

SZENT ISTVÁN EGYETEM

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

Doktori értekezés tézisei

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

Iskolavezető

.....
Dr. Kiss Erzsébet

Témavezető

A munka előzményei, a kitűzött célok

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. Az etilén érés-szabályozó hatása a nem utóérő gyümölcsök érésére nicsen pontosan tisztázva. A funkcionális genomikai alapú kutatások fejlődésének köszönhetően egyre inkább kirajzolódik, hogy etilén függő és transzkripciós faktorok által szabályozott etilén független kaskádok 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 gyümölcsbiológiai kutatások területén, több megválaszolatlan kérdés maradt még a szamóca érésével és gyümölcsfejlődésével kapcsolatban.

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 gyümölcsfejlődés, -érés és szenescencia.

Munkánk során elsőként tanulmányoztunk egy bHLH transzkripciós faktort kódoló *SPATULA* gént, amelyet egy nem utóérő érési csoportba tartozó gyümölcsből, a termesztett szamócából izoláltunk. Kutatásaink célja a következő pontokban foglalható össze:

1. Izoláljuk és klónozzuk a gén ORF-ét (Open Reading Frame, nyitott leolvasási keret).
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 kezelésekre 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 expresszió alkalmazásával a *FaSPT* gén csendesítését hajtjuk végre a számócák hairpin vektorkonstrukcióval történő agroinjektálásával.

Anyag és módszer

Érett számóca gyümölcs eredetű *SPATULA* gén (*FaSPT*) sikeres klónozását követően *in silico* analízist hajtottunk végre. Ehhez BLASTN, BLASTX (NCBI, National Center for Biotechnology Information), ClustalW 1.83 programokat (Thompson et al. 1994), illetve CLC bio (CLC protein workbench) és Pfam (Sonnhammer et al. 1998) software-eket használtunk.

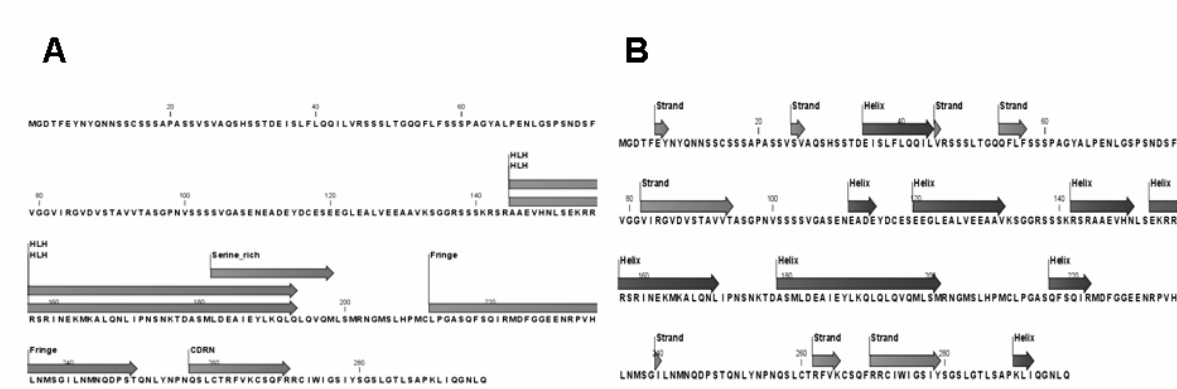
Vegetatív és generatív számóca szövetekben követtük nyomon a *FaSPT* gén expresszióját qRT-PCR módszerrel. Szintén qRT-PCR technikával vizsgáltuk az expressziós változást különböző hormonkezelések (auxin, etilén) és mechanikai sebzés hatására leveleken, illetve auxin és etilén kezelés hatására különböző fejlődési és érési stádiumban lévő gyümölcsökön.

A gén *in planta* funkciójának felderítésére *Agrobacterium* közvetítette tranziens expressziós géncsendesítést hajtottunk végre.

