SZENT ISTVÁN EGYETEM

Termesztett szamócából származó, bHLH transzkripciós faktort kódoló *SPATULA* gén jellemzése

Doktori értekezés

Tisza Viktória

Gödöllő

2011

A doktori iskola

Megnevezése: Növénytudományi Doktori Iskola

Tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

Vezetője: Dr. Heszky László
Egyetemi tanár, az MTA rendes tagja
SZIE, Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar
Genetika és Biotechnológiai Intézet

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

…… ……

Dr. Heszky László — Dr. Kiss Erzsébet

Iskolavezető — Témavezető

Tartalomjegyzék

TARTALOMJEGYZÉK **3**

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE **5**

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS **7**

1.1. A TÉMA AKTUALITÁSA 7
1.2. CÉLKITŰZÉS 8

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS **9**

2.1. A SZAMÓCA 9
2.2. GYÜMÖLCSFEJŐDÉS ÉS -ÉRÉS 10
2.2.1. Etilén függő útvonal *13*
2.2.1.1. Az etilén szerepe a szamóca gyümölcsfejlődésében és -érésében 15
2.2.2. Etilén független útvonal *16*
2.2.3. Az auxin szerepe a szamóca gyümölcsfejlődésében – és érésében *17*
2.3. FUNKCIONÁLIS GENOMIKAI KUTATÁSOK SZAMÓCÁBAN 18
2.4. A BASIC-HELIX-LOOP-HELIX (BHLH) TRANSZKRIPCIÓS FAKTORT KÓDOLÓ SPATULA GÉN 21

3. ANYAG ÉS MÓDSZER **27**

3.1. NÖVÉNYANYAG 27
3.2. HORMONKEZELÉSEK ÉS SEBZÉS 27
3.2.1. Auxin, etilén kezelés, és sebzés alkalmazása leveleken *27*
3.2.2. Hormonkezelés gyümölcsökön *28*
3.2.2.1. Auxin 28
3.2.2.2. Etilén 28
3.3. NÖVÉNYI RNS TISZTÍTÁS 29
3.4. CDNS SZINTÉZIS 30
3.5. ELVÁLASZTÁS 31
3.6. NORTHERN HIBRIDIZÁCIÓ 31
3.7. QRT-PCR ANALÍZIS 31
3.8. VEKTORKONSTRUKCIÓK ELŐÁLLÍTÁSA 33
3.8.1. A FaSPT *ORF-ének klónozása* *33*
3.8.2. A FaSPT *génjének csendesítéséhez használt hairpin vektorkonstrukció előállítása* *34*
3.9. A KÍSÉRLETEK SORÁN ALKALMAZOTT PRIMEREK 35
3.10. BAKTÉRIUM SEJTEK TRANSZFORMÁLÁSA 35
3.10.1. Echerichia coli *sejtek transzformálása* *35*
3.10.2. Agrobacterium tumefaciens *sejtek transzformálása* *36*
3.11. AGROINJEKTÁLÁS 36
3.12. IN SILICO ANALÍZIS 37
3.13. STATISZTIKAI ANALÍZIS 37

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK **38**

4.1. A FASPT CDNS-ÉNEK KLÓNOZÁSA 38
4.2. IN SILICO ANALÍZIS 39
4.3. GÉNEXPRESSZIÓS KÍSÉRLETEK 40
4.3.1 A FaSPT *expressziójának meghatározása különböző vegetatív és generatív szövetekben* *41*
4.3.2. A FaSPT *expressziós vizsgálata auxin, etilén, és sebzési stressz hatására szamóca levelekben, mint vegetatív szövetekben* *43*
4.3.3. Gyümölcsökön végrehajtott hormonkezelések eredményei *46*
4.3.3.1. Az auxin gátolja a *FaSPT*-át 46
4.3.3.2. A *FaSPT* expressziója etilén kezelés hatására különböző érési stádiumban lévő gyümölcsökben 48
4.4. IN SILICO MICROARRAY ADATELEMZÉS 50
4.5. A FASPT GÉNJÉNEK HPRNS ALAPÚ CSENDESÍTÉSE FIATAL GYÜMÖLCSÖKBEN 51

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK **55**

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK **56**

6. ÖSSZEFOGLALÁS **58**
M1. IRODALOMJEGYZÉK 62
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS **75**

Rövidítések jegyzéke

ACO: 1-aminocyclopropane-1-carboxylate-oxidase
ACS: 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase

AtSPT: *Arabidopsis thaliana*-ból származó *SPATULA* gén

AtSPT: *Arabidopsis thaliana*-ból származó SPATULA fehérje

bHLH: basic-helix-loop-helix (alap-spirál-hurok-spirál)

AG: AGAMOUS

AP2: APETALA2

AuxRE: auxin responsive element, auxin válaszért felelős motívum

bp: basepair, bázispár

cDNS: komplementer DNS

CDRN: **C**ysteine-rich **D. r**adiodurans **N** terminus

Cnr: **c**olorless **n**on-**r**ipening

CRC: CRABS CLAW

DMSO: dimetil szulfoxid

DOF1 **D**NA binding with **o**ne **f**inger **1**

EDTA: etilén-diamino-tetra-ecetsav

EMS: etil-metán-szulfonát

ERE: ethylene responsive element, etilén válaszért felelős motívum

ETT: ETTIN, auxin válasz faktor

FaCTR1: *Fragaria x ananassa* constitutive triple response

FaEG1 és FaEG3: *Fragaria x ananassa* endo-β-1,4-glucanase, EGase

FaERS1: *Fragaria x ananassa* ethylene response sensor

FaETR1 és FaETR2: *Fragaria x ananassa* ethylene response 1, 2

FaGT1: *Fragaria x ananassa* glycosil-transferase, glikozil transzferáz

FaOMT: *Fragaria x ananassa* O-methyltransferase, O-metiltranszferáz

FaPE1, FaPE2, FaPE3, FaPE4: *Fragaria x ananassa* pektin észteráz

FaSPT: *Fragaria x ananassa*-ból származó *SPATULA* gén

FaSPT: *Fragaria x ananassa*-ból származó SPATULA fehérje

Fra a1: Fragaria allergen 1

GA: gibberellinsav

GA3ox: GA3 oxidáz

GalUR: galakturonsav reduktáz

GAPDH: gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz

GEO: Genexpression Omnibus

HDMF: 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone

HEC: HECATE

LEMADS RIN: *Lycopersicon esculentum*-ból származó **R**ipening **In**hibitor fehérje

LEMADS MC: *Lycopersicon esculentum*-ból származó **M**acro**c**alyx fehérje

Mc: macrocalyx

MES: 2-N-morpholin-etánszulfonsav

mRNS: messenger RNS

miRNS: mikro RNS

siRNS: kis interferáló RNS

NCBI: **N**ational **C**enter for **B**iotechnology **I**nformation

NES: naftil ecetsav

nor: **no**n-**r**ipening

ORF: **O**pen **R**eading **F**rame, nyitott leolvasási keret

PCR: **P**olymerase **C**hain **R**eaction, polimeráz láncreakció

PVP: polivinil-pirrolidone

qRT-PCR: quantitative reverse transcribed PCR, kvantitatív reverz transzkripciós PCR

RACE: **R**apid **A**mplification of **c**DNA **E**nds

RIN: **r**ipening **in**hibitor

RNAi: RNS interferencia

spt, spt1, spt2: spatula mutánsok

STY: STYLISH

TAIR: **T**he **A**rabidopsis **I**nformation **R**esource

TDF: **T**ranscript **D**erived **F**ragment, transzkriptum eredetű fragmentum

1. Bevezetés és célkitűzés

1.1. A téma aktualitása

A gyümölcsöket attól függően, hogy az etilén miként befolyásolja az érésüket, illetve mutatnak-e respirációs ráta növekedést érésük előrehaladtával két csoportra, az utóérők (klimaktérikus) és a nem utóérők (nem klimaktérikus) csoportjára oszthatjuk. Az etilén gázhalmazállapotú hormon, amely fontos szerepet játszik számos növényélettani folyamatban.

Míg érés-szabályozó szerepe az utóérő gyümölcsök (alma, banán stb.) esetében bizonyított és jól definiált, addig a nem utóérő gyümölcsök (szamóca, citrusok stb.) érésében betöltött szerepe nincsen pontosan tisztázva. A funkcionális genomikai alapkutatások fejlődésének köszönhetően egyre inkább kirajzolódik, hogy etilén-függő, és transzkripciós faktorok által szabályozott etilén-független kaszkádok egyaránt működnek mindkét csoportban. A nem klimaktérikus érés leginkább tanulmányozott modellnövénye a termesztett szamóca (*Fragaria x ananassa* Duch.). Bár számos nagyszabású projekt fontos előrelépéseket eredményezett a gyümölcs biológiai kutatások területén, több megválaszolatlan kérdés maradt még a szamóca érésével és gyümölcsfejlődésével kapcsolatban. A 2010 decemberében publikussá vált *Fragaria vesca* genomjának ismerete minden bizonnyal új fejezetet fog nyitni ebben a témakörben.

Genomi szinten a transzkripcionális szabályozásban fontos szerepet betöltő regulátor elemek (transzkripciós faktorok, enhancerek) azonosíthatók a génkifejeződésről kapott ismeretek és az összehasonlító genomkutatás kombinálásával. A transzkripciós faktorok a DNS speciális részeihez kötődve a genetikai információ DNS-ről RNS-re történő átírását szabályozó fehérjék. Működésüket és funkciójukat tekintve különböző osztályokba sorolhatjuk őket.

A basic-helix-loop-helix (bHLH) transzkripciós faktorok lényeges fejlődési és élettani folyamatokban részt vevő szabályozó elemek. Az eddig ismert és funkcionálisan jellemzett növényi bHLH-k a termőlevél fejlődésben, fitokróm jelátvitelben, antocianin bioszintézisben és stressz válaszokban játszanak szerepet. Egy-egy transzkripciós faktor funkciójának kiderítése fontos feladat az olyan élettani alapfolyamatok molekuláris hátterének a megismeréséhez mint például a gyümölcsérés, szeneszcencia, vagy a gyümölcsfejlődés.

1.2. Célkitűzés

Munkánk során egy, a termesztett szamóca érett gyümölcséből izolált, bHLH transzkripciós faktort kódoló *SPATULA* gént vizsgáltunk. Ennek során a következő feladatokat tűztük ki célul:

1. Izoláljuk és klónozzuk a gén ORF-ét.
2. A gén szekvenciájának ismeretében másodlagos struktúrák és domén azonosítás céljából elvégezzük annak *in silico* analízisét.
3. Meghatározzuk a gén expresszióját vegetatív és generatív szövetekben.
4. Meghatározzuk az expressziós szintet szamóca levelekben, mint vegetatív szövetekben sebzés, auxin és etilén kezelések hatására.
5. Fejlődésben lévő fiatal gyümölcsökön vizsgáljuk a gén expresszióját auxin hormon kezelés hatására.
6. Különböző érési stádiumban lévő szamócákban meghatározzuk a gén expressziós szintjét etilén hormon kezelés hatására.
7. Tranziens expressziós elemzés alkalmazásával a *FaSPT* gén csendesítését hajtjuk végre szamócák hairpin vektorkonstrukcióval történő agroinjektálásával.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A szamóca

Botanikai besorolás alapján a szamóca a rózsafélék (*Rosaceae*) családjába, ezen belül pedig a *Fragaria* nemzetségbe tartozik.

A termesztett fajtákat a köznyelv gyakran tévesen illeti a botanikai és kertészeti értelemben nem létező „földieper”, illetve „eper” elnevezésekkel, a szamóca elnevezést pedig az erdei szamócára használják.

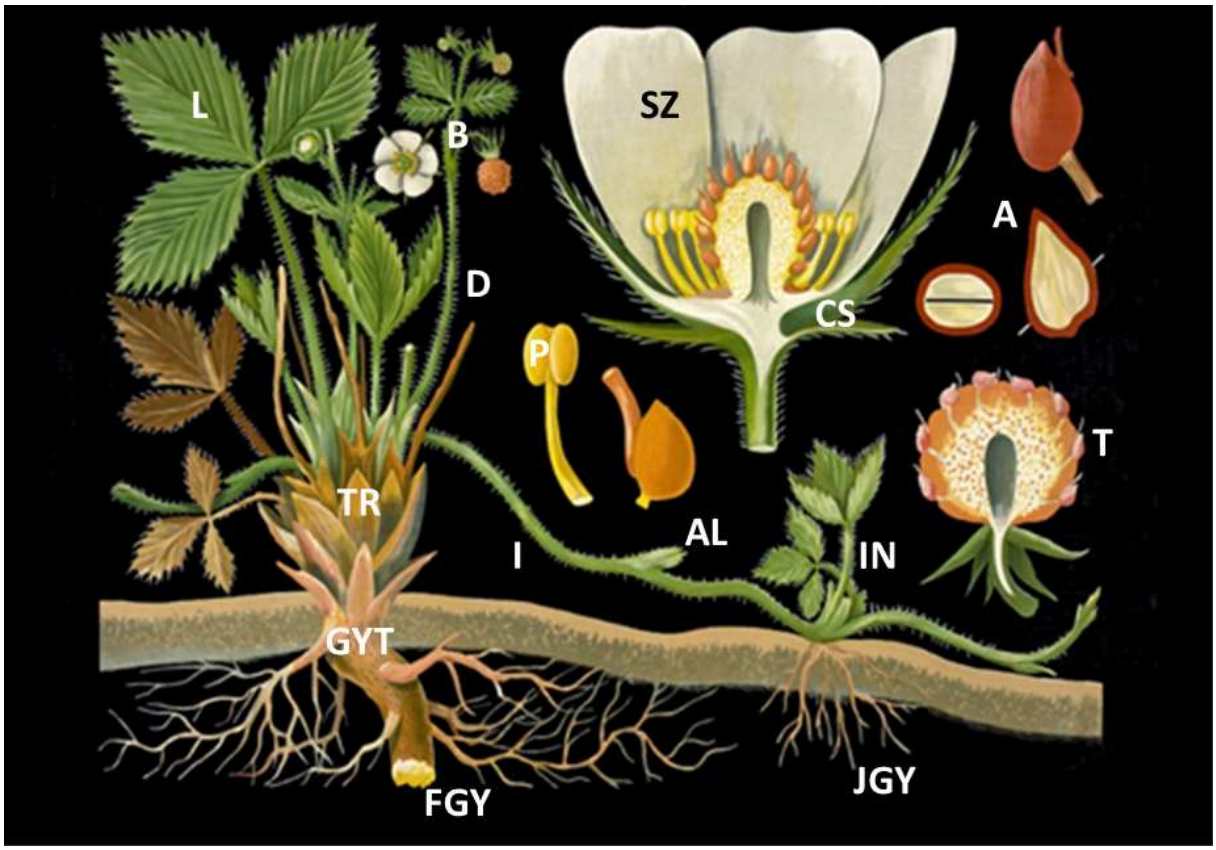
A diploid erdei szamóca (*Fragaria vesca*) termését az emberiség ősidők óta kedvelte és gyűjtögette, sőt, a 17. században nemesítésével is próbálkoztak.

Az oktoploid termesztett szamóca (*Fragaria x ananassa* Duch) spontán keletkezett két faj, a *Fragaria chiloensis* és a *Fragaria virginiana* kereszteződéséből a 18. században. A Chiléből és Argentinából származó *F. chiloensis* nagyobb méretével, míg az Észak-Amerikából származó *F. virginiana* kellemes ízével járult hozzá a termesztett szamóca kialakulásához.

Páratlan íz-és aromaanyag összetételének, tetszetős küllemének köszönhetően méltán nevezik a „gyümölcsök királynőjének”, és termesztik nagy mennyiségben világszerte. Ezenkívül nagy földrajzi alkalmazkodóképessége is hozzájárult széleskörű termeszthetőségéhez. Magyarországon termesztése mintegy 500 ha-on folyik, és ez éves szinten 3-4000 tonna szamóca termést jelent, ezt kb. ugyanennyi import egészít ki a téli hónapokban (forrás: Zöldség-Gyümölcs Piac és technológia, 2010).

Évelő, tőrózsás, lágyszárú növény. Gyümölcse az elhúsosodó vacokkúpból kialakult áltermés, a valódi termések a receptákulum felületén fejlődő aszmagok (1. ábra).

A gyümölcs a biológiai kutatásokban központi szerepet tölt be, mivel az oly sokat vitatott nem utóérő gyümölcsérés egyik legintenzívebben kutatott modellnövénye.



1. ábra: A szamóca morfológiai felépítése és fejlődési sajátosságai (forrás: www.botany.wisc.edu). L: lomblevél, B: bogernyő, D: dudvaszár, SZ: sziromlevél, CS: csészelevél, A: aszmagok, TR: tőrózsa, P: porzó, I: inda, AL: allevél, IN: inda növény, T: termés, GYT: gyökértörzs, FGY: főgyökér, JGY: járulékos gyökér.

2.2. Gyümölcsfejlődés és -érés

Az egészséges étrend fontos részét képezik a gyümölcsök, mivel vitaminokról, ásványi anyagokról, rostokról, továbbá egyéb kedvező hatású anyagokról, pl. antioxidánsokról gondoskodnak az emberiség számára. A gyümölcsfejlődés és -érés bekövetkeztével a gyümölcsökön számos szembetűnő és mérhető változás következik be cukor anyagcseréjükben, héjuk, húsuk, magjuk színében, pH értékükben, aroma anyag összetételükben, textúrájukban, ízükben egyaránt. Az érésnek indult és érett gyümölcsök patogén fertőzésekkel szembeni ellenállósága csökken. Ezek az agronómiai szempontból is fontos változások attól függetlenül mennek végbe, hogy utóérő, illetve nem utóérő gyümölcsérésről van-e szó.

Az első zárvatermő gyümölcsök a kréta korban jelentek meg. Ezek a korai gyümölcsök szárazak voltak elkülönült termőlevéllel (ováriumba zárt mag), ami valószínűleg leválhatott az egyik oldalról, hogy a magok kiszabadulhassanak. Összeforrt termőlevéllel

rendelkező gyümölcsök majd csak a közép kréta korban, míg csonthéjasok és bogyósok – a klasszikus értelemben vett húsos gyümölcsűek – pedig a kései kréta korban jelentek meg. A száraz gyümölcsűek lehetnek felnyílóak és nem felnyílóak, a húsosak pedig valódi termésűek (a gyümölcs termőlevél eredetű) illetve álterméűek (a gyümölcs kialakításában egyéb járulékos szervek is részt vesznek). Fosszíliák és molekuláris bizonyítékok is alátámasztják, hogy a húsos gyümölcsök a szárazakból származtathatók. Ebből az következik, hogy számos, a száraz gyümölcsök fejlődésében és érésében szerepet játszó gén konzerválódhatott a húsosak evolúciója során (Seymour et al. 2008).

A gyümölcsfejlődéskor a virág különböző részei (2. ábra) alakítják ki a száraz és húsos gyümölcsök végső szerkezetét (Coombe 1976). A végső forma attól függ, hogy hány és milyen típusú virágszerv vett részt a kialakításban, milyen ezeknek a helyzete, illetve a különböző szövetek hogyan növekednek és differenciálódnak.

Általánosságban véve a gyümölcsfejlődés négy szakaszra osztható: gyümölcskötődés, gyors sejtosztódási szakasz, sejt megnyúlás fázisa, érés.

A gyümölcskötődés előtt dől el, hogy a magház elhal, vagy gyümölcsöt fejleszt. A magház fejlődését a pollentömlő általi stimulálás, illetve a pollen váltja ki, azáltal hogy gibberellint termel. A növekvő pollentömlő mögött a bibeszál és a magház által termelt megemelkedett szintű auxin mennyiség detektálható.

A gyors sejtosztódási fázis kiterjed a gyümölcs összes növekedésben lévő részére. Pozitív korreláció van a fejlődő embrió citokinin szintje és az azt körülvevő szövetekben lévő sejtosztódás között, ugyanakkor még nem bizonyították, hogy az embrió citokinin szintje közvetlen szabályozza a gyümölcs sejtek osztódását.

A sejt megnyúlási fázis során következik be a legnagyobb mértékű növekedés a gyümölcs volumenét tekintve. Az egyes gyümölcsöket felépítő különböző szövettípusok sejtjeinek megnyúlása más intenzitással megy végbe. A gibberellinek serkentik a sejtmegnyúlási folyamatokat, továbbá szerepük van a szártagok hosszanti megnyúlásának fokozásában, sejtosztódásban, a levélnövekedés serkentésében. A receptor-hormon komplex hatására intracelluláris jelzőanyagok keletkeznek, amelyek a sejtmagba transzlokálódva módosítják a génaktivitást (Fodorpataki és Szigyártó, 2009).

Az érési fázis a mag és az embrió érésével szinkronban megy végbe. A száraz termésekben (pl. gabonafélék) a kiszáradás jelenti magát az érést. A húsos gyümölcsök esetében az érési folyamatoknak olyan vonzó minőségbeli változásokat (puhulás, megnövekedett létartalom, íz-és aromaanyagok felhalmozódása, szín) kell eredményezniük, amelyek majd biztosítják a magok szétterjesztését az állatok által.

2. ábra: Egyes termések kialakulása különböző eredetű virágszervekből. (forrás: http://bio1903.nicerweb.com/Locked/media/ch38/38_09FruitDevelopment.jpg)

A növényélettan a gyümölcsöket érésük alapján két csoportra-utóérőkre (pl: alma, banán, paradicsom) és nem utóérőkre (pl: szamóca, citrusok, szőlő)- osztja annak alapján, hogy mutatnak-e megemelkedett respirációs csúcsot és hirtelen beinduló etilén termelést az érés során. Ugyanakkor egyre több olyan bizonyíték kerül előtérbe, ami szerint az etilén részt vesz olyan gyümölcsök érésében is, amelyeket az eddigi ismeretek alapján a nem utóérők közé soroltak, sőt, számos növényfaj (pl.: sárgadinnye) különböző változatai és fajtái mindkét típusú érési jellegzetességet mutatják (Barry és Giovannoni 2007).

