

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BUDAPEST

Nyári és téli alma kutikulájának mikroszkópos és molekuláris vizsgálata

Ivanics Balázs Ágoston

Készült a Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszéken

Tanszéki konzulensek:
Albert Zsolt PhD hallgató
Dr. Papp István egyetemi tanár

Bírálok:

Budapest, 2011. november 14.

tanszékvezető

konzulens

konzulens

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK	3
2. TUDOMÁNYOS ELŐZMÉNYEK	4
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
3. 1. A növényi kutikula szerepe és felépítése	4
3. 2. A növényi kutikula feladatai	5
3. 3. Kutikuláris viaszok anyagcseréje és a kutikuláris viaszok bioszintézise	7
3. 4. A kutikula vizsgálati lehetőségei	9
4. CÉLKITŰZÉS	11
5. ANYAG ÉS MÓDSZER	11
5. 1. Növényanyag	11
5. 2. Mintagyűjtés	12
5. 3. Oldatok, reagensek	13
5. 4. Alma méret meghatározás	15
5. 5. Vízesztés meghatározás	15
5. 6. Kutikuláris viaszok leoldása és vizsgálata	16
5. 7. Alkalmazott statisztikai módszerek	17
5. 7.1. Egytényezős varianciaanalízis	17
5. 7.2. Lineáris regresszió	18
5. 8. Genomi DNS izolálás	18
5. 9. RNS izolálás	19
5. 10. NanoDrop, spektrofotometria	20
5. 11. DNáz kezelés	20
5. 12. Reverz transzkripció, cDNS szintézis	21
5. 13. Polimeráz láncreakció (PCR)	23
5. 14. Agaróz gélelektroforézis	25
5. 15. Primer tervezés és adataik	25
5. 16. Szekvenáltatás	27
5. 17. Metszet készítés	27
5. 18. Fénymikroszkópos vizsgálatok	27
5. 19. Fixálás	28
5. 20. Szudán festés	28
5. 21. Konfokális mikroszkópia	28

5. 22. Auramin O festés	30
5. 23. Calcofluor festés	30
6. EREDMÉNYEK	30
6. 1. Vízesztés	30
6. 2. Viaszleoldások	31
6. 3. RNS izolálás	32
6. 4. PCR módszerrel kapott eredmények	33
6. 5. Genomi DNS izolálás és gDNS ellenőrzés	40
6. 6. Szekvenáltatás	41
6. 7. Fénymikroszkópos megfigyelések	41
6. 8. Konfokális mikroszkópia eredményei	43
7. KÖVETKEZTETÉSEK	45
8. ÖSSZEFOGLALÁS	46
9. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	47
10. IRODALOMJEGYZÉK	47

1. RÖVIDÍTÉSEK

ACP – acyl carrier protein, acil-hordozó fehérje

cDNS - mRNA templáthoz szintetizált komplementer DNS

cer – *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. „*eceriferum*” mutánsa

CTAB - cetil-trimetil-ammónium-bromid

ECR- transz-2,3-enoyl-KoA reduktáz

EDTA- etiléndiamin-tetraecetsav

ER- endoplazmatikus retikulum

EST – expressed sequence tag

FAE – fatty acid elongase, zsírsav-elongáz komplex

FAS – fatty acid synthase, zsírsav szintáz komplex

FAT – fatty acyl-thioesterase, zsírsavacil-ACP tioészteráz

FDH - *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. *fiddlehead* mutánsa

gDNS - genomi DNS

KCR- 3-ketoacil-KoA reduktáz

KCS- 3-ketoacil-KoA szintáz

KoA – koenzim-A

LACS – long-chain acyl-CoA sythase, hosszúlancú koenzimA szintáz

PAS - *Saccharomyces cerevisiae* Phs1p proteinjének *Arabidopsis thaliana* beli homológja

PCR - polimeráz láncreakció

RT-PCR - reverz transzkripció - polimeráz láncreakció

SDS - nátrium-dodecil-szulfát

TBE – Tris-bórsav-EDTA oldat

VLCFA- “very long chain fatty acid”, 20 vagy annál több szénatomláncú zsírsav

2. TUDOMÁNYOS ELŐZMÉNYEK

Kutatómunkám előzményeként a Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszéken már régóta folytak abiotikus stresszélettani kutatások. Vizsgálták többek között növények nehézfémekre adott válaszát és a szárazság hatásainak megjelenését, valamint, az arra adott növényi választ, és az esetlegesen megjelenő, vagy mesterségesen kialakított rezisztenciát.