Eredmények

A *FaSPT* ORF klónozása és *in silico* analízise

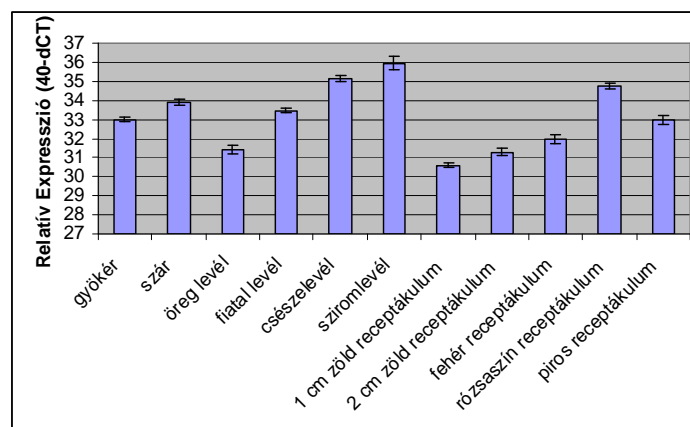
Klónoztuk a számócából származó *SPATULA* gén ORF-ét (*FaSPT*). A gén fehérje szinten a legnagyobb homológiát a funkcionálisan már jellemzett *Arabidopsis* *SPATULA*-val (*AtSPT*) mutatta. További *in silico* analízisek alkalmazásával a *FaSPT* aminosav szekvenciáján CDRN, Fringe, és szerin gazdag motívumokat is sikerült azonosítanunk (1. ábra).



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

Génexpressziós kísérletek

A vizsgált gén szövet-szintű expressziójának meghatározásához qRT-PCR technikát alkalmaztunk. Az analízis során azt tapasztaltuk, hogy a *FaSPT* a különböző eredetű szövetekben más-más szinten fejeződik ki. Gyökér, szár, öreg és fiatal levelekben, illetve csésze- és szíromlevelekben nagyobb szintű expressziót azonosítottunk, mint az éretlen receptákulumokban, ahol gyenge, de folytonos növekedés volt megfigyelhető a gyümölcsfejlődés három stádiumán (1 cm kis zöld, 2 cm nagy zöld, fehér) át. Rózsaszín receptákulumokban a transzkriptum mennyisége hirtelen megnőtt, majd a pirosakban jelentősen lecsökkent. Ezek az expressziós különbségek arra engednek következtetni, hogy a *FaSPT* folyamatosan expresszál a fejlődő és érő gyümölcsökben végig a rózsaszín stádiumig (2. ábra).



2. ábra: A *FaSPT* gén relatív expressziós profilja különböző növényi szövetekben. A feltüntetett \pm SD (standard deviation) értékek a három technikai ismétlésből származó szórásokból adódnak.

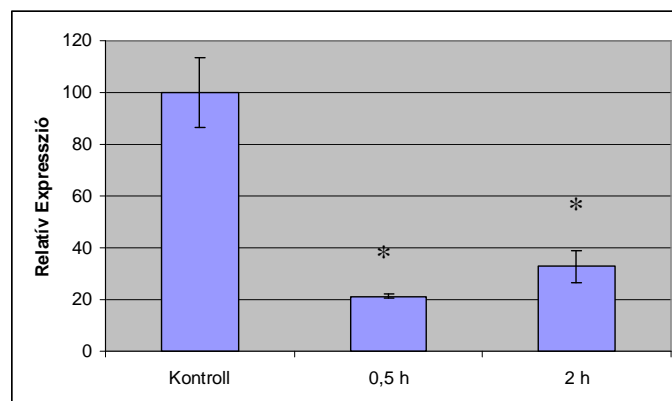
Mivel a vizsgált génről az előzetes kísérletek alapján bebizonyosodott, hogy nemcsak az érés során expresszál, hanem egyéb vegetatív és generatív szövetekben is kimutatható (Heisler et al. 2001), érdekesnek találtuk megvizsgálni, hogy számóca levelekben hogyan változik a transzkriptumok mennyisége különböző hormonkezelések és mechanikai sebzés hatására.

Bizonyították, hogy számos, a gyümölcsfejlődésben résztvevő kulcsfontosságú regulátor a levelek fejlődésében is szerepet játszik, 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 utolsósorban a levél-szenescenciát.

A gén promóter régiójában egy TGA-box fordul elő 646 bp-ra a start kodontól (Balogh et al. 2005). 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 (3. ábra). Már fél óra elteltével szignifikáns csökkenés volt tapasztalható, a kezelt minták transzkriptum mennyisége egyötöde volt a kezeletlen kontroll mintáénak. Két óra elteltével némi növekedést detektáltunk, de ez még mindig szignifikánsan alacsony volt a kontrollhoz képest.

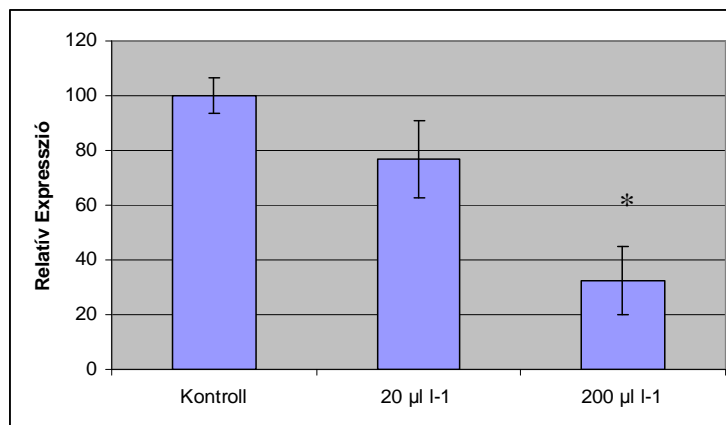


3. ábra: a *FaSPT* gén relatív expressziós profilja számóca levelekben auxin kezelés hatására. A feltüntetett \pm SD (standard deviation) értékek a három technikai ismétlésből származó szórásokból adódnak. *P-érték < 0,05.

