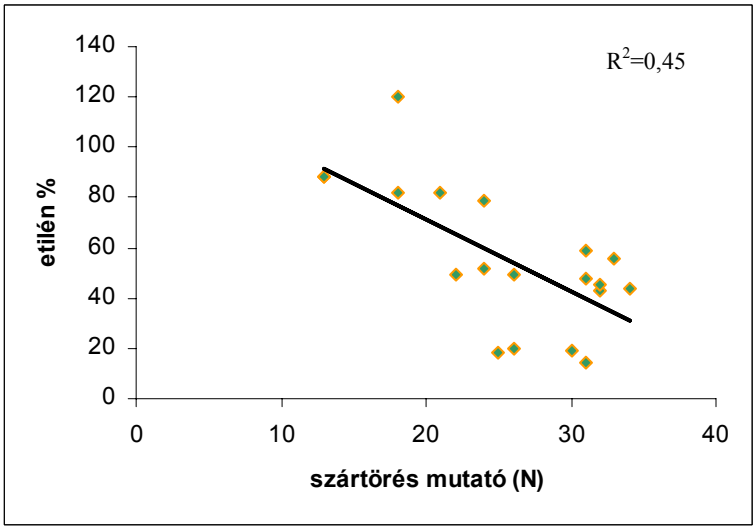


	Átlag	Szórás		CCA	KK	GUS	IWS
CCA	26	6,3	CCA		4,1	2,1	0,5
KK	20	4,0	KK			0,7	2,4
GUS	18	4,5	GUS				2,0
IWS	28	5,2	IWS				

29. ábra: A növények (CCA, KK, GUS, IWS) szártörés mutatójának kiértékelés és statisztikai próbája. Z= 1,96.



30. ábra: A szártörésmutató és a vázaélettartam közötti összefüggés. Az adatok a 2.4 mellékletből származnak.



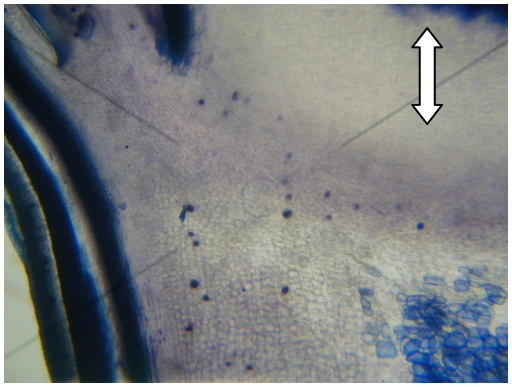
31. ábra: A szártörésmutató és a vázaélettartam közötti összefüggés. Az adatokat a 2.4 melléklet szolgáltatta.

12. táblázat: A vázaélettartam, az tiléntermelés, és a szártörésmutató eredményei alapján legjobb teljesítményt adó ACC antiszensz génnel transzformált növények. (szám a 2.1 melléklet alapján)

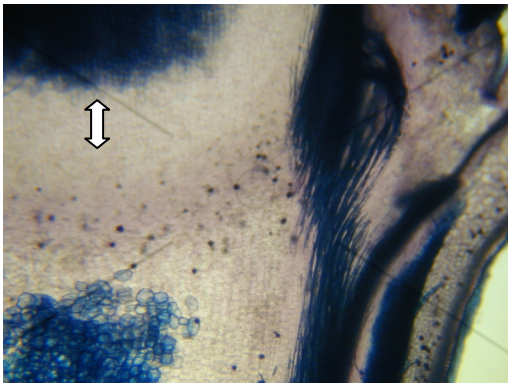
A növény száma	Vázaélettartam	Etiléntermelés	Szártörésmutató
57	3	45	32
358	6	14	31
359	3	60	32

4.4.5. A szárak szövettani vizsgálata

Kerestük a választ, hogy mi okozhatja a transzgénikus növények szártörésének javulását. Ezért szövettani vizsgálatokat végeztettünk. A 31. és 32. ábrán látható egy kontroll és egy transzgénikus növény metszetének képe. Mindkét mintánál a nódusz aljánál diafragma van, ahol a centrális helyzetű, nagyobb méretű bélparenchima sejtek csoportja (itt kékre festődtek) megszakad. A diafragma alsó harmadánál apró, szinte merisztematikus sejtekre jellemző méretet mutató sejtek rétege van horizontálisan. A transzformált növényben ennek festődése kissé intenzívebb. Ez az a sejtréteg, ahol a törés bekövetkezhet. A központi henger perifériális részén két masszívan festődő szövettáj van: 1. xilem, 2. a floemen kívül elhelyezkedő szklerenchima-rost réteg a periciklus helyén. Ez utóbbi jellegzetesen megtalálható a szegfűféléknél. A transzformált növényekben, a fent említett két szövettáj vastagabb. Ez indokolja a kevésbé törékeny jelleget, de hogy ez milyen összefüggésben van a redukált etiléntermeléssel nem tudjuk megmagyarázni.



31. ábra: az ACC antiszensz génnel transzformált szegfű (358) szárának metszete a 4. nódusznál.



32. ábra: kontroll szegfű (KK) szárának metszete a 4. nódusznál.

4.5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1) A szegfűben az etilénbioszintézis molekuláris gátlását almából származó antiszensz ACC-szintáz (CCA) génnel történő transzformációval értük el.
2) Kimutattuk, hogy az etiléntermelés gátlása a CCA transzgénikus virágokban egyedi variabilitást mutatott.
3) Bizonyítottuk, hogy a transzgénikus növények levélből kiinduló hajtásregenerációs képessége kétszerese, mint a nem transzgénikus növényeké és ezt a hatását nem a transzformációs eljárás, hanem az etiléntermelés csökkenése okozta.
4) Kimutattuk, hogy az etilénbioszintézis módosítása növelte a ’Bíbor’ virágok vázaélettartamát akár 6 nappal is, és a megnövekedett vázaélettartam szoros, negatív korrelációban volt a termelt etilén mennyiségével (R^2 =0,96).
5) Bizonyítottuk, hogy a transzgénikus növények szárszilárdsága javult. A szártörés javulása korrelációban volt a vázaélettartammal ((R^2 = 0,79), és negatív korrelációban (R^2 = 0,45) az etiléntermeléssel.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A szegfű etilénbioszintézisének gátlását más fajból, az almából származó az etilén bioszintézisben a SAM→ACC átalakulást katalizáló ACC-szintáz antiszensz gátlásával sikerült elérnünk. A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy antiszensz ACC-szintáz génnel történő transzformációval a szegfű növények vázaélettartama szobahőmérsékleten 6 nappal is meghosszabbítható, tehát köztermesztésben lévő értékes fajták egyik legfontosabb értékmérő tulajdonsága, a vázaélettartam, javítható. Esetünkben az illatos, gazdaságilag értékes 'Bíbor' fajta vázaélettartamát tudtuk javítani. A virágok illata és vázaélet hossza között negatív korreláció van, ezzel a módszerrel tehát korrelációtörő egyedeket sikerült előállítanunk.

A 'Bíbor' fajta másik negatív tulajdonságán, a törésre való hajlamán is sikerült javítanunk a transzformációval. A szártörésre való hajlamosság egy másik fontos értékmérő tulajdonság, ami az eredményeink alapján javult az antiszensz ACC-szintázzal történt transzformáció következtében. Az ACC-szintáz antiszensz génnel történő transzformáció olyan új nemesítési lehetőség, amellyel az értékes fajta két értékmérő tulajdonságai (vázaélettartam, szártörés) javíthatónak bizonyult. Az etilénbioszintézisében módosított transzgénikus szegfű, a kereslet igényeit kielégítve (illat, hosszú eltarthatóság, nem törő szár) versenyképes lehet a hazánkat, és más Európai országot elárasztó importból származó szegfűvel szemben, ugyanakkor a vázaélettartam növelése előnyt jelenthet mind az exportáló, mind az importáló országoknak is a szállítási és tárolási veszteségek csökkentése miatt.

Másik fontos eredmény az, hogy az etilénbioszintézis módosításával a levélből történő hajtásregeneráció hatékonysága jelentősen nőtt, ami mind géntechnológiai, mind mikroszaporítási szempontból alkalmazható vagy kihasználható előnyt jelenthet és lerövidítheti a fajták nemesítési és kereskedelmi forgalomba kerülésének idejét.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A kísérleteink célja, a szegfű etilénbioszintézisének géntechnológiai módosításával, a termelt etilén mennyiségének csökkentése volt. Azt vártuk, hogy a csökkent etiléntermelés következtében a virágok néhány tulajdonsága, amelyet az etilén növényi hormon közvetve vagy közvetlenül befolyásol, megváltozik. A genetikai transzformációhoz a McIntosh almából izolált az etilénbioszintézisben kulcsszerepet játszó 1-aminociklopropán-1-karboxilát-szintáz cDNS-e állt rendelkezésünkre.

Az 1-aminociklopropán-1-karboxilát-szintáz az etilénbioszintézisben a SAM→ ACC konverziót katalizálja, az ACC-t az ACO enzim alakítja etilénné. Az *Agrobacterium* közvetítette transzformáció során az ACC-szintáz gént antiszensz orientációban jutattuk be a növényekbe.

A transzformáció előfeltétele hatékony növényregenerációs rendszer megléte. A szegfű növény hajtásregenerációs rendszerét már a 70-es években kidolgozták, így az általunk kiválasztott transzformációs rendszerben javasolt regenerációs táptalajon azt vizsgáltuk, melyik fajta regenerációja jobb. A transzformációt megelőzően, 7 különböző fajta, levélből és sziromlevélből kiinduló hajtásregenerációs képességét vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy az *in vitro* szaporított növények hajtásregenerációja jobb, mint a kereskedelemben magként forgalmazottaké és a levélből kiinduló regeneráció hatékonyabb, mint a sziromlevélből kiinduló. A kísérletek eredményei alapján a két jól regenerálódó fajta közül az Óbuda Kertészet köztermesztésben lévő, elismert fajtáját a ’Bíbor’-t választottuk ki a transzformációra.