Dr. Papp István kutatócsoportjában számos kísérletet folytattak a növényi szárazságtűrés és vízvesztés témakörében. Vizsgálták többek között vad típusú, mutáns vagy genetikailag módosított paradicsom és lúdfű növények szárazság stresszre adott válaszait. Búzánál az ezzel, és a hideg stresszel összefüggésbe hozható géncsaládok működését. Saját kísérletem előzményeként pedig olyan kutikuláris viaszokat alkotó vegyületek szintéziséért felelős gének működését is vizsgálták almában, mely az egyes viaszkomponensek kialakulásának egy kezdő lépését képviselik.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A növényi kutikula szerepe és felépítése

A kutikula egy olyan növényi rész, amely rendkívül változatos felépítéssel és sok funkcióval rendelkezik, a növények földfeletti részeit borítja. Abból adódóan, hogy a növényi szöveteket a külvilágtól ez a réteg választja el, előnyös és hátrányos tulajdonságai mind hatással vannak az egész élőlényre.

A kutikula az epidermiszt borító erősen hidrofób réteg. Kémiai összetétele növényfajonként változhat, így szerkezete is rendkívül sokféle lehet. Evolúciós és gyakorlati jelentősége abban áll, hogy az első szárazföldi növények a szárazföldre való kilépéskor jelentős vízháztartást érintő és fénystresszt szenvedtek el, így szükség volt egy olyan, bőrszövetet borító struktúrára, amely az ezek elleni védelmet nagy biztonsággal el tudja látni. A szárazföldön élő növények egyik alapvető feladata, hogy egyensúlyt tartsanak a felvett és leadott víz között, ez utóbbit a gázcsereenyílások illetve a kutikula szabályozzák eltérő utakon (Berend és Fazekas, 2001).

A kutikula általánosan poliszacharid-tartalmú és lipidekből álló rétegekből áll. Az utóbbi csoport tovább bontható kutinra, mely enzimes emésztéssel bontható, és a másik strukturális elemtől, a kutántól, mely enzimesen tovább nem bontható. A lipofil tulajdonságokért pedig a kutikuláris viaszok felelősek. Jelenlegi ismereteink a kutinrétegre és a viaszokra terjednek ki, a kután réteg a ma alkalmazott eljárásokkal azonban nem vizsgálható (Pollard *et al.*, 2008). A kutin réteg polimerjei glicerolból és hozzá kovalensen kapcsolódó 16 és 18 szénatomos epoxi- és hidroxizsírsavakból áll, melyek lehetnek telítettek, vagy akár többszörösen telítetlenek is, de általánosan polimerizált struktúrában jelennek meg. Az összes transpiráció akár 25%-a is történhet a kutikula vízre átjárható részein keresztül. Azonban a lipofil vegyületek számára sem átjárhatatlan réteg, ilyenek lehetnek másodlagos anyagcsere termékek vagy növényvédőszer (Riederer és Müller, 2006). Paradicsomnál feltárták, hogy egy kutint túltermelő fajta, a *dfd* (*delayed fruit deterioration*) hosszabb pulton tarthatóságot és nagyobb ellenállóságot mutatott a kontroll fajtával történő összehasonlításban mikrobiális patogénnel szemben, még a patogén (*Botrytis cinerea*) könnyebb fertőzését elősegítendő mesterségesen előidézett sérülések esetén is, melynek okaként a *dfd* kutikulájának nagyobb mennyiségű és eltérő összetételű viasz és kutin-tartalmát tették felelőssé (Saladié *et al.*, 2007).