Arabidopsis-ban végrehajtott kísérletek bizonyították, hogy a hormon hatására azoknak a géneknek nőtt a kifejeződése, amelyek a sejtnövekedéssel vagy sejtoszódással voltak

kapcsolatban, míg a szeneszcenciával vagy a stressz válaszokkal kapcsolatosak gátlódtak a kezelés hatására (Bao et al. 2002).

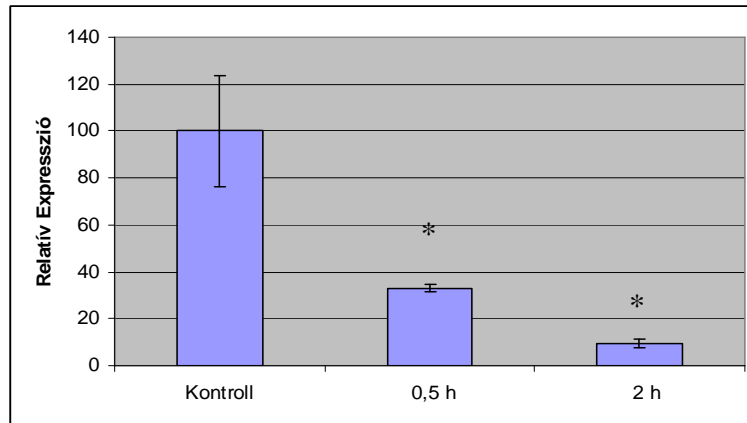
Négy etilén-válasz elemet (ERE) sikerült azonosítani a gén promóter régiójában (Balogh et al. 2005), ezért feltételeztük, hogy az etilén szerepet játszhat a *FaSPT* transzkripció szintjének szabályozásában a levelek esetében is. A vizsgálatok során megállapítottuk, hogy az expresszió már $20 \mu\text{l l}^{-1}$ mennyiségű etilén gáz adagolásával csökkent, és ehhez a csökkenéshez viszonyítva szignifikáns csökkenést tapasztaltunk $200 \mu\text{l l}^{-1}$ beinjektálásával (4. ábra).



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

Feltételezhetően, a vegetatív szövetekben található endogén etilén szint változásának következtében, a *FaSPT* eltérő expressziós mintázatot mutatott fiatal és öreg levelekben (2. ábra). Az etilénnek bizonyított hatása van a levelek szeneszcenciájára, ugyanis minél 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. Ennek alapján feltételezhetjük hogy a szamóca leveleket tekintve a *FaSPT* működése összefüggésbe hozható szeneszcenciával kapcsolatos mechanizmusokkal is.

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 transzkripció aktivátoraiként működnek, a *FaSPT* expresszióját megvizsgáltuk mechanikai sebzés hatására. Fél óra után igen gyors transzkriptum csökkenést tapasztaltunk, majd a két órás kezelés után a transzkriptum mennyisége nagymértékben lecsökkent, míg el nem érte a minimum szintet, ami még a fél órás kezelésnél észlelt szintnél is alacsonyabbnak bizonyult (5. ábra).

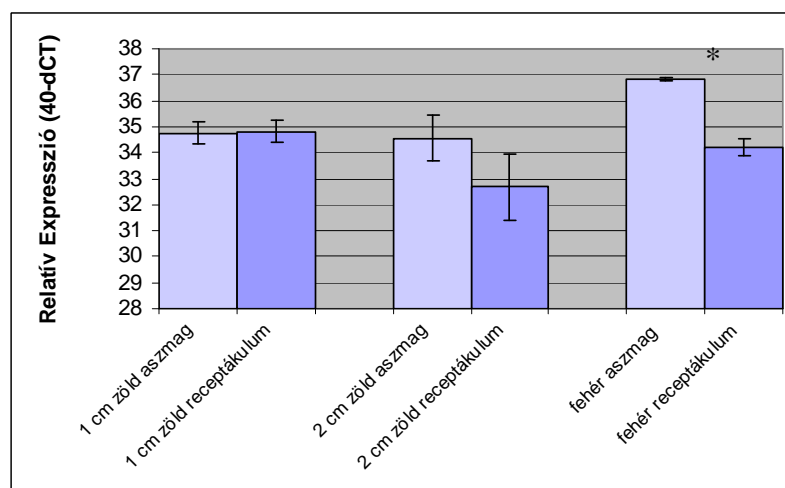


5. ábra: A *FaSPT* gén relatív expressziós profilja mechanikai sebzés hatására. A feltüntetett \pm SD (standard deviation) értékek a három technikai ismétlésből származó szórásokból adódnak. *P-érték < 0,05.