A transzformációhoz a McIntosh almából származó 1,1 kb méretű cDNS-t használtuk, amelyet szubklónozási lépéseken keresztül a pBI 121-es plazmidba antiszensz orientációban építettek be, majd a plazmidot *Agrobacterium tumefaciensbe* jutatták. Kontrollként egyrészt a GUS génnel transzformáltuk a növényeket, másrészt, pedig a transzformáció lépésit végrehajtottuk, de

Agrobacterium-os fertőzést nem alkalmaztunk Az *Agrobacterium*-os transzformációt követően, a transzgénikus egyedeket első lépésként kanamicin tartalmú táptalajon szelektáltuk. A zöld hajtást hozó egyedek leveleiből DNS-t izoláltunk, majd PCR- rel, és Southern hibridizációval igazoltuk a transzgén integrációját, működését, pedig RT-PCR-rel bizonyítottuk. A transzgénikus egyedeket gyökereztetés után üvegházba ültettük ki. Az *in vitro* szaporítás során azt tapasztaltuk, hogy az antiszensz ACC-szintáz gént tartalmazó transzgénikus növények hajtásregenerációja jobb, mint a kontroll növényeké. Hajtásregenerációt összehasonlító kísérletekben azt kaptuk, hogy hormon tartalmú táptalajon a kontroll növények levelei 24%-ban regeneráltak, míg az etilénbioszintézisében módosítottak 49%-ban. Azért hogy, bizonyítsuk, hogy a módosított etilénbioszintézis következménye a megnövekedett hajtásregeneráció, más – az etilénbioszintézis szempontjából semleges- transzgént tartalmazó szegfű növényeket is bevontunk a vizsgálatba. Az eredmények a más géneket tartalmazó transzgénikus egyedek esetében a kontrollal azonos regenerációt mutattak, így egyértelműen az etilénbioszintézis módosítása okozta a hajtásregeneráció növekedését.

A kiültetett növények vázaélettartamát 5 éven keresztül vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a kontroll növények 1-2 nappal virágoztak rövidebb ideig, vagy ugyanannyi ideig, mint a kertészeti kontroll virágok, a transzgénikus egyedek vázaélettartama viszont 22ºC-on tárolva akár 6 nappal is meghosszabbodott. A transzgénikus (CCA) növények közül csak 40%-nak változott meg a vázaélettartama. A vázaélettartam növekedés és a csökkent etilén termelés között szoros korrelációt tudtunk kimutatni, a hosszabb vázaélettartam csökkent etilén termeléssel párosult.

A ‘Bíbor’ szegfű szártörésre hajlamos fajta. Az ápolási munkák során felfigyeltünk arra, hogy a transzgénikus egyedek szára kevésbé hajlamos a törésre, ezért szárszilárdság méréseket végeztünk. Az irodalomban nem találtunk adatot arra, hogy hogyan mérik a szegfűk szárának szilárdságát. Ezért egy módosított

szakítószilárdság mérő készüléket alkalmaztunk erre a célra. A törési kísérletek eredményeként kimutatható volt, hogy a transzgénikus egyedek szára törésre kevésbé hajlamos, mint a kontroll növényeké, és statisztikailag nem lehetett különbséget kimutatni a törésre nem hajlamos IWS szegfű és a transzgénikus 'Bíbor' szegfű szártörési mutatói között. A szártörés javulása és a vázaélettartam növekedése között pozitív korrelációt mutattunk ki, míg a termelt etilén mennyisége és a szártörés javulása között negatív korrelációt.

Sikerült tehát a gazdaságilag értékes illatos szegfűfajta értékmérő tulajdonságait oly módon javítani, hogy közben más jó tulajdonságai nem változtak. Így az etilénbioszintézis transzgénikus úton történő módosítása új nemesítési utat jelenthet a szegfűfajták előállításában.

7. SUMMARY

The aim of our experiments was to reduce the quantity of produced ethylene of carnation *(Dianthus caryophyllus)* plant by the genetic modification of its ethylene biosynthesis.

Due to the reduced ethylene production it has been expected that some characteristics of the flower influenced by the phytohormone ethylene will directly or indirectly be affected. For the genetic transformation the cDNA of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase isolated from McIntosh apple was available to us, which has a key role in ethylene biosynthesis. The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase catalyses the SAM→ACC conversion in the ethylene biosynthesis, while ACC is converted into ethylene by the ACO enzyme. Through *Agrobacterium* mediated transformation, the ACC synthase gene was introduced into the plants in antisense orientation. The prerequisite of transformation is the existence of an effective plant regeneration system. The shoot regeneration system of carnation is already established, thus we examined that which variety showed the best regeneration on a medium proposed by the chosen transformation system. Therefore, prior to the transformation, leaf- and petal-based shoot regeneration ability of seven varieties was examined on the given medium. According to our results plant regeneration of *in vitro* propagated plants is better than that of those marketed as seed. Furthermore, the leaf-based regeneration proved to be more effective than the petal-based one. On the basis of the results of our experiments, from the two varieties showing good regeneration, the 'Bíbotr' commercial variety (Óbuda Kertészet Horticultural Company) was chosen for transformation.

The 1.1 kb ACC cDNA of McIntosh apple, which was inserted into the pBI121 plasmid in antisense orientation was introduced in carnation. Control plants

were transformed by GUS gene or all the steps of transformation were performed expect for *Agrobacterium* infection.

Following *Agrobacterium* mediated transformation transgenic individuals were, as a first step, selected on a medium containing kanamycin. DNA was isolated from the leaves of individuals growing green shoots. Afterwards, the presence as well as the integration of transgene was verified by PCR and Southern hybridisation while RT-PCR was used to demonstrate its operation. Comfirmed transgenic events were transplanted into greenhouse at their appropriate growth stage.

During *in vitro* propagation we observed that transgenic lines containing antisense ACC synthase gene had better shoot regeneration (49%) than the control plants (24%).

In order to prove that the increased shoot regeneration results from the modification of ethylene biosynthesis, carnations containing other kind of transgenes were also involved in the experiments. Results in case of transgenic individuals with these transgenes showed the same regeneration (25%) as control plants. This gives clear evidence that modification of ethylene biosynthesis caused the increase in shoot regeneration.

The vase-life of planted flowers has been examined for five years. We stated that the vase-life of control plants was by 1-2 days shorter or as long as the greenhouse control plants, while the vase-life of transgenic individuals – stored at 22ºC – increased by up to 6 days. The length of vase-life changed only in the case of 40% of the transgenic (CCA) plants. We showed a strict correlation between the increase in vase-life and the reduction of ethylene production: longer vase-life was coupled with reduced ethylene production.

The stem of the purple carnation variety ’Bíbor’ tends to break easily. During growing and sampling transgenic plants appeared to be less susceptible to stem break. Since, no references were found on how to measure the strength of the stem of carnation plants, therefore a modified tensile strength measuring equipment

was developed for this purpose. The results of breaking experiments show that the stem of transgenic plants is less susceptible to breaking than that of control plants, and that statistically there is no difference between the breaking parameters of transgenic carnation and 'Improved White Sim' carnation that are less prome to breaking.

We succeeded to improve the valuable properties of a fragrant, economically importent carnation variety, while its already existing beneficial properties have not changed. Thus the transgenic modification of ethylene biosynthesis may lead to new breeding approaches.

8. MELLÉKLET

M1. IRODALOMJEGYZÉK:

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

AITCHITT M, AINSWORTH CC, THANGAVELU M (1993): A rapid and efficient method for the extraction ot total DNA from mature leaves of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Plant Molec. Biol. Report.* 11: 317-319

ALEXANDER L, GRIERSON D (2002): Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *J. Exp. Bot.* 53: 2039-2055

AMOR MB, GUIS M, LATCHÉ A, BOUZAYEN J, PECH C, ROUSTAN JP (1998): Expression of an antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene stimulates shoot regeneration in *cucumis melo. Plant Cell Reports* 17: 586-589

ARAKI S, MATSUOKA M, TANAKA M, OGAWA T (2000): Ethylene formation and phenotypic analysis of transgenic tobacco plants expressing a bacterial ethylene-forming enzyme. Plant Cell Physiol 41 (3): 327-334

ARAKI S, MATSUOKA M, TANAKA M, YOSHIDA K, ATSUHIKO S, OGAWA T (2001): Expression of an ethylene-forming enzyme from Pseudomonas syringae under the control of alcohol dehydrogenase gene promoter in tobacco roots. *Biotechnol Lett* 23: 433-436

AUYB R, GUIS M, BEN AMOR M, GILLOT L, ROUSTAN J, LATCHE A, BOUZAYEN M, PECH JC (1996): Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. *Nature Biotechnology* 14: 862-865

AYLIN OE, OZDEN-TOKATLI Y, AKCIN A (2005): Effect of silver nitrate on multiple shoot formation of Virginia-type peanut through shoot tip culture. *In Vitro Cellular and Development Biology - Plant* 41: 151-156

BARRY CS, LLOP-TOUS MI, GRIERSON D (2000): The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. *Plant Physiol*. 123: 979-986

BAULCOMBE DC (1996): RNA as an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 32: 79-88

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

BLOKLAND R, DE LANGE P, MOL JNM, KOOTER JM (1993): Modulation of gene expression in plants by antisense genes. *Antisense Research and Appl.* ed: S.T. Crooke, Lebleu B CRC Press. Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo. pp. 126-143

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

BOROCHOV A, MAYAK S, BROUN R (1982): The involvment of water stress and ethylene synthesis in senescence of cut carnation flowers. *J. Exp. Bot*. 33: 1202-1209

BOROCHOV A, WOODSON WR (1989): Physiology and biochemistry of flower petal senescence. *Hort. Rev*. 11: 15-43

BOTELLA JR, ARTECA JM, SCHLAGNHAUFER CD, ARTECA RN, PHILIPS AT (1992/a): Identification and characterization of a full-lenght cDNA encoding for an auxin-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from etiolated mungbean hypocotyl segments and expression of its mRNA in response to indole-3-acetic acid. *Plant Mol. Biol*. 20: 425-436

BOTELLA JR, SCHLAGNHAUFER CD, ARTECA RN, PHILIPS AT (1992/b): Identification and characterization of three putative genes for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from etiolated mungbean hypocotyl segments. *Plant Mol. Biol*. 18: 793-797

BOTELLA JR, SCHLAGNHAUFER CD, ARTECA RN, PHILIPS AT (1993): Identification of two new members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase-encoding multigene family in mung bean. *Gene* 123: 249-253

BOURQUE JE (1995): Antisense strategies for genetic manipulation in plants. Plant Sci. 105: 125-149

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

BROWN KM (1997): Ethylene and abscission. Physiol. Plant. 100: 567-576

BUESCHER RW (1979): Influence of carbon dioxide on postharvest ripening and deterioration of tomatoes. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci*. 102: 545-549

BUI AQ, O'NEILL SD (1998): Three 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes regulated by primary and secondary pollination signals in orchid flowers. *Plant Physiol*. 116: 419-428

BYUNGJOON A, YOUNGHEE J, KAMO KK (2004): Transgenic plants of Easter lily (*Lilium longiflorum*) with phosphinothricin resistance. *Journal of Plant Biotechnology* 6: 9-13

CHANDLER SF, CORNISH EC (1995): Antisense ACC oxidase RNA delays carnation petal senescence. HortSci. 30: 970-972

CHANG C, KWOK SF, BLEECKER AB, MEYEROWITZ EM (1993): *Arabidopsis* ethylene-response gene ETR1: Similarity of product to two-component regulators. *Science* 262: 539-544

CHAO Q, ROTHENBERGER M, SOLANO R, ROMAN G, TERZAGHI W, ECKER J (1997): Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell* 89: 1133-1144

CHAVES AR, TOMAS JO (1984): Effect of brief CO_2 exposure on ethylene production. *Plant Physiol.* 76: 88-91

CHURCH GM, GILBERT W (1984): Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1991-1995.