3.2. A növényi kutikula feladatai

A kutikula létrehozásáért a növény epidermisz sejtjei felelősek, melyek az elsődleges merisztémákból kialakult, differenciálódott sejtek, csak erélyes külső hatásra dedifferenciálódnak. Állhatnak egy sejt sorostagban a sejtek, de ha osztódásuk több irányú, akkor akár több sejt sor is képezheti az epidermiszt. A felületre merőleges sejt falak sok esetben lehetnek hullámosak, ezzel biztosítva a nagyobb tapadást egymáshoz. Emiatt ennek a szövetnek a húzószilárdsága nagyobb, mint az alatta lévőké, ezért gyakran könnyen lenyúzható. A szorosan egymáshoz kapcsolódó sejtek által alkotott felületet gázcsere nyílások szakítják meg, amelyek elsődleges feladata a gázcsere szabályozása. Erre azért van szükség, mert a légzés és a fotoszintézis során O_2 és CO_2 gázokra van szüksége a sejteknek, azonban a növény felülete korlátlanul nem engedheti át ezek a gázokat. Másrészt a bőrszövet a vízvesztést is korlátozza, e nélkül a párolgási veszteségek miatt az egész növény kiszáradna. Hogy a szabályozást megoldja a szervezet, szükséges egy olyan réteg jelenléte, ami nem engedi át a gázok nagy részét, és egy olyan út is, amely élettani folyamatok által irányítja oldja meg a szabályozást. Utóbbi szerepét látják el a sztomák, az előbbit pedig a kutikula (Riederer és Müller, 2006). A kutikula és az érettség szerepét a vízvesztés szabályozásában Díaz-Pérez és munkatársai vizsgálták paprika termékek esetén (Díaz-Pérez *et al.*, 2007). Feltárták, hogy a vízvesztésre nem csupán a fajta lehet hatással, de a bogyók érettségi állapota és mérete is, amelyek

az előrehaladása negatív korrelációban állt a vízvesztés mértékével. Az elvesztett víz mennyiségét a kutikulán keresztül elpárologtatott víznek tudták be, ugyanis a paprika termése nem rendelkezik gázcsere nyílásokkal, a kocsányt pedig vízre átjárhatatlan paraffin olajjal kenték be. Ez az eredmény azt sugallja, hogy a fiatalabb termések kevésbé védettek a kutikuláris párologtatással szemben az idősebbekhez képest, a folyamatban esetleges szöveti változások is szerepet játszhatnak. Alma esetén is vizsgálták a párologtatást szabályozó faktorokat, ezek fontosságát. Beszámoltak arról, hogy az átermések párologtatásában lényeges szerepet tölt be a bőrszövet és a kutikula vízáteresztő képessége, a kutikula összetétele, a párologtatást lebonyolító felszín mérete és állapota. A kutikula vastagságának szerepéről illetően azonban gyakran egymásnak ellentmondó eredmények születtek (Maguire *et al.*, 2001).

A vízháztartásban a párologtatáson túl másként is betölti szerepét a növényi kutikula. A paradicsom vagy meggy termések esetén például a túlzott gyökéren keresztül történő vagy a termésen át bejutó víz a termések falát megrepesztheti, jelentős termés minőség romlást, ezzel pedig termés kiesést okozva (Simon G., 2006).

Biotikus stresszek elleni védelmi funkcióját egyes baktériumok és gombák fertőzésekor, kártevők megjelenésekor tárták fel. Mai ismereteink szerint egyes kórokozók spóráinak csírázását bizonyos kutikuláris komponensek gátolhatják, de az ezen keresztül történő fertőzés is a legtöbb esetben gátolt, a vízre való átjárhatatlanság miatt (Riederer és Müller, 2006). Feltárták továbbá, hogy egyes mászó rovaroknak gátat jelenthet a kutikula a viaszok csúszóssága miatt, de egyes húsevő növények is a bőrszövet épp ezen tulajdonsága miatt tudják áldozataikat elkapni (Riederer és Müller, 2006).

A növények felületén látható hamvasságért az ún. epikutikuláris viaszok a felelősek. A kutikula fő alkotóelemei az alifatikus 20-60 szénatomos zsírsavak, valamint triterpenoidok, fenilpropanoidok és flavonoidok (Samuels *et al.*, 2008). Megtalálhatók benne továbbá alkoholok, aldehidek vagy akár ketonok is (Kunst és Samuels, 2009).

A növények fejlődése és egyes szervek kialakulása során a kutikuláris viaszréteg elhatároló szerepet tölt be, meggátolja a növekvő részek összenövését (Samuels *et al.*, 2008). Lúdfű (*Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.)) mutánsokban tárták fel, hogy a viaszok bioszintéziséért felelős gének abnormális működése szervfúziókat, torz növényeket eredményezett (Pruitt *et al.*, 2000).