Valószínűsíthető, hogy a sebzés hatására felszabaduló metabolitok gátolhatják a *FaSPT* transzkripcióját, továbbá a sebzési stressz hatására keletkező etilén mennyiség szintén befolyással lehet a génexpresszióra.

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

Annak érdekében, hogy kiderítsük, milyen szerepet tölt be a *FaSPT* a szamóca gyümölcs fejlődésének folyamata során, megvizsgáltuk annak expresszióját három különböző stádiumú (1 cm zöld, 2 cm zöld, fehér) receptákulumban ill. azok aszmagjaiban egyaránt (6. ábra). Az aszmagok receptákulumoktól való elkülönítésével további adatokat nyertünk arról, hogy milyen hatással lehet az endogén auxin az expresszióra a fejlődő szövetekben.

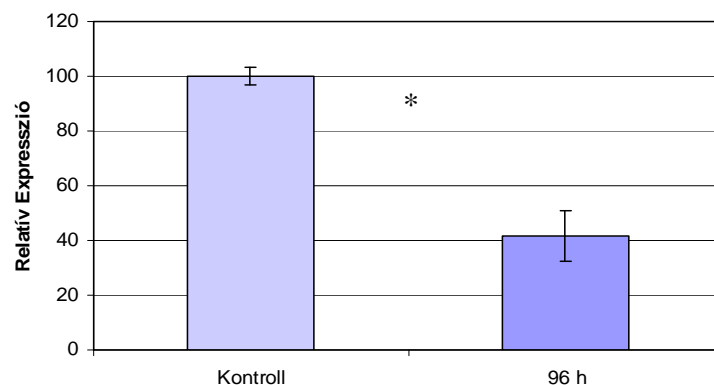


6. ábra: A *FaSPT* expressziós profilja fejlődő aszmagokban és receptákulumokban. A feltüntetett \pm SD (standard deviation) értékek a három technikai ismétlésből származó szórásokból adódnak. *P-érték < 0,05.

A vizsgált gén aszmag- és receptákulum-specifikus expresszióját elemezve szinte ugyanaz a transzkriptum mennyiség volt detektálható a kérdéses szövettípusokban az 1 cm-es zöld szamócákban. Ennek oka feltételezhetően az lehet, hogy ezeknek a szöveteknek a hormonszintje valószínűleg azonos ebben a fejlődési stádiumban. Ezekkel az eredményekkel ellentétben, a *FaSPT* expressziójának csökkenését figyeltük meg a 2 cm nagyságú szamócák receptákulumaiban az aszmagjaikban mért expresszióhoz képest, ahol a transzkriptum mennyisége olyan szintű volt mint azt az 1 cm-es szamócnál tapasztaltuk. Hasonló eredményt kaptunk a fehér szamócák esetében is: az expressziós szint szignifikánsan magasabb volt az aszmagokban, mint a receptákulumokban.

Szamócában az aszmagokban kimutatható természetes hormon szint, a fő auxin forrás 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 szamócból származó receptákulumokban és aszmagokban a *FaSPT* gyümölcsfejlődési folyamatokban betöltött szerepére utal.

Az előbbieken említett adatok és a gén promoter régiójában található AuxRE motívum alapján kísérleteink során azt feltételeztük, hogy az exogén auxin kezelés szuppresszálja a *FaSPT* transzkripcióját.