CLERY R, OWEN NE, CHAMBERS FS (1999): An investigation into the scent of carnations. *Journal of Essential Oil Research* 11: 355-359

COGINI C, IRELAN J, SCHUMACHER M, SCHMIDHAUSER T, SELKER E, MACINO G (1996): Transgene silencing of the al-1 gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *EMBO J.* 15: 153–163.

COOK EL, VAN STADEN J (1988): The carnation as a model for hormone studies in flower senescence. *Plant Physiol. Biochem*. 26: 793-807

CUI ML, HANDA T, EZURA H (2003): An improved protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Antirrhinum majus* L. *Molecular Genetics and Genomics* 270: 296-302

DE MARTINIS D, MARIANI C (1999): Silencing Gene expression of the ethylene-forming enzyme results in a reversible inhibition of ovule development in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* 11: 1061-1071

DEFILIPPI BG, KADER AA, DANDEKAR AM (2005): Apple aroma: alcohol acyltransferase, a rate limiting step for ester biosynthesis, is regulated by ethylene. *Plant Scince* 168: 1199-1210

DOHM A, LUDWIG C, SCHILLING D, DEBENER T (2005): Transformation of roses with genes for antifungal proteins to reduce their susceptibility to fungal diseases. *ISHS Acta Hort.* 572: XX International Eucarpia Symposium 652 p.

DOLGOV SV, MITIOUCHKINA TYU (1995): Production of transgenic plants of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. with the gene of *B. thuringiensis d-endotoxin. Acta Hort*. 420: 46-47

DOLGOV SV, MITIOUCHKINA TYU, SKRYABIN KG (1997): *Agrobacterial* transformation of *Chrysanthemum*. *Acta Hort*. 447: 329-334

DONG JG, KIM WT, JIP WK, THOMPSON GA, LI L, BENNET AB, YANG SF (1991): Cloning of a cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and expression of its mRNA in ripening apple fruit. *Planta* 183: 38-45

DUDITS D, HESZKY L (1990): Növénybiotechnológia. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. pp. 205-246

DYNAL ® HANDBOOK (1998): Dynabeads ® mRNA DIRECT ™ Micro kit mRNA isolation for RT-PCR amplification Prod. No. 610.21 (9-14)

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

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

ELOMAA P, HONKANEN J, PUSKA R, SEPPÄNEN P, HELARIUTTA Y, MEHTO M, KOTILAINEN M, NEVALAINEN L, TEERI TH (1993): *Agrobacterium*-mediated transfer of antisense chalcone synthase cDNA to *Gerbera hybrida* inhibits flower pigmentation. *Bio/Technology* 11: 508-511

ENG-CHONG P, LEE J (1994): Ethylene regulating shoot regenerability *in vitro*. *Rice Biotechnology Quarterly* 21: 22-23

ENGVILD KC (1972): Callus and cell suspension cultures of carnation. Physiol Plant 26: 62-66

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

EVENSEN K (1991): Ethylene responsiveness changes in *Pelargonium x domesticum* florets. *Physiol. Plant*. 82: 409-412

EVENSEN K, PAGE AM, STEAD AD (1993): Anatomy of ethylene-induced petal abscission in Pelargonium x hortorium. *Ann. Bot*. 71: 559-566

FARIA JLC, SEGURA J (1997): In vitro control of adventitious bud differentiation by inorganic medium components and silver thiosulfate in explants of *Passiflora edulis f. flavicarpa*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 33: 209-212

FEINBERG AP, VOGELSTEIN (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry* 132: 6-13.

FIRE A, XU S, MONTGOMERY MK, KOSTAS SA, DRIVER SE, MELLO CC (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.

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

FLORES FB, MARTINEZ-MADRID MC, SANCHEZ-HIDALGO FJ, ROMOJARO F (2001): Differential rind and pulp ripening of transgenic antisense ACC oxidase melon. *Plant Physiol. and Biochemistry* 39, 37–43

FLUHR R, MATTOO AK (1996): ethylene-biosynthesis and preception. *Critical Reviews in Plant Sci.s* 15: 479-523

FUJINO DW, REID MS, YANG SF (1980): Effect of aminooxyacetic acid on postharvest characteristics of carnation. *Acta Hort.* 113: 59-64

GAÁL I (1986): Az etilén szerepe a magasabb rendű növények élettani folyamataiban. *Növénytermelés* 35: 69-75

GALLI Z (1997): Növénytranszformációra alkalmas vektorok előállítása az aminociklopropán-karboxilát (ACC)-szintáz gén felhasználásával. Diploma dolgozat, Agrártudományi Egyetem, Gödöllő pp. 53

GALLI Z (2004): Az alma etilénbioszintézisének gátlása és különböző *Festuca* fajok taxonómiai összehasonlítása molekuláris genetikai módszerekkel. Doktori értekezés, SZIE Gödöllő pp. 103

GALLI Z, KISS E, HRAZDINA G, HESZKY L (2003): The effects of ACS (1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase) gene down regulation on ethylene production and fruit softening in transgenic apple. *International Journal of Horticultural Sci.* 9: 65-70

GANE R (1934): "Production of ethylene by some ripening fruits". Nature 134:1008. in Bleecker A, Kende H (2000) Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 16: 1-18

GONG Y, GAO F, TANG K (2005): In vitro high frequency direct root and shoot regeneration in sweet potato using the ethylene inhibitor silver nitrate. *South African Journal of Botany* 71(1): 110-113

GOOD X, KELLOGG JA, WAGONER W, LANGOFF D, MATSUMURA W, BESTWICK RK (1994): Reduced ethylene synthesis by transgenic tomatoes expressing S-adenosylmethionine hydrolase. *Plant Mol. Biol.* 26: 781-790

GORNY JR, KADER AA (1994): The mode of CO_2 action on ACC oxidase and its role in the inhibition of ethylene biosynthesis. *HortSci.* 29: 533

GRAY J, PICTON S, SHABBEER J, SCHUCH W, GRIERSON D (1992): Molecular biology of fruit ripening and its manipulation with antisense genes. *Plant Mol. Biol.* 19: 69-87

GRICHKO VP, FILBY B, GLICK BR (2000): Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb and Zn. *Journal Biotechnology* 81: 45-53

GRICHKO VP, GLICK BR (2001): Flooding tolerance of transgenic tomato plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase controlled by the 35S, *rolD* or *PRB-1b* promoter. *Plant Physiol Biochem* 39: 19-25

GUO S, KEMPHEUS KJ (1995): Par-1, a gene required for establishing polarity in C. elegans embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. Cell 81: 611-620.

HALEVY AH, WHITEHEAD CS, KOFRANEK AM (1984): Does pollination induce corolla abscission of cyclamen flowers by promoting ethylene production? *Plant Physiol*. 75: 1090-1093

HALL LN, TUCKER GA, SMITH CJS, WATSON CF, SEYMOUR GB, BUNDICK Y, BONIWELL JM, FLETCHER JD, RAY JA, SCHUCH W, BIRD CR, GRIERSON D (1993): Antisense inhibition of pectinesterase gene expression in transgenic tomatoes. *Plant Journal* 3: 121-129

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

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

HASSAN FAS, GERZSON L (2002): Effect of 1-MCP (1-methylcyclopropene) on the vase-life of chrysanthemum and carnation cut flowers. *International J. of Horticut. Sci. 8*: 29-33

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

HELARIUTTAY, ELOMAA P, KOTILAINEN M, SEPPÄNEN P, TEERI TH (1993): Cloning of cDNA coding for dihydroflavonol-4-reductase (DFR) and

characterization of dfr expression in the corollas of *Gerbera hybrida* var. Regina (*Compositae)*. *Plant Mol. Biol*. 22: 183-193

HENSKENS JAM, ROUWENDAL GJA, HAVE AT, WOLTERING EJ (1994): Molecular cloning of two different ACC synthase PCR fragments in carnation flowers and organ-specific expression of the corresponding genes. *Plant Mol. Biol.* 26: 453-458

HENZI MX, MCNEIL DL, CHRISTEY MC, LILL RE (1999): A tomato antisense 1-aminocyclopropane-1carboxylic acid oxidase gene causes reduced ethylene production in transgenic broccoli. *Austral J. Plant Physiol.* 26: 179-183

HONG Y, WANG TW, HUDAK KA, SCHADE F, FROESE CD, THOMPSON JE (2000): An ethylene-induced cDNA encoding a lipase expressed at the oneset of senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 8717-8722

HORSCH RB, FRY J, HOFFMANN N, NEIDERMEYER J, ROYERS SG, FRALEY R (1988): Leaf disc transformation. *Plant Mol. Biol. Manual* A5: 1-9. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

HOSHI Y, KONDO M, MORI S, ADACHI Y, NAKANO M, KOBAYASHI H (2004): Production of transgenic lily plants by *Agrobacterium-mediated* transformation. *Plant Cell Rep*. 22: 359-364

HUANG PL, PARKS JE, ROTTMANN WH, THEOLOGIS A (1991): Two genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in zucchini (*cucurbita pepo*) are clustered and similar but differentially regulated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8*8: 7021-7025

ICHIMURA K, SHIMIZU H, HIRAYA T, HISAMATSU T (2002): Effect of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on the vase-life of cut carnation, 'Delphinium' and sweet pea flowers. *Bull. Natl. Inst. Flor. Sci.* 2: 1-7

IORDACHESCU M, VERLINDEN S (2005): Transciptional regulation of three EIN-3like genes of carnation (*Dianthus caryophyllus* L. cv. Improved White Sim) during flower development and upon wounding, pollination, and ethylene exposure. *J. Exp. Bot.* 56: 2011-2018

IWAZAKI Y, KOSUGI Y, WAKI K, YOSHIOKA T, SATOH S (2004): Generation and ethylene production of transgenic carnations harboring ACC synthase cDNA in sense or antisense orientacion. *J. of Appl. Horticult.* 6: 67-71

IZANT JG, WEINTRAUB H (1984): Inhibition of thymidine kinase gene expression by antisense RNA: a molecular approach to genetic analysis. *Cell* 36: 1007-1015

JÁMBORNÉ BENCZÚR E (1993): Dísznövények mikroszaporítása. Egyetemi jegyzet. KÉE Budapest

JÁMBORNÉ BENCZÚR ERZSÉBET (2005): Kertészeti növények mikroszaporítása Budapest: Mezőgazda Kiadó 324p.