A növényi felszínek sok esetben extrém erős látható fény- és UV-sugárzásnak vannak kitéve. Előbbi a fotoszintézisben gátló szerepet tölthet be a fotoinhibíció előidézése révén az elektrontranszport-lánc blokkolása által (Vass *et al.*, 1992) az UV sugárzás pedig a szöveteket roncsoló hatása révén káros az élő szervezetekre. Ennek kivédésére a kutikuláris viaszok jelenthetnek gátat, melyek a beérkező sugárzás akár 60%-át is visszaverhetik.

Az eddig felsorolt funkciók mellett a kutikula réteg, és azon belül is a kutikuláris viaszok játszanak jelentős szerepet a „Lótusz-effektusnak” elnevezett jelenségben, mely lényege, hogy a viaszok víztaszító tulajdonságaik miatt a víz a levél felszínén apró cseppekben összegyűlve lefolyik arról, eközben pedig magával húzza a felszínre került szennyeződések (Riederer és Müller, 2006).

3.3. Kutikuláris viaszok anyagcseréje és a kutikuláris viaszok bioszintézise

A kutikulába épülő, illetve annak felszínén megjelenő intra- és epikutikuláris viaszok bioszintézisének útja még ma sem teljesen ismert. Számos olyan molekuláris átalakulás van, amelyet végző enzimet eddig nem azonosítottak, ám a molekulák jelenléte miatt valószínűsíthető ezek közeljövőben történő feltárása. A feltehetően kutikuláris viaszok szintézisében szerepet játszó funkciókat és az ezeket ellátó géneket az I. táblázatban foglaltam össze.

I. táblázat: Kutikuláris viaszok szintézisével összefüggésbe hozható gének jelenléte növényekben (Beisson *et al.*, 2003)

Funkció	Azonosított gének száma	EST-k száma
Ketoacil-KoA szintáz (KCS)	20	183
Ketoacil-KoA reduktáz (KCR)	2	47
Hidroxiacil-KoA dehidráz (HCD)	0	0
Enoil-KoA reduktáz (ECR)	1	31
Acil-KoA reduktáz	8	8
Viasz szintáz	12	0
Aldehyd dekarboniláz	5	36
Transzkripciós faktor (feltételezett)	3	28
CER3	1	7
Viasz észter ω -hidroxiláz	8	51
Acil-KoA reduktáz (aldehid termék)	0	0
Hidroxiláz (másodlagos alkohol termék)	0	0
Oxidáz (keton termék)	0	0
ELO-típusú elongáz	4	10
Plasztidiális hosszú láncú acil-KoA szintetáz (LACS)	3	10
Nem plasztidiális hosszú láncú acil-KoA szintetáz (LACS)	3	53
Plasztidiális ABC acil-transzporter	1	1

A plasztiszokban képződő 16 illetve 18 szénatomos zsírsavláncok szintézise egy ott működő enzim-komplex, a zsírsav-szintáz (fatty acid synthase, FAS) működésével kezdődik. A bioszintézis során a létrejövő páros szénatomszámú zsírsavláncok kettosával gyarapítják szénatomjaik számát a FAS komplex egyes enzimeinek segítségével, melyek csak szubsztrát specifikusban térnek el egymástól (Kunst és Samuels, 2003). A létrejött acil-csoportok acil-hordozó fehérjéhez (acyl carrier protein, ACP) kapcsolódnak, majd az endoplazmatikus retikulum membránjába ágyazott zsírsav

elongáz komplexek (fatty acid elongase, FAE) végzik a szintetizált láncok nagyon hosszú szénláncú zsírsavakká (very long-chain fatty acid, VLCFA) történő tovább alakítását. Erre a helyre történő eljutásukhoz azonban hidrolizálódniuk kell az ACP-ről egy acil-ACP-tioeszteráz (fatty acyl-ACP thioesterase, FAT) enzim katalízisével. Növényekben eddig a FATA és FATB enzimek működését írták le, melyek a FAS enzimkomplex tagjaihoz hasonlóan szubsztrát specifitásban térnek el egymástól (Jetter és Kunst, 2008). A plasztiszokban szintetizált telített láncok posztszintetikus módosításai, így például a telítetlenné válás, deszaturálás is ebben a sejtalkotóban zajlik.