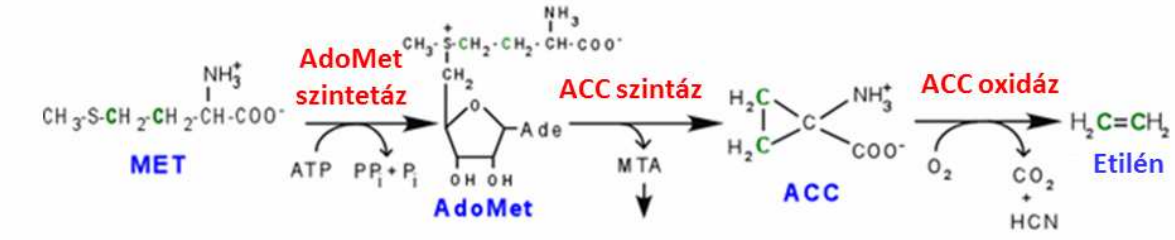
Igen fontos elemek a gyümölcsfejlődés és -érés szabályozásában résztvevő, növényi élettani folyamatokban központi szerepet betöltő, konzerválódott mikroRNS-ek (microRNA, miRNS). Ezek általánosságban a génszabályozásban egyfajta összehangoló funkcióval rendelkeznek, és expressziójuk hiánya pleiotróp hatások megjelenését vonja maga után a fejlődésben (Seymour et al. 2008). Másik fontos részei a génműködés fenntartásának a kis RNS-ek (small interfering RNA, siRNS) melyek a target génszabályozásban, és az epigenetikai géncsendesítésben vesznek részt.

2.2.1. Etilén függő útvonal

A magasabbrendű növényekben az etilén termelés szabályozásának két szintje van (Leliévre et al. 1997). Az I-es szint (alapszint) utóérőkben és nem utóérőkben egyaránt működik, és a stressz hatásra bekövetkező etilén termeléshez szükséges alap etilén szintet, illetve a vegetatív szövetekben kimutatható etilén szintet biztosítja. A II-es szint (második szint) ezzel ellentétben csak az utóérők hirtelen beinduló és megemelkedett etilén termelését, illetve virágszirmok (petúnia, szegfű) szeneszcenciáját szabályozza (Vendrell et al. 2000). Míg az I-es szintű etilén termelés exogén etilén hatására negatív visszacsatolással válaszol ugyanakkor etilén antagonisták pedig növelik az etilén szintézist, addig a II-es szintű etilén termelés autokatalitikus folyamat.

Az a megfigyelés, hogy a gázhalmazállapotú etilén számos húsos, főleg utóérő csoportba tartozó gyümölcs érését képes meggyorsítani, az etilén klimaktérikus érésben betöltött szerepének a tisztázásához vezetett. A hormon bioszintézisében lejátszódó folyamatok megismerése két kulcsfontosságú enzim az ACS (1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase) és az ACO (1-aminocyclopropane-1-carboxylate-oxidase) génjeinek a klónozását eredményezte. Ezeket az enzimeket multigén családok kódolják a magasabbrendű növényekben. Paradicsom esetében eddig kilenc *ACS*, és öt *ACO* gént izoláltak (Zarembinski and Theologis 1994; Barry et al. 1996; Oetiker et al. 1997; Nakatsuka et al 1998; Van-der-Hoeven et al. 2002; Barry and Giovannoni 2007).

Az etilén bioszintézisének útvonala jól definiált és számos korábbi publikáció tárgyalja (Yang and Hoffmann 1984, Leliévre et al. 1997).

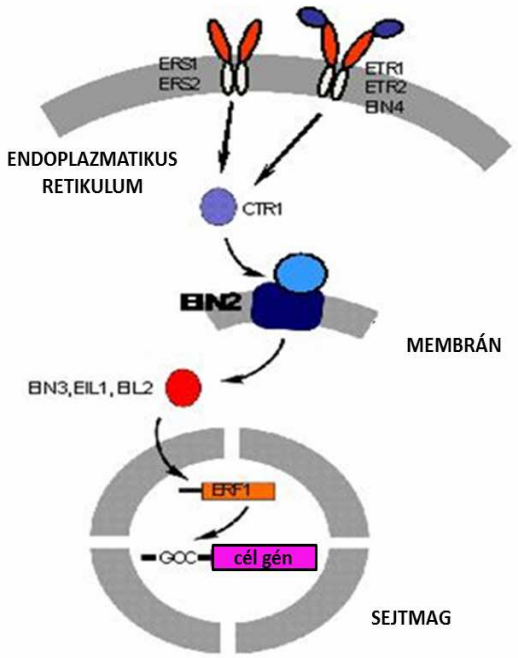


3. ábra: Az etilén bioszintézis útvonala (forrás: www.bio.unc.edu).

A szintézis metioninból indul, amiből az SAM-szintetáz enzim által az SAM (S-adenozil-metionin) keletkezik, majd ebből az ACS (1-aminociklopropán-1-karboxilát-szintáz)

enzim az ACC keletkezését katalizálja, (1-aminociklopropán-1-karboxilát) amit végül az ACO (1-aminociklopropán-1-karboxilát-oxidáz) enzim alakít át etilénné (C_2H_4) (3. ábra).

Az etilén jelátviteli útvonalában lejátszódó mechanizmusokat szintén több kutatócsoport vizsgálta az elmúlt tíz év során (Guo és Ecker, 2004). Ezek az eredmények legelőször a modell növény *Arabidopsis*, majd a paradicsom esetében adtak betekintést az etilén szignál transzdukciója során végbemenő folyamatokról. Megállapították, hogy etilén hiányában az etilén-kötő receptorok kapcsolatba kerülnek és inaktiválják a CTR1 (CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1) protein kinázt, amely negatívan szabályozza a folyamat további downstream eseményeit, kiváltva az EIN2 (ETHYLENE INSENSITIVE 2) fehérje csökkenését. A hormon receptorokhoz való kötődésekor viszont a CTR1 inaktiválódik, így nem tudja gátolni az EIN2-t, aminek következtében az EIN3, és EIL fehérjék aktiválódnak, kiváltva az EREPB (ETHYLENE RESPONSE ELEMENT BINDING PROTEIN) transzkripciós faktorokat, amelyek pedig a folyamat további target vagy effektor génjeinek expresszióját szabályozzák (4. ábra).



4. ábra: Az etilén szignál transzdukciós útvonala (forrás: www.biologie.uni-duesseldorf.de)

Bár a növények között az etilén receptorok családja nagymértékű strukturális különbséget mutat, ennek ellenére az összes eddig megvizsgált receptornak megvolt az etilén kötő képessége élesztőben történő túltermeltetés során. Filogenetikai rokonságuk és szerkezeti jellegzetességeik alapján az etilén-kötő receptorok két osztályba sorolandók. Az 1-es alosztály

tagjai az ETR1 és ERS1, míg a 2-es alosztály képviselői az ETR2, ERS2, és az EIN4 receptorok. A receptorok struktúráját tekintve mindegyikőjük tartalmaz három konzerválódott transzmembrán domént az N-terminális szomszédságában, egy GAF domént, amelynek funkciója jelenleg ismeretlen, és végül a C-terminális végen jel kiviteli motívumokat találunk (O'Malley et al. 2005, Barry et al. 2007).

2.2.1.1. Az etilén szerepe a szamóca gyümölcsfejlődésében és -érésében

Bár kis mennyiségben, de a szamóca gyümölcse képes endogén etilént (15-80 nL/kg-h) termelni (Knee et al. 1977, El-Kazazz et al. 1983, Perkins-Veazie et al. 1988, Abeles and Takeda 1990, Perkins-Veazie 1995). A hormont legnagyobb mennyiségben a nagyon fiatal, zöld gyümölcsökben detektálták, és megfigyelték, hogy innentől kezdve egészen a fehér érési stádiumig folyamatosan csökken az etilén szint, majd az érés során kissé, de folyamatosan nő mindaddig, míg a gyümölcsök pirosak nem lesznek (Abeles és Takeda 1990, Perkins-Veazie et al. 1996). Szamóca virágokban, különösen a szirom lehullása során szintén nagyobb mennyiségű etilént találtak (Knee et al. 1977). Újabb, *in planta* szamóca gyümölcsökben és virágokban elvégzett vizsgálatok azt támasztják alá, hogy a fejlődés és az érés során etilén szint-növekedés és respirációs ráta emelkedés mutatkozik a piros, érett szamóca gyümölcsökben (Iannetta et al. 2006). Arra is fény derült, hogy ez a megemelkedett etilén szint egy pozitív visszacsatolási mechanizmus szabályozása alatt áll, ez azonban a bekövetkezés idejét tekintve eltérő a klimaktérikus érésben megfigyelhető autokatalitikus etilén termeléstől. Ugyanis, míg az utóérő paradicsom érésének a kezdetén emelkedik a hormon szintje, addig a szamóca esetében ezt a szint-emelkedést nem tapasztalták csak 24 órával azután, hogy a gyümölcs a teljesen piros stádiumot elérte. Így a szamóca megemelkedett etilén szintjének élettani szerepe tisztázatlan maradt.

Etilén bioszintézisben résztvevő géneket (*FaACO1*, *FaACO2*, *FaACS*) már szamócából is izoláltak, illetve klónoztak (Trainotti et al. 2005, Balogh et al. 2006). Ezeknek az expressziós mintázatát vizsgálva megállapították, hogy mindkét *ACO* gén a legnagyobb mértékű expressziót a virágokban mutatta, és ehhez képest csökkenő mértékű szintet detektáltak a fiatal, fejlődő gyümölcsökben. A *FaACO1* esetében, a nagy zöld stádiumot követő fehér szamócákban expresszió növekedést figyeltek meg, amit folyamatos csökkenés követett egészen egy minimum szint beálltáig a piros, érett gyümölcsökben. A *FaACO2*-t

vizsgálva megállapították, hogy a minimum szint a fehér gyümölcsökben van, amit csekély mértékű, de folyamatos növekedés követett az érés során.

Trainotti és munkatársai megerősítették, hogy a megemelkedett etilén termelés nemcsak az érett szamóca gyümölcsökben figyelhető meg, hanem a világoszöldből fehér stádiumba kerülő gyümölcsök fejlődése során is, továbbá az érés látható kezdetét megelőző megnövekedett etilén termeléssel párhuzamosan a *FaACO1* gén folyamatosan megnyilvánul. Összehasonlítva a szintén nem utóérők csoportjába sorolt *Citrus* gyümölcs *ACO* génjét (*CsACO1*) a szamóca *ACO1*-el, nagyfokú hasonlóságot kaptak *in silico*. Ennek ellenére, míg a *CsACO1* génje etilén hatására megnövelt kifejeződést mutatott a nagyon fiatal gyümölcsökben és érzéketlen volt a hormonra az érett gyümölcsökben (Katz et al., 2004), addig a *FaACO1* a legnagyobb szintű etilén választ a piros, érett szamócákban adja.

A *FaACS* teljes hosszúságú cDNS-ét Balogh et al. (2006) RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) technikával izolálták. Megfigyelték, hogy a gén transzkriptuma legnagyobb mennyiségben a zöld gyümölcsökben található, továbbá bizonyították, hogy a fiatal zöld levelekben sebzés hatására indukálható.

Szamóca esetében a *FaETR1* és *FaERS1* gének expressziója folyamatosan növekszik az érési fázis során, a *FaETR2* pedig maximumát fehér gyümölcsökben éri el és marad végig ezen a szinten (Trainotti et al. 2005).

Ez a megemelkedett receptor szintézis és az ezzel járó, szintén megemelkedett etilén szint arra adhat következtetést, hogy akár nagyon kicsi mennyiségű etilén is képes kiváltani éréssel kapcsolatos fiziológiai választ (Trainotti et al. 2005). A *FaCTR1* konstitutív expresszióját figyelték meg az érés előrehaladtával a gyümölcs húsban és a vegetatív szövetekben egyaránt (Balogh et al. 2006, Kiss et al. 2007).

2.2.2. Etilén független útvonal

Az utóérő gyümölcsök fejlődésében és érésében etilén függő kaszkádok mellett etilén független kaszkádok is részt vesznek (White 2002). Ezt a RIN, NOR, és CNR transzkripciós faktorok jelenléte támasztja alá. Paradicsomban, ezeknek a géneknek érési mutánsai a következők: rin (ripening-inhibitor), nor (non-ripening), és Cnr (Colorless non-ripening). Megfigyelték, hogy ezekben a mutáns gyümölcsökben az érési folyamat teljes egészében gátolva van, beleértve a megemelkedett respirációs szintet, az etilén szintézist, karotin felhalmozódást, az aromaanyagok termelődését, a puhulást (Tigchelaar et al. 1978, Thompson

et al. 1999, Barry et al. 2007). Rin és nor gyümölcsöket vizsgálva azonban észrevették azt is, hogy sebzési etilént ezek is képesek előállítani, azaz a mutációk nem pusztán egy, az etilén bioszintézisben bekövetkezett akadály eredményei (Lincoln et al. 1988, Yokotani et al. 2004, Barry et al. 2007). Bár exogén etilén jelenlétében nem produkálnak autokatalitikus etilént, és nem is érnek be, de az etilén szenzitivitást és az etilén indukálta génexpressziót mutatják (White et al. 2002).

A gének lókuszait pozicionális klónozással behatárolták, és megállapították, hogy különböző családokba tartozó transzkripciós faktorokat kódolnak (Moore et al. 2002, Vrebalov et al. 2002, White et al. 2002, Manning et al. 2006, Barry et al. 2007). A MADS-box *RIN* gén szerepét a génkifejeződés gátlásával és mutáns egyedek komplementációjával állapították meg. A *MACROCALYX* (*MC*)-ban történő mutáció olyan virágzatot eredményez, ahol a csészelevelek levélszerű alakzatot vesznek fel. Ez az *MC* gén szomszédos a *RIN* lókusszal, és a *RIN* klónozása során azonosították. A rin lókusz egy deléciót tartalmaz, ami két szomszédos *MADS-box* gén között jött létre. A *MADS box* géncsalád tagjai számos, növénybiológiai folyamatban résztvevő transzkripciós faktort kódolnak (Leseberg et al. 2008). A paradicsomból izolált *MADS-box* géneknek az egyike, a *LEMADS-RIN*, a rin mutáns érést nem mutató fenotípusát adja, míg a másik gén, a *LEMADS-MC* promoterében bekövetkezett deléció eredménye a *macrocalyx* (*mc*) mutáció. A *RIN* a SEPALLATA alcsaládba, míg az *MC* az APETALA1 alcsaládba tartozik. A SEPALLATA és APETALA1 alcsaládok a MADS-box transzkripciós faktorok alosztályaiba sorolandók.

A *RIN* gén homológját (*Fv-MADS-9*) már szamócából is izolálták (Vrebalov et al. 2002). Ez az adat releváns lehet, mivel fény derülhet egy közös szabályozó kaszkádra, ami mindkét érési csoportba tartozó gyümölcs esetében működik.

2.2.3. Az auxin szerepe a szamóca gyümölcsfejlődésében – és érésében

Nitsch (1952) figyelte meg először, hogy ha a megtermékenyítés utáni 4, 7, 14, vagy 21. napon a szamócákról eltávolítják az aszmagokat, akkor a receptákulum fejlődése megáll, ami exogén auxin alkalmazásával helyreállítható. Tömegspektrofotométeres eljárással meghatározták, hogy az auxin szint a csúcsot mind a receptákulumban, mind pedig az aszmagban a fehér érési stádium előtt éri el (Perkins-Veazie 1995). A szamócák érése az auxin mennyiség aszmagból receptákulumba történő csökkenésével veszi kezdetét. Az eddig

azonosított éréshez kapcsolódó, szamócából származó génekről bizonyították, hogy auxin hatására csökken az expressziójuk (Manning 1994, Harpster et al. 1998, Manning 1998).

2.3. Funkcionális genomikai kutatások szamócában

Az utóbbi években számos kiváló publikáció jelent meg a szamóca genomika területéről, amelyek a szamóca érésében illetve gyümölcsfejlődésében végbemenő folyamatok pontosabb megismerését célozzák. Aharoni és O'Connell (2002) génexpressziós kísérleteket hajtottak végre cDNS mikrochip felhasználásával különböző érési stádiumú gyümölcsökben és aszmagban, ahol szignifikáns különbségeket találtak 441 transzkriptumban az aszmag és receptákulum szövetek között. Feltételezett etilén-válasz elem kötő faktorokról (EREB), illetve etilén válasz génekről megállapították, hogy aszmagban nagyobb mértékben fejeződnek ki. Ezek az eredmények mind hozzájárultak a későbbiekben olyan releváns transzkripciós faktorok azonosításához, amelyek az etilén-független szabályozó kaszkádokban vehetnek részt. Ilyen transzkripciós faktorok a MADS-box fehérjék, amelyekről bebizonyították, hogy alapvető szerepet játszanak a növénybiológiai folyamatokban a gyökérfejlődéstől kezdve a gyümölcsérésig (Leseberg et al. 2008).

Vrebalov et al. (2002) bizonyították, hogy a paradicsom éréséhez nélkülözhetetlen egy *MADS-box* gén jelenléte a RIN (ripening-inhibitor, érés-inhíbítor) lókuszon. A szamócából származó homológ tanulmányozásával egy közös szabályozó kaszkádra derülhet fény, ami utóérők és nem utóérők között egyaránt működik (White 2002, Giovannoni 2004).

Miután a gyümölcspuhulás az érés egyik elkerülhetetlen velejárója, több csoport vizsgálta az ezzel kapcsolatos mechanizmusokat. A szamóca érése során puha, lágy textúrájú gyümölcsöt fejleszt, ami számos módosulásnak a következménye (pektinek oldhatóságának növekedése, xiloglükán depolimerizáció, sejtfal megduzzadása) (Redgwell et al. 1997, Koh és Melton 2002, Santiago-Doménech et al. 2008). A pektinek olyan sejtfalban található makromolekulák, amelyek a puhulás során depolimerizálódnak és oldhatóvá válnak. Ezekről a folyamatokról feltételezik, hogy elősegítik a sejtfal tágulását és szétesését (Fischer és Bennett 1991, Castillejo et al. 2004). Már több pektin módosító gént izoláltak, amelyek között szerepelnek β-galaktozidázok, endopoligalakturonázok, pektát liázok.

A pektát liáz a nem észterifikált galakturonázok közötti kötéseket hasító enzim (Marín-Rodríguez et al., 2002, Santiago-Doménech et al. 2008). Egy szamócából származó

pektát liáz gén expressziójának gátlása során hosszabb idejű pulton tarthatóságot tapasztaltak és keményebb gyümölcsöket kaptak (Jimenez-Bermúdez et al. 2002).

A pektin észterázok szintén a gyümölcspuhulásban szerepet játszó enzimek, amelyek a pektin demetilációt katalizálják. Castillejo et al. (2004) négy pektin észteráz gént (*FaPE1, FaPE2, FaPE3, FaPE4*) klónoztak szamócából és megállapították, hogy a *FaPE1* expresszióját az érés kezdetén az auxin indukálja, és etilén hatására csökken a kifejeződése a szeneszcencia során. Ezeknek az eredményeknek a függvényében azt a következtetést vonták le, hogy a génexpresszió csökentése fontos faktor lehet a szamóca gyümölcs tárolhatóságának gyakorlatában.

A galaktózok a pektinekben igen nagyszámban megtalálható cukor származékok (Brett és Waldron 1996, Trainotti et al. 2001). Már elég korai kísérletek is bizonyították, hogy a szamóca érése során csökken a gyümölcsök galaktóz tartalma, így a galaktozidáz enzim fontos szerepet tölthet be a gyümölcs puhulása során (Knee et al. 1977, Redgwell et al. 1997). A β-galaktozidáz aktivitás zöld, fehér, rózsaszín, és piros érési stádiumú gyümölcsökben történő nyomonkövetése során megállapították, hogy az aktivitás csökkenése figyelhető meg a fehértől a piros stádiumig (Trainotti et al. 2001).

Az expanzinok olyan sejtfal fehérjék, amelyek megszüntetik a hidrogén kötéseket a cellulóz és hemicellulóz mikrofibrillumok között (Civello et al. 1999). A *FaExp2* expanzin tanulmányozása során arra derítettek fényt, hogy a génexpresszió etilén-inszenzitív, és az auxin kezelés sem befolyásolja (Civello et al. 1999). Ezek az adatok arra utalnak, hogy egyéb, -etilénen és auxinen kívüli- endogén szignálok is hatással lehetnek az érésben lévő szamócák génregulációjára.

Mivel a gyümölcsszín fontos minőségi paraméter, a szamóca flavonoid bioszintézissel kapcsolatos mechanizmusokat is intenzíven tanulmányozták. A flavonoidok másodlagos metabolitok, amelyek számos folyamatban fontos szerepet töltenek be (Moyano et al. 1998). Az antocianinok a flavonoidok csoportjába tartozó pigmentek, amelyek a gyümölcsök tetszetős színének a kialakításában vesznek részt. Bár már több szamóca pigment anyagot tanulmányoztak molekuláris szinten is, az antocianin bioszintézis útvonalának pontos megismerése a jövőbeli kutatások feladata. Ezt megcélozva Moyano és munkatársai (1998) egy feltételezett hidroflavonol 4-reduktáz gén expressziós analízisét hajtották végre, amelynek során eltérő expressziót tapasztaltak a különböző érési stádiumú gyümölcsökben. Erről a génről már előzetes vizsgálatok alapján is feltételezték, hogy fontos szerepet tölt be a magasabb rendű növények antocianin bioszintézisében.

Hasonló megfontolásból, Griesser és munkatársai (2008) egy feltételezett glikoziltranszferáz gén, a *FaGT1 in planta* funkciójának meghatározását tűzték ki célul. Az enzim, amelyet ez a gén kódol, az antocianin útvonalban megjelenő, első stabil köztes termék kialakulását katalizálja (Griesser et al. 2008). Egy újonnan kifejlesztett RNS interferencián alapuló, tranziens agroinfiltrációs analízis (Hoffmann et al. 2006, Griesser et al. 2008) segítségével a *FaGT1* gén csendesítését hajtották végre szamóca gyümölcsökön, ami a piros pigmentáltság csökkenését, és megvátozott színárnyalatát eredményezte.

Fehér hússzínű szamóca mutáns vizsgálatával azonosítottak egy Fra a1 (Fragaria allergen1) nevű allergént, ami a normális piros szín kialakításában résztvevő egyéb fehérjékkel van kapcsolatban (Hjerno et al. 2006).

Az esszenciális vitaminok, ásványi- és tápanyagokon kívűl a szamócát egyéb tulajdonságai is vonzóvá teszik a fogyasztók számára, ilyenek például az aroma és az íz. A gyümölcsök ízanyag összetevőinek a megjelenése az érési folyamatok velejárója. A szamóca ízének kialakulása jelentős mértékben függ a cukroktól és szerves savaktól és a közöttük lévő arányoktól. A gyümölcsben előforduló legjelentősebb oldható cukor a glükóz, fruktóz és szacharóz, ezeknek a mennyisége az érés előrehaladtával nő (Hancock 2000), míg a kisebb mennyiségben jelenlévők mint az inozit, xilóz és galaktóz, csökkennek az érés során (Moing et al. 2001). GC-MS analízis segítségével Fait et al. (2008) megállapították, hogy az általuk vizsgált összes metabolit közül a cukrok voltak azok, amelyek a legnagyobb szintű különbséget mutatták a receptákulumokban a fejlődés során.