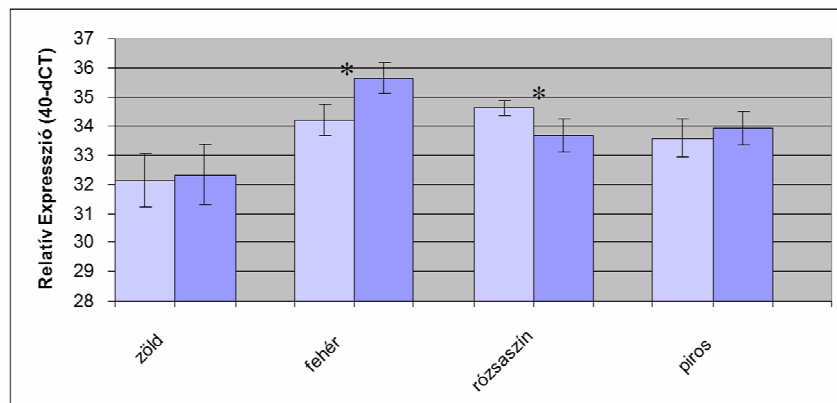


7. ábra: A *FaSPT* relatív expressziós profilja fiatal zöld gyümölcsökben (1 cm), amelyeket 1% DMSO-ban feloldott 1 mM NES szintetikus auxin tartalmú lanolin pasztával kezeltünk. A kontrollok esetében a kezeltekkel megegyező pasztát alkalmaztuk, a hormon hozzáadása nélkül. Minden gyümölcsöt 96 órával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

Eredményeink azt bizonyították hogy a 96 órás auxin kezelés csökkentette a gén transzkripcióját (7. ábra).

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

Ezekben a gyümölcsökben különböző expressziós mintázatokat detektáltunk az etilén hatására (8. ábra). A 24 órás hormonkezelés hatására a zöld receptákulumokban a *FaSPT* nem mutatott változást a kezeletlen kontrollokhöz képest. Ugyanakkor, 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.



8. 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 \pm 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 növekvő tendenciát mutat a zöldtől a fehér fejlődési stádiumig, míg csökken az érés során (rózsaszín és piros érési stádiumban) a kezeletlen gyümölcsökben, jelezvén a *FaSPT*-nak inkább a gyümölcsfejlődésben, mint a gyümölcsérésben betöltött lényeges funkcióját.

A *FaSPT* génjének hairpin alapú csendesítése fiatal gyümölcsökben

A vizsgált gén szamóca gyümölcsben betöltött funkciójának meghatározása érdekében *Agrobacterium* közvetítette RNS interferencián alapuló géncsendesítést hajtottunk végre.

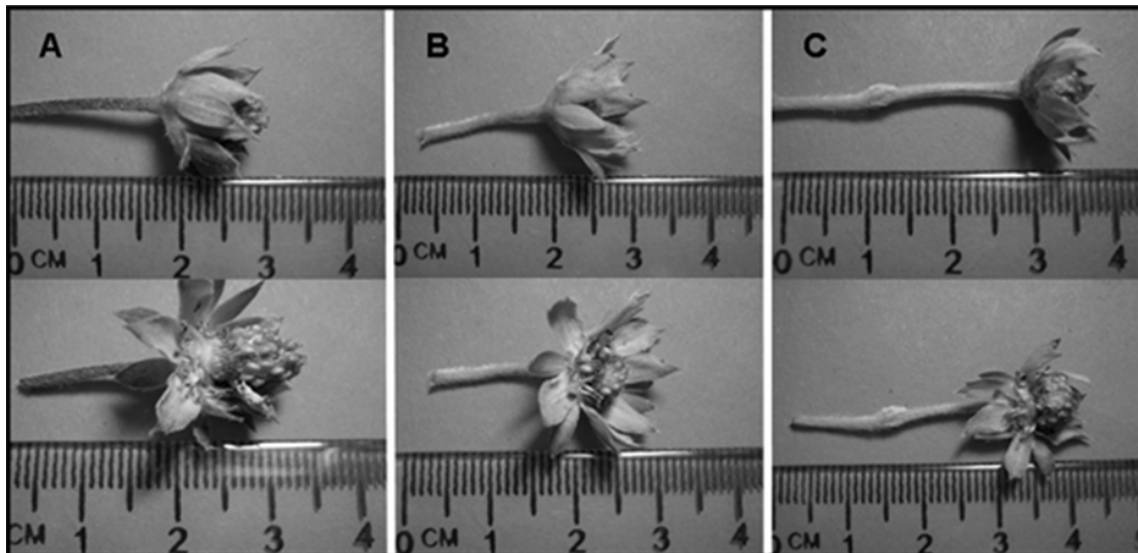
Létrehoztunk egy, a vizsgált génre tervezett szensz-intron-antiszensz kazettát hordozó hairpin vektorkonstrukciót (9. ábra).