A plasztiszokból kikerülve a létrejött zsírsavak KoA molekula kapcsolódásával észteresednek, amit egy hosszú láncú acil-CoA szintetáz enzim (long-chain acyl-CoA synthetase, LACS) katalizál, és bár az enzimes család számos izoenzimét sikerült azonosítani és vizsgálni *Arabidopsis thaliana* növényekben a reakció pontos menete máig ismeretlen (Jetter és Kunst, 2008). Az észteresített zsírsavláncok ezek után léphetnek be a FAE enzimkomplex lánc hosszabbító folyamatába, melynek eredményei a VLCFA-k lesznek.

A FAE komplex négy reakciót végez el egymás után, ezek egy kondenzáció, egy redukció, egy dehidratáció majd végül egy újabb elongáció, melynek eredményeként a bekerült lánc két szénatommal hosszabbodott. A részfolyamatokat katalizáló enzimek közül mára sikerült legalább egy-egy olyan gént azonosítani *Arabidopsis* modell növényben, melyek bizonyítottan az adott reakciót katalizálják. Az első elongációs lépést például egy CER6/CUT1 nevű enzim szabályozza, a redukcióért a KCR1 enzim, a dehidratációt egy a *pasticcino* nevű mutánsból izolált PAS2 enzim, az elongáció utolsó lépését pedig ismét egy *eceriferum* mutáns kapcsán feltárt fehérje, a CER10 katalizálja. Az *eceriferum* (*cer*) mutánsok vizsgálata mára számos kutatócsoport fókuszába került (Joubés *et al.*, 2008; Aarts *et al.*, 1995; Xia *et al.*, 1997, Rowland *et al.*, 2006), az általuk katalizált reakciók növényélettani szempontból nélkülözhetetlen fontos volt emiatt. Ezen mutánsok alapján olyan enzimeket azonosítottak, melyek specifikusan a kondenzációs reakciókat katalizálják (KCS1-KCS21), és feltehetően egymás izoenzimeiként funkcionálnak a növényekben. A KCR1 enzimet *Arabidopsis*-ban vizsgálva azt találták, hogy ezen enzim hiánya embrionális letalitást okozott a fejlődés során, hiánya végzetes a fejlődésben lévő növények számára (Beaudoin, *et al.*, 2009). A dehidratációt katalizáló enzimet a *pasticcino* mutáns ismeretében írták le, és ezen enzim funkcióvesztése szintén embrionális letalitást váltott ki a lúdfű növényekben (Bach *et al.*, 2008).

A FAE-komplex tevékenységének eredményeként tehát VLCFA-k jönnek létre, melyek enzimes átalakításokkal alkánokká, alkoholokká, észterekké, aldehidekké vagy ketonokká alakulnak, majd transzportfolyamatok révén jutnak ki az epidermális sejtrétegből a kutikulába. Ezen enzimek közül azonban számos résztvevő pontos szerepe ugyan feltételezett, de nem bizonyított. Bizonyosan elkülönítik azonban egymástól a két fő szerves kémiai átalakulási útvonalat, az acil-

redukciós és a dekarbonilációs utakat (Kunst és Samuels, 2003). Az előbbiben a primer alkoholok és viasz észter komponensek, utóbbi során pedig az alkánok, aldehidek, szekunder alkoholok és ketonok szintézise zajlik.

A primer alkoholok VLCFA-kból való átalakítását jelenlegi ismereteink szerint a *CER4* gén terméke szabályozza. Mivel az anyagcsere-útvonal első folyamata ez, az enzim sérülése az útvonal termékeinek csökkenését eredményezte egy mutáns lúdfűben. A viasz észterek pedig a WSD1 enzim segítségével jönnek létre, mely szubsztrátként akár primer alkoholokat, akár acil-KoA molekulákat használhat fel (Kunst és Samuels, 2009).