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

JONES ML, LARSEN PB, WOODSON WR (1995): Ethylene-regulated expression of carnation cysteine proteinase during flower petal senescence. *Plant. Mol. Biol.* 28: 505-512

JONES ML, WOODSON WR (1997): Pollination-induced ethylene in carnation: role of stylar ethylene in corolla senescence. *Plant Physiol.* 115: 205-212

JONES ML, WOODSON WR (1999/a): Inter-organ signaling following pollination in carnations. *Journal of the American Society for Hort. Sci*.124: 598-604

JONES ML, WOODSON WR (1999/b): Differential expresson of three members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family in carnation. *Plant Physiol*. 119: 755-764

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

KAMO K, GERA A, COHEN J, HAMMOND J, BLOWERS A, SMITH F, VAN ECK J (2005): Transgenic gladiolus plants transformed with the bean yellow mosaic virus coat-protein gene in either sense or antisense orientation. *Plant Cell Rep*. 23: 654-663

KAMO K, ROH M, BLOWERS A, SMITH F, VAN ECK J (2001): Transgenic gladiolus. *Biotechnology in Agriculture and forestry* 48: 155-170

KENDE H (1989): Enzymes of ethylene biosynthesis. Plant Physology 91: 1-4

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

KIM WT, CAMPBELL A, MORIGUCHI T, YI HC, YANG SF (1997): Auxin induces three genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in mung bean hypocotyls. *J. Plant Physiol*. 150: 77-84

KISS E, NORELLI J, ALDWINCKLE H, HRAZDINA G (1995): Down-regulation of ethylene biosynthesis in apples: cloning and sequencing of partial ACC-synthase gene in McIntosh. Proceedings of a Symposium on. Use of Induced Mutation and Molecular Techniques for Crop Improvement. IAEA-FAO-SM 340: 562-564

KISS E, VERES A, GALLI Z, 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 Sci.* 6: 104-107

KLEE HJ, HAYFORD MB, KRETZMER KA, BARRY GF, KISHMORE GM (1991): Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. *Plant Cell* 3: 1187-1193

KNIGHT LI, ROSE RC, CROCKER W (1910): Effects of various gases and vapors upon etiolated seedlings of the sweet pea. *Science* 31: 635-636 in Roman G, Lubarsky G, Kieber JJ, Rothenberg M, Ecker JR (1995) Genetic analysis of ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*: five novel mutant loci integrated into a stress response pathway

KNOESTER M, LINTHORST HJM, BOL JF, VAN LOON LC (1997): Modulation of stress-inducible ethylene biosynthesis by sense and antisense gene expression in tobacco. *Plant Sci.* 126: 173-183

KOCHA KA, CAPITANIB G, GRUETTERB MG, KIRSCH JF (2001): The human cDNA for a homologue of the plant enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase encodes a protein lacking that activity. *Gene* 272: 75-84

KOSUGI S, OHASI Y (2000): Cloning and DNA-binding properties of a tobacco ethylene-insensitive3 (EIN3) homolog. *Nucleic Acids Res*. 28: 960-967

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 Sci*. 158: 139-145

KRASKO A, SCHRODER HC, PEROVIC S, STEFFEN R, KRUSE M, REICHERT W, MULLER IM, MULLER WEG (1999): Ethylene modulates gene expression in cells of the marine sponge *Suberites domuncula* and reduces the degree of apoptosis. *J. Biol. Chem*. 274: 524-530

KUMAR A, TAYLOR MA, MAD ARIF SA, DAVIS HV (1996): Potato plants expressing antisense and sense S-adonosylmethionine decarboxylate (SAMDC) transgenes show altered levels of polyamines and ethylene: antisense plants display abnormal phenotypes. *Plant Journal* 9: 147-158

LAI CC, YU TA, YEH SD, YANG JS (1998): Enhancement of in vitro growth of papaya multishoots by aeration. *Plant Cell, Tissue and Org. Cult.*. 53: 221-225.

LAY-YEE M, KNIGHTON M (1995): A full-length cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from apple. *Plant Physiol*. 107: 1017-1018

LIANG XW, ABEL S, KELLER JA, SHEN NF, THEOLOGIS A (1992): The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1046-1050

LIANG XW, SHEN NF, AND THEOLOGIS A (1996): Li^+ -regulated 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene expression in *Arabidopsis thaliana. Plant J.* 10: 1027-1036

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

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 *nptII* genes in monocotyledonous and dicotyledonous plant cells. *Molecular Breeding* 3: 15-28

MANNING K (1985): The ethylene forming enzyme system in carnation flowers. Proc. Easter Sch. Agric. Sci 39th Univ. Nottingham (Ethylene Plant Development) 83-92

MANNING K (1986): Ethylene production and β-cyanoalanine synthase activity in carnation flowers. *Planta* 168: 61-66

MARÓTI M (1976): A növényi szövettenyésztés alapjai. Akadémiai Kiadó, Budapest. pp. 276-292

MARTÍNEZ-MADRID MC, FLORES F, ROMOJARO F (2002): Behaviour of abscisic acid and polyamines in antisense ACC oxidase melon (*Cucumis melo*) during ripening. *Functional Plant Biol.* 29: 865 - 872

MATHOOKO FM (1996): Regulation of ethylene biosynthesis in higher plants by carbon dioxide. *Postharvest Biology and Technology* 7: 1-26

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

MAYAK S, DILLEY DR (1976): Regulation of senescence in carnation (*Dianthus carryophyllus*). Effect of abscisic acid and carbon dioxide on ethylene production. *Plant Physiol.* 58: 663-665

MELCHERS (1989): in James DJ, Uratsu S, Cheng J, Negri P, Viss P, Dandekar AM (1993) Acetosyringone and osmoprotectants like betaine or proline. *Plant Cell Reports* 12: 559-563

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

MILLER RM, KAUL V, HUTCHINSON J, RICHARDS D (1991): Adventious shoot regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) from axillary bud explants. *Ann. Bot*. 67: 35-42

MILLGATE AG, POGSON BJ, WILSON IW, KUTCHAN TM, ZENK MH, GERLACH WL, FIST AJ, LARKIN PJ (2004): Morphine pathway block in top1 poppies. *Nature* 431: 413-414

MIROSHNICHENKO DN, DOLGOV SV (1999): The effect of explant type on the efficiency of *Agrobacterium tumefaciens* –mediated transformation of carnation *Dianthus caryophyllus* L. upon sselection on hygromycin. *Russian J. of Genetics* 35: 1038-1042

MIROSHNICHENKO DN, DOLGOV SV (2000): Production of transgenic hygromocin resistant carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) plants after cocultivation with *A. tumefaciens*. *Acta Hort*. 255: 255-258

MITIOUCHKINA TYU, IVANOVA EP (2000): *Chalcone synthase* gene from *Antirrhinum majus* in antisense orientaion successfully suppressed the petals pigmentation of *Chrysanthemum*. *Acta Hort*. 508: 215-217

MOHIUDDIN AKM, CHOWDHURY MKU, ABDULLAH ZC, NAPIS S (1997): Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber in vitro shoot regeneration. *Plant Cell, Tissue and Org. Cult.* 51: 75-78.

MOL JNM, VAN DER KROL AR, VAN TUNEN AJ, VAN BLOKLAND R, DE LANGE P, STUITJE AR (1990): Regulation of plant gene expression by antisense RNA. *FEBS Lett*. 268: 427-431

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

MURAYAMA H, TOYOMASU T, MITSUHASHI W, DANDEKAR AM, GAO M, MATSUTA N, NISHIMURA K, TAO R (2003): Transformation of pear (Pyrus Communis cv. 'La France') with genes involved ethylene biosynthesis. *Acta Hort.* 625: 387-393

MÜLLER R, STUMMAN BR (2003): Genetic regulation if ethylene perception and signal transduction related to flower senescence. *Food Agriculture & Enviroment* 1: 87-94

NAGY M, KÖVES E (2002): Bevezetés a növényélettanba III. Budapest KÉE. 75p.

NAIK SK, CHAND PK (2003): Silver nitrate and aminoethoxyvinylglycine promote in vitro adventitious shoot regeneration of pomegranate (*Punica granatum* L.) *Journal of Plant Physiol.* 160(4): 423-430

NAKAJIMA N, MORI H, YAMAZAKI K, IMASEKI H (1990): Molecular cloning and sequence of a complementary DNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase induced by tissue wounding. *Plant Cell Physiol*. 31: 1021-1029

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

NAKATSUKA A, SHIOMI S, KUBO Y, INABA A (1997): Expression and internal feedback regulation of ACC synthase and ACC oxidase genes in ripening tomato fruit. *Plant Cell Physiol*. 38: 1103-1010

NAKATSUKA A, MURACHI S, OKUNISHI H, SHIOMI S, NAKANO R, KUBO Y, INABA A (1998): Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. *Plant Physiol*. 118: 1295-1305

NAPOLI C, LEMIEUX C, JORGENSEN R (1990): Introduction of a chimeric *chalcone synthase* gene into Petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell* 2: 279-289

NELJUBOW D (1901): Üeber die horizontale nutation der stengel von *Pisum sativum* und einiger anderer. *Pflanzen Beih. Bot. Zentralbl*. 10: 128-39 in Roman G, Lubarsky G, Kieber JJ, Rothenberg M, Ecker JR (1995) Genetic analysis of ethylene signal transduction in *Arabidopsis thalianna*: five novel mutant loci integrated into a stress response pathway

NIE L, SHASH S, RASHID A, BURD GI, DIXON DG, GLICK BR (2002): Phytoremediation of arsenate contaminated soil by transgenic canola and the plant growth-promoting bacterium *Enterobacter cloacae* CAL2. *Plant Physiol Biochem* 40: 355-361