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

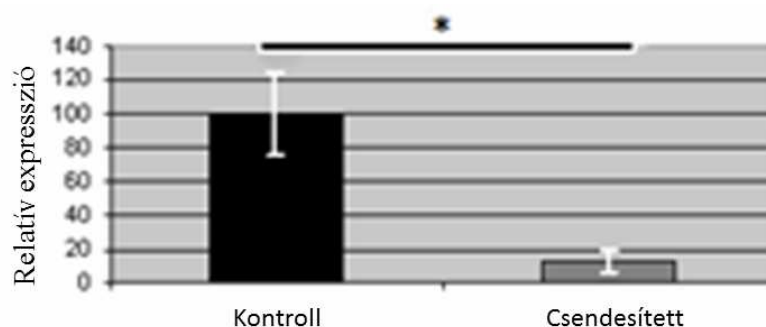
A már meglévő *FaSPT* kódoló szekvencián 399 bp hosszú szensz és antiszensz orientációjú darabokat szaporítottunk és klónoztunk pBluescript II KS (Stratagene) 597 bp hosszú növényi intron szekvenciát már tartalmazó vektorba (Koscienska et al. 2005), egy szensz-intron-antiszensz kazettát hozva így létre. A fragmentumot pBIN20 bináris vektorba klónoztuk a következőképpen: a szensz fragmentumot az intronnal együtt *XhoI/XbaI* emésztéssel szubklónoztuk a pBIN20-ba, majd a szensz-intron darab mellé az *XbaI/XbaI* emésztéssel kivágott antiszensz fragmentumot is klónoztuk. A megfelelő orientációról szekvenálással bizonyosodtunk meg. Ezt követően a konstrukcióval GV3101 *Agrobacterium* törzset transzformáltunk, amit a tranziens expressziós kísérleteinkben használtunk fel a szamóca gyümölcsök agroinjektálására.

A hairpin vektorkonstrukciónkkal injektált szamóca gyümölcsöknek kb. ¼-e mutatott eltérő fenotípust a kontroll konstrukcióval injektált szamócákhoz képest. Ezek a különbségek a csendesítő vektorral injektált gyümölcsökben a redukált méretben és megváltozott formában jelentkeztek (10. ábra).



10. ábra: *FaSPT* silencing fejlődő gyümölcsökben tranziens géncsendesítéssel. 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.

Mivel a szamóca termése számos különálló termőlevélből tevődik össze, párhuzam feltételezhető az általunk kapott redukált méretű szamócák és az *Arabidopsis spt* mutánsok abnormalis fenotípusú becői között. Bár valós idejű PCR segítségével bizonyítottuk a vizsgált gén transzkriptumának csökkenését 1, 2, ill. 3 nappal az infiltráció után (11. ábra), de nem tudtunk hasonló transzkriptum-csökkenést detektálni azokban a gyümölcsökben (14. napon), amelyek a megváltozott fenotípust mutatták (nem közölt adatok). Feltételezhetően a korai gyümölcsfejlődésben bekövetkezett géncsendesítés következménye a redukált gyümölcsméret, de a génfunkció valószínűleg a 14. npra visszaállt, tranziens expresszióról lévén szó.



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

Mivel az általunk vizsgált *FaSPT* egy lényeges transzkripciósfaktort kódol, a korai silencing hatása feltételezhetően felelős volt a gyümölcsfejlődésben adódott defektusokért. Eredményeink arra utalhatnak, hogy a *FaSPT* egy, a gyümölcs fejlődésében is szerepet játszó gén.

Új tudományos eredmények

Elsőként tanulmányoztunk egy bHLH transzkripciósfaktort kódoló *SPATULA* gént egy nem utóérő érési csoportba tartozó gyümölcsből, a természetett 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 szíromlevelekben 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 gén expressziót.
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 kontrollokhöz képest, ugyanakkor etilén kezelés hatására kismértékű

expresszió növekedést figyeltünk meg a fehér receptákulumokban, míg csökkenést a rózsaszínekben.

7. Tranziens expresszióval a *FaSPT* gén csendesítését hajtottuk végre szamócák agroinjektálásával. Ennek során defektusokat figyeltünk meg a fiatal gyümölcsök alakjában az injektálást követő 14. napon.

Következtetések és javaslatok

Bár a szamóca nem klimaktérikus érésére az etilén nem- vagy csak csekély hatást gyakorol, bizonyították az etilén bioszintézisében és jelátviteli útvonalában résztvevő kulcsgének létezését ebben a növényfajban is. 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 fejlődésben működő génről van szó.

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

Különböző kezelések hatására a vizsgált gén különbözőképpen expresszál. 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 vontuk le, hogy a *FaSPT* a szenescenciával és stressz válaszokkal kapcsolatos folyamatokban is részt vesz.

A *FaSPT* transzkriptum mennyiségének növekedését detektáltuk a fejlődés előrehaladtával a zöld és fehér 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, amiből következik, hogy az exogén hormonbevitel befolyással van a *FaSPT* expressziójára.

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 számócákban.

Különböző szövettípusokban végzett expressziós kísérleteink bizonyították, hogy a gén a legnagyobb szinten a szíromlevelekben expresszál. Ez az adat korrelál az *Arabidopsis thaliana* *SPATULA* génjének vizsgálata során kapott eredménnyel, ahol megállapították, hogy a *SPATULA* a szíromlevél expanzióinak is egy kulcs regulátora.