A dekarbonilációs anyagcsereúton a MAH1 enzimet azonosították résztvevőként, amin kívül két *eceriferum* mutáns kapcsán leírt fehérje, a CER3 és CER1 vállalkoznak tevékeny szerepet az alkánok előállításában. Ezek mellett azonban számos génről feltételezhető, hogy a kutikuláris viaszok bioszintézisében szerepet játszik. Ilyenek például a WAX2 (Chen *et al.*, 2003), a HTH (*hothead*; Krolkowski *et al.*, 2003), a FDH (*fiddlehead*; Pruitt *et al.*, 2000), a LCR (*lacerata*; Wellesen *et al.*, 2001), melyek megváltozása vagy sérülése viaszkomponensek mennyiségi és minőségi elváltozásaihoz vezetett.

A fent említett gének és termékeik mellett azonosítottak egy transzkripció faktor (WIN1), mely a képződő kutikuláris anyagok mennyiségét befolyásolja (Broun *et al.*, 2004). A vizsgálatok alapján a lipidek kutikulára való kijutásban szerepet játszik egy ABC-transzporter (WBC11; Bird *et al.*, 2007), és egy LTPG nevű, glikozil foszfatidil-inozitolhoz kapcsolt lipid transzfer protein (DeBono *et al.*, 2009), melyek sérülése esetén csökkent viaszmenyiséget azonosítottak a növényi felszíneken, amiből a funkciót valószínűsítették.

3.4. A kutikula vizsgálati lehetőségei

A kutikula vizsgálatára számos módszer kínálkozik, annak ellenére, hogy a szerkezete elég komplex. A hagyományos fénymikroszkópos vizsgálati módszerekkel vizsgálható a kutikula teljes struktúrája. Igaz ugyanakkor, hogy a felszín felé történő sejtfalvastagodások ezzel a módszerrel nem különíthetők el. A festetlen mintákon az epidermisz külső felületén lévő réteg azonosítható kutikulaként. Riederer és Müller ajánlott definíciója szerint ugyanis mindazon réteg a növényi felszínen, amely az elsődleges és másodlagos sejtfalakat is magába foglalja, és erősen átszőtt kutintartalmú régiókkal, „kutikularizált rétegnek” hívható (Riederer és Müller, 2006).

Elektronmikroszkópos eljárásokkal a kutikularizált rétegen egy másik zóna különíthető el a kutikulán belül, ez a „kutikula anyag”, amely elektronmikroszkópos képeken egy fénylő, elektrodenz réteggént tűnik fel. Szintén ilyen vizsgálatokkal a kutikularizált rétegen belül megkülönböztethetjük az extrakutikuláris és az intrakutikuláris rétegeket. Az így definiált rétegekbe

besorolhatók a korábban már taglalt struktúrák: az extra- és intrakutikuláris viaszok, és a kutinréteg a kutikula anyagba, a kutikularizált rétegben pedig szintén található kutin és intrakutikuláris viasz. Sajnos azonban a kutin természete miatt annak pontos helyéről túl sokat nem tudunk (Riederer és Müller, 2006; Pollard *et al.*, 2008).

Festetlen mintákat vizsgálva a fénymikroszkóppal sajnos nem különíthetők el a finomabb kutikuláris struktúrák, és esetleg a látottak meghatározásában is hibákat ejthetünk. Fluoreszcens jelöléssel azonban láthatóvá tehető sok minden, ami a hagyományos fénymikroszkóppal nem vizsgálható. Buda és munkatársai több mikroszkópos és fluoreszcens mikroszkópos festést is alkalmazott kutikuláris struktúrák vizsgálatára (Buda *et al.*, 2009). A „Nile blue A” festék speciális jellege miatt alkalmasnak tűnt a kutikuláris anyagcsere-termékek elhelyezkedésének detektálására, és így a kutikula kialakulásának vizsgálatára. Savas közegben ugyanis ez a festék kék színű, apoláris tulajdonságú vegyületekhez kötéskor viszont pirosas-rózsaszínes lesz (Buda *et al.*, 2009). A már tárgyalt folyamatokon keresztül a kutikulára mindazon prekursor vegyületek is kiülhetnek, amely nem észter-típusúak, mint a viaszok. Így a zsírsavak, és egyéb savas prekursorok jelenléte kékes színnel, az erősen lipofil vegyületek elhelyezkedése pedig pirossal követhető nyomon. Sajnálatos módon azonban ez a festék a cellulóztartalmú sejtfal komponenseket és a membrán struktúrákat is kékre festi, és ez az erős kék szín zavarhatja a kutikuláris komponensek elkülönítését, még ha a szerzők szerint ez a fénymikroszkópos vizsgálatokra az egyik legalkalmasabb festés (Buda *et al.*, 2009). A kutikula vastagságának meghatározására azonban ajánlják a Szudán IV festést is, mellyel a festék erősen lipofil és vízzoldhatatlan tulajdonsága miatt az apoláros vegyületeket tartalmazó szövetek, így a kutikula is megfesthető. Annak ellenére, hogy a sejtekben is található ilyen tulajdonságú komponensek, nem tapasztalható zavaró háttér képződés a sejteken belül (Buda *et al.*, 2009). A fluoreszcens technikák közül kiemelik az Auramin O és a Calcofluor White MR2 festékek használatát. Ezek közül az előbbi a telítetlen, savas viaszok és kutin prekursorok festéséért, utóbbi pedig a cellulóz és karboxilálódott poliszacharidok festéséért felelős (Bisio *et al.*, 1999). Így együttes alkalmazásukkor a sejtfalakat tartalmazó részek háttérében jelennek meg a viaszok és a kutikula egyéb komponensei.