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

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. *J. Hortic. Sci. Biotechnol*. 77: 520-525

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

NUÑEZ-PALENIUS HG, CANTLIFFE DJ, HUBER DJ, KLEE HJ (2004): Transformation of muskmelon parental line (*Cucumis Melo* var. *Reticulatus ser*.) with antisense ACC oxidase gene. *Acta Hort*. 659: 805-810

OELLER PW, WONG LM, TAYLOR LP, PIKE DA, THEOLOGIS A (1991): Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science* 254: 437-439

OETIKER JH, OLSON DC, SHIN OY, YUNG SF (1997): Differential induction of sense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes by elicitor in suspension cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Mol. Biol.* 34: 275-286

ONAMU R, OBUKOSIA SD, MUSEMBI N, HUTCHINSON MJ (2003): Efficacy of thidiazuron in *in vitro* propagation of carnation shoot tips influence of dose and duration of exposure. *African Crop Sci. Journal* 11: 125-132

ONAZAKI T, HIROSHI I, YAMAGUCHI T (2001): Genetic improvement of vase-life of carnation flowers by crossing and selection. *Scientia Horticulturae* 87: 107-120

ORLIKOWSKA T (1996): Silver nitrate inhibits Silver Nitrate Inhibits Bacterial Growth in Plant Tissue Cultures. *Genet. Pol*. 37: 122-125

ORLIKOWSKA T, KUCHARSKA D, NOWAK E, ROJEK Z (1996): Influence of silver nitrate on regeneration and transformation of roses. *J. Appl. Genetics* 37: 123-125

OUMA JP, YOUNG MM, REICHERT NA (2004): Optimization of in vitro regeneration of multiple shoots from hypocotyl sections of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) *African Journal of Biotechnology* 3: 169-173

OZUDOGRU A, OZDEN-TOKATLI E, ABDULKALDIR YA (2005): Effect of silver nitrate on miltiple shoot formation of virginia-type peanut through shoot tip culture. *In Vitro Cellular and Develo.l Biol. - Plant* 41: 151-156

PARK KY, DRORY A, WOODSON WRI (1992): Molecular cloning of an 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from senescing carnation flower petals. *Plant Mol. Biol.* 181: 377-386

PELLINEN R, PALVA T, KANGASJÄRVI J (1999): Subcellular localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells. *Plant J*. 20: 349-356

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

PORAT R, HALEVY A, SEREK M, BOROCHOV A (1995): An increase in ethylene sensitivity following pollination is the initial event triggering an increase

in ethylene production and enhanced senescence of Phalaenopsis orchid flowers. *Physiol. Plant.* 93: 778-784

PRIEL (1999): Restoring flower scent with genetic engineering. *FlowerTECH* 28: 2-4

PURNHAUSER L, MEDGYESY P, MARTON L, DIX P (1987): Stimulation of shoot regeneration in wheat and *Nicotiana plumbaginifolia* tissue cultures using the ethylene inhibitor $AgNO_3$. *Plant Cell Reports* 6: 1-4

RAVANEL S, GAKIERE B, JOB D, DOUCE R (1998): The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7805-7812

REED AJ, MAGIN KM, ANDERSON JS, AUSTIN GD, RANGWALA T, LINDE DC (1995): Delayed ripening tomato plants expressing the enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase : 1. Molecular characterization enzyme expression and fruit ripening traits. *Journal Agric Food Chem* 43: 1954-1962

REID MS, PAUL JL, FARHOOMAND MB, KOFRANEK AM, STABY GL (1980): Pulse treatmens with the silver thiosulphate complex extend the vase life of cut carnation. *J. Amer. Soc. Hort Sci*. 105: 25-27

REID MS, WU MJ (1992): Ethylene and flower senescence. *Plant Growth Regul*. 11: 37-43

ROBERTS J, SCHINDLER CB, TUCKER GA (1984): Ethylene-promoted tomato flower abscission and possible involvement of an inhibitor. Planta 160: 159-163

ROBINSON MM, GRIFFITH M, PAULS KP, GLICK BR (2001/b): Dual role of ethylene in susceptibility of tomato to *Verticillium wilt*. *Journal Phytopathol.* 2: 385-388

ROBINSON MM, SHASH S, TAMOT B, PAULS KP, MOFFATT BA GLICK BR (2001/a) Reduced symptoms of Verticillium wilt in transgenic tomato expressing a bacterial ACC deaminase. *Mol. Plant Pathol.* 2: 135-145

ROMBALDI CV, SILVA JA, WALLY L, DA COSTA DS, ZANUZO MR (2002): Charachterization of transgenic melons expressing an apple ACC oxidase antisense gene. NATO advenced research workshop on biology and biotechnology of the plant hormone ethylene Murcia Spain, april 23-27 161. Abs S8-P4

RONEN M, MAYAK S (1981): Interrelationship between abscisic acid and ethylene in the control of senescence process in carnation flowers. *J. Exp. Bot.* 32: 759-765

ROSENFIELD CL, KISS E, HRAZDINA G (1996): Md-ACS-2 and Md-ACS-3: Two new 1-aminocyclopropane-1-carboxylate-synthase in ripening apple fruit. Plant Gene Register PGR 96-122. *Plant Physiol.* 112: 1735

ROTTMANN WE, PETER FG, OELLER PW, KELLER JA, SHEN NF, NAGY BP, TAYLOR LP, CAMPBELL AD, THEOLOGIS A (1991): 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato is encoded by a multigene

family whose transcription is induced during fruit and floral senescence. *J. Mol. Biol.* 222: 937-961

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989): In. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2: 9-31

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

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

SCHALLER GE, KIEBER JJ (2002): Ethylene. In: The Arabidopsis Book http://www.aspb.org/downloads/arabidopsis/schall2.pdf eds. Somerville CR, Meyerowitz EM, Am. Soc. of Plant Biol.

SCHLAGNHAUFER CD, GLICK RE, ARTECA RN, PELL EJ (1995): Molecular cloning of an ozone-inducated 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase cDNA and its relationship with a loss of *rbcS* in potato (*Solanum tuberosum* L.) plants. *Plant Mol. Biol*. 28: 93-103

SCHUCH W, HOBSON G, KANCZLER J, TUCKER G, ROBERTSON D, GRIERSON D, BRIGHT S, BIRD C (1991): Improvement of tomato fruit quality through genetic engineering. *Hort. Sci*. 26: 1517-1520

SHABDE M, MURASHIGE T (1977): Hormonal requirements of excised *Dianthus caryophyllus* L. shoot apical meristem *in vitro*. *Am J. Bot*. 64: 443-448

SHIBUYA K, TOSHIHITO Y, HASHIBA T, SATOH S (2000): Role of the gynoecium in natural senescence of carnation (*Dianthus carryophyllus* L.) flowers. *J. Exp. Bot.* 51: 2067-2073

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

SMITH CJS, WATSON CF, RAY J, BIRD CR, MORRIS PC, SCHUCH W, GRIERSON D (1988): Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Nature* 334: 724-726

SOUTHERN EM (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol*. 98: 503-517

SUBRAMANIAN S, GRAHAM MY, YU O, GRAHAM TL (2005): RNA interference of soybean isoflavone synthase genes leads to silencing in tissues distal to the transformation site and to enhanced susceptibility to *Phytophthora sojae*. *Plant Physiol.* 137: 1345-1353

SUGAWARA H, SHIBUYA K, YOSHIOKA T, HASHIBA T, SATO S (2002): Is cysteine proteinase inhibitor involved in the regulation of petal wilting in senescing carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flowers? *J. Exp. Bot.* 53: 407-413

SURPLUS SL, JORDAN BR, MURPHY AM, CARR JP, THOMAS B, MACKERNES SAH (1998): Ultraviolet-β-induced responses in *Arabidopsis*

thaliana: Role of salicylic acid and reactive oxygen species in the regulation of transcripts encoding photosynthetic and acidic parthogenesis-related proteins. *Plant Cell Environ*. 21: 685-694

SZTOLÁR Z (2004): A virágkereskedelem és dísznövénykertészet szerkezeti felépítése hazánkban, a Flora Hungaria KFT szerepe az értékesítés rendszerében. BGF KKFK Elektronikus Könyvtár

TAKATSU Y, NISHIZAWA Y, HIBI T, AKUTSU K (1999): Transgenic chrysanthemum (*Dendrathema grandiflorum* (Rama.) Kitamura) expressing a rice chitinase gene shows enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Scientia Horticulture* 82: 113-123

TOMIZAWA J, ITOH T, SELZER G, SOM T (1981): Inhibiton of colE1 primer formation by a plasmid specified small RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA . Nat. Sci. USA 78*: 1421-1425

TORREY JG (1976): Root hormones and plant growth. Ann. Rev. Plant Physiol. 27: 435-459 in López-Bucio J, Hernández-Abreu E, Sánchez-Calderón L, Nieto-Jacobo MF, Simpson J, Herrera-Estrella L (2002) Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiol*. 129: 244-256.

TREVISAN F, MENDES BMJ (2005): Optimization of in vitro organogenesis in passion fruit (Passiflora edulis f. flavicarpa). *Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)* 62: 346-350.