A szamóca zamatanyagok összetevőit intenzíven tanulmányozták, és eddig már több mint 360 illóanyagot azonosítottak (Nijssen 1996, Lunkenbein et al. 2006). Ezek közül mintegy 15-20-ról feltételezik, hogy kulcs-összetevők. A FaOMT (*Fragaria x ananassa* O-methyltransferase) egy olyan enzim, amely az érés során a HDMF (4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone) metilációját katalizálja DMMF-ná (2,5-dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone). Ezenkívül a HDMF-ról azt is feltételezik, hogy a szamóca legfontosabb ízanyag összetevője.

A gyümölcstermesztés fontos paramétereként tartják számon a termékenyülést és a gyümölcshozamot is. Ehhez kapcsolódó érdekes kísérletet hajtottak végre Mezzetti és munkatársai (2004) a defH9-iaaM auxin bioszintézisért felelős gén tanulmányozása során. A *Solanaceae* családba tartozó növényfajok esetében megfigyelték, hogy a defH9-iaaM partenokarpiát okoz a triptofán indol-3-acetamiddá történő konvertálásával, amiből egy következő lépésben pedig indolecetsav hidrolizálódik. A génnel transzformált szamóca és

málna növények gyümölcshozamának jelentős mértékű növekedését tapasztalták (Mezzetti et al. 2004).

A szamóca legkülönfélébb minőségi paramétereinek fejlesztése megkívánja a szövet-specifikus promóterek izolálását és jellemzését is. A promóterek működésének tanulmányozására is széleskörben alkalmazott módszerek a tranziens expressziós elemzések. Ezt a technikát alkalmazva a *FaEG1* és *FaEG3* (endo-β-1,4-glucanase, EGase) gének promótereit vizsgálták, és bizonyították, hogy a két promóter fontos szabályozó elemeket tartalmaz: G-box kötő helyet azonosítottak a FaEG1 promóter aktív régiójában, és DOF1 (DNA binding with one finger 1) motívumot találtak a *FaEG3* gén promóterében. Előbbinek transzkripció szabályozó, míg utóbbinak anyagcsere szabályozó szerepe van. Megállapították, hogy a FaEG3 3' régiója lehet felelős az érett gyümölcsökben lévő alacsony FaEG3 mRNS szintjéért (Spolaroe et al. 2003). Az EGase-ok a gyümölcs puhulásában résztvevő, gazdaságilag fontos cellulázok.

Egy másik érdekes szamóca promóter a *GalUR* gén promótere. Ez a gén a D-galakturonsav–reduktázt kódolja, amely a C-vitamin bioszintézisben résztvevő enzim (Agius et al. 2005). Maga a gén gyümölcs-specifikus, és expressziója az érés előrehaladtával nő, továbbá megállapították, hogy a promóter fényindukálható, és aktivitásának mértéke hasonló a CaMV 35S kostitutív promóteréhez. Miután a gén a D-galakturonsavat C vitaminná konvertálja, promótere pedig fényindukálható, ezért fontos gazdasági jelentőség tulajdonítható mindkettőnek a szamóca gyümölcs minőségi paramétereinek javításában a C-vitamin tartalom növelése által.

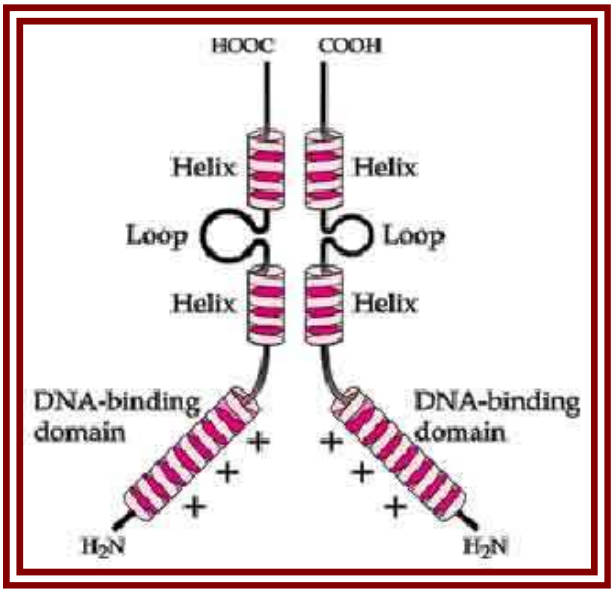
2.4. A basic-helix-loop-helix (bHLH) transzkripciós faktort kódoló SPATULA gén

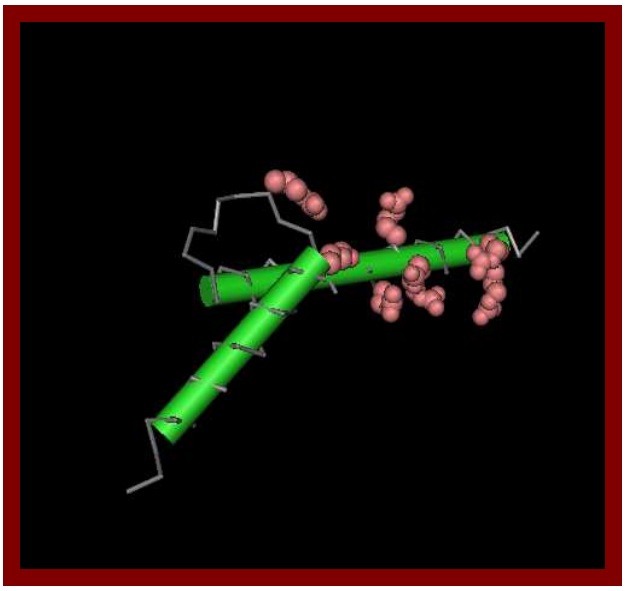
A transzkripciós faktorok olyan fehérjék, amelyek a genetikai információ DNS-ről RNS-re történő átírását szabályozzák. A transzkripciós faktorok ezt a funkciót egyedül, vagy más fehérjékkel együtt komplexben hajtják végre elősegítve (aktivátorként) vagy gátolva (represszorként) az RNS polimeráz működését. Az eukarióta transzkripciós faktorok DNS kötő doménjeit strukturális kategóriákba sorolják. A szerkezet sajátosságai alapján ezeket a motívumokat helix-turn-helix, cink-ujj, leucin-cipzár, helix-loop-helix elnevezésekkel illetik.

A basic-helix-loop-helix (bHLH) fehérjék olyan transzkripciós faktorok, amelyek nem növényi eukariótákban - legfőképp emlősökben - funkcionálisan már jól jellemeztek. Az

eddig megismert és jellemzett állati bHLH-k fontos szerepet töltenek be az idegrendszer-, izom-, és bélszövetek fejlődésében, illetve toxinokra adott válaszok szabályozásában.

Maga a bHLH domén ~60 aminosavból áll, és két, funkcionálisan eltérő régiót tartalmaz (5. ábra, A, B): az alap régió a domén N terminális végén található, és a DNS kötésében vesz részt, míg a HLH régió a C terminális részen van, és dimerizációs doménként működik (Murre et al. 1989, Ferre-D'Amare et al. 1994).





A. **B.**

5. ábra: A basic-helix-loop-helix transzkripciós faktor doménjei (A.) (forrás: http://8e.devbio.com/images/ch05/0504fig5.gif) és a konzerválódott HLH domén 3D szerkezete (B.) (BLAST, Conserved Domains)

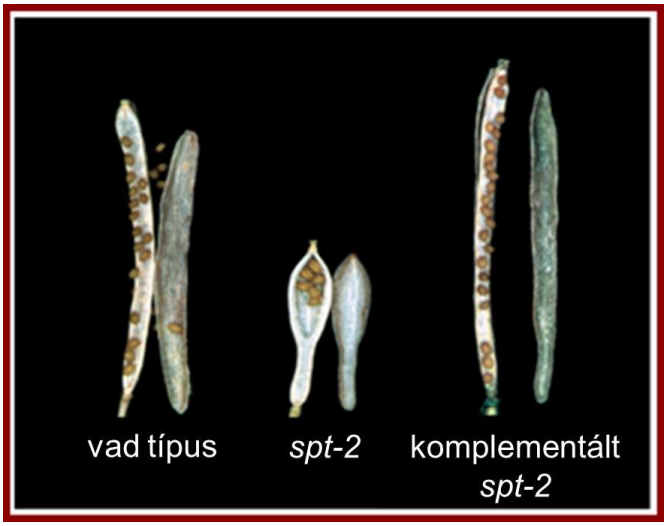
Az eddigi jellemzett növényi bHLH fehérjék olyan transzkripciós faktorokként működnek, amelyek a termőlevél és epidermális fejlődésben, fitokróm jelátviteli mechanizmusokban, antocianin bioszintézisben, valamint stressz válaszokban játszanak szerepet (Schiefelbein 2003, Toledo-Ortiz et al. 2003, Duek és Fankhauser 2005).

Egy újabb tanulmány számol be arról, hogy a növényi bHLH-k monofiletikus eredetűek, és ezt olyan bHLH alcsaládok közötti hasonlóságokra alapozzák, amelyeket a növények és egyéb eukarióták között találtak (Pires és Dolan 2010).

Az *Arabidopsis thaliana*-ból származó *SPATULA* gén egy olyan bHLH-t kódol, amely fontos szerepet tölt be a termőlevél és becő (gyümölcs) fejlődésében, ezen kívül egyéb szövetekben is mutat expressziót, ahol a növekedést és a szövetek abszcisszióját segíti elő (Heisler et al. 2001, Groszmann et al. 2008). Ez az első olyan növényi basic-helix-loop-helix gén, amely a virág organogenezisében játszik szerepet (Heisler et al. 2001). A legújabb

eredmények pedig azt bizonyítják, hogy az *AtSPT* a végső levél méret kialakítását is szabályozza (Ichihashi et al. 2010), továbbá megnyílvánul a becők (gyümölcsök) leválási zónáiban, fejlődő portokokban, embriókban, a gyökércsúcsok bőrszövetében és központi hengerében (sztéle) (Groszmann et al. 2010).

Etil-metán-szulfonát (EMS) mutagén alkalmazásával két *SPATULA* allélt izoláltak, a gyengébb *spt-1*, illetve az erősebb *spt-2* mutánst (Alvarez és Smyth 1999). A mutáns fenotípus vizsgálata során megállapították, hogy a *spt-2* növények virágzásakor a termőtáj (gynoecium) keskenyebb a bibeszál tájékán, és a bibe felületén lévő papillák fejlődése is redukált. Néhány esetben a termőlevelek egy, vagy mind a két oldalukon nincsenek összeforrva a legfelső részeiken, továbbá a bibeszál üres, és a válaszfal (septum) alulfejlett, illetve összeforratlan. Nincs bibecsatorna, mivel hiányoznak azok a sejtek a bibeszálból és a septumból, amelyek kiválasztják az ehhez szükséges extra-celluláris mátrixot. A *spt-2* termője mintegy 20%-kal kevesebb magkezdeményt tartalmaz, amelyeknek majd csak kb. a negyedéből fejlődik mag. Ez nagy valószínűséggel annak tudható be, hogy a bibecsatorna hiányából adódóan nincs megfelelő pollentömlő növekedés. A *spt* mutáns becők rövidebbek, mint a vad típusúak, és a közepükön szélesebbek, ez eredményezi a „spatula-szerű" megjelenést (6. ábra). Egyéb virágbéli, vagy vegetatív szöveti eltérést nem tapasztaltak. A *spt-1* mutáns is mutatja az összes, *spt-2*-nél leírt defektusokat, de többnyire gyengébb mértékben.



6. ábra: Vad típusú, *spt-2* mutáns, és az *AtSPT* génjével komplementált *spt-2 Arabidopsis* növények. Míg a vad típusú növényről származó becő normális fenotípusú, addig a *spt-2* mutáns becője fejlődésében redukált, „spatula-szerű" deformálódást mutat. A *SPATULA* génnel komplementált *spt-2* növények újra a vad típusú becők fenotípusos jegyeit hordozzák, bizonyítva a gén funkcióját a termőlevél fejlődésében (Forrás: Heisler et al. 2001).

Abból a célból, hogy kiderítsék, hogyan szabályozza az *AtSPT* a saját transzkripcióját, *spt-2* mutánsok fejlődő termő szöveteiben követték nyomon a génexpressziót. Ennek során megállapították, hogy az *AtSPT* expressziója valószínűleg nem autoregulált.

További vizsgálatok segítségével kimutatták, hogy az *AtSPT* két másik génnel, a *CRABS CLAW*-val (*CRC*) és az *AGAMOUS*-szal (*AG*) párhuzamosan szabályozza a termőlevél fejlődését (Alvarez és Smyth, 1999). Ezek közül a *CRC* szupresszálja a fejlődő termőtáj sugárirányú növekedését, ugyanakkor elősegíti a hosszirányú növekedést, míg az *AG* szerepe a bibeszál csúcsi növekedésének elősegítésében és a termő falának a kialakításában van.

A három gén (*AG*, *CRC*, *SPT*) többnyire egymástól függetlenül működik, de ennek ellenére a köztük fellépő szabályozó kölcsönhatások befolyásolhatják az expressziójukat (Alvarez és Smyth 1999, Bowman és Smyth 1999, Heisler et al. 2001).

Gremski és munkatársai (2007) számoltak be arról, hogy sikerült három, az *Arabidopsis* női reproduktív szerveinek fejlődésében szerepet játszó *HECATE* (*HEC*) gént azonosítaniuk. A *HEC* gének bHLH-hoz hasonló funkciójú transzkripciós faktorokat kódolnak és a gén funkciójának elvesztése abnormalitást okoz a bibecsatorna, a bibe és a válaszfal fejlődésében, illetve a fertilitás is korlátozott, csakúgy mint azt korábban a *spt* mutánsokban is tapasztalták. Hogy pontos információt szerezzenek a *SPT* és *HEC* gének közötti lehetséges kölcsönhatásokról, élesztő két-hibrid rendszer segítségével bizonyították, hogy a HEC fehérjék képesek a SPT fehérjével heterodimert képezni, viszont saját magukkal nem tudnak dimerizálódni. A kísérletekből arra következtettek, hogy a *SPT* és *HEC* gének bizonyos fejlődési programokban együttműködve vesznek részt, és a *SPT* a szélesebb expressziós doménje miatt más egyéb bHLH fehérjékkel léphet kölcsönhatásba így további fejlődési folyamatokba kapcsolódnak be (Gremski et al. 2007).

Már bebizonyosodott, hogy a SPT funkció a termőtájban kapcsolatban áll az auxin érzékenységgel. Az apikális-bazális mintázat kialakulása ugyanis a termő csúcsi irányából alapi irányába történő csökkenő auxin koncentrációtól függ (Nemhauser et al. 2000).

Egy auxin válszért felelős faktorról, az ETTIN-ről (ETT) azt feltételezik, hogy negatívan szabályozza a SPT expressziót (Heisler et al. 2001).

A *SPT* termőlevél fejlődésben betöltött funkcióján kívül bizonyították szabályozó szerepét a csírázásban fény- és hidegkezelés hatására, illetve a sziklevelek és sziromlevelek megnyúlásában (Penfield et al. 2005). Megállapították, hogy a SPT mint transzkripciós represszor hat a gibberellinsav (GA) bioszintézisében részt vevő génre, a GA3 oxidázra (GA3ox), melynek expresszióját transzkripcionális szinten fény és hideg hatás indukálja a

megduzzadt magokban. A gibberellin a mag csírázásához feltétlenül szükséges növényi hormon, bioszintézisét mind a fény, mind pedig a hideg hatás szabályozza. Kísérleteik során Penfield és munkatársai rávilágítottak arra, hogy a SPT egy fény-stabil represszora a GA3ox-nak, és csírázási választ közvetít hideg hatására.

A *SPATULA* bHLH régióját vizsgálva két fontos konzerválódott strukturális domént azonosítottak: egy amfipatikus helix-et és egy savas domént (Groszmann et al. 2008). Megállapították továbbá, hogy a savas alegység a SPT termőlevél funkció kialakításában lényeges, amit pedig az amfipatikus helix segíti elő. Ezek a strukturális domének konzerválódtak a paradicsom ortológjukban, és a kísérletek során bebizonyosodott, hogy ez a paradicsom SPT ortológ képes teljesen helyreállítani a termő funkciót az *Arabidopsis spt* mutáns növényekben (Groszmann et al. 2008).

A kísérletek azt is bebizonyították, hogy a SPT inkább aktiválja, mintsem gátolja a target termőlevél géneket (Groszmann et al. 2008). Ezt egyrészt egy SRDX repressziós domén, másrészt egy VP16 aktivációs domén SPT fehérjéhez való fúzionáltatásával, majd a növénytranszformálást követően a transzgénikus egyedek vizsgálatával sikerült alátámasztani. A 35S:SPT-VP16 konstrukció képes volt a termőlevél fejlődési program számos résztvevőjét aktiválni, aminek során ektópikus bibeszál-szerű szövetek, illetve bibe-és magkezdemény-szerű kinövések voltak megfigyelhetők a befelé görbülő csészeleveleken. Ezek az abnormális csészelevelek hasonlóak voltak azokhoz az *ap2agcrc* (*apetala2, agamous, crabs claw*) hármas mutánsokhoz, ahol a SPT ektópikusan aktív (Alvarez és Smyth 1999, Heisler et al. 2001, Groszmann et al. 2008). Normál esetben az APETALA2 (AP2) megakadályozza a SPT működését, illetve feltételezhetően a ko-aktivátorok működését is a csészelevél körben, bár ezeknek a ko-aktivátoroknak a hiánya valamilyen részben ellensúlyozható a VP16 aktivátor alkalmazásával.

Érdekességként felmerült, hogy a 35S:SPT-VP16 által ektópikusan aktivált gének egyike lehet a *STYLISH2* (*STY2*) (Kuusk et al. 2002, Groszmann et al. 2008). Úgy találták, hogy az *STY2* akkor expresszál a bibeszál szövetekben, amikor a *SPT* funkció is működik (Groszmann et al. 2008). További bizonyítékok támasztják alá, hogy a *STY* gének és a *SPT* inkább egymást átfedve, mintsem egymást követően fejtik ki hatásukat a bibeszál fejlődési folyamatokra (Kuusk et al. 2002).

A *STY* és *SPT* gének funkciója az auxin kapcsán is összefonódik (Nemhauser et al. 2000, Groszmann et al. 2008). A poláris auxin transzport gátlásával a *spt* mutáció valamely részben helyreáll (Nemhauser et al. 2000), míg a *sty1* mutáns defektusok erősebb fogékonyságot mutatnak (Sohlberg et al. 2006). Így elképzelhető, hogy a SPT az auxin

szignál transzdukciós útvonalban lejátszódó folyamatokat segíti elő a fejlődő termőcsúcsokban (Nemhauser et al. 2000), a STY fehérjék pedig az auxin bioszintézis szabályozásában vehetnek részt az apikális régiókban (Sohlberg et al. 2006).

Az amfipatikus hélixek gyakoriak a fehérje-fehérje kölcsönhatásokban, és a SPT konzerválódott amfipatikus hélixe szintén a ko-aktivátor fehérjékkel léphet kölcsönhatásba. A bHLH C terminálisán lévő béta szál kétségkívül a SPT termőlevél funkciójához nélkülözhetetlen.

Az *AtSPT* gén promóter core régióját tanulmányozva Groszmann és munkatársai (2010) olyan CCAAT box-ot azonosítottak, amelynek meglétét osztódó szövetekben expresszálódó gének transzkripciójával hozzák összefüggésbe (Mantovani 1998, Romier et al. 2003). Számos egyéb szabályozó elem jelenlétére is fény derült, köztük egy E-box-ra is, ami a fejlődő leválási zónában lévő *SPT* expresszióhoz szükséges (Groszmann et al. 2010). A promóter core részétől upstream további szövet-specifikus enhanszerek találhatók, köztük olyanok, amelyek a bibecsatorna-és termőlevélbéli expressziót befolyásolják. Ezenkívül sikerült több silencert is azonosítani a promóter mentén, ezek közül vannak, amelyek a levél epidermiszében, a gyökerekben, vagy a porzószál csúcsi részében szabályozzák az expressziót (Groszmann et al. 2010).

3. Anyag és módszer

3.1. Növényanyag

A kísérleteket köztermesztésben lévő oktoploid szamócafajták (*Fragaria x ananassa* cv. Marmalade, *Fragaria x ananassa* cv. Frapendula) felhasználásával végeztük. Vegetatív és generatív szöveteket egyaránt alkalmaztunk. A növényeket a Genetika és Biotechnológiai Intézet kísérleti terén neveltük kertészeti körülmények között. A gyümölcsök esetében különböző érési stádiumban lévő anyagot vontunk vizsgálatba (7. ábra).

7. ábra: Különböző érési stádiumban (zöld, fehér, rózsaszín, piros) lévő szamócák

3.2. Hormonkezelések és sebzés

3.2.1. Auxin, etilén kezelés, és sebzés alkalmazása leveleken

A leveleken történő kezelésekhez levélnyéllel együtt begyűjtött fiatal szamóca leveleket használtunk fel. A kezelések időtartama alatt 20 mM koncentrációjú MES (2-N-morpholin-etánszulfonsav) oldatban tartottuk a leveleket.

Az auxin kezelést 1 mM koncentrációjú NES (naftil ecetsav) adagolásával hajtottuk végre különböző időtartamok (0,5 óra, 1 óra, 2 óra) alkalmazásával. Ezután a mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd -80°C-on tároltuk felhasználásukig.

Az etilén kezelés során a leveleket gumimembrános tetejű üvegekbe tettük, és Hamilton pipettával juttattuk be a különböző mennyiségű (20 µl l^{-1} és 200 µl l^{-1}) etilén gázt. 5 óra elteltével a mintákat lefagyasztottuk, és -80°C-on tároltuk.

A sebzési kísérlethez a leveleket a levéltesten szikével többször bevagdaltuk, és különböző idő intervallumok (0,5 óra, 2 óra) elteltével fagyasztottuk le.
Kontroll mintaként minden esetben kezeletlen növényanyagot használtunk.