Tranziens expressziós elemzéssel RNS interferencián alapuló géncsendesítést hajtottunk végre fejlődésben lévő gyümölcsökön. Ennek hatására számos, fejlődésükben gátolt gyümölcsöt figyeltünk meg, ami a vizsgált gén gyümölcsfejlődésben betöltött szerepére utal. Megfontolandó feladat 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.

Irodalomjegyzék

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

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

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.

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.

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.

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

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

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

Publikációk

Az értekezés témakörében megjelent publikációk

Tudományos cikkek

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 Physiology and Biochemistry*. 48 (10-11):822-826. IF: 2,485

BALOGH A., KONCZ T., **TISZA V.**, KISS E., AND HESZKY L. (2005): The effect of 1-MCP on the expression of several ripening-related genes in strawberries. *HortScience*, 40(7): 2088-2090. IF: 0,570

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

Konferencia absztraktok

KONCZ T., BALOGH A., **TISZA V.** KISS E., HESZKY L. (2006): Ripening induced genes in strawberry. **11th IAPTC&B Congress, Biotechnology and Sustainable Agriculture 2006 and Beyond.** Book of Abstracts. Beijing, China, August 13-18, 2006. p.36 (S-120)

TISZA V., BALOGH A., KONCZ T., DELIMPALTADAKIS N., KARANDEMIRIS K., VRETTOS N., KRITON K., HESZKY L., KISS E. (2007). Egy bHLH (basic Helix-Loop-Helix) transzkripciós faktort kódoló *Spatula* gén funkcionális vizsgálata. *Functional analysis of a spatula gene encoding a bHLH ((basic Helix-Loop-Helix) transcription factor.* Lippay János - Ormos Imre – Vas Károly Tudományos Ülésszak /Scientific Conference/, Budapest 2007. november 7-8. Összefoglalók, Kertészettudomány / *Abstracts Horticultural Science* p. 166-167.

Egyéb publikációk

Tudományos cikkek

POLGÁRI D., KALAPOS B., **TISZA V.**, KOVÁCS L., KERTI B., HESZKY L., KISS E. (2010): In silico analysis of a putative Spiral gene related to strawberry ripening. *Acta Agronomica Hungarica* 58 (3):267-272.

TISZA V., KOVÁCS L., KISS E., HESZKY L. (2009): Ripening associated processes in strawberry, a nonclimacteric fruit: a short overview. *International Journal of Horticultural Science*, 15 (1-2): 105-109.

KONCZ T., **TISZA V.**, BALOGH, A., KISS, E., HESZKY, L. (2007): Szamóca szövet-és érés-specifikus gének promotereinek izolálása TAIL-PCR-rel és a szekvenciák bioinformatikai elemzése. *Debreceni Egyetem Agrártudományi Közlemények, Acta Agraria Debreceniensis* 27: 91-99.

BALOGH A, KONCZ T, **TISZA V**, KISS E, HESZKY L. (2005): Szamóca gyümölcsfejlődésében és érésében szerepet játszó gének és promótereik izolálása *Kertgazdaság, Különkiadás*: 105-110.

Referált konferencia kötetek

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: Proceedings 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.

KOVÁCS L., **TISZA V.**, KONCZ T., KERTI B., SZŐKE A., KISS E., HESZKY L.: A szamóca (*Fragaria x ananassa* Duch.) ACC-szintáz gén promóterének bioinformatikai jellemzése. XV. Növénynevelési Tudományos Napok, Hagyomány és haladás a növénynevelésben (2009), 262-266.

Konferencia absztraktok

KOVÁCS L., KONCZ T., **TISZA V.**, GALLI ZS., KERTI B., SZŐKE A., BALOGH A., KISS E., HESZKY L.: Ripening and tissue-specific promoters in strawberry. *Molecular Mapping and Marker Assisted Selection in Plants*, International Conference, Vienna 3-6 February 2008. Programme and Abstracts p. 95.

KISS E., BALOGH A., **TISZA V.** KONCZ T., HESZKY L. (2006): Ethylene biosynthetic and signalling genes in strawberry fruit: isolation and characterization of *ACC-synthase*, *-oxidase* and *CTR1*. **7th International Symposium on Plant Hormone Ethylene, Pisa, June 18-22. 2006.** Book of Abstracts P1-7. p. 34.

TISZA V., BALOGH A., KONCZ T., IVANICS M., JENES B., KISS E., HESZKY L. (2006): Identification and functional analysis of a novel strawberry gene *FaRH2*, encoding a RING-finger protein. **XV. FESPB Congress on Plant Biology, July 17-21. 2006, Lyon, France**, Book of Abstracts p. 37.