TURHAN H (2004): The effect of Silver Nitrate (ethylene inhibitor) on in vitro shoot development in potato (*Solanum tuberosum* L.). *BioTechnology* 3: 72-74

UIMARI A, KOTILAINEN M, ELOMAA P, YU D, ALBERT VA, TEERI TH (2004): Integration of reproductive meristem fates by a *sepallata*-like *MADS-box* gene. *Plant Biology* 101: 817-822

VAHALA J, SCHLAGNHAUFER CD, PELL EJ (1998): Induction of an ACC synthase cDNA by ozone in light-grown *Arabidopsis thaliana* leaves. *Physiol. Plant*. 10: 345-50

VAN ALTVORST AC, KOEHORST HJJ, BRUINSMA T, JANSEN J, CUSTERS JBM, DE JONG J AND DONS JJM (1992): Adventitious shoot formation from *in vitro* leaf explants of carnation (*Dianthus caryophyllus* L). *Scientia Horticulturae 5*1: 223-235

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

VAN ALTVORST AC, RIKSEN T, KOEHORST H, DONS JJM (1995): 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 JJM (1996): Transgenic carnation plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of petal explants. *Plant Cell Tissue Org. Cult*. 45: 169-173

VAN DER KROL AR, LENTING PE, VEENSTRA J, VAN DER MEER IM, KOES RE, GERATS AGM, MOL JNM, STUITJE AR (1988): An anti-sense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature* 333: 866-869

VAN DER STRAETEN D, RODRIGUES-POUSADA R, SMALLE J, ZHOU Z, NEEF V, CAENEGHEM W, MARICHAL M, VAN MONTAGU M (1995): Ethylene: a small hormone with many functions. *Faculty of Agricultural and Applied Biol. Sci. Gent* 27-29 September 1995. pp. 1567-1574

VEEN H (1979): Effect of silver on ethylene and action in cut carnations. *Plant*a 145: 467-470

VERGARA BS, JACKSON B, DATTA SK (1976): Deep water rice and its response to deep water stress. In Climate and Rice. International Rice Research Institute, Los Baños, The Philippines, pp. 301–319. in Lorbiecke R, Sauter M (1999) Adventitious Root Growth and Cell-Cycle Induction in Deepwater Rice. *Plant Physiol*. 119: 21–30

VISSER RGF, FEENSTRA WJ, JACOBSEN E (1991): Inhibition of the expression of the gene for granule-bound starch synthase in potato by antisense constructs. *Mol. Gen. Genet*. 225: 289–296

WAKI K, SHIBUYA K, YOSHIOKA T, HASHIBA T, SATOH S (2001): Cloning of a cDNA encoding EIN3-like protein (DC-EIL1) and decrease in its mRNA level during senescence in carnation flower tissues. *J. Exp. Bot*. 355: 377-379

WANG D, FAN J, RANU RS (2004): Cloning and expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase cDNA from rosa (Rosa x Hybrida). *Plant Cell Rep*. 22: 422-429

WANG H, WOODSON WR (1991): A flower senescence-related mRNA from carnation shares sequence similarity with fruit ripening-related mRNAs involved in ethylene biosynthesis. *Plant Physiol*. 96: 1000-1001

WANG KLC, LI H, ECKER J (2002): Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* 14: 131-151

WATERHOUSE PM, WANG MB, LAUGH T (2001): Gene silencing as an adaptive defence againts viruses. *Nature* 411: 834-842

WEGRZYNOWICZ-LESIAK E, KAWA-MISZCZAK L, SANIEWSKI M, HORBOWICZ M (2005): Possible involvementment of lipid peroxidation cooled tulip bulbs. *ISHS Acta Hort. 669*: VIII International Symposium on Postharvest Physiology of Ornamental Plants 452 p.

WHITEHEAD CS, HALEVY AH, AND REID MS (1984): Control of ethylene synthesis during development and senescence of carnation petals. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 109: 473-475

WILMINK A, VAN DER VEN BCE, CUSTERS JBM, VAN TUYL JM, EIKELBOOM W, DONS JJM (1995): Genetic transformation in Tulipa species (tulips). *Biotechnology in Agric. and Forestry* 34: 289-298

WOLTERING EJ (1987): Effect of ethylene on ornamental pot plants: A classification. *Sci. Hortic*. 31: 283-294

WOLTERING EJ, VAN DOORN WG (1988): Role of ethylene in senescence of petals: Morphological and taxonomical relationships. *J. Exp. Bot*. 39: 1605-1616

WOODSON WR, BRANDT AS (1991): Role of the gynoecium in cytokinin-induced carnation petal senescence. *Journal of the American Society for HortSci*. 116: 676-679

XIAOHAN Y, BO J, YAN Z, DING M, XUEMEI T (2003): Enhancement of direct shoot regeneration from internode segment of *chrysanthemum* by silver nitrate. ISHS Acta Hort. 404: International Symposium on Cultivar Improvement of Horticultural Crops. Part 3: Flowers

YAKIMOVA E, WOLTERING E (1997): Stress-induced ethylene production in flower parts of cut carnation flowers cv. Light Pink Tasman. *Bulg. J. Plant Physiol* 23: 43-56

YANG SF, HOFFMAN NE (1984): Ethylene biosynthesis and its regulation in higher-plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*. 35: 155-189

YANG ZH, JIN H, PLAHA P, WOONG BT, JIANG GB, WOO JG, YUN HD, LIM YP, LEE HY (2004): An improvement of plant regeneration protocol using cotyledonary explants from inbred lines of chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. Pekinensis*). J. of Plant Biotechnology* 6(4): 235-239

ZAREMBINSKI T, THEOLOGIS A (1993): Anaerobiosis and plant growth hormones induce two genes encoding 1-aminocylopropane-1-carboxylate synthase in rice (*Oryza sativa* L). *Mol. Biol. Cell*. 4: 363-373

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

ZOBAYED SMA, ARMSTRONG J, ARMSTRONG W (1999): Evaluation of a closed system, diffuse and humidity-induced convective through flow ventilation on the growth and physiology of cauliflower in vitro. *Plant Cell, Tissue and Org. Cult.* 59: 113-123

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 Hort*. 64: 177-185

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, AHRONI A, VAINSTEIN A (1997): A highly efficient method for carnation transformation. *Acta Hortic*. 447: 373-375

M.2.1. MELLÉKLET

A szegfűk vázaélettartamának adatai. Több virágzási adat alapján számítottuk ki az átlagot. Az értékek minden esetben a Kertészeti kontroll (KK) növények vázaélettartamából számítottam ki (3.13 fejezet). Azokat a növényeket, amelyeknél nem tudtunk legalább 3 ismétlést megmérni kizártuk az értékelésből.

Kontroll növények „K” csoport	1. virágzás	2. virágzás	3. virágzás	4. virágzás	5. virágzás	6. virágzás	7. virágzás	Vázaélet-tartam
8	0	0	-1	0	2	-2		0
9	-2	0	-1	0	-1	1	0	0
10	-1	1	-1	1	-2	-2		-1
14	0	-1	0	0				0
22	0	1	0	1	-1			0
36	0	0	0	0	0	0		0
40	0	0	2	-2				0
42	-1	0	1	-1	-1	-2		-1
46	0	0	0	-2	2			0
49	-2	-2	-1	-2				-2
52	-1	-1	0					-1
76	0	0	0	0	1			0
81	-1	2	0	1	1			1
82	0	0	1	1	1	-1		0
83	-2	-1	-2	-2	-1			-2
84	1	0	0	0	1			0
85	1	1	1					1
86	0	1	1	1				1

Transz-formált növény-ek „CCA” csoport	1. Virág-zás	2. Virág-zás	3. Virág-zás	4. Virág-zás	5. Virág-zás	6. Virág-zás	7. Virág-zás	Vázaélet-tartam
1	-1	-1	2	1	1	-1	0	0
2	3	4	3	5	3	3		3
3	1	1	1	2	1	2		1
4	1	1	0	0	0	0	1	0
5	1	2	2	1	1	2	1	1
6	1	3	5	3	3	3		3
7	4	4	4	4	3			4
11	3	4	5	6	4	5		4
12	-2	0	1	-2	-1	0	1	-1
13	0	1	1	2	-1	1	0	1
15	6	6	6	4	6			6
16	-1	0	0	-2	-1	-1		-1
17	-1	-1	1	2	1	1	-1	0
18	3	3	3	3				3
19	1	-1	-1	-1	-2	0	0	-1
20	0	-2	-2	-2	-1	-2		-2
21	2	2	2	2	2	2	2	2
23	-1	-1	1	1	0	0		0
24	1	0	1	-1	0			0
25	1	0	1	0	-1	-1	0	0
26	1	2	1	-1	0	1	2	1
27	3	2	3	2	2			2
28	-2	-2	0	-2				-1
29	4	5	5	4	5			5
30	3	3	2	3	2	2		2
31	3	2	3					3
32	2	2	2	1	1	2		2
33	1	1	1	1	1	2	1	1
34	4	5	5	4	5			5
35	0	1	2	2	1	1		1
37	-1	2	1	0	-1			0
38	4	5	5					5
39	3	2	3					3
41	3	4	3					3
43	1	0	-2	-1	-2	0		-1
44	1	2	1	2	1			1
45	1	2	2	0	1	1	2	1
47	0	-1	-1	1	0	1		0

transzformált növé-nyek „CCA csoport	1. Virág-zás	2. Virág-zás	3. Virág-zás	4. Virág-zás	5. Virág-zás	6. Virág-zás	7. Virág-zás	Vázaélet-tartam
48	5	4	5					5
50	3	2	3					3
51	2	1	2	0	-1	-2	0	0
53	1	3	2					2
54	1							
55	2							
56	0							
57	4	3	3					3
58	-1							
59	3							
60	-1	1	0	-1				0
61	1	1	1					1
62	0	0	0					0
63	-2	-2	-2					-2
64	0	-1	1					0
65	2	2	2					2
66	4	4	4	4				4
67	0	0	1					0
68	3	3	3					3
69	3	2	3					3
70		1						
71		3						
72	0	0	1					0
73	-1	0	-1					-1
74	4	3	4	4				4
75	1	-1	-1	-1				-1
77	3	3	3					3
78	1	0	0	0	0			0
79	3	3	3					3
308	4	4	5					5
309	0	0	0	1				0
310	2	1	1	2	1	1		1
311	5	4	4					4
312	6	5	5					5
313	1	1	0	-1	-1	0	1	0
314	3	2	1	1	1	2	1	1
315	-1	-2	-2	0	1	1	2	0
316	1	0	-1					0
317	-1	-1	0	1				0
318	-1	1	1	0	-1	-1	0	0

Transz-formált növény-ek „CCA” csoport	1. Virág-zás	2. Virág-zás	3. Virág-zás	4. Virág-zás	5. Virág-zás	6. Virág-zás	7. Virág-zás	Vázaélet-tartam
319	1	-1	1	0	1			0
320	1	-1	-2	2				0
321	-1	3	3	1	1	1	2	1
322	2	2	3	4	2			3
323	0	0	-2	0	-1			-1
324	-1	0	0	-1	1	1	1	0
325	-2	-2	0	0	2	2		0
326	-1	0	-1					-1
327	-1	-1	1	1	-1	1		0
328	-1	1	0	1	-1	-1		0
329	3	4	4	3	3			3
330	4	5	5	4	5			5
331	3	2	2	3				2
332	3	4	3					3
333	1	2	1	0	0	0	1	1
334	4	5	5					5
335	1	1	0	-1	1	-1	1	0
336	2	1	0	-1	-1	1	2	0
344	0	-1	-1	-1	0			-1
345	3	4	4					4
346	-1	0	1	1	1	0		0
347	0	0	0	1	1	1	1	0
356	4	4	3	4				4
357	3	3	2	2				2
358	6	5	6	6				6
359	4	3	3					3
360	0	0	0					0
361	1	0	0					0
621	0	0	1					0
627	3	2	1					2
626	2	2	2					2
633	2	2	2					2
635	2	3	3					3

transzformált növények „GUS” csoport	1. virágzás	2. virágzás	3. virágzás	4. virágzás	5. virágzás	6. virágzás	7. virágzás	Vázaélet-tartam
302	-1	-1	0					-1
303	0	0	0					0
304	1							
305	0	-1	1					0
306	-1	-2	-2					-2
307	0	1	1					1
337	0	0	0					0
338	-1	0	1					0
339	0	0	-1	0	0			0
340	0	1	1	0	-1			0
341	1	0	1	1	0	0		1
342	-2	-1	-2	-1	-2			-2
343	1	0	0	0	0	0		0
348	1	-1	-1	0	1			0
349	2	2	1	1	1			1
350	-1	-2	-1	0				-1
351	-1	-1	0	-1	1			0
352	0	-2	-1	-2	-1	0		-1
353	0	2	1	0	0	-1	-2	0
354	0	1	-1	1	1	1	1	1
355	0	0	-1	0	-1	-1	-1	-1

M.2.2. MELLÉKLET

A szegfűk etiléntermelésének adatai (a termelt etilén mennyisége 100 g/ virágra számítva). A termelt etilén relatív értéke, az ugyanakkor mért kertészeti kontroll (KK) növények által termelt etilén mennyiségének az átlagából (100 %) lett kiszámítva.