3.2.2. Hormonkezelés gyümölcsökön

3.2.2.1. Auxin

Az auxin kezeléshez 1 cm nagyságú, fiatal zöld stádiumban lévő gyümölcsöket használtunk Medina-Escobar (1998) leírása alapján. A kísérlet során a gyümölcsök végig a növényeken maradtak, csak a kezelés befejeztével szedtük le őket. A kezeléshez a szamócákat 1% (v/v) DMSO-ban (dimetil szulfoxid) oldott 1 mM NES-t tartalmazó lanolin pasztával vontuk be. A kontrollok esetében hasonlóképp jártunk el, azzal a kivétellel, hogy a paszta hormon nélkül került a gyümölcsökre, csak az üres DMSO-t tartalmazta. A kezelés 96 órán át tartott, majd folyékony nitrogénben lefagyasztottuk a gyümölcsöket, és -80°C-on tároltuk a további felhasználásukig.

3.2.2.2. Etilén

Az etilén kezeléshez négy érési stádiumban lévő gyümölcsöket (zöld, fehér, rózsaszín, piros) használtunk. A szamócákat gumimembrános tetőkkel ellátott üvegekbe helyeztük (8. ábra), és ezeken a membránokon át injektáltuk be a 100 µl l^{-1} mennyiségű etilén gázt (Linde ethen) egy Hamilton pipettával. A kontrollnak szánt anyag hasonlóképp volt kezelve, a hormon hozzáadásának kivételével. A gyümölcsöket 24 óra elteltével fagyasztottuk le folyékony nitrogénben, majd -80°C-on tároltuk őket felhasználásukig.

8. ábra: Etilén kezelés alkalmazása a különböző érési stádiumú szamócákon. A meghatározott mennyiségű gázhalmazállapotú hormont Hamilton pipettával juttattuk be az üvegekbe a gumimembrános tetők átszúrásával.

3.3. Növényi RNS tisztítás

Az RNS extrakcióhoz a Salzman et al. (1999) által közölt metodikát alkalmaztuk. Ehhez friss szamóca szöveteket (100-500 mg) folyékony nitrogénben elporítottunk, majd hozzáadtunk a tömegüknek megfelelő mennyiségű extrakciós puffert, amely a következőket tartalmazta: 4 M guanidin-tiocianát, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 25 mM nátrium-citrát (pH 8,0), 0,5% N-lauryl sarcosine. A pufferhez frissen 0,1g PVP-t és 200 µl 2-merkaptoetanolt adtunk 10 ml-enként. A szövetet a pufferrel alaposan elvegyítettük, összeráztuk, majd egyenlő térfogatú kloroform:izoamilalkohol (24:1) keverékével szintén alaposan összeráztuk. Ezt 10 perces 16000 g-n történő 4°C-os centrifugálás követte. A felülúszót átpipettáztuk új csövekbe, és a kloroformos tisztítást mindaddig ismételtük, míg látható interfázist tapasztaltunk. Ezután a felülúszóhoz 2x térfogatú abszolút etanolt és 0,1x térfogatú NaCl-ot adtunk és egy éjszakán át -20°C-on csaptuk ki. Másnap 10 perces 16000 g-n történő 4°C-os centrifugálás következett, majd a csapadékot 5 ml nukleáz mentes vízben (Fermentas) vettük fel. Ehhez egyenlő térfogatú fenol (pH 8,0): kloroform: izoamilalkohol (25:24:1) keveréket adtunk,10 percen keresztül alaposan összeráztuk, majd 10 percig 13000 g-n centrifugáltuk. Ezt a lépést addig folytattuk, míg látható volt az interfázis. A felülúszóhoz 2x térfogat abszolút etanolt és 0,1x térfogat 5 M NaCl-t adtunk, és overnight csaptuk ki az RNS-t. Másnap 16000 g-n 15 percen át 4°C-on centrifugáltuk, majd a csapadékot 1ml nukleáz mentes vízben szuszpendáltuk. Az így kapott RNS-t DNase I (Roche) kezelését követően a Qiagen cég Rneasy Kit szilika membrános csöveinek és reagenseinek felhasználásával tisztítottuk tovább, végül

spektrofotométer (NanoDrop) és agaróz gélen történő elválasztással győződtünk meg arról, hogy megfelelő minőségű (260/280=2,0 és 260/230=1,8-2,2) és mennyiségű (50-100 ng) RNS áll rendelkezésünkre a cDNS szintéziséhez.

3.4. cDNS szintézis

100-200 ng mennyiségű össz RNS-t Multiscribe Reverz Transzkriptázzal (Applied Biosystems Incorporation, ABI) írtuk át cDNS-sé az ABI protokolljában leírtak szerint, 15 µl végtérfogatban. A reakció elegy összetételét az 1. táblázat tünteti fel. A reakciót jégen mértük össze, majd a következő reakciókörülményeket állítottuk be: 16°C 30 perc, 42°C 30 perc, 85°C 5 perc, 4°C ∞.

1. táblázat: A cDNS szintézishez használt reakcióelegy összetétele

Komponens	Master Mix térfogat/15µl
dNTP mix (100 mM) (Fermentas)	0,15 µl
Multiscribe RT enzim (50 u/ µl) (Applied Biosystems)	1 µl
10x RT puffer (Applied Biosystems)	1,5 µl
RNase Inhíbítor (20 u/ µl) (Fermentas)	0,19 µl
Nukleáz-mentes H_2O (Fermentas)	4,16 µl
Random hexamer (50 µM) (Applied Biosystems)	2 µl
OligodT (50 µM) (Applied Biosystems)	1 µl
RNS templát (100-200 ng)	5 µl
Összesen:	15 µl

3.5. Elválasztás

Az RNS, és PCR termékek futtatásához etídium-bromidos 1-1,5%-os agaróz gélt és 0,5x TBE (90 mM Tris-HCl, 90 mM bórsav, 20 mM EDTA) puffert használtunk, a futtatás 9 V/gél cm feszültséggel történt, majd UV fény segítségével tettük a termékeket láthatóvá. Az eredményeket Alpha Innotech ChemImager géldokumentációs rendszerrel rögzítettük.

3.6. Northern hibridizáció

A totál RNS mennyiségi és minőségi paramétereinek meghatározása után 7 µg-ot 1,2%-os formaldehid-agaróz gélen [1,2 g agarose, 73 ml H_2O, 10 ml 10X MAE (500 mM MOPS, 100 mM EDTA), 17 ml formaldehid] futtattuk meg, majd Hybond N+ filterre (Amersham) vittük kapilláris blot segítségével (Sambrook et al. 1989), ezután 30 másodpercig UV fényben tartottuk (crosslink: 70 000 micro Joule/cm^2). A radioaktív próbához *FaSPT* és *FaGAPDH* génekből származó, génspecifikus primerekkel cDNS-en felszaporított, agaróz gélen elválasztott, majd a gélből visszaizolált és tisztított terméket jelöltünk [α^{32}P] CTP-vel. A hibridizációt 65°C-on Perfecthyb TM Plus pufferben (Sigma) hajtottuk végre. A filter mosása szintén 65°C-on, 2X SSC-0,1%SDS és 0,2X SSC-0,1%SDS oldatokkal történt 20, majd 15 percig. A radioaktív jeleket Storm Phosphorimager készülékkel (Molecular Dynamics) jelenítettük meg, és Phosphorimage screent (GE Healthcare) használtunk a detektáláshoz.

3.7. qRT-PCR analízis

A real time PCR vizsgálatokat Rotorgene 6000 (Corbett Research, Australia) készüléken hajtottuk végre. Az eredményeket a Rotor-Gene Analysis Software V6.0 szoftverrel elemeztük. A reakciókörülmények a következők voltak: 10 perc kezdeti denaturáció 95°C-on, majd 95°C 10 sec, 65°C 15 sec, 72°C sec 40 cikluson keresztül.

A reakcióelegy összetételét a 2., a felhasznált primereket a 3. táblázat mutatja.
A specifikus primerek a már ismert *FaSPT* szekvenciára lettek tervezve, referenciaként (*normalizer)* pedig a szamóca gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz génjére (*Fragaria x ananassa GAPDH2*, GenBank azonosító: AF421145) tervezett primereket használtuk, mivel a

kísérletek kezdetekor erről a háztartási génről rendelkeztünk szekvencia információval, továbbá expresszióját a kezelések nem befolyásolták.

Minden esetben három technikai ismétlést alkalmaztunk.

2. táblázat: A qRT-PCR során felhasznált reakcióelegy összetétele

Komponens	Master Mix térfogat/20µl
dNTP mix (10 mM) (Fermentas)	0,5 µl
WestTeam Taq Polimeráz (1u/µl) (WestTeam Biotech)	1 µl
20x WT puffer (WestTeam Biotech)	2 µl
$MgCl_2$ (25 mM) (Fermentas)	1,5 µl
20x EvaGreen fluoreszcens festék (Biotium Incorporation)	1 µl
Nukleáz-mentes H_2O (Fermentas)	11 µl
Primer forward (10 µM)	0,5 µl
Primer reverse (10 µM)	0,5 µl
cDNS templát	2 µl
Összesen:	20 µl

Az analízis során a transzkriptumok mennyiségi meghatározása a C_t (treshold cycle, küszöb ciklus) értékeken alapult. A C_t az az érték, amelyet az amplifikáció exponenciális fázisa alatt kapunk amikor még a PCR hatékonyságát a kiindulási reakcióelegyben lévő limitáló reagensek és kisebb különbségek nem befolyásolják. A C_t az a ciklus, amelynél a fluoreszcencia először detektálható a háttér fölött, és a kezdeti kópiaszám logaritmusával fordítottan arányos. Kísérleteinkben minden qRT-PCR reakció C_t értéke a szamóca *GAPDH* génjének C_t értékéhez volt normalizálva. A ΔC_t és $\Delta(\Delta C_t)$ értékek a következőképpen kerültek számításra:

$\Delta C_t = C_t$ (vizsgált gén)-C_t (housekeeping gén)

$\Delta(\Delta C_t) = C_t$ (kontroll minta)-C_t (kezelt minta)

3.8. Vektorkonstrukciók előállítása

3.8.1. A FaSPT *ORF-ének klónozása*

A *FaSPT* génjének cDNS-AFLP-vel történő izolálását egy korábbi disszertáció tárgyalja (Balogh Andrea: A termesztett szamóca gyümölcsérésében és fejlődésében szerepet játszó gének izolálása, 2006).

Az 1098 bp hosszú *FaSPT* ORF-et pGemTeasy (Promega) vektorba TA klónozással ligáltuk a gyártó utastásai szerint. A klónozásokhoz DH5α kompetens sejteket használtunk. A klónozás sikerességét kolónia PCR-rel igazoltuk, melynek reakciókörülményei a következők voltak: 94ºC 4 perc, majd 35 cikluson át 94°C-on 30 s-ig, 60°C 30 s-ig és 72°C-on 1,5 perc, végül a keletkezett terméket egyszer 10 percig 72°C-on elongáltuk BioRad készülékben. A reakcióelegy összetételét a 3. táblázat foglalja össze, templátként fogvájónyi baktériumtelepet mostunk bele a Master Mix-be.

A kolónia PCR alapján pozitívnak bizonyult telepekből folyékony tenyészetet inditottunk, majd a plazmidok tisztítása után restrikciós endonukleázokkal (SmaI/SacI, Fermentas) történő hasítással is igazoltuk a klónozás sikerességét. Ennek során a plazmid DNS-eket 20-50 µl reakció-térfogatban, a gyártó által javasolt pufferben és hőmérsékleten 60-90 percig emésztettük.

3. táblázat: A kolónia PCR során használt reakcióelegy összetétele

Komponens	Master Mix térfogat/20µl
dNTPmix (10 mM) (Fermentas)	0,5 µl
WestTeam Taq Polimeráz (1u/µl) (WestTeam Biotech)	1 µl
20x WT puffer (WestTeam Biotech)	2 µl
$MgCl_2$ (25 mM) (Fermentas)	1,5 µl
Primer forward (10 µM)	0,5 µl
Primer reverse (10 µM)	0,5 µl
Nukleáz-mentes H_2O (Fermentas)	14 µl
Összesen:	20 µl

3.8.2. A FaSPT *génjének csendesítéséhez használt hairpin vektorkonstrukció előállítása*

A konstrukció létrehozása során az emésztési és ligálási reakciókhoz a gyártó (Fermentas) által leírt útmutatókat követtük. A plazmidok izolálását a Qiagen Miniprep Kit-jével, illetve a Sambrook et al. (1989) által közölt módszer szerint vittük véghez, a gélből a fragmentumok visszaizolálását a Qiagen Gel Purification Kit-jével végeztük.

A szükséges szekvenálások végrehajtásával a Biomi Kft.-t (Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Gödöllő) bíztuk meg. A konstrukció előállításának részleteit az Eredmények fejezet tartalmazza.

3.9. A kísérletek során alkalmazott primerek

A vizsgálatok során felhasznált primereket *primer3* programmal terveztük, és a Csertex Kft.-vel szintetizáltattuk. A primerek elnevezéseit, szekvenciáit és az általuk felszaporított termékek méreteit a 4. táblázat foglalja össze.

4. táblázat: Kísérleteink során felhasznált primerek adatai

Primer elnevezése	Primer szekvenciája (5'- 3')	Felszaporított termék mérete
FaSPT forward	TCTGAAACAGAGCAATAGGAATG	1098 bp
FaSPT reverse	TTACTGAGTACCCTCCTTCCTGTC	1098 bp
FaSPT hp sense forward	TCTCGAGTGACCGGACAGCAGTTC	399 bp
FaSPT hp sense reverse	TGAATTCGCATTGAAGCCTTGTCTG	399 bp
FaSPT hp antisense forward	GTCTAGATGACCGGACAGCAGTTC	399 bp
FaSPT hp antisense reverse	GTCTAGAGCATTGAAGCCTTGTCTG	399 bp
FaSPT RT forward	CCTCAAACAGCTCCAGCTTC	134 bp
FaSPT RT reverse	CAGGCCTATTTTCCTCACCA	134 bp
FaGAPDH forward	CAAGGCTGCTATCAAGGAGGAG	133 bp
FaGAPDH reverse	TGCAATTCCAGCCTTGGCATC	133 bp

3.10. Baktérium sejtek transzformálása

3.10.1. Echerichia coli *sejtek transzformálása*

A klónozások során DH5α coli törzset használtunk a kompetens sejtek előállításához, amit Mandel és Higa (1970) módszere szerint végeztünk. Az *Echerichia coli* esetében LB tápoldatot (10 g Bacto tripton, 5 g Bacto élesztő kivonat, 10 g NaCl, pH=7) és LB agar lemezt (15 g agar/1000 ml LB tápoldat) használtunk.

A transzformálások során a lefagyasztott 200 µl térfogatú kompetens sejteket jégen felolvasztottuk, majd rövid keveréssel hozzáadtuk a 10-20 µl mennyiségű ligátumokat. Ezt

követően 30 percig jégen inkubáltuk a sejteket, amit 45 másodperces 42°C-os hősokk, majd újra jégen történő pár perces inkubálás követett. Ezután LB tápoldatban regeneráltuk 45 percig 37°C-on rázatva a sejteket, majd szelektív táptalajra szélesztettük őket.

3.10.2. Agrobacterium tumefaciens *sejtek transzformálása*

A kísérleteink során használt bináris vektorkonstrukciókkal a GV3101 *Agrobacterium* törzset transzformáltuk a Biotechniques (1994) által közölt módszer szerint. Ennek során YEP tápoldatot (10 g pepton kivonat, 1 g cukor, 5 g Bacto élesztő kivonat, 0,5 g $MgSO_4$ x 7 H_2O, pH=7-7,2) és YEP agar lemezt (15 g agar/1000 ml YEP tápoldat) használtunk.

Ehhez *Agrobacterium* starter kultúrát indítottunk, amelyet egy éjszakán keresztül 28°C-on növesztettünk. Másnap ebből hígítást készítettünk, amit több órán át tovább növesztettünk amíg az OD_{600} el nem érte a 0,5 értéket. Ezután a tenyészetet jégen tartottuk 10 percig, centrifugáltuk 3000 g-n 5 percig, majd a sejteket jéghideg 1 ml 20 mM-os $CaCl_2$ oldattal felszuszpendáltuk, mostuk. Ezt követően újra centrifugáltuk (30 s 3000 g), majd 100 µl $CaCl_2$-ban felvettük a sejteket, és hozzá adtuk az 1 µg plazmid DNS-t, amit -196°C-os hősokk követett. YEP tápoldatban egy éjszakán át 28°C-on regeneráltuk, majd szelektív táptalajra szélesztettük őket.

3.11. Agroinjektálás

Fiatal szamóca gyümölcsöket (1 cm-nél kisebb vacokkúpok) injektáltunk be a pBIN-FaSPTi, illetve üres pBIN20 vektort tartalmazó *Agrobacterium* szuszpenzióval a Hoffmann et al. (2006) által közölt módszer szerint. Ezzel párhuzamosan, kezeletlen gyümölcsöket is fenntartottunk. Az esetleges változásokat, a gyümölcsök növekedésében és fejlődésében bekövetkezett fiziológiai válaszokat nyomon követtük és dokumentáltuk. 1, 2, 3 nap elteltével a gyümölcsökből RNS-t tisztítottunk, cDNS-t szintetizáltunk és qRT-PCR módszerrel vizsgáltuk az expressziós különbségeket a pBIN-FaSPTi vektorral csendesített, és a kontroll pBIN20 vektorral injektált szamócák között.

3.12. In silico analízis

A homológia kereséshez a BLASTN, BLASTX programokat használtuk (NCBI, National Center for Biotechnology Information). A fehérje összehasonlításhoz ClustalW 1.83 programot (Thompson et al. 1994), a domének, másodlagos struktúrák azonosításához CLC bio (CLC protein workbench) és Pfam (Sonnhammer et al. 1998) software-eket alkalmaztunk. Az *in silico* microarray analízishez a Genevestigator platformot használtuk.

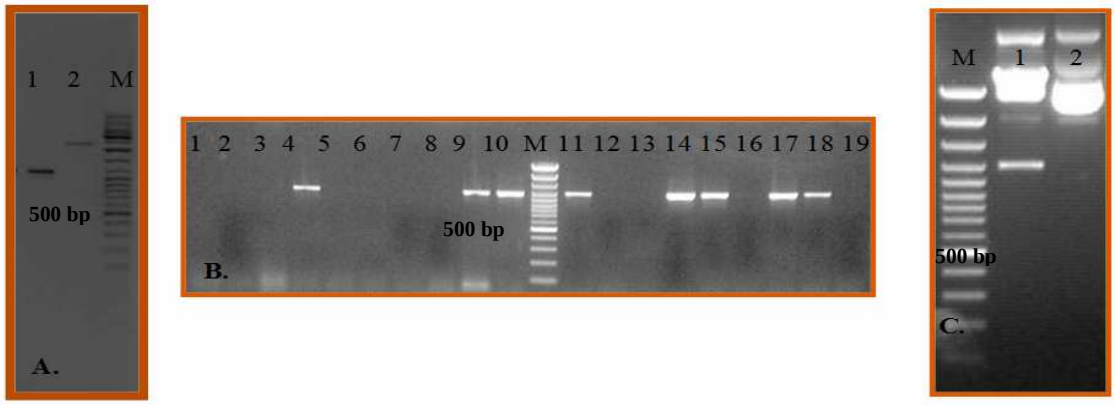
3.13. Statisztikai analízis

A qRT-PCR során kapott eredmények szignifikanciájának megállapításához T-test-et alkalmaztunk.

4. Eredmények és megvitatásuk

4.1. A FaSPT cDNS-ének klónozása

A nem utóérő gyümölcsök fejlődésében és érésében résztvevő gének izolálása céljából számos, eltérő mértékben expresszáló transzkriptumot sikerült azonosítani különböző érési stádiumban lévő szamóca gyümölcsökből cDNS-AFLP technika alkalmazásával (Balogh et al. 2006). A kapott TDF-ek (**T**ranscript **D**erived **F**ragment, Transzkriptum Eredetű Fragmentum) klaszterezését követően BLAST adatbázis segítségével homológia keresést hajtottak végre. Ennek során derült fény arra, hogy a C24M33M004 jelzésű, érés indukálta cDNS-AFLP fragmentum homológiát mutat egy *Arabidopsis*ból származó, funkcionálisan jellemzett génnel, a bHLH transzkripciós faktort kódoló *SPATULA*-val. Miután a kapott TDF hossza meglehetősen kicsi (240 bp), 3' és 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends, cDNS végek rapid amplifikációja) technikára volt szükség, hogy precízebb szekvencia információt szerezzünk (Balogh et al. 2005 a). A kapott szekvencia ismeretek tükrében, génspecifikus primerek segítségével érett szamóca receptákulumból izoláltuk majd pGemTeasy vektorba klónoztuk a teljes hosszúságú szamóca *SPATULA* (továbbiakban *FaSPT*) ORF-ét (**O**pen **R**eading **F**rame, nyitott leolvasási keret) (9. ábra).



9. ábra: A *FaSPT* cDNS-ének felszaporítása (A.) és sikeres klónozásának igazolása kolónia PCR-rel (B.) valamint restrikciós emésztéssel. A. ábra: 1: a FaSPT ORF-e, 2: össz DNS-en felszaporított genomi klónja, M: molekulatömeg marker (Fermentas GeneRuler 1 Kb). B. ábra: 1-19: tesztelt kolóniák, 11: pozitív kontroll, M: molekulatömeg marker (Fermentas GeneRuler 100 bp LadderPlus). C. ábra: 1: az ORF-et hordozó plazmid SmaI és SacI restrikciós endonukleázokkal emésztve, 2: emésztetlen kontroll, M: molekulatömeg marker (Fermentas GeneRuler 100 bp LadderPlus).