A mikroszkópos vizsgálatok mellett a kutikula egyéb módokon is vizsgálható. Vízáteresztése és átjárhatósága közvetlenül például enzimatis emésztéssel és utána vízáteresztési vizsgálatokkal mérhető (Riederer és Müller, 2006). Kutikulával borított szervrész sötétben történő tömegvesztéséből pedig a perisztómásan elpárologtatott víz mennyiségére lehet következtetni (Díaz-Pérez *et al.*, 2007).

4. CÉLKITÚZÉS

Ismereteink szerint számos biotikus és abiotikus stresszre adott válaszbán az alma átermését borító kutikula réteg kitüntetett szerepű. Vizsgálataim egyik célja az volt, hogy *Malus domestica* Borkh. 'Prima' és 'Florina' fajtaának áterméseiben, különösen a kutikula szerkezetében különbségeket mutassak ki. A héj szövettáját többféle módszerrel is vizsgáltam. A szakirodalomban ismertetett módszereket alkalmazva elemeztem az érés során a viaszok mennyiségét és az érett átermések vízvesztését. *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. növényben feltárt, viasz bioszintézisben szerepet játszó gének almabeli homológjainak kifejeződését is kutattam. A két fajta között feltehetőleg eltérő génaktivitások kimutatása főszerepet kapott kísérleteimben. Az eddig említett molekulárisnak tekinthető módszerek mellett a szöveti különbségek feltárására fény- és konfokális pásztázó fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokat is végeztem. Utóbbi eljárást irodalmi ismereteink alapján először alkalmaztam a két fajtára.

5. ANYAG ÉS MÓDSZER

5.1. Növényanyag

A hazánkra is jellemző mérsékelt égövön legnagyobb mennyiségben előállított gyümölcs az alma. Világviszonylatban a banán, a citrusfélék és a nálunk is termő szőlő előzi meg. A világ összes termésmennyisége 65 millió tonna, országunk részesedése ebből 500-540 ezer tonna. A termesztés mai gazdasági helyzetéhez az is szorosan kötődik, hogy az elmúlt évtizedekben a termesztéstechnológia sokat fejlődött. Az almatermesztésben jelent meg első között az intenzív és integrált termesztés. Ezek alapvető részei a modern alany és nemes fajta, a műtrágya használat és talajtani vizsgálatok, korszerű növényvédelmi eljárások és szerek használata stb. Ennek köszönhetően, telepítésük és fenntartásuk is tökeigényesebb lett, valamint a termőre fordult gyümölcsösök nagyobb értéket képviselnek. A fogyasztók részéről kifejeződött egy magasabb minőségi igény, amely kezd egyre jobban elválni a feldolgozóipar igényeitől. Így a termesztésben egyre nagyobb szükség van a szakértelemre és az ezt megalapozó kutatásokra és tapasztalatokra.

Az általunk vizsgált almafajta a 'Florina' és a 'Prima'. Rendszertani besorolásuk szerint a *Malus domestica* Borkh. fajta, a *Rosaceae* család, *Maloideae* alcsaládjába tartozó zárvatermők. Fás szárú, alacsony fa habitusú növények. Átermésük bogernyő virágzatuk virágaiból fejlődik. Alapvetően gömbhöz hasonlítható, de a lapított gömb és a harang alak között igen formagazdag megjelenésű. Abban egységesek, hogy a kocsány és az éretten elszáradt csészelevelek kissé

besüppednek az átermés közepe felé. A vastag gyümölcshús általában öt magot rejt. Hamvas, viaszos, gyakran kétszínű héj borítja. Környezeti igényei a mérsékelt égövnek megfelelőek, 9-13°C évi középhőmérséklettel és 600-800mm évi csapadékkal jellemezhető helyeket kedveli.

Az általunk tanulmányozott nyári alma fajta a 'Prima'. Augusztus utolsó és szeptember első dekádjában érnek gyümölcsei. Szüret után csupán egy hónapig eltartható, beltartalmi értékei gyorsan csökkennek, így friss fogyasztásra alkalmas leginkább. Átlagos gyümölcsmérete 140-190 g, lapított gömbölyded, vagy tompa kúp alakú. Éretten sárga alapszínű, mosott piros fedőszíne pedig felületének háromnegyedét borítja. Húsa bőlevű, roppanós, mérsékelten savas ízű. Bőven és rendszeresen terem. Hazánkban eddig varasodásra rezisztensnek bizonyult.

Kutatásunk második célfajtája a 'Florina'. Október első dekádjában szüretelhető téli alma. Gyümölcse átlagosan 140-180 g, alakja enyhén kúpszerű, a csészénél erősen bordázott. Sárgászöld alapszínű, élénkpiros mosott és csíkozott fedőszínű. Jóval hamvasabb, mint a 'Prima', és lenticellái is feltűnőbbek. Húsa halvány sárgás, lédús és roppanós, szilárdabb mint a 'Prima'-é. Szabályozott légterű tárolóban akár március végéig is eltartható. Varasodásra való érzékenysége igen kicsi, tűzelhalással szemben is igen ellenálló, lisztharmat toleranciája közepes (Tóth M., 2009).

A két vizsgált almafajta fő jelentősége, jó értelemben vett átlagos ízviláguk mellett (vásárlók által keresettek közé illő), hogy az almaállományokat rendszeresen és nagymértékben sújtó varasodásra (*Venturia inaequalis*) és lisztharmatra (*Podosphaera leucotricha*) rezisztensek, illetve toleránsak. A Prima nyári alma, amely nem tartható el hosszú ideig, míg a Florina téli fajta, és több hónapig tárolható. Feltételeztük, hogy ezek a különbségek a szövetszerkezeti szinten, és az azt meghatározó génműködésekben is megjelenhetnek.

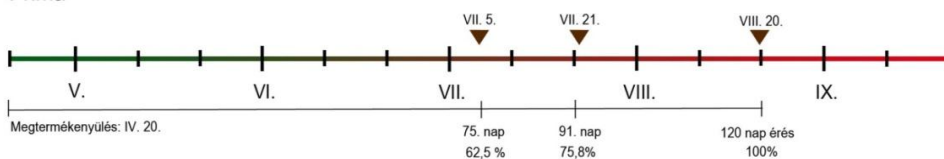
A soroksári Kísérleti Üzem és Tangazdaságban működő ültetvényből származó növényanyagot a Gyümölcstermő Növények Tanszék kutatói biztosították számunkra.

5.2. Mintagyűjtés

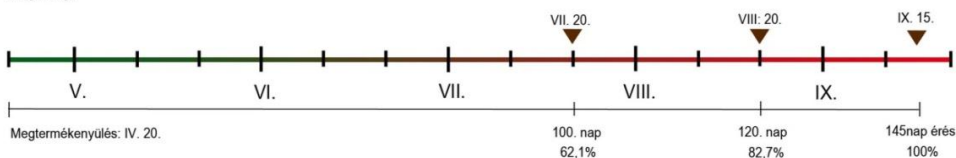
Több időpontban is gyűjtöttünk mintákat. A két almafajta ugyan egyszerre termékenyül meg, fejlődésük azonban nem egyenlő hosszú. Így azokban a vizsgálatokban, amelyekben többször is feldolgoztunk növényanyagot, ugyanolyan fejlődési fázisban kellett mintákat gyűjtenünk