Minta	Termelt etilén (nl/g/24h)	Vázaélet-tartam	Termelt etilén a kontroll átlagának %-ában
15	10	6	10
324	94	0	99
330	24	5	25
333	96	1	101
334	18	5	19
335	93	0	98
342	114	-2	120
347	104	0	109
358	13	6	14
9 (K)	101	0	106
46 (K)	91	0	96
52 (K)	93	-1	98

Minta	Termelt etilén (nl/g/24h)	Vázaélet-tartam	Termelt etilén a kontroll átlagának %-ában
6	63	3	49
45	119	1	92
53	61	2	47
61	22	4	17
65	70	2	54
68	39	3	30
310	102	1	79
313	116	0	90
316	124	0	96
331	74	2	57
306 (GUS)	128	-2	99

355(GUS)	850	-1	101
14 (K)	131	0	102
40 (K)	133	0	103
49 (K)	126	-2	98
85 (K)	129	1	100

Minta	Termelt etilén (nl/g/24h)	Vázaélet-tartam	Termelt etilén a kontroll átlagának %-ában
5	105	1	88
15	35	6	30
30	58	2	49
30	54	2	46
51	120	0	101
51	122	0	104
53	53	2	45
57	49	3	42
311	42	4	36
340	121	0	102
352 (GUS)	111	-1	94
22 (K)	108	0	92
36 (K)	119	0	100
83 (K)	126	-2	107
85 (K)	107	1	91

Minta	Termelt etilén (nl/g/24h)	Vázaélet-tartam	Termelt etilén a kontroll átlagának %-ában
15	18	6	19
53	36	2	39
64	78	0	84
302	107	-1	116
311	18	4	19
331	42	2	46
331	39	2	43
335	82	0	89
52 (K)	92	-1	100

Minta	Termelt etilén (nl/g/24h)	Vázaélet-tartam	Termelt etilén a kontroll átlagának %-ában
5	115	1	76
30	83	2	55
44	132	1	87
50	76	3	50
53	62	2	41
57	70	3	46
65	89	2	59
68	61	3	40
78	149	0	98
79	75	3	49
85	141	1	93
347	151	0	99
357	90	2	59
305 (GUS)	148	0	98
339 (GUS)	159	0	104
343 (GUS)	134	0	88
355 (GUS)	153	-1	101
49 (K)	152	1	100
76 (K)	147	0	97
85 (K)	156	1	103

Minta	Termelt etilén (nl/g/24h)	Vázaélet-tartam	Termelt etilén a kontroll átlagának %-ában
50	77	3	43
313	148	0	83
314	145	1	82
317	157	0	89
339	186	0	105
356	32	4	18
357	104	2	59
359	104	3	59
349 (GUS)	151	1	85
14 (K)	189	0	107
40 (K)	172	0	97
52 (K)	170	-1	96

Minta	Termelt etilén (nl/g/24h)	Vázaélet-tartam	Termelt etilén a kontroll átlagának %-ában
5	99	1	89
15	30	6	27
30	62	2	55
50	53	3	47
57	59	3	52
311	42	4	38
322	58	3	52
36 (K)	113	0	101
49 (K)	112	-2	100
85 (K)	102	1	91
85 (K)	108	1	96
86 (K)	118	1	105

Minta	Termelt etilén (nl/g/24h)	Vázaélet-tartam	Termelt etilén a kontroll átlagának %-ában
311	64	4	36
338	194	0	110
359	109	3	62
352 (GUS)	164	-1	93
40 (K)	181	0	102
86 (K)	172	1	98

Minta	Termelt etilén (nl/g/24h)	Vázaélet-tartam	Termelt etilén a kontroll átlagának %-ában
15	34	6	18
26	127	1	68
30	119	2	64
38	47	5	25
39	52	3	28
41	84	3	45
57	83	3	45

62	165	0	89
327	164	0	88
336	167	0	90
10 (K)	180	-1	97
52 (K)	174	-1	94
76 (K)	212	0	114
81 (K)	178	1	96

Minta	Termelt etilén (nl/g/24h)	Vázaélet-tartam	Termelt etilén a kontroll átlagának %-ában
6	55	3	35
18	76	3	48
48	44	5	28
65	83	2	53
357	87	2	55
359	91	3	58
352 (GUS)	165	-1	105
9 (K)	167	0	106
42 (K)	147	-1	94

Minta	Termelt etilén (nl/g/24h)	Vázaélet-tartam	Termelt etilén a kontroll átlagának %-ában
3	149	1	77
21	66	2	34
27	109	2	56
45	140	1	72
50	101	3	52
57	74	3	38
65	84	2	43
322	67	3	34
331	111	2	57
345	39	4	20
349 (GUS)	136	1	70
350 (GUS)	195	-1	101

8 (K)	200	0	103
14 (K)	199	0	103
76 (K)	181	0	94

Minta	Termelt etilén (nl/g/24h)	Vázaélet-tartam	Termelt etilén a kontroll átlagának %-ában
5	29	1	78
5	31	1	81
30	21	2	55
41	16	3	42
57	18	3	47
311	12	4	31
322	15	3	39
327	34	0	89
333	24	1	63
46 (K)	38	0	100
76 (K)	36	0	95
83 (K)	40	-2	105

M.2.3. MELLÉKLET

A szegfűk (’Bíbor’, kertészeti kontroll, ’Improved White Sim’) szártöréseinek eredményei Newtonban a 2.-7. nóduszoknál.

A szártörés mutató értékét a 2.-7. nódusz átlaga adta meg.

	Növény	2. nódusz	3. nódusz	4. nódusz	5. nódusz	6. nódusz	7. nódusz	Szártörés mutató
CCA	1	11,7	16	23	24,2	24		19,8
CCA	2	12	20	25	29	35	35	26
CCA	5	10	11		18	28	37	20,8
CCA	20	7	10	17,2		19	34,5	17,5
CCA	27	18,2	21	37	37	43	43	**33,2**
CCA	29	18	23	36,5	33	28	40	29,7
CCA	50	17	17	19	47	43	45	**31,3**
CCA	51	7	17	21	25	37	33	23,3
CCA	51	9	20	27	30	31,2	36,2	25,6
CCA	53	14,7	19,7	32	37,2	49	40	**32,1**
CCA	53	13	20	26	44	45	45	**32,2**
CCA	57	19	23	29	32	45	43	**31,8**
CCA	60	8	11	16	21	22	21	16,5
CCA	60	8	11	15,2	18,2	17,2		13,9
CCA	65	11	18	26,5	27,5	32	29	24
CCA	72	13,2	21	25	55,2	30	24	28,1
CCA	73	14	15	22	25	24	30	21,7
CCA	73	14	16	22	25	24	30	21,8
CCA	74	12	17,7	32	37	61	37	**32,8**
CCA	75	9	19	26	25	38	31	24,7
CCA	75	13	20	26	32	34	35	26,7
CCA	79	13	19	23	31	35,7	33	25,8
CCA	310	20	11	16	25	31,2	41,2	24,1
CCA	311	10	14,7	18,5	25	16	16,5	16,8
CCA	311	8	14,7	19,5	18,5	33,5	32	21
CCA	313	20,2	25	24	47	34	44	**32,4**
CCA	314	10	13	18,7	21	24,5	17,5	17,4
CCA	314	8	15	18	31	24,7		19,3
CCA	316	15	20	38	53	45	45	36
CCA	317	17	24	27,5	34	38	35,5	29,3
CCA	318	12	18	23	24	21	19	19,5
CCA	322	17	23,7	31	40	38,5	55	**34,2**

Növény	2. nódusz	3. nódusz	4. nódusz	5. nódusz	6. nódusz	7. nódusz	Szártörés mutató
CCA 322	15	22,2	27,5	34	57	52	**34,6**
CCA 322	21	33	43	63	57	54	**45,2**
CCA 323	12		15	20	29	36	22,4
CCA 323	11	19	22	35	25	34	24,3
CCA 323	8	12	19	21	31	32	20,5
CCA 324	13	22	29	51	38	36	**31,5**
CCA 325	11	17	26	40	38	31	27,2
CCA 327	13	15	33	49	57	62	**38,2**
CCA 328	10,2	17	24	32	32	56,2	28,6
CCA 329	7	18	23	24	15	30	19,5
CCA 331	12	21,5	15	22	17	15,7	17,2
CCA 331	13	17	21,5	33	30	34	24,7
CCA 332	12	20	15	25,2	30,7	30,7	22,3
CCA 334	17	22	29,7	36,2	32,2	40,2	29,5
CCA 344	7	17	20	20	16		16
CCA 344	10	18	27	39	25	23	23,7
CCA 345	13,5	17,5	21	37	37	30	26
CCA 351	10	16	24	21	33	38	23,7
CCA 356	11	15	21	28	32	46	25,5
CCA 356	11	15	20	33	30	36	24,1
CCA 357	14,2	20	26,2	38,5	42	43,5	**30,7**
CCA 357	15	18	25	37	45	47	**31,2**
CCA 358	16	22	42	37,7	35	38	**31,8**
CCA 358	14	18,5	37,25	34			25,9
CCA 358	12	20	26	43	47	51	**33,2**
CCA 359	17	25	26	49	43	48	**34,7**
CCA 359	13	18	24	35	42	44	29,3
Átlag							**26**

Növény	2. nódusz	3. nódusz	4. nódusz	5. nódusz	6. nódusz	7. nódusz	Szártörés mutató
KK	4	10	13	12	16	27	13,7
KK	4	8	13	15	14	21	12,5
KK	7	11	12	15	17	18	11,7
KK	8	15	20	25	23	27	18,3
KK	11,2	13	22	21,2	30	51	24,7
KK	9	14,7	22,7	32	33	29	23,2
KK	16	18	22,7	31	32	19	23
KK	9	18	25,5	36	36,7	33	25,8
KK	12,2	15	22,7	32,5	28,5	21,7	22
KK	9	16	19,7	27	25,5	20	19,5
KK	9,75	11,2		19,7	23,7	25,2	19,6
KK	10	13	20	24	29	41	22,8
KK	8	11	19	24	34	30	21
KK	8	7	18	22	23	23	16,8
KK	9,5	14	21	27	22,5	24	18
KK	11	16	25	29	34	19	22,3
KK	8	12	10	21	18	20	14,8
KK	10	19	23	22	19	21	19
KK	11	20	24	35	36	38	27,3
KK	8	14	18	24	24	24	18,7
KK	8	11	12	17	19	22	14,8
KK	10	15	24	32	34	30	24,2
KK	5	10		24	28	35	20,4
KK	12	20	22	18	31	35	23
KK	16	17	21	23	22	28	21,2
KK	17	13	25	23	25	25	21,3
KK	16	19	24	32	25	28	24
KK	9	10	15	21	25	24	17,3
Átlag							**20**

Növény	2. nódusz	3. nódusz	4. nódusz	5. nódusz	6. nódusz	7. nódusz	Szártörés mutató
GUS 339	13	17,2	18,7	28	36,5	28	23,6
GUS 341	6,7	9,5	10,5	14	9,2		10
GUS 341	9,5	15		28	46	52	30,1
GUS 342	8	10	16	24	45	52	25,8
GUS 342	7	12	12,5	14,7			11,5
GUS 343	5,5	10	18,2	14,5	17		13,1
GUS 349	6,5	10	12	14	15	21	13,1
GUS 354	5	14	15	19,7	25	21,5	16,7
Átlag							**18**

Növény	2. nódusz	3. nódusz	4. nódusz	5. nódusz	6. nódusz	7. nódusz	Szártörés mutató
IWS	13	18,5	23,5	33,2	31	20,5	23,2
IWS	9	14,5	20	22	24,7	26	17,7
IWS	9,5	16	23	28	37	54	28
IWS	12	15	26	34	51	67	34,2
IWS	14	25	30	48	63	36	37,7
IWS	17	19	29	43	52	48	34,7
IWS	10	15	22	25	42	39	27,3
IWS	11	15	23	25	36	40	25
IWS	11	16	21	25	37	52	28,5
IWS	9	14	22	22	31	43	22,8
Átlag							**28**

2.4. MELLÉKLET

A különböző mérési adatok (vázaélettartam, termelt etilén mennyisége a kontroll %-ában, szártörésmutató) összesítése növényekre lebontva. A növényekhez tartozó molekuláris vizsgálatok (PCR, RT-PCR, Hibridizáció) jelölése (+ ha a vizsgálat eredménye pozitív volt – ha, a vizsgálat eredménye negatív volt).

	Növény száma	Vázaélet -tartam	Termelt etilén a kertészeti kontrol %-ában	Szártörés mutató	PCR	RT PCR	Hibridi -záció
Kont-roll	8	0	103				
	9	0	106, 106				
	10	-1	97		-	-	-
	14	0	102, 107, 103		-	-	-
	22	0	92				
	36	0	100, 101				
	40	0	103, 97, 102				
	42	-1	94				
	46	0	96, 100				
	49	-2	98, 100, 100		-	-	-
	52	-1	98, 100, 96, 94				
	76	0	97, 114, 94, 95				
	81	1	96				
	82	0					
	83	-2	107, 105				
	84	0					
	85	1	100, 91, 93, 103, 91, 96		-	-	-
	86	1	105, 98				
CCA	1	0		19,8			
	2	3		26			
	3	1	77				
	4	0					
	5	1	88, 76, 89, 78, 81	20,8	+	+	+
	6	3	49, 35				
	7	4			+		
	11	4			+		
	12	-1					
	13	1					
	15	6	10, 30, 19, 27, 18		+	+	+

	Növény száma	Vázaélet -tartam	Termelt etilén a kertészeti kontrol %-ában	Szártörés mutató	PCR	RT PCR	Hibridi -záció
CCA	16	-1					
	17	0					
	18	3	48		+		+
	19	-1					
	20	-2		17,5			
	21	2	34		+		
	23	0			+		
	24	0					
	25	0			+		
	26	1	68				
	27	2	56	33,2			
	28	-1			+		+
	29	5		29,7	+	+	
	30	2	49, 46, 55, 55, 64, 55		+	+	+
	31	3			+		
	32	2					
	33	1			+		
	34	5			+		+
	35	1					
	37	0			+		
	38	5	25		+		
	39	3	28		+		
	41	3	45, 42		+		
	43	-1					
	44	1	87		+		
	45	1	92, 72				
	47	0					
	48	5	28		+		
	50	3	50, 43, 47, 52	31,3	+		
	51	0	101, 104	23,3/25,6			
	53	2	47, 45, 39, 41	32,1/32,2	+	+	+
	54						
	55						
	56						
	57	3	42, 46, 52, 45, 38, 47	31,8	+	+	+
	58						
	59						

	Növény száma	Vázaélet -tartam	Termelt etilén a kertészeti kontrol %-ában	Szártörés mutató	PCR	RT PCR	Hibridi -záció
	61	1	17		+		
	62	0	89		+		
	63	-2					
	64	0	84				
	65	2	54, 59, 53, 43	24	+		+
	66	4			+		
	67	0					
	68	3	30, 40		+	+	+
	69	3					
	70						
	71						
	72	0		28,1	+	+	+
	73	-1		21,7/21			
	74	4		32,8	+		+
	75	-1		24,7/26,7			
	77	3			+	+	
	78	0	98				
	79	3	49	25,8	+	+	+
	308	5			+		
	309	0					
	310	1	79	24,1	+		
	311	4	36, 19, 38, 36, 31	16,8/21	+	+	+
	312	5			+	+	+
	313	0	90, 83	32,4			
	314	1	82	17,4/19,3			
	315	0					
	316	0	96	36	+	-	+
	317	0	89	29,3			
	318	0		19,5			
	319	0					
	320	0			+	-	-
	321	1					
	322	3	52, 34, 39	34,2/34,6/45,2	+	+	+
	323	-1		22,4/24,3/20,5			
	324	0	99	31,5			
	325	0		27,2	+		

	Növény száma	Vázaélet -tartam	Termelt etilén a kertészeti kontrol %-ában	Szártörés mutató	PCR	RT PCR	Hibridi -záció
	326	-1					
	327	0	88, 89	38,2			
	328	0		28,6	+	-	
	329	3		19,5	+		
	330	5	25		+		+
	331	2	57, 41, 43, 57	17,2/24,7			
	332	3		22,3			
	333	1	101, 63				
	334	5	19	29,5			
	335	0	98, 89		+		
	336	0	90				
	344	-1		16/23,7			
	345	4	20	26	+		+
	346	0					
	347	0	109, 99				
	356	4	18	25,5/24,2			
	357	2	59, 59, 55	30,7/31,2			
	358	6	14	31,8/25,93 75/33,7	+	+	+
	359	3	59, 62, 58	34,7/29,3	+	+	+
	360	0					
	361	0					
	621	0					
	627	2			+		
	626	2			+		
	633	2			+		
	635	3			+		
GUS	302	-1	116		+		
	303	0					
	304						
	305	0	98				
	306	-2	99				
	307	1			+		
	337	0					
	338	0	110				
	339	0	104, 105	23,6	+		
	340	0	102				
	341	1		10/30,1			

	Növény száma	Vázaélet -tartam	Termelt etilén a kertészeti kontrol %-ában	Szártörés mutató	PCR	RT PCR	Hibridi -záció
GUS	342	-2	120	25,8/11,55			
	343	0	88	13	+		
	348	0					
	349	1	85, 70	13,1			
	350	-1	101		+		
	351	0		23,7			
	352	-1	94, 93, 105				
	353	0			+		
	354	1		16,7			
	355	-1	101, 101				

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton mondok köszönetet konzulemsemnek Dr. Kiss Erzsébet tanárnőnek támogatásáért, szakmai és gyakorlati segítségért és tanácsaiért. Köszönöm Dr. Heszky László tanszékvezető úrnak, hogy lehetővé tette kísérleteim elvégzését a Genetika és Növénynemesítés Tanszéken és emellett biztosította a folyamatos szakmai ellenőrzést is.

Köszönöm Dr. Tóth Endrének (Óbuda Kertészet), Dr. Tóth Árpádnak (Corvinus Egyetem) és Dr. Csapó Gyulának (Szent István Egyetem) a kísérletek elvégzésében, kiértékelésében nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom Varga Ágnesnek, Szőke Antalnak, Nagy Natáliának, Dr. Galli Zsoltnak, Dr Törjék Ottónak, Kondrák Mihálynak szakmai javaslataikért és baráti támogatásukért.

Köszönöm a nyugodt, baráti és inspiratív munkahelyi légkör megteremtését és mindig áldozatkész segítségét a tanszék minden dolgozójának: Dr. Gyulai Gábornak, Dr. Kiss Józsefnek, Dr. Hajósné Novák Mártának, Dr. Mázikné Tőkei Katalinnak, Dr. Bellusné Daniek Ágnesnek, Katona Melindának, Tóth Péternének, Bakos Györgynének, Ócsai Sándornének, Balogh Andreának, Szabó Zoltánnak, Füle Lórántnak, Bittsánszky Andrásnak, Halász Gábornak, Koncz Tímeának, Tisza Viktóriának és Lágler Richárdnak, Galbács Zsuzsának, Molnár Stellának.

Külön szeretném kiemelni Ádám Zoltánné -Stefi nénit-, akinek segítségéért és lelkesítő szavaiért sokat köszönhetek.

Végül köszönöm családomnak a támogatást, megértést, bizalmat, és azt, hogy biztosították számomra a nyugodt családi légkört, amely szükséges volt hogy tanulmányaimat befejezhessem.