4.2. In silico analízis

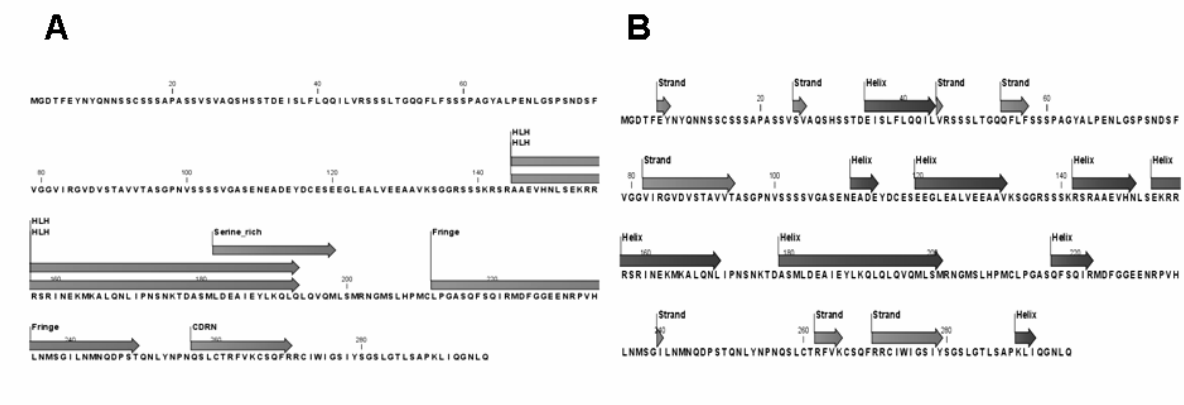
A cDNS-AFLP technikával érett szamóca gyümölcsben azonosított, a szamóca *FaSPT* génről megállapították, hogy fehérje szinten a legnagyobb homológiát (51%) az *Arabidopsis thaliana* SPATULA-val mutatta (Balogh Andrea doktori disszertáció 2006). Egy újabb publikáció (Groszman et al., 2008) szintén megerősítette, hogy az általunk leírt szamóca eredetű bHLH domén igen magas szintű azonosságot mutat az *Arabidops*ból származó bHLH-val (azonosság: 59/62), ezáltal jelezve hogy a két különböző növényből származó protein hasonló funkciót tölthet be. A FaSPT és AtSPT fehérjék közötti összehasonlító elemzést ClustalW 1.83 programmal végeztük el (10. ábra).

A CLC protein workbench software-jét (CLC bio) használva további szerin gazdag, Fringe és CDRN (Cysteine-rich D. radiodurans N terminus) doméneket sikerült azonosítanunk a *FaSPT* aminosav szekvenciáján (11/A. ábra). A Pfam adatbázisban (http://pfam-sanger.ac.uk) összefoglalt információk alapján a szerin gazdag domének fehérje-fehérje kölcsönhatásokban vesznek részt. A Fringe doméneknek a Notch jelátviteli rendszerben van jelentős szerepük, és bár ez a rendszer a többsejtű állatok (Metazoa) között konzerválódott, egy újabb tanulmány szerint a Fringe-k jelen vannak nemcsak ezekben az állatokban, hanem növényekben és egysejtűekben is (Gazave et al. 2009). Ez egy erősen konzerválódott jelátviteli rendszer, amely állati szervezetekben a sejtek közötti kommunikációt teszi lehetővé, továbbá szerepe van olyan alapvető folyamatokban, mint az idegrendszer-fejlődés és -működés, vagy az érképződés. A CDRN domének megtalálhatók néhány multidomén fehérjében az N terminuson. Számos ilyen domént találtak a *Deinococcus radiodurans* baktériumban, amely képes túlélni olyan dózisú radioaktív sugárzást és egyéb olyan DNS károsító hatásokat, amelyek más organizmusokra letálisak. A FaSPT másodlagos szerkezetét a 11/B. ábra szemlélteti.

```
FaSPT -------------VRSS---------SLTGQQFLFSSSPAGYALPENLGS
AtSPT SSDEISQFLRHIFDRSSPLPSYYSPATTTTTASLIGVHGSGDPHADNSRS

FaSPT ------PSN------------DSFVGG----------VIRGVDVSTAVVT
AtSPT LVSHHPPSDSVLMSKRVGDFSEVLIGGGSGSAAACFGFSGGGNNNNVQGN

FaSPT ASGPNVSSSSVGASENEADEYDCESEEGLEALVEEAAVKSGG---RSSSK
AtSPT SSGTRVSSSSVGASGNETDEYDCESEEGGEAVVDEAPSSKSGPSSRSSSK

FaSPT RSRAAEVHNLSEKRRRSRINEKMKALQNLIPNSNKTDKASMLDEAIEYLK
AtSPT RCRAAEVHNLSEKRRRSRINEKMKALQSLIPNSNKTDKASMLDEAIEYLK

FaSPT QLQLQVQMLSMRNGMSLHPMCLPGAS----QFSQIR-------------M
AtSPT QLQLQVQMLTMRNGINLHPLCLPGTTLHPLQLSQIRPPEATNDPLLNHTN
```

```
FaSPT DFGGEENRPVHLNMSGILNMNQDPSTQNLYNPNQSLCTRFVKCSQFRRCI
AtSPT QFASTSNAPEMINTVASS-YALEPSIRSHFGPFPLLTSPVEMSREGGLTH

FaSPT WIGSIYSGSLGTLSAPKLIQG--NLQ----
AtSPT PRLNIGHSNANITGEQALFDGQPDLKDRIT
```

10. ábra: A FaSPT és AtSPT aminosav szekvenciáinak összehasonlítása ClustalW 1.83 program segítségével.

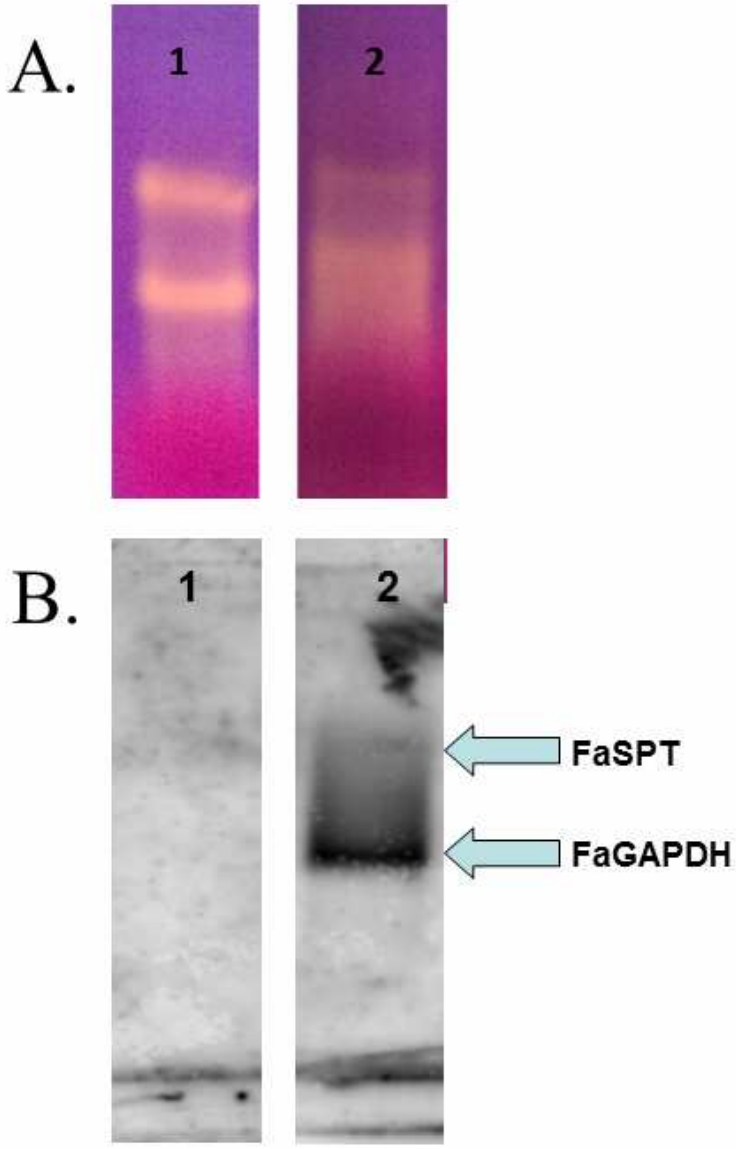


11. ábra: Szerin gazdag, Fringe és CDRN domének (A), és a FaSPT másodlagos struktúrája (B). A predikciót a CLC protein work bench software (CLC bio) felhasználásával végeztük.

4.3. Génexpressziós kísérletek

A mRNS detektálására használt jelenleg ismert legérzékenyebb technika a kvantitatív real time PCR, amit a génexpresszióban bekövetkezett változások kimutatása mellett széleskörben alkalmaznak microarray-ből származó eredmények validálására is. A qRT-PCR technika legnagyobb előnyei közé tartozik az érzékenysége, ugyanis akár egyetlen sejt mRNS szintje is detektálható ezzel a módszerrel.

Mivel az előkísérletek során a vizsgálataink tárgyát képező gén transzkriptumának mennyisége igen kicsinek bizonyult, így a *FaSPT* expresszióját kvantitatív real-time PCR technika alkalmazásával követtük nyomon. A Northern hibridizáción alapuló vizsgálatok esetünkben nem vezettek eredményre, mivel a *FaSPT* gén expressziója nem volt detektálható ezzel a módszerrel, csak a referenciaként (*normalizer)* használt háztartási géné (*FaGAPDH*) (12. ábra). Az aspecifikus hibridizáció ellenőrzése végett kontrollként állati eredetű RNS-t használtunk.

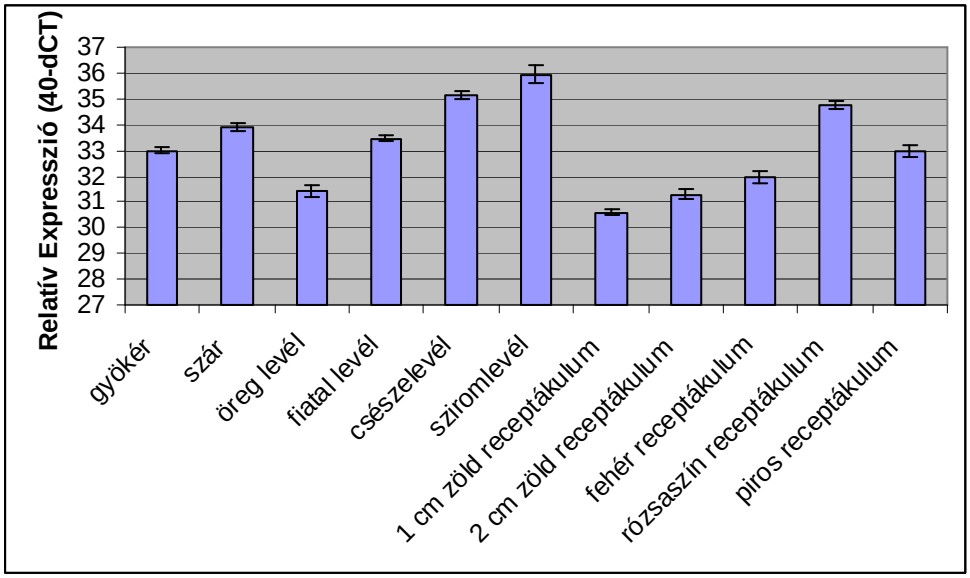


12. ábra: Northern hibridizáció eredménye szamóca rózsaszín receptákulumban (A/1: kontroll állati szövetből származó RNS, A/2: szamócából származó RNS, B/1: hibridizáció eredménye a kontroll mintán, B/2: hibridizáció eredménye a szamóca mintán).

4.3.1 A FaSPT *expressziójának meghatározása különböző vegetatív és generatív szövetekben*

A vizsgált gén szövet-szintű expressziójának meghatározásához a qRT-PCR technikát alkalmaztunk. Az analízis során azt tapasztaltuk, hogy a *FaSPT* a különböző eredetű szövetekben más-más szinten expresszál. *Arabidopsis*ban az *SPT* általában növekedésben vagy osztódó szövetben nyilvánul meg (Heisler et al. 2001). Szamóca esetében a

transzkriptum legnagyobb mennyiségben a sziromlevelekben fordult elő, ami hatszorosa volt a fiatal levelekben mérthez képest. Ez a megfigyelés nem volt meglepő, mivel Penfield és munkatársai (2005) már leírták, hogy az *AtSPT* a sziromlevél expanziónak egy kulcs-regulátora. Gyökér, szár, öreg és fiatal levelekben nagyobb szintű expressziót azonosítottunk, mint az éretlen receptákulumokban, ahol egy gyenge, de folytonos növekedés volt megfigyelhető a gyümölcsérés három stádiumán (1 cm kis zöld, 2 cm nagy zöld, fehér) át. Rózsaszín receptákulumokban a transzkriptum mennyisége hirtelen megnőtt, majd jelentősen lecsökkent a pirosakban. A receptákulumokban tapasztalt expressziós különbségek arra engednek következtni, hogy a *FaSPT* folyamatosan expresszál a fejlődő és érő gyümölcsökben végig a rózsaszín stádiumig (13. ábra).



13. ábra: A *FaSPT* gén relatív expressziós profilja különböző növényi szövetekben. A feltüntetett ±SD (standard deviation) értékek a három technikai ismétlésből származó szórásokból adódnak. Az RT-PCR során a reakcióban jelen levő templát molekulák mennyisége minden ciklusban megduplázódik (amit 2^n-en összefüggéssel követhetünk nyomon, ahol n=a reakció ciklusok számával). Azt az értéket, ahol a templát koncentráció az érzékelési határ fölé emelkedik, C_t értéknek vagy áttörési pontnak nevezzük. Két minta áttörési pontja közötti különbség a dC_t, vagy, ugyanazon minta két vizsgált génje közötti C_t érték eltérés arányos a kiindulási koncentrációkkal, mégpedig 2^n összefüggés szerint, ahol n=a ciklus különbségek számát jelenti. Ha pl. n=3, akkor az egyik minta 8x (2^3=8) annyi kiindulási kópiát tartalmazott a vizsgált génből, vagy az egyik mintában a gén expressziója 8x-ra növekedett.

4.3.2. A FaSPT *expressziós vizsgálata auxin, etilén, és sebzési stressz hatására szamóca levelekben, mint vegetatív szövetekben*

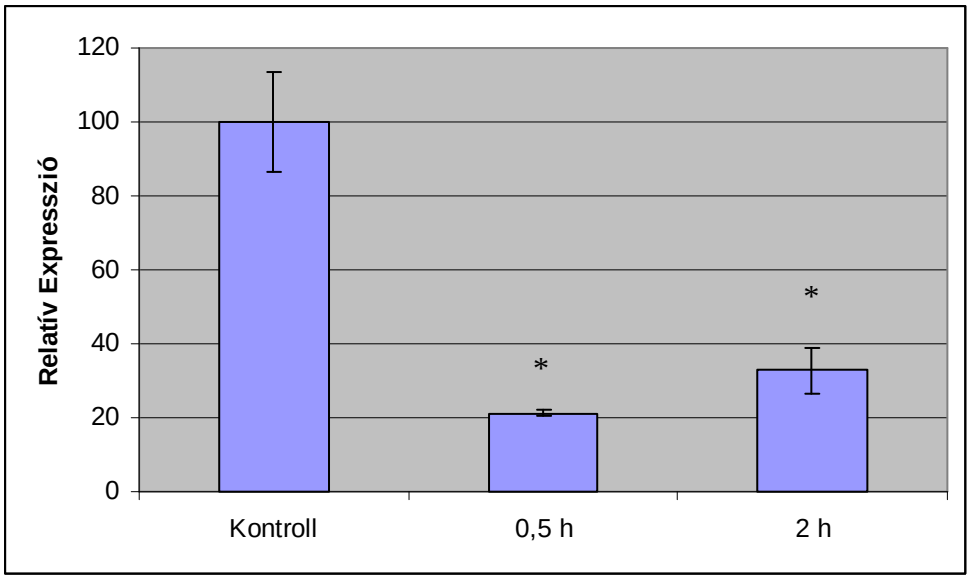
Mivel a vizsgált génről az előzetes kísérletek alapján bebizonyosodott, hogy nemcsak az érés során expresszál, hanem egyéb vegetatív és generatív szövetekben is kimutatható, megvizsgáltuk, hogy szamóca levelekben hogyan változik a transzkriptumok mennyisége különböző hormonkezelések és mechanikai sebzés hatására, illetve a leveleken végrehajtott kísérletek eredményeiből következtethetünk-e arra, hogy a *FaSPT* összefüggésbe hozható a levelek öregedésével és stressz válaszokkal.

Bizonyították, hogy számos, a gyümölcsfejlődésben résztvevő kulcsfontosságú regulátor a levelek fejlődésében is szerepet játszhat, ezáltal hangsúlyozva a termőlevelek, mint módosult levelek evolúciós eredetét (Østergaard 2008).

Az auxin a növényi növekedés és fejlődés különböző folyamatait befolyásolja, beleértve a sejtoszódást, megnyúlást, vaszkuláris szövet differenciálódást, laterális gyökérfejlesztést, a tropizmust, és nem utolsó sorban a levél szeneszcenciát.

A gén promóter régiójában egy TGA-box fordul elő 646 bp-ra a start kodontól (Balogh et al. 2005 b). A TGA box egy auxin-válasz elem (AuxRE) részeként auxin válasszal áll kapcsolatban és a bZIP típusú transzkripciós faktorok kötőhelyeként ismeretes, így megalapozottnak tűnt a feltételezésünk, hogy az auxin valamilyen hatást gyakorol a *FaSPT* expressziójára.

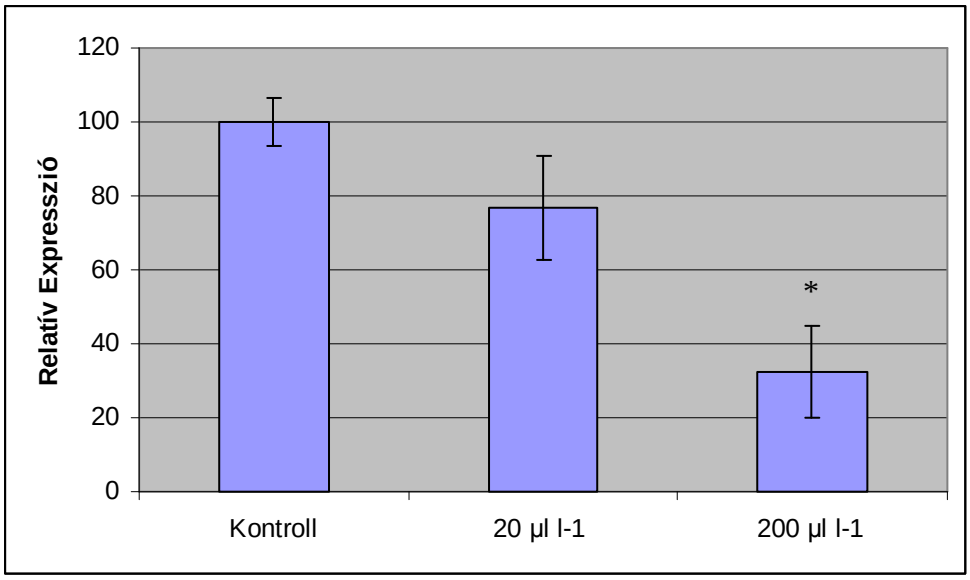
Kísérleteinkben a gén csökkent kifejeződést mutatott a kezelés hatására (14. ábra). Már fél óra elteltével szignifikáns csökkenés volt tapasztalható, ahol a kezelt minták transzkriptum mennyisége egyötöde volt a kezeletlen kontroll mintáéhoz hasonlítva. Két óra elteltével némi növekedést detektáltunk, de ez még mindig szignifikánsan alacsony volt a kontrollhoz képest.



14. ábra: a *FaSPT* gén relatív expressziós profilja szamóca levelekben auxin kezelés hatására. A feltüntetett ±SD (standard deviation) értékek a három technikai ismétlésből származó szórásokból adódnak. *P-érték < 0,05.

Bao és munkatársai (2002) auxin válaszért felelős géneket azonosítottak *Arabidopsis*ból, és megállapították, hogy a hormon hatására azoknak a géneknek nőtt a kifejeződése, amelyek a sejt-növekedéssel vagy sejtosztódással voltak kapcsolatban, míg a szeneszcenciával vagy a stressz válaszokkal kapcsolatosak gátlódtak a kezelés hatására. Érdekes megemlíteni egy Myb-rokon transzkripciós faktort, amely egy szignál transzdukcióban résztvevő gén, és auxin hatására szintén csökkent az expressziója (Bao et al. 2002).

Négy etilén-válasz elemet (ERE) sikerült azonosítani a gén promóter régiójában (Balogh et al. 2005 b), ezért feltételeztük, hogy az etilén szerepet játszhat a *FaSPT* transzkripciós szintű szabályozásában a levelek esetében is. A vizsgálatok során megállapítottuk, hogy az expresszió már 20 µl l^{-1} mennyiségű etilén gáz adagolásával csökkent, majd további szignifikáns csökkenést tapasztaltunk 200 µl l^{-1} beinjektálásával (15. ábra).



15. ábra: A *FaSPT* gén relatív expressziós profilja etilén kezelés hatására szamóca levelekben. A feltüntetett ±SD (standard deviation) értékek a három technikai ismétlésből származó szórásokból adódnak. *P-érték < 0,05.

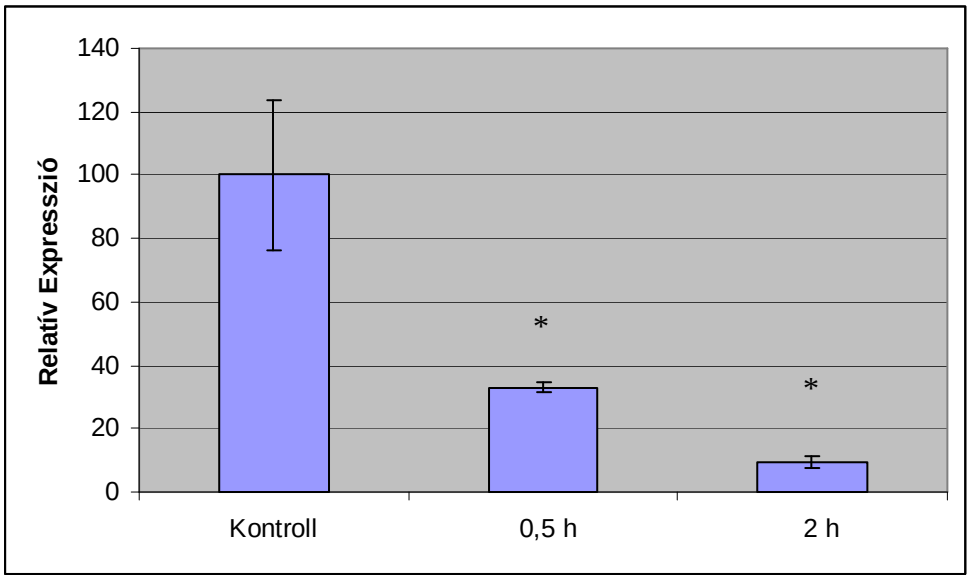
Feltételezhetően, a vegetatív szövetekben található endogén etilén szint változásának következtében, fiatal és öreg levelekben a *FaSPT* eltérő expressziós mintázatot mutatott (13. ábra). Az öregedés előrehaladtával ugyanis az etilénnek bizonyított hatása van a levelek szeneszcenciájára, ugyanis minnél öregebb egy szövet, annál magasabb szintű etilén termelés tapasztalható. A leveleken végrehajtott etilén kezelések során a nagyobb mennyiségű etilén hatására nagyobb mértékű expresszió csökkenés volt detektálható. Ez arra enged következtetni, hogy a *FaSPT* összefüggésbe hozható a szamóca levelek szeneszcenciájában működő mechanizmusokkal is.

A növények folyamatosan ki vannak téve a legkülönbözőbb környezeti stresszhatásoknak, beleértve a mechanikai sebzést is. Az ebből eredő fenyegetések kiküszöbölésére különféle önvédő rendszerekkel (pl: proteináz inhibítorok, és jelátviteli molekulák, jázmonátok, szisztéminek termelése) védekeznek. A növényi szövetek mechanikai károsodásakor a sebzési szignálok a sérült részből gyorsan átterjednek az egész növénybe, kiváltva a védekező reakciót, ami a résztvevő gének megnövelt vagy csökentett kifejeződéseinek a hatására következik be (Kodama és Sano 2006).

Mivel néhány bHLH fehérje különböző biotikus (bakteriális és vírusos fertőzések), és abiotikus (hősokk, szárazság, sebzés) stressz válaszokban játszik szerepet (Kiribuchi et al. 2005), azáltal, hogy az ezek hatására indukálódó génexpresszió transzkripciós aktivátoraiként működnek, a *FaSPT* expresszióját megvizsgáltuk mechanikai sebzés hatására is. Fél óra után igen gyors transzkriptum csökkenést tapasztaltunk, majd a két órás kezelés után a

transzkriptum mennyiségében további nagymértékű csökkenés volt mérhető (30%-ról 5%-ra) (16. ábra). Valószínűsíthető, hogy egyrészt a sebzés hatására felszabaduló metabolitok gátolják a *FaSPT* transzkripcióját, másrészt a sebzési stressz hatására keletkező etilén szintén hat a génexpresszióra.

Eredményeink arra utalnak, hogy a *FaSPT* részt vesz a stressz választ kiváltó molekuláris kaszkádokban.



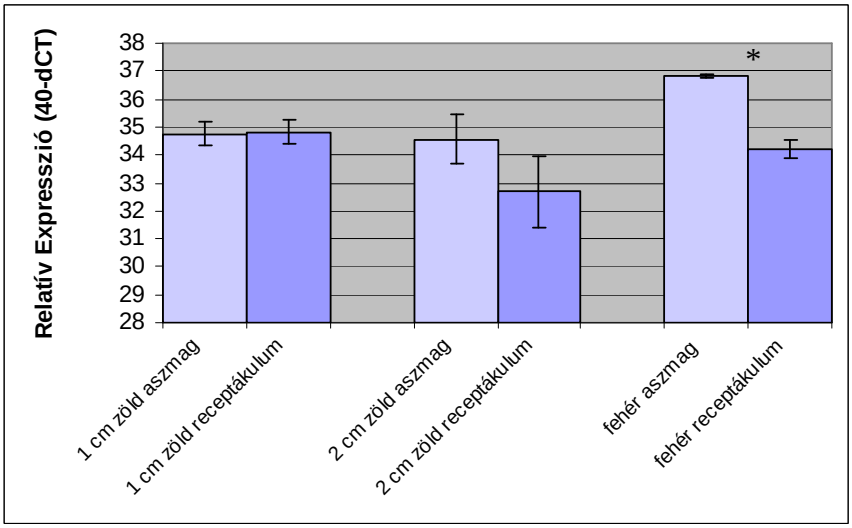
16. ábra: A *FaSPT* gén relatív expressziós profilja mechanikai sebzés hatására. A feltüntetett ±SD (standard deviation) értékek a három technikai ismétlésből származó szórásokból adódnak. *P-érték < 0,05.

4.3.3. Gyümölcsökön végrehajtott hormonkezelések eredményei

4.3.3.1. Az auxin gátolja a *FaSPT*-át

A *FaSPT* expresszióját három különböző fejlődési stádiumú (1 cm zöld, 2 cm zöld, fehér) receptákulumban illetve azok aszmagjaiban is megvizsgáltuk, hogy meghatározzuk mi ennek a transzkripciós faktornak a szerepe a szamóca gyümölcs fejlődésében (17. ábra). Az aszmagok receptákulumoktól való elkülönítésével további adatokat nyertünk arról, hogy milyen hatással lehet az endogén auxin az expresszióra a fejlődő szövetekben. A vizsgált gén aszmag-és receptákulum specifikus expresszióját elemezve az 1 cm-es zöld szamócákban szinte ugyanaz a transzkriptum mennyiség volt detektálható a kérdéses szövettípusokban. Ennek oka az lehet, hogy ezeknek a szöveteknek a hormonszintje valószínűleg azonos ebben a fejlődési stádiumban. Ezekkel az eredményekkel ellentétben, a *FaSPT* expressziójának hirtelen csökkenését figyeltük meg a 2 cm nagyságú szamócák receptákulumaiban az

aszmagjaikban mért expresszióhoz képest, ahol a transzkriptum mennyisége olyan szintű volt, mint az 1 cm-es bogyóknál. Hasonló eredményt kaptunk a fehér szamócák esetében is: az expressziós szint szignifikánsan magasabb volt az aszmagokban, mint a receptákulumokban (Tisza et al. 2010). Egy nemrégiben megjelent publikáció az *AtSPT* fejlődő embriókban történő expressziójáról számol be, beleértve a korai, szív, és torpedó stádiumokat (Groszmann et al. 2010). Ennek alapján feltételezhető, hogy az aszmagi *FaSPT* expresszió az embriogén génexpresszió következménye.



17. ábra: A *FaSPT* expressziós profilja fejlődő aszmagokban és receptákulumokban. A feltüntetett ±SD (standard deviation) értékek a három technikai ismétlésből származó szórásokból adódnak. *P-érték < 0,05.

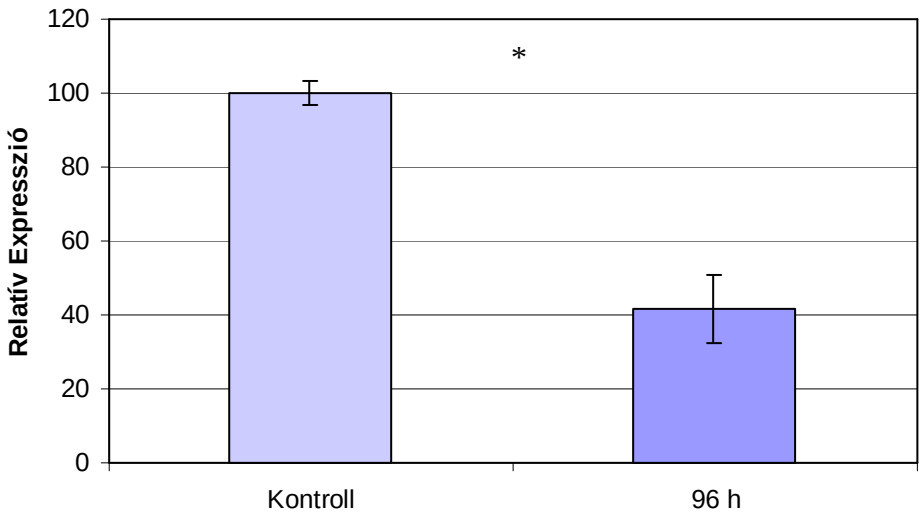
Mint azt már több szerző is alátámasztotta (Given 1988, Perkins-Veazie 1995, Castillejo 2004,), az aszmagokban megtalálható természetes auxin hormon szint a gyümölcsfejlődési folyamatok előrehaladtával fokozatosan csökken, következésképpen a receptákulumok auxin szintje is kisebb lesz. Ezzel a jelenséggel magyarázható az, hogy a *FaSPT* transzkriptum mennyiségének növekedését tapasztaltuk a gyümölcsfejlődés előrehaladtával, azaz a nagyobb mennyiségű transzkriptum jelenléte a 2 cm-es zöld, ill. fehér szamócákból származó receptákulumokban és aszmagokban a *FaSPT* gyümölcsfejlődési folyamatokban betöltött szerepére utal.

Korábbi eredmények bizonyítják, hogy az eddig szamócából izolált és azonosított, az érés során indukálódó gének legtöbbjének a kifejeződését az auxin csökkenti (Civello 1999, Mut 2008). A hormon a gyümölcsfejlődés korai stádiumaiban elősegíti a bogyó növekedését, ugyanakkor az érés megindulását a receptákulumok auxin szintjének csökkenése kíséri. Kimutatták, hogy az érésben lévő aszmagokban az auxin szintézise leáll, a hormon

transzportja a receptákulumba az érés kezdetével befejeződik (Manning 1994, Perkins-Veazie 1995).

Az előbbiekben említett adatoknak megfelelően kísérleteink során azt feltételeztük, hogy az exogén auxin kezelés szuppresszálja a *FaSPT* transzkripcióját. Ezt a hipotézist az is alátámasztotta, hogy egy auxin válaszért felelős motívum (AuxRE) részeként azonosított TGA boxot is találtunk a gén promoter régiójában (Balogh et al. 2005 b), ami a hormon *FaSPT* expressziójára gyakorolt hatására utalt.

Eredményeink valóban azt bizonyították, hogy a 96 órás auxin kezelés csökkentette a gén transzkripcióját (18. ábra) (Tisza et al. 2010).



18. ábra: A *FaSPT* relatív expressziós profilja fiatal zöld gyümölcsökben (1 cm), amelyeket 1% DMSO-ban feloldott 1mM NES szintetikus auxin tartalmú lanolin pasztával kezeltünk. A kontrollok esetében a kezeltekkel megegyező pasztát alkalmaztuk, a hormon hozzáadása nélkül. Minden gyümölcsöt 96 órával a kezelés után gyűjtöttünk be. Az értékeket a kontrollokhoz normalizáltuk. A feltüntetett ±SD (standard deviation) értékek a három technikai ismétlésből származó szórásokból adódnak. *P-érték < 0,05.

4.3.3.2. A *FaSPT* expressziója etilén kezelés hatására különböző érési stádiumban lévő gyümölcsökben

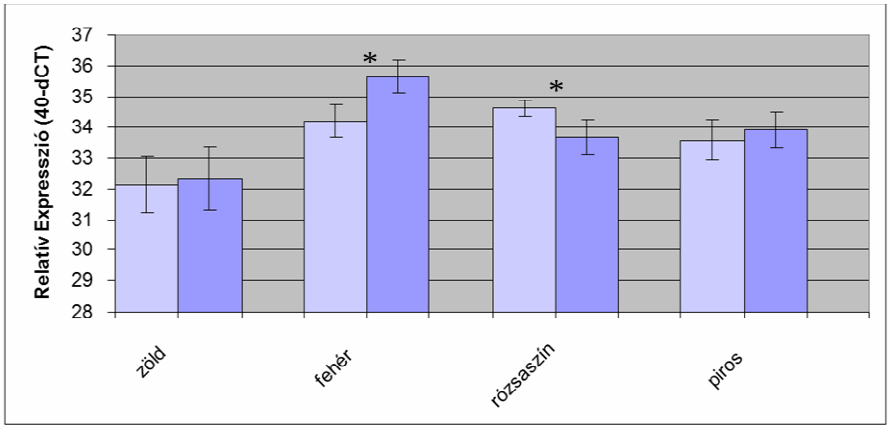
A szamócát a nem-utóérő gyümölcsök közé sorolják, mivel az érési hormon, az etilén nem, vagy csak csekély hatást gyakorol ezeknek a gyümölcsöknek az érésére (Manning 1994, Bustamante et al. 2009). A szamóca etilén-bioszintetikus génjeinek izolálása, és az etilén hatásának vizsgálata ellenére (Trainotti et al. 2005, Balogh et al. 2006) még mindig rengeteg ellentmondásos eredmény van a különböző kutatócsoportok között. Példaként említhető egy *ACO*-val kapcsolatos kísérlet. Ennek során megállapították, hogy bár a nem utóérők közé

sorolandó mindkét gyümölcs, mégis ellentmondás van a narancs és a szamóca *ACO* génjeinek a vizsgálata során kapott eredmények között. Míg a citrusból származó *ACO1* (*CsACO1*) gén etilén hatására megnövekedett expressziót mutatott a nagyon fiatal gyümölcsökben és érzéketlen volt az érett gyümölcsökben, addig a szamóca *ACO1* (*FaACO1*) a legnagyobb szintű etilén választ az érett szamócákban adta (Trainotti et al. 2005).

Feltételezhetően mind etilénfüggő, mind pedig etilén független útvonalak is jelen vannak ezekben a gyümölcstípusokban. Bár már több transzkripciós faktor etilénre adott válaszát tanulmányozták az utóérő paradicsomból, igen kevés információval rendelkezünk a nem-utóérők etilén szabályozta transzkripciós faktorairól.

Miután négy etilén válaszért felelős elemet (ERE) azonosítottunk a gén promoter régiójában (Balogh et al. 2005 b), feltételeztük, hogy a hormon hatással van a *FaSPT* expressziójára. Hogy ezt a feltételezést alátámasszuk, exogén etilén kezelést alkalmaztunk különböző érési stádiumban lévő szamócákon.

Ezekben a receptákulumokban különböző expressziós mintázatokat detektáltunk az etilén hatására (19. ábra). A 24 órás hormonkezelés hatására a *FaSPT* nem mutatott változást a zöld receptákulumokban a kezeletlen kontrollokhoz képest. Ezzel ellentétben, bár nem jelentős mértékben, de transzkriptum növekedést figyeltünk meg a fehér szamócák esetében, amit majd a rózsaszínekben bekövetkezett szintén kismértékű csökkenés követett. Az érett, piros receptákulumokban nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a kezelt és kezeletlen minták között.



19. ábra: A 24 órás etilén kezelés hatása a *FaSPT* expressziójára különböző érési stádiumú szamócákban. A kontrollok kezeletlen növényi anyagot reprezentálnak. Világos oszlop jelöli a kontroll, sötét pedig a kezelt mintákat. A feltüntetett ±SD (standard deviation) értékek a három technikai ismétlésből származó szórásokból adódnak. *P-érték < 0,05.

Adataink arra utalnak, hogy az etilén csekély mértékben szabályozza a *FaSPT* expressziót a fehér és rózsaszín receptákulumokban, de láthatóan nem indukálja azt a zöld és az érett piros szamócákban. A gén expressziója hasonló tendenciát követ a kontroll, etilénnel nem kezelt gyümölcsökben is: növekszik a a zöldtől a fehér fejlődési stádiumig, majd csökken az érés során (rózsaszín és piros érési stádiumban), jelezve, hogy a *FaSPT* inkább a gyümölcsfejlődésben semmint az érésben tölt be lényeges funkciót (Tisza et al. 2010).

Fujii és munkatársai (2007) érett mandarin gyümölcsökben etilén-válaszért felelős gének expressziós profilját vizsgálva azt tapasztalták, hogy a hormon kezelés azoknak a géneknek a működését gátolta, amelyek a fotoszintézisben, kloroplasztisz biogenezisben és cukor metabolizmusban vesznek részt, míg indukálta azokat, amelyek rezisztenciával, védekezéssel, stresszel kapcsolatosak, továbbá aminosavak szintézisében, fehérje degradációban, és másodlagos anyagcsere folyamatokban játszanak szerepet.

4.4. In silico microarray adatelemzés

A Genevestigator a GEO (Genexpression Omnibus) és TAIR (The Arabidopsis Information Resource) adatbázisban fellelhető microarray adatokat kezelő felület, amelynek segítségével *Arabidopsis*ban a saját eredményeinkhez hasonló változásokat is sikerült azonosítanunk a *SPT* gén expressziójára nézve. Ennek során megállapítottuk, hogy a fejlődési fázisokat figyelembe véve *Arabidopsis thaliana*ban az *AtSPT* expressziója csíranövényekben a legnagyobb, majd a levél rozetták és bimbók esetében visszaesik, azután a virágokban és éretlen becőkben egy kissé megnő. Szamóca levélminták vizsgálatakor a fiatalabb szövetekben mi szintén nagyobb mértékű expressziót detektáltunk az öreg levelekben mérthez képest. További párhuzamot találtunk az *Arabidopsis* szár, fiatal levél, és öreg levél (szárban legmagasabb, öreg levélben legalacsonyabb), illetve sziromlevél és csészelevél (szinte ugyanakkora mértékű expresszió) mintákban mért adatok és az általunk tapasztalt expressziók között.

Arabidopsis esetében az auxin kezelés hatására a *SPT* gén expressziója nem, vagy csak igen kis mértékben – idő függvényében – változik (kísérlet azonosító: GSE18975). Esetünkben a levélmintákon végrehajtott auxin kezelés már fél óra elteltével csökkentette a génkifejeződést, ugyanakkor a 2 órás kezelés után kis mértékű növekedést volt tapasztalható, a gyümölcsökön végzett 96 órás kezelés pedig szintén csökkentette a génexpressziót.

Mechanikai sebzés hatására nem változik az *Arabidopsis SPT* expressziója (kísérlet azonosító:1007966439), ugyanakkor kísérleteinkben a *FaSPT* csökkent kifejeződést mutatott.

Az etilén kezelésekre irányuló kísérleteket *Arabidopsis* csíranövényeken hajtották végre (kísérlet azonosító: GDS414), aminek során azt tapasztalták, hogy az etilén igen csekély mértékben indukálta a génexpressziót. Ezen adatok és a saját eredményeink között nem tudtunk párhuzamot vonni.

4.5. A FaSPT génjének hpRNS alapú csendesítése fiatal gyümölcsökben

A vizsgált gén szamóca gyümölcsben betöltött funkciójának meghatározása végett *Agrobacterium* közvetítette RNS interferencián alapuló géncsendesítést hajtottunk végre. Ez egy igen hatékony, széleskörben alkalmazott technika, amely lehetővé teszi a növényi gének *in planta* funkciójának meghatározását (Hoffmann et al. 2006, Griesser et al. 2008). A csendesítést indukáló dupla szálú RNS-ek többféleképpen juttathatók a növénybe. Egyrészt olyan konstrukciókkal való transzformációval, amelyek tartalmazzák a hairpin RNS-t (hpRNS) vagy virális RNS-t, másrészt *Agrobacterium* közvetítette növényi sejtekbe történő infiltrációval. Alternatív módot jelent a növények vírussal való fertőzése is (Hoffmann et al. 2006).

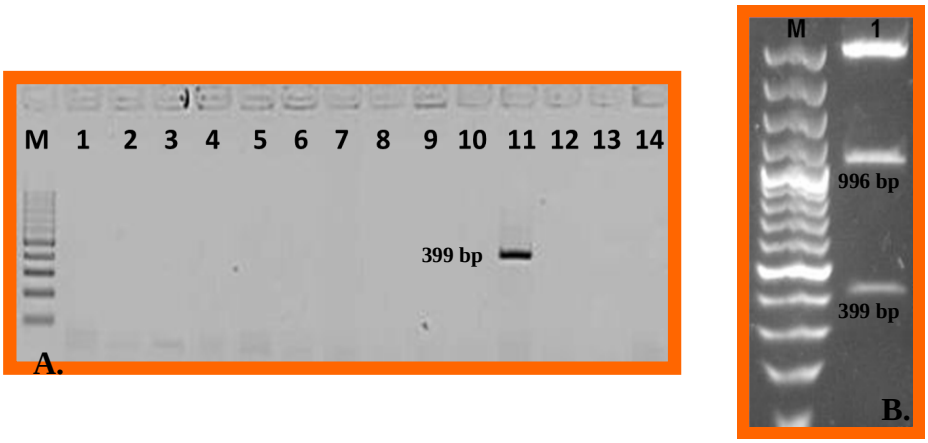
A silencing során bekövetkező mechanizmus lényege a következő: duplaszálú RNS molekulák indukálják az RNS interferenciát azáltal, hogy kicsi, 21-23 nukleotid hosszú siRNS-ké (small interfering, kis interferáló RNS) konvertálódnak a Dicer által. Ez a lépés eredményezi a 2 nukleotid túlnyúló véget a 3’ végen, és a foszfát csoportot az 5’ végen. Szubsztrátként a Dicer lineáris dsRNS-t (double-stranded) vagy hairpin RNS-t tud használni.
Az siRNS egy RNS-indukálta silencing komplexbe (RISC) rendeződik, majd egy RNS-fehérje komplex alakul ki (siRISC), ez egyesíti a vezető szálat a RISC-be. A vezető szál a RISC-kel együtt, a target RNS-hez kötődik, és a target RNS hasítása által kiváltja a géncsendesítést. A hasítás az 5’ végen történik a 10 és 11 nukleotidok között upstream.

Általánosan használt módszer ezért olyan DNS vektorok alkalmazása, melyek hairpin RNS-t expresszálnak, bár alternatívaként a Dicer által elhasított termékek, az siRNS-ek (post Dicer cleavage products) exogén úton is bejuttathatók a sejtbe RNAi indukálására.

A *FaSPT* gén szamóca gyümölcsben betöltött funkciójának meghatározása végett *Agrobacterium* közvetítette RNS interferencián alapuló géncsendesítést hajtottunk végre. Létrehoztunk egy, a vizsgált génre tervezett szensz-intron-antiszensz kazettát hordozó hairpin vektorkonstrukciót (20. ábra).

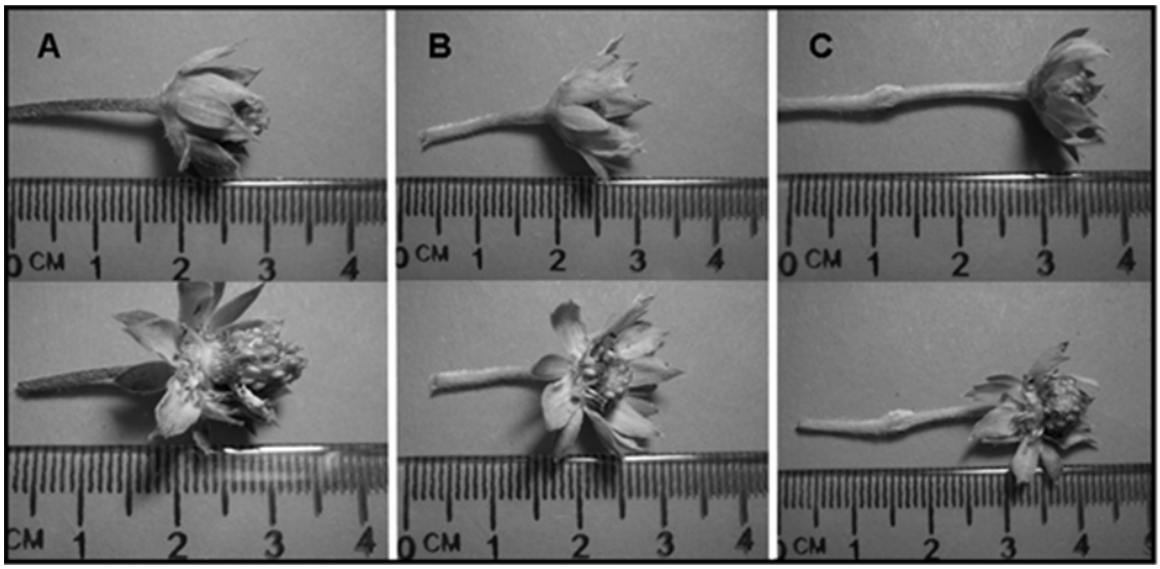
20. ábra: A pBIN-FaSPTi hairpin vektorkonstrukció sematikus ábrája.

Ennek során a már meglévő *FaSPT* kódoló szekvencián 399 bp hosszú szensz és antiszensz orientációjú darabokat szaporítottunk fel olyan primerekkel, amelyeknek a végei a következő hasítási helyeket tartalmazták: XhoI/EcoRI (szensz), illetve XbaI/XbaI (antiszensz). A PCR reakciót követően a kapott termékeket a megfelelő enzimekkel emésztettük, gélből visszaizoláltuk, tisztítottuk és pBluescript II KS (Stratagene) 597 bp hosszú növényi intron szekvenciát (Koscienska et al. 2005) már tartalmazó vektorba klónoztunk, létrehozva egy szensz-intron-antiszensz kazettát (21. ábra). A kapott szensz-intron-antiszensz fragmentumot pBIN20 bináris vektorba klónoztuk a következőképpen: a szensz fragmentet az intronnal együtt XhoI/XbaI emésztéssel szubklónoztuk a pBIN20-ba, majd a szensz-intron darab mellé XbaI/XbaI emésztéssel kivágott antiszensz fragmentumot is klónoztuk, létrehozva így a szensz-intron-antiszensz kazettát. A megfelelő orientációkról szekvenálással bizonyosodtunk meg. Ezt követően a konstrukcióval GV3101 *Agrobacterium* törzset transzformáltunk, amit a tranziens expressziós kísérleteinkben használtunk fel a szamóca gyümölcsök agroinjektálására.



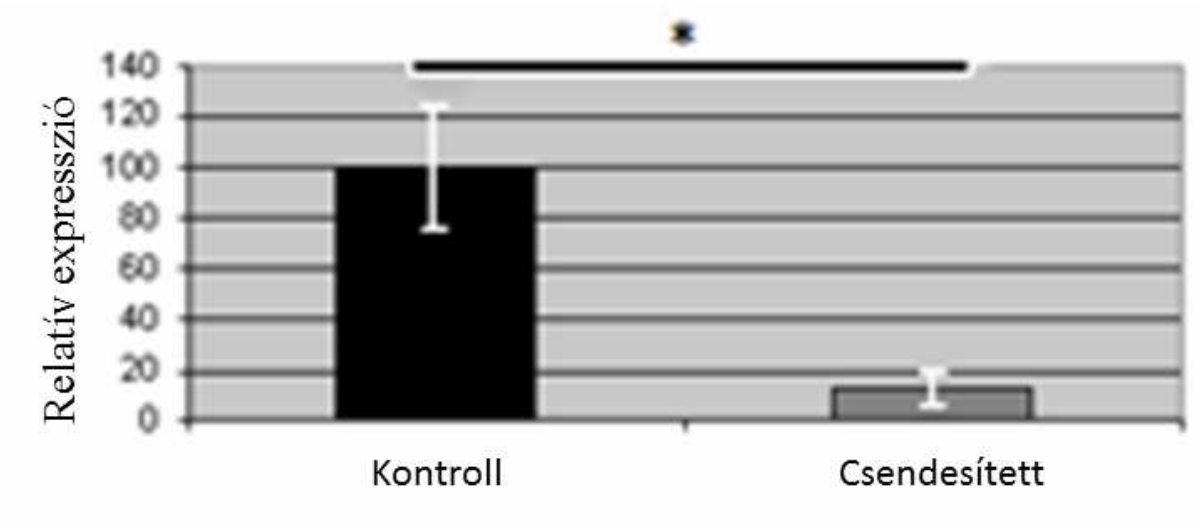
21. ábra: A: a 399 bp hosszúságú antiszensz fragmentum darab sikeres klónozásának visszaigazolása kolónia PCR-rel (M: molekulatömeg marker Fermentas GeneRuler 100 bp LADDER (100 bp-1000 bp), 1-14: kolóniák) B: a 399 bp antiszensz, és az 996 bp (597+399) szensz+intron darabok sikeres pBluescript II KS vektorba való klónozásának bizonyítása XbaI és XhoI restrikciós endonukleázokkal történő emésztéssel. (M: molekulatömeg marker Fermentas GeneRuler 100 bp LadderPlus).

A hairpin vektorkonstrukciót tartalmazó *Agrobacterium*mal injektált szamóca gyümölcsöknek kb. ¼-e mutatott eltérő fenotípust a kontroll konstrukcióval injektált kontroll szamócákhoz képest. Ezek a különbségek a hairpin vektorral injektált gyümölcsökben a redukált méretben és megváltozott formában voltak tapasztalhatók (22. ábra).



22. ábra: *FaSPT* silencing fejlődő gyümölcsökben tranziens géncsendesítés elemzéssel. A: üres pBIN20 vektort tartalmazó *Agrobacterium*mal injektált kontroll gyümölcsök. B, C: a pBIN-FaSPTi hairpin vektorkonstrukcióval injektált gyümölcsök fenotípusai. A fotókat az injektálásokat követő 14. napon készítettük.

Korábbi adatok beszámolnak arról, hogy az *Arabidopsis spt* mutánsok becőtermése több jegyben különbözik a vad típusúakétól. Ezek közül a legjelentősebbek a termőlevél szöveteket (pollentömlő, bibe, bibeszál) érintő defektusok (Heisler et al. 2001, Groszmann et al. 2008). Mivel a szamóca termése számos különálló termőlevélből tevődik össze, párhuzam feltételezhető az általunk kapott redukált méretű bogyók és az *Arabidopsis spt* mutánsok abnormális fenotípusú becői között. Bár valós idejű PCR segítségével bizonyítottuk a vizsgált gén transzkriptumának csökkenését 1, 2, ill. 3 nappal az infiltráció után (23. ábra), de nem tudtunk hasonló transzkriptum-csökkenést detektálni azokban a gyümölcsökben (14. napon), amelyek a megváltozott fenotípust mutatták (nem közölt adatok).



23. ábra: A *FaSPT* relatív expressziója kontroll és agroinjektált gyümölcsökben. A vizsgálatok során felhasznált cDNS-ek a kontroll és hairpin vektorral infiltrált szamócákból származnak az injektálást követő 1, 2, és 3. napon (poolozott minták). A reakciókat *FaSPT* és *FaGAPDH* specifikus primerekkel vittük véghez. A feltüntetett ±SD (standard deviation) értékek a három technikai ismétlésből származó szórásokból adódnak. *P-érték < 0,05.

A redukált gyümölcsméret feltételezhetően a korai gyümölcsfejlődésben bekövetkezett géncsendesítés következménye, valószínű azonban, hogy a génfunkció a 14. napra visszaállt, tranziens expresszióról lévén szó. Griesser et al. (2006) tanulmánya arról is beszámolt, hogy a termesztett szamóca oktoploid természete kompenzálhatja egy-egy csendesített gén hatását.

Mivel az általunk vizsgált *FaSPT* egy lényeges transzkripciós faktort kódol, a korai silencing hatása feltételezhetően felelős volt a gyümölcsfejlődésben tapasztalt defektusokért, újabb érvet szolgáltatva amellett, hogy a *FaSPT* egy, a gyümölcs fejlődésében is szerepet játszó gén.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Elsőként tanulmányoztunk egy bHLH transzkripciós faktort kódoló *SPATULA* gént egy nem utóérő érési csoportba tartozó gyümölcsből, a termesztett szamócából. Tudomásunk szerint eddig ezt a gént csak a modellnövény *Arabidopsis thaliana*-ban jellemezték, így munkánk során meglehetősen kevés korábbi eredményre támaszkodhattunk. Kísérleteink új tudományos eredményeit a következő pontokban foglaljuk össze:

1. Izoláltuk és klónoztuk a gén ORF-ét.

2. A gén szekvenciájának ismeretében szerin gazdag, Fringe és CDRN (Cysteine-rich D. radiodurans N terminus) doméneket sikerült azonosítanunk a FaSPT aminosav szekvenciáján.

3. Meghatároztuk a gén expresszióját vegetatív és generatív szövetekben, ennek során megállapítottuk, hogy a *FaSPT* expressziója a sziromlevelekben a legnagyobb, míg az 1 cm nagyságú, zöld receptákulumokban a legkisebb.

4. Meghatároztuk az expressziós szintet szamóca levelekben mint vegetatív szövetekben sebzés, auxin és etilén kezelések hatására. Mindhárom kezelés gátolta a génexpressziót.

5. Fejlődésben lévő fiatal gyümölcsökön vizsgáltuk a gén expresszióját auxin hormon kezelés hatására, aminek során a *FaSPT* szintén csökkentett génkifejeződést mutatott.

6. Különböző érési stádiumban lévő szamócákban meghatároztuk a gén expressziós szintjét etilén hormon kezelés hatására. A zöld és piros érési stádiumokban nem tapasztaltunk változást a kezeletlen kontrollokhoz képest etilén kezelés hatására, ugyanakkor a fehér receptákulumokban kismértékű expresszió növekedést, a rózsaszínűekben pedig csökkenést figyeltünk meg.

7. A gén *in planta* funkciójának meghatározása céljából tranziens expresszióval a *FaSPT* gén csendesítését hajtottuk végre szamócák agroinjektálásával. Ennek során a fiatal gyümölcsök alakjában defektusokat, a bogyók méretének csökkenését figyeltünk meg az injektálást követő 14. napon.

5. Következtetések és javaslatok

Bár a szamóca nem klimaktérikus érésére az etilén nem, vagy csak csekély hatást gyakorol, az etilén bioszintézisében és jelátviteli útvonalában résztvevő kulcsgének létezését ebben a növényfajban is bizonyították. Valószínűleg, hasonlóan mint az utóérőkben, etilén függő és etilén független-transzkripciós faktorok általi- szabályozó kaszkádok egyaránt jelen vannak a nem utóérőkben is.

Izoláltunk és klónoztunk egy bHLH transzkripciós faktort kódoló *SPATULA* gént termesztett szamócából. A gén nagyfokú homológiát mutatott az *Arabidopsis SPATULA*-val, amit már több korábbi munkában funkcionálisan is jellemeztek. Ennek során kiderült, hogy egy, a termőlevél fejlődésében működő releváns génről van szó.

Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a gyümölcsökben a génexpresszió a zöld fejlődési stádiumoktól egészen a rózsaszínűekig fokozatosan nő, majd a pirosakban a rózsaszínűekben detektált szinthez képest lecsökken. Ez az észrevétel arra enged következtetni, hogy a gén mind a gyümölcsfejlődés, mind pedig az érés során expresszál, tehát nyilvánvaló szerepe van ezekben az élettani folyamatokban.

Különböző kezelések hatására a vizsgált gén különbözőképpen expresszált. Leveleken végrehajtott auxin, etilén, és mechanikai sebzés hatására csökkent a *FaSPT* expressziója, és a korábbi irodalmi adatokat is figyelembe véve ezekből az eredményekből azt a következtetést tudtuk levonni, hogy a *FaSPT* a szeneszcenciával és stressz válaszokkal kapcsolatos folyamatokban is részt vehet.

A *FaSPT* transzkriptum mennyiségének növekedését detektáltuk a fejlődés előrehaladtával a különböző fejlődési stádiumban lévő gyümölcsökben, azaz a nagyobb mennyiségű transzkriptum jelenléte a 2 cm-es zöld, ill. fehér szamócákból származó receptákulumokban és aszmagokban a *FaSPT* gyümölcsfejlődési folyamatokban betöltött szerepére utal.

A gyümölcsökön végrehajtott 96 órás auxin kezelés nagymértékben gátolta a gén transzkripcióját.

A gyümölcsökön elvégzett etilén kezelések eredményei azt támasztották alá, hogy ez a hormon csekély mértékben szabályozza a *FaSPT* expressziót a fehér és rózsaszín receptákulumokban, de nem indukálta azt a zöld és az érett piros szamócákban.

Különböző szövettípusokban végzett expressziós kísérleteink bizonyították, hogy a gén a legnagyobb szinten a sziromlevelekben expresszál. Ez az adat korrelál az *Arabidopsis thaliana SPATULA* génjének vizsgálata során kapott eredménnyel, ahol megállapították, hogy a *SPATULA* a sziromlevél expanziónak is egy kulcsregulátora.

Tranziens expressziós elemzéssel RNS interferencián alapuló géncsendesítést hajtottunk végre fejlődésben lévő gyümölcsökön. Ennek hatására több tíz, fejlődésükben gátolt gyümölcsöt figyeltünk meg, ami a vizsgált gén gyümölcsfejlődésben betöltött szerepére utalt. Érdemes lehet ezzel a konstrukcióval történő stabil növénytranszformálás is, a gén funkciójának mélyebb felderítésére, továbbá a gént túltermelő konstrukcióval *Arabidopsis spt* mutáns növények komplementációja választ adhat a termőlevél fejlődésében betöltött szerep tisztázására.

A *FaSPT* gén promóterének analízise egy következő dolgozat tárgya, az erre tervezett deléciós vonalak elemzése is folyamatban van.

6. Összefoglalás

Dolgozatom célja egy bHLH transzkripciós faktort kódoló *Arabidopsis SPATULA* homológ jellemzése volt termesztett szamócából. A nem klimaktérikus gyümölcsérés és fejlődés, így a szamóca érésében és fejlődésében is lejátszódó alapfolyamatok pontos molekuláris hátterének felderítése a genomikai kutatások egyik fontos területe.

Munkánk során klónoztuk a szamócából származó *SPATULA* gén ORF-ét. (Továbbiakban *FaSPT*). A gén fehérje szinten a legnagyobb homológiát a funkcionálisan már jellemzett *Arabidopsis* SPATULA-val (AtSPT) mutatta. További *in silico* analízisek alkalmazásával a FaSPT aminosav szekvenciáján CDRN, Fringe, és szerin gazdag motívumokat is sikerült azonosítanunk.

qRT-PCR technikával megállapítottuk, hogy milyen szövettípusban milyen szinten expresszál a kérdéses gén. Ennek során meghatároztuk, hogy a *FaSPT* expressziója a sziromlevelekben a legnagyobb, és az 1 cm zöld receptákulumokban volt a legkisebb.

Leveleken mint vegetatív szöveteken végrehajtott auxin, etilén és mechanikai sebzés hatására a gén transzkripciója csökkent.

A vizsgált gén aszmag- és receptákulum specifikus expressziójának tanulmányozása során megállapítottuk, hogy a detektált transzkriptum mennyisége szinte ugyanakkora volt ezekben a szövetekben az 1 cm-es zöld szamócákban, feltehetőleg a szövetek azonos hormonszintje miatt. Ezzel ellentétben, a *FaSPT* expressziójának hirtelen csökkenése volt megfigyelhető a 2 cm nagyságú szamócák receptákulumaiban az aszmagjaikban mért expresszióhoz képest, ahol a transzkriptum mennyisége olyan szintű volt, mint az 1 cm-es bogyókban. A fehér szamócák esetében is hasonló eredményt kaptunk: az expressziós szint szignifikánsan magasabb volt az aszmagokban, mint a receptákulumokban.

Előzetes irodalmi adatoknak megfelelően feltételeztük, hogy az exogén auxin kezelés szuppresszálja a *FaSPT* transzkripcióját a fejlődő szamóca gyümölcsökben. Ezen kívül egy auxin válaszért felelős motívum (AuxRE) részeként azonosított TGA box jelenléte a gén promoter régiójában is arra utalt, hogy a hormon hatással van a *FaSPT* expressziójára. Ezzel kapcsolatos eredményeink valóban bizonyították feltételezésünket, miszerint az exogén auxin szint gátolta a gén transzkripcióját.

A gén promóter régiójában lévő négy etilén válaszért felelős elem (ERE) jelenléte miatt várható volt, hogy az exogén etilén kezelés befolyással lesz a *FaSPT* expresszióra.

A 24 órás hormonkezelés hatására nem detektáltunk változást a génexpresszió szintjét tekintve a zöld receptákulumokban a kezeletlen kontrollokhoz képest. Ezzel ellentétben, transzkriptum növekedést figyeltünk meg a fehér szamócákban, majd csökkenést a rózsaszínekben. Az érett, piros receptákulumokban a zöldekhez hasonlóan szintén nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a kezelt és kezeletlen minták között.

Létrehoztunk egy, a vizsgált génre tervezett szensz-intron-antiszensz kazettát hordozó hairpin vektorkonstrukciót amellyel *Agrobacterium* közvetítette tranziens expressziós géncsendesítést végeztünk. qRT-PCR-rel bizonyítottuk ezzel a vektorkonstrukcióval injektált gyümölcsökben a transzkriptumok csökkenését, továbbá defektusokat figyeltünk meg a gyümölcsök alakját és méretét tekintve.

Összességében eredményeink arra engednek következtetni, hogy a *FaSPT* egy, a szamóca gyümölcs fejlődési folyamataiban résztvevő lényeges transzkripciós faktort kódoló gén.

SUMMARY

The aim of this work was the isolation of a *SPATULA* homologue gene encoding a bHLH transcriptional factor from cultivated strawberry. Clarification of basic processes concerning the non-climacteric fruit development and ripening is an important area in fruit genomics.

We cloned the ORF region of a strawberry derived *SPATULA* gene (hereunder: *FaSPT*), which showed the highest homology with a well characterized SPATULA from *Arabidopsis* (AtSPT) at protein level. By using additional *in silico* approaches, CDRN, Fringe and serine rich motifs were identified on the FaSPT amino acid sequence.

We verified the expression level of *FaSPT* in different tissues of strawberry plant by qRT-PCR. We showed that the gene expressed the highest level in petals, while it showed the smallest expression in the 1cm green receptacles.

The gene was repressed in leaves by auxin, ethylene treatments and mechanical wounding.

Analyzing the achene and receptacle specific expression almost the same transcript amount was detected in these tissues in the 1 cm fruit. The reason for this observation is presumably due to almost the same hormone level in both tissues at this developmental stage. By contrast, a sudden decrease of the *FaSPT* expression occured in the receptacles of the 2 cm fruits compared to their achene tissues where it remained as high as in the 1 cm fruit. Similar results were found examining the white strawberries: the expression level of *FaSPT* was significantly higher in the achenes than in receptacles.

According to previous data, we expected exogenous auxin treatment to suppress *FaSPT* transcription. Moreover, a TGA-box, as a part of the auxin responsive element (AuxRE) motif was identified in the *FaSPT* promoter region, suggesting that auxin has an impact on *FaSPT* expression. Indeed, our experiment revealed that the gene is down-regulated by auxin treatment.

Since four ethylene responsive element (ERE) were identified in the promoter region, we assumed a possible effect of ethylene on the expression of *FaSPT*. Divergent expression patterns were exhibited in the receptacles being at different ripening stages by exogenous ethylene treatment. After the 24 h treatment, *FaSPT* did not show any alteration in young green fruits, compared to the control samples. By contrast, an increment of the transcript

amount was observed in the white fruits that was followed by a decrease in the pink ones. Then, there was no significant change found in the mature red strawberries.

In order to down-regulate *FaSPT* expression *in planta*, we applied *Agrobacterium* mediated RNAi assay. We confirmed the decrease of the transcript amount of *FaSPT* by qRT-PCR in the infiltrated fruits, moreover we detected defects in fruit shape and size.

Summarizing, our results may indicate that *FaSPT* is an essential transcriptional factor involved in strawberry fruit developmental processes.

7. MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

ABELES F.B. & TAKEDA F. (1990): Cellulase activity and ethylene in ripening strawberry and apple fruits. Scientia Horticulturae. 42: 260-275.

AGIUS F., GONZÁLEZ-LAMONTHE R., CABALLERO J.L., MUNOZ-BLANCO J., BOTELLA M.A. & VALPUESTA V. (2003): Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. Nature Biotechnology 21: 177-181.

AGIUS F., AMAYA I., BOTELLA M.A. & VALPUESTA V. (2005): Functional analysis of homologous and heterologous promoters in strawberry fruits using transient expression. Journal of Experimental Botany. 56: 37-46.

AHARONI A. & O'CONNELL A.P. (2002): Gene expression analysis of strawberry achene and receptacle maturation using DNA microarrays. Journal of Experimental Botany. 53: 2073-2087.

ALVAREZ J. AND SMYTH D. R. (1999): CRABS CLAW and SPATULA, two Arabidopsis genes that control carpel development in paralell with AGAMOUS. Development 126, 2377-2386.

BALOGH A., KONCZ T., TISZA V., KISS E. & HESZKY L. (2005 a): Identification of ripening-related genes in strawberry fruit by cDNA-AFLP. International Journal of Horticultural Science. 11 (4):33-41.

BALOGH A., KONCZ T., TISZA V., KISS E., HESZKY L. (2005 b): Identification of genes and their promoters involved in strawberry fruit development and ripening. Kertgazdaság Special edition: 105-110.

BALOGH A., KISS E., KONCZ T., DÉNES F. & HESZKY L. (2006): Isolation and characterization of genes involved in the biosynthesis and signalling pathway for ethylene in strawberry. ISHS Acta Horticulturae. 708: 541-545.

BAO F., HU Y., LI J. (2002): Identification of auxin responsive genes in Arabidopsis by cDNA array. Chinese Science Bulletin. 47: 548-552.

BARRY C.S., BLUME B., BOUZAYEN M., COOPER W., HAMILTON A.J., GRIERSON D. (1996): Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. The Plant Journal. 9:525-535.

BARRY C.S., GIOVANNONI J.J. (2007): Ethylene and fruit ripening. Journal of Plant Growth Regulation. 26: 143-159.

Biotechniques (1994): Freeze-thaw transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. 16(4) 664-669.

BOWMAN J. L. AND SMYTH D. R. (1999): CRABS CLAW, a gene that regulates carpel and nectary development in Arabidopsis, encodes a novel protein with zinc finger and helix-loop-helix domains. Development.126, 2387-2396.

BRETT C.T. & WALDRON K.W. (1996): Physiology and biochemistry of plant cell walls. 2nd edn. London: Chapman & Hall.

BUSTAMANTE C.A. CIVELLO P.M. MARTÍNEZ G.A. (2009): Cloning of the promoter region of β-xylosidase (FaXyl1) gene and effect of plant growth regulators on the expression of FaXyl1 in strawberry fruit. Plant Science. 177: 49-56.

CASTILLEJO C., DE LA FUENTE J.I., IANNETTA P., BOTELLA M.Á. & VALPUESTA V. (2004): Pectin esterase gene family in strawberry fruit: study of FaPE1, a ripening specific isoform. Journal of Experimental Botany. 55: 909-918.

CIVELLO P.M., POWELL A.L.T., SABEHAT A. & BENNETT A.B. (1999): An expansin gene is expressed in ripening strawberry fruit. Plant Physiology. 121:1273-1279.

COOMBE B.G. (1976): The development of fleshy fruits. Annual Review of Plant Physiology. 27: 507-528.

CULPEPPER C.W., CALDWELL S. & MOON H.H. (1935): A physiological study of development and ripening in the strawberry. Journal of Agricultural Research. 50: 645-696.

DAYAWON M.M. & SHUTAK V.G. (1967): Influence of N-benzyladenine on the postharvest rate of respiration of strawberries. HortScience. 2:12.

DUEK P.D. AND FANKHAUSER C. (2005): bHLH class transcription factors take centre stage in phytochrome signalling. Trends in Plant Science. 10(2): 51-54.

EL-KAZZAZ M.K., SOMMER N.F. & FORTLAGE R.J. (1983): Effect of different atmospheres on postharvest decay and quality of fresh strawberries. Phytopathology. 73: 282-285.

FAIT A., HANHINEVA K., BELEGGIA R., DAI N., ROGACHEV I., NIKIFOROVA V.J., FERNIE A.R., AHARONI A. (2008): Reconfiguration of the achene and receptacle metabolic networks during strawberry fruit development. Plant Physiology. 148: 730-750.

FERRE-D' AMARE A.R., POGNONEC P., ROEDER R.G., BURLEY S.K. (1994): Structure and function of the b/HLH/Z domain of USF. The EMBO Journal. 13: 180-189.

FISCHER R.L. & BENNETT A.B. (1991): Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 42: 675-703.

FODORPATAKI L., SZIGYÁRTÓ L. (2009): A növények ökofiziológiájának alapjai. Kriterion Kiadó, 2009.

FUJII H., SHIMADA T., SUGIYAMA A., NISHIKAWA F., ENDO T., NAKANO M., IKOMA Y., SHIMIZU T., OMURA M. (2007): Profiling ethylene responsive genes in mature mandarin fruit using a Citrus 22 K oligoarray. Plant Science. 173: 340-348.

GAZAVE E., LAPÉBIE P., RICHARDS G.S., BRUNET F., ERESKOVSKY A.V., DEGNAN B.M., BORCHIELLINI C., VERVOORT M., RENARD E. (2009): Origin and evolution of the Notch signalling pathway: an overview from eukaryotic genomes. BMC Evolutionary Biology. 9(249): 1471-2148.

GIOVANNONI J.J. (2004): Genetic regulation of fruit development and ripening. The Plant Cell.16: 70-180.

GIVEN N.K., VENIS M.A. & GRIERSON D. (1988): Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit. Planta. 174: 402-406.

GREMSKI K., DITTA G., YANOFSKY M.F. (2007): The HECATE genes regulate female reproductive tract development in Arabidopsis thaliana. Development. 134, 3593-3601.

GRIESSER M., HOFFMANN T., BELLIDO M.L., ROSATI C., FINK B., KURTZER R., AHARONI A., MUNOZ-BLANCO J. & SCHWAB W. (2008): Redirection of flavonoid biosynthesis through the down-regulation of an anthocyanidin glucosyltransferase in ripening strawberry fruit. Plant Physiology. 146: 1528-1539.

GROSZMANN M., PAICU T., SMYTH D.R. (2008): Functional domains of SPATULA, a bHLH transcription factor involved in carpel and fruit development in Arabidopsis. The Plant Journal. 55: 40-52.

GROSZMANN M., BYLSTRA Y., LAMPUGNANI E.R., SMYTH D.R. (2010): Regulation of tissue specific expression of SPATULA, a bHLH gene involved in carpel development, seedling germination, and lateral organ growth in Arabidopsis. Journal of Experimental Botany. 61: 1495-1508.

GUO H., ECKER J.R. (2004): The ethylene signalling pathway: new insights. Current Opinion in Plant Biology. 7:40-49.

HANCOCK J.F. (2000): Strawberries. In Erez, A., ed, Temperate fruit crops in warm climates. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

HARPSTER M.H., BRUMMELL D.A., DUNSMUIR P. (1998): Expression analysis of a ripening-specific, auxin-repressed endo-1, 4-beta-glucanase gene in strawberry. Plant Physiology. 118(4): 1307-1316.

HEISLER M.G.B., ATKINSON A., BYLSTRA Y.H., WALSH R., SMYTH D.R. (2001): SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in Arabidopsis, encodes a bHLH protein. Development. 128: 1089-1098.

HJERNO K., ALM R., CANBÄCK B., MATTHIESEN R., TRAJKOVSKI K., BJÖRK L., ROEPSTORFF P., EMANUELSSON C. (2006): Down regulation of the strawberry Bet v 1-homologous allergen in concert with the flavonoid biosynthesis pathway in colorless strawberry mutant. Proteomics. 6(5): 1574-1584.

HOFFMANN T., KALINOWSKI, G. & SCHWAB, W. (2006): RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit (Fragaria x ananassa) by agroinfiltration: a rapid assay for gene function analysis. The Plant Journal. 48: 818-826.

HUBER D.J. (1984): Strawberry fruit softening: the potential roles of polyuronides and hemicelluloses. Journal of Food Science. 49: 1310-1315.

IANNETTA P.P.M., LAARHOVEN L.J., MEDINA-ESCOBAR N., JAMES E.K., MCMANUS M.T., DAVIES H.V., HARREN F.J.M. (2006): Ethylene and carbon dioxide production by developing strawberries show a correlative pattern that is indicative of ripening climacteric fruit. Physiologia Plantarum. 127:247-259.

ICHIHASHI Y., HORIGUCHI G., GLEISSBERG S., TSUKAYA H. (2010): The bHLH transcription factor SPATULA controls final leaf size in *Arabidopsis thaliana*. Plant and Cell Physiology. 51(2): 252-261.

JIMÉNEZ-BERMÚDEZ S., REDONDO-NEVADO J., MUNOZ-BLANCO J., CABALLERO J.L., LOPEZ-ARANDA J.M., VALPUESTA V., PLIEGO-ALFARO F., QUESADA M.A. & MERCADO J.A. (2002): Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. Plant Physiology. 128: 751-759.

KATZ E., LAGUNES P.M., RIOV J., WEISS D., GOLDSCHMIDT E.E. (2004): Molecular and physiological evidence suggests the existence of a system II-like pathway of ethylene production in non-climacteric Citrus fruit. Planta. 219:243-252.

KIRIBUCHI K., JIKUMARUL Y., KAKU H., MINAMI E., HASEGAWA M., KODAMA O., SETO H., OKADA K., NOJIRI H., YAMANE H. (2005): Involvement of the basic helix-loop-helix transcription factor RERJ1 in wounding and drought stress responses in rice plants. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 69(5): 1042-1044.

KISS E., BALOGH A., TISZA V., KONCZ T., HESZKY L. (2007): Ethylene biosynthetic and signalling genes in strawberry fruit: isolation and characterization of ACC-synthase, -oxidase and CTR1. Advances in Plant Ethylene Research: Procceedings of the 7th International Symposium on Plant Hormone Ethylene, 41-43. Eds.: A. Ramina, C. Chang, J. Giovannoni, H. Klee, P. Perata, E. Woltering 2007 Springer.

KNEE M., SARGENT J.A. & OSBORNE D.I. (1977): Cell wall metabolism in developing strawberry fruits. Journal of Experimental Botany. 8: 377-396.

KODAMA Y. & SANO H. (2006): Evolution of a basic-helix-loop-helix protein from a transcriptional repressor to a plastid-resident regulatory factor involvement in hypersensitive cell death in tobacco plants. The Journal of Biological Chemistry. 281 (46):35369-35380.

KOH T.H. & MELTON L.D. (2002): Ripening-related changes in cell wall polysaccharides of strawberry cortical and pith tissues. Postharvest Biology and Technology. 26: 23-33.

KOŚCIAŃSKA E., KALANTIDIS K., WYPIJEWSKI K., SADOWSKI J., TABLER M. (2005): Analysis of RNA silencing in agroinfiltrated leaves of *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana tabacum*, Plant Molecular Biology. 59: 647–661.

KUUSK S., SOHLBERG J. J., LONG J. A., FRIDBORG I., SUNDBERG E. (2002): STY1 and STY2 promote the formation of apical tissues during *Arabidopsis* gynoecium development. Development. 129. 4707-4717.

LELIEVRE J.M., LATCHÉ A., JONES B., BOUZAYEN M., PECH J.C. (1997): Ethylene and fruit ripening. Physiologia Plantarum. 101: 727-739.

LESEBERG C.H., EISSLER C.L., WANG X., JOHNS M.A., DUVALL M.R., MAO L. (2008): Interaction study of MADS-domain proteins in tomato. Journal of Experimental Botany. 59: 2253-2265.

LINCOLN J.E., FISCHER R.L. (1988): Regulation of gene-expression by ethylene in wild-type and rin tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit. Plant Physiology. 88:370-374.

LUNKENBEIN S., SALENTIJN E.M.J., COINER H.A., BOONE M.J., KRENS F.A. & SCHWAB W. (2006): Up- and down-regulation of *Fragaria x ananassa* O-methyltransferase: impacts on furanone and phenylpropanoid metabolism. Journal of Experimental Botany. 57: 2445-2453.

MANDEL M. & HIGA, A. (1970): Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. Journal of Molecular Biology. 14(53): 159-162.

MANNING K. (1994): Changes in gene expression during strawberry fruit ripening and their regulation by auxin. Planta. 1994: 62-68.

MANNING K. (1998): Isolation of a set of ripening-related genes from strawberry: their identification and possible relationship to fruit quality traits. Planta. 205(4): 622-631.

MANTOVANI R. (1998): A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes. Nucleic Acid Research 26: 1135-1143.

MARÍN RODRÍGUEZ M.C., ORCHARD J. & SEYMOUR, G.B. (2002): Pectate lyase, cell wall degradation and fruit softening. Journal of Experimental Botany. 53: 2115-2119.

MEDINA-ESCOBAR N., CÁRDENAS J., MUÑOZ-BLANCO J.L. CABALLERO J. (1998): Cloning and molecular characterization of a strawberry fruit ripening-related cDNA corresponding a mRNA for a low-molecular-weight heat-shock protein. Plant Molecular. Biology. 36: 33-42.

MEZZETTI B., LANDI L., PANDOLFINI T., SPENA A. (2004): The defH9-iaaM auxin-synthesizing gene increases plant fecundity and fruit production in strawberry and raspberry. BMC Biotechnology. 4:4.

MOING A., RENAUD C., GAUDILLERE M., RAYMOND P., ROUDEILLAC P., DENOYES-ROTHAN B. (2001): Biochemical changes during fruit development of four strawberry cultivars. Journal of American Society for Horticultural Science. 126:394-403.

MOORE S., VREBALOV J., PAYTON P., GIOVANNONI J. (2002): Use of genomics tools to isolate key ripening genes and analyse fruit maturation in tomato. Journal of Experimental Botany. 53:2023-2030.

MOYANO E., PORTERO-ROBLES I., MEDINA-ESCOBAR N., VALPUESTA V., MUNOZ-BLANCO J. & CABALLERO J.L. (1998): A fruit-specific putative dihydroflavonol 4-reductase gene is differentially expressed in strawberry during the ripening process. Plant Physiology. 117: 711-716.

MURRE C., MCCAW P.S., BALTIMORE D. (1989): A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. Cell. 56: 777-783.

MUT P., BUSTAMANTE C., MARTÍNEZ G., ALLEVA K., SUTKA M., CIVELLO M., AMODEO G. (2008): A fruit-specific plasma membrane aquaporin subtype PIP1;1 is regulated during strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit ripening. Physiologia Plantarum. 132(4): 538-551.

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 Physiology. 118:1295-1305.

NEMHAUSER J. L., FELDMAN L. J., ZAMBRYSKI P. C. (2000): Auxin and ETTIN in Arabidopsis gynoecium morphogenesis. Development. 127: 3877-3888.

NIJSSEN L.M. (1996): Volatile compounds in food: qualitative and quantitative data. Zeist, The Netherlands: TNO Nutrition and Food Research Institute.

NITSCH J.P. (1952): Plant hormones in the development of fruits. The Quarterly Review of Biology. 27:33-57.

OETIKER J.H., OLSON D.C., SHIU O.Y., YANG S.F. (1997): Differential induction of seven 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes by elicitor in suspension cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum*). Plant Molecular Biology. 34:275-286.

O'MALLEY R.C., RODRIGUEZ F.I., ESCH J.J., BINDER B.M., O'DONNELL P., KLEE H.J., BLEECKER, A.B. (2005): Ethylene-binding activity, gene expression levels, and receptor system output for ethylene receptor family members from Arabidopsis and tomato. The Plant Journal. 41:651-659.

ƟSTERGAARD L. (2009): Don't ‚leaf' now. The making of a fruit. Current Opinion in Plant Biology. 12: 36-41.

PENFIELD S., JOSSE E.M., KANNANGARA R., GILDAY A.D., HALLIDAY K.J., GRAHAM I.A. (2005): Cold and light control seed germination through the bHLH transcription factor SPATULA. Current Biology. 15(22): 1998-2006.

PERKINS-VEAZIE P.M., HUBER D.J. & BRECHT J.K. (1988): Ethylene synthesis in developing strawberry fruit. Plant Physiology. 86: 155.

PERKINS-VEAZIE P.M. (1995): Growth and ripening of strawberry fruit. Horticultural Reviews. 17: 267-297.

PERKINS-VEAZIE P.M., HUBER D.J. & BRECHT J.K. (1996): In vivo growth and ripening of strawberry fruit in the presence of ACC, STS or propylene. Annals of Applied Biology. 128: 105-116.

PIRES N., DOLAN L. (2010): Origin and diversification of 407 basic-helix-loop-helix proteins in plants. Molecular Biology and Evolution. 27: 862-874.

REDGEWELL R.J., MACRAE E.A., HALLETT I., FISCHER M., PERRY J. & HARKER R. (1997): In vivo and in vitro swelling of cell walls during fruit ripening. Planta. 203:162-173.

RESEN J.C. & KADER A.A. (1989): Postharvest physiology and quality maintenance of sliced pear and strawberry fruits. Journal of Food Science. 54: 656-659.

ROMIER C., COCCHIARELLA F., MANTOVANI R., MORAS D. (2003): The NF-YB/NF-YC structure gives insight into DNA binding and transcription regulation by CCAAT factor NF-Y. Journal of Biological Chemistry. 278: 1336-1345.

ROSIN F.M., AHARONI A., SALENTIJN E.M.J., SCHAART J.G., BOONE M.J., HANNAPEL D.J. (2003): Expression patterns of a putative homolog of AGAMOUS, STAG1, from strawberry. Plant Science. 165: 959-968.

SALZMAN R.A., FUJITA T., ZHU-SALZMAN K., HASEGAWA P.M., BRESSAN R.A. (1999): An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. Plant Molecular Biology Reporter. 17: 11–17.

SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. (1989): Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

SANTIAGO-DOMÉNECH N., JIMÉNEZ-BEMÚDEZ S., MATAS A.J., ROSE J.K.C., MUÑOZ-BLANCO J., MERCADO J.A. & QUESADA M.A. (2008): Antisense inhibition of a pectate lyase gene supports a role for pectin depolymerization in strawberry fruit softening. Journal of Experimental Botany. 59:2769-2779.

SCHIEFELBEIN J. (2003): Cell-fate specification in the epidermis: a common patterning mechanism in the root and shoot. Current Opinion in Plant Biology. 6(1): 74-78.

SEYMOUR G., POOLE M., MANNING K., KING G.J. (2008): Genetics and epigenetics of fruit development and ripening. Current Opinion in Plant Biology. 11:58-63.

SOHLBERG J. L., MYRENAS M., KUUSK S., LAGERRCRANTZ U., KOWALCZYK M., SANDBERG G., SUNDBERG E. (2006): STY1 regulates auxin homeostasis and affects apical-basal patterning of the Arabidopsis gynoecium. The Plant Journal. 47. 112-123.

SONNHAMMER E. L., EDDY S. R., BIRNEY E., BATEMAN A., DURBIN R. (1998): Pfam: multiple sequence alignments and HMM-profiles of protein domains. Nucleic Acid Research. 26:320-322.

SPOLAROE S., TRAINOTTI L., PAVANELLO A. & CASADORO G. (2003): Isolation and promoter analysis of two genes encoding different endo-β-1,4-glucanases in the non-climacteric strawberry. Journal of Experimental Botany. 54:271-277.

THOMPSON J.D., HIGGINS D.G., GIBSON T.J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through squence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acid Research. 22:4673-4680.

THOMPSON A.J., TOR M., BARRY C.S., VREBALOV J., ORFILA C., JARVIS M.C., GIOVANNONI J.J., GRIERSON D., SEYMOUR G.B. (1999): Molecular and genetic characterization of a novel pleiotropic tomato-ripening mutant. Plant Physiology. 120:383-389.

TIGCHELAAR E.C., MCGLASSON W.B., BUESCHER R.W. (1978): Genetic regulation of tomato fruit ripening. HortScience. 13:508-513.

TISZA V., KOVÁCS L., BALOGH A., HESZKY L., KISS E. (2010): Characterization of FaSPT, a SPATULA gene encoding a bHLH transcriptional factor from the non-climacteric strawberry fruit. Plant Physiol and Biochemistry. 48 (10-11):822-826.

TOLEDO-ORTIZ G., HUQ E., QUAIL P.H. (2003): The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. The Plant Cell. 15(8): 1749-177.

TRAINOTTI L., SPINELLO R., PIOVAN A., SPOLAROE S. & CASADORO G. (2001): β-Galactosidases with a lectin-like domain are expressed in strawberry. Journal of Experimental Botany. 52:1635-1645.

TRAINOTTI L., PAVANELLO A. & CASADORO G. (2005): Different ethylene receptors show an increased expression during the ripening of strawberries: does such an increment imply a role for ethylene in the ripening of these non-climacteric fruits? Journal of Experimental Botany. 56: 2037-2046.

VAN-DER-HOEVEN R., RONNING C., GIOVANNONI J., MARTIN G., TANKSLEY S. (2002): Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. The Plant Cell. 14:1441-1456.

VENDRELL M., DOMINGUEZ-PUIGJANER E., LLOP-TOUS I. (2000): Climacteric versus non-climacteric physiology. ISHS Acta Horticulturae 553: 345-349. IV. International Conference on Postharvest Science.

VREBALOV J., RUEZINSKY D., PADMANABHAN V., WHITE R., MEDRANO D., DRAKE R., SCHUCH W. & GIOVANNONI J. (2002): A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (rin) locus. Science. 296: 343-346.

WHITE P.J. (2002): Recent advances in fruit development an ripening: an overview. Journal of Experimental Botany. 53: 1995-2000.

YANG S.F., HOFFMAN N.E. (1984): Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Annual Review Plant Physiology. 35:155-190.

YOKOTANI N., TAMURA S., NAKANO R., INABA A., MCGLASSON W.B., KUBO Y. (2004): Comparsion of ethylene- and wound-induced responses in fruit of wild-type, rin and nor tomatoes. Postharvest Biology and Technology. 32:247-252.

ZAREMBINSKI T.I., THEOLOGIS A. (1994): Ethylene biosynthesis and action: A case of

conservation. Plant Molecular Biology. 26: 1579-1597.

Zöldség-Gyümölcs Piac és technológia, XIV. évfolyam, 6.szám, 2010 június.

www.botany.wisc.edu

www.biologie.uni-duesseldorf.de

www.bio.unc.edu

http://bio1903.nicerweb.com/Locked/media/ch38/38_09FruitDevelopment.jpg

www.quisqualis.com/Climacteric.html

http://8e.devbio.com/images/ch05/0504fig5.gif

Köszönetnyilvánítás

Édesanyámnak, Édesapámnak, Nagyszüleimnek és Testvéreimnek hálásan köszönöm a nyugodt hátteret, a biztatást és az anyagi támogatást amelyet tanulóéveim alatt mindvégig nyújtottak és nyújtanak. Spisák Sándornak köszönöm értékes szakmai tanácsait, javaslatait, és hogy mindig mellettem állt.

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Kiss Erzsébetnek hogy elindított ezen a pályán, és hogy értékes tanácsaira, támogatására mindvégig számíthattam. Külön köszönöm belém vetett bizalmát, és hogy munkám során folyamatos felügyelete mellett nagyfokú szabadságot kaphattam ötleteim megvalósításához.

Köszönöm Dr. Heszky Lászlónak hogy kutatásaimat a Genetika és Biotechnológia Intézetében elkezdhettem, hogy munkámat mindig figyelemmel kísérte és értékes szakmai tanácsokkal látott el.

Köszönöm Dr. Balogh Andreának a kísérleteink alatt nyújtott segítségét, ösztönző szavait, és hogy hasznos tanácsaira mindvégig számíthattam.

Szeretném megköszönni Kassai Tamás mestertanárnak, hogy kísérleteink kivitelezéséhez számos esetben növényanyagot biztosított.

Köszönöm jelenlegi főnökömnek, Dr. Papp Péternek hasznos javaslatait, értékes tanácsait, türelmét disszertációm készítése alatt.

Köszönöm barátaimnak, kollégáimnak nélkülözhetetlen segítségüket, lankadatlan biztatásukat: Katona Melindának, Lencsés Kittinek, Gálné Szóráth Nellinek, Stéger Viktornak, Lózsa Ritának, Maszlag Editnek, Kalapos Balázsnak és Polgári Dávidnak munkám során nyújtott segítségüket, ami nagyban elősegítette kísérleteim végrehajtását és az előre haladást.

Külön köszönöm Kovács László predoktoranduszsnak, hogy lelkiismeretes munkájával hozzájárult kísérleteink eredményességéhez.

Továbbá köszönöm a Genetika és Biotechnológia Intézet összes dolgozójának segítségét.

Köszönöm az Európai Uniónak hogy Marie Curie ösztöndíjjal Görögországban dolgozhattam.

Kutatásainkat az OTKA 37861 számú pályázat támogatta.