TISZA V., BALOGH A., KONCZ T., KISS E., HESZKY L. (2006): Identification and sequencing of ethylene biosynthetic genes and their promoter in strawberry. **11th IAPTC&B Congress, Biotechnology and Sustainable Agriculture 2006 and Beyond.** Book of Abstracts. Beijing, China, August 13-18, 2006. p. 66 (P-1081).

KOVÁCS L., KONCZ T., **TISZA V.**, KERTI B., SZŐKE A., KISS E., HESZKY L. (2009): Szamóca érésében működő ACC-szintáz gén promóterének bioinformatikai jellemzése. *Fiatalkutatók az élhető Földért* 50. ISBN 963993502-6.

KOVÁCS L., KONCZ T., **TISZA V.**, KERTI B., SZŐKE A., KISS E., HESZKY L. (2009): Érész- és szövetspecifikus gének promótereinek izolálása TAIL-PCR alkalmazásával szamócából. *Fiatalkutatók az élhető Földért* 50. ISBN 963993502-6.

TISZA V., KOVÁCS L., KONCZ T., KALANTIDIS K., SZŐKE A., KISS E., HESZKY L.: Szamócából származó nitriláz-gén funkcionális elemzése. *Fiatalkutatók az élhető Földért* (2009), 50. ISBN 963993502-6.

KOVÁCS L., **TISZA V.**, KONCZ T., KERTI B., SZŐKE A., HESZKY L., KISS E.: Szamóca érés- és szövetspecifikus gének promótereinek izolálása TAIL-PCR alkalmazásával. (XV. Növénynevelési Tudományos Napok 2009).

KOVÁCS L., **TISZA V.**, KONCZ T., KERTI B., SZŐKE A., HESZKY L., KISS E.: A szamóca (*Fragaria x ananassa* Duch.) ACC-szintáz gén promóterének bioinformatikai jellemzése. (XV. Növénynevelési Tudományos Napok 2009).

TISZA V., BALOGH A., KOVÁCS L., KRITON K., HESZKY L., KISS E. 2008. *Fragaria x ananassa* Duch. nitriláz-szerű génjének funkcionális vizsgálata. **XIV. Növénynevelési Tudományos Napok, XIV. Scientific Days of Plant Breeding** Budapest MTA 2008. március 12. Összefoglalók, p. 78.

TISZA V., BALOGH A., KONCZ T., KRITON K., HESZKY L., KISS E. 2007. Szamóca-eredetű nitriláz-szerű gén funkcionális elemzése. Functional analysis of a strawberry derived nitrilase-like gene. Lippay János - Ormos Imre – Vas Károly Tudományos Ülésszak /Scientific Conference/, Budapest 2007. november 7-8. Összefoglalók, Kertészettudomány / Abstracts Horticultural Science p. 216-217.

KONCZ T., **TISZA V.**, BALOGH A., KERTI B., MOGYORÓSI D., HESZKY L., KISS E. 2007. Érés- és szövetspecifikus gének promótereinek izolálása TAIL-PCR alkalmazásával szamócából. Isolation of ripening-specific gene promoters by TAIL-PCR in strawberry. Lippay János - Ormos Imre – Vas Károly Tudományos Ülésszak /Scientific Conference/, Budapest 2007. november 7-8. Összefoglalók, Kertészettudomány / Abstracts Horticultural Science p. 194-195.

BALOGH A., **TISZA V.**, KONCZ T., KISS E., HESZKY L. (2006): Szamóca Ring-H2 finger gén és promóterének azonosítása, funkcionális elemzése. **XII. Növénynevelési Tudományos Napok, XII. Scientific Days of Plant Breeding** Budapest MTA 2006. március 7-8. Összefoglalók, p. 27.

KONCZ T., BALOGH A., **TISZA V.**, KISS E., HESZKY L. (2006): Szamóca (*Fragaria x ananassa* Duch.) gyümölcs-specifikus gének és promótereik izolálása, bioinformatikai jellemzése. **XII. Növénynevelési Tudományos Napok, XII. Scientific Days of Plant Breeding** Budapest MTA 2006. március 7-8. Összefoglalók, p. 116.

KONCZ T., **TISZA V.**, HALÁSZ G., VERES A., BALOGH A., KISS E., DÉNES F., HESZKY L. (2006): Szamóca fajták elemzése molekuláris markerekkel. **Molekuláris markerek felhasználása a növénygenetikai és nemesítési kutatásokban, MAE Genetikai Központi Szakosztály ülése, Martonvásár, 2006. január 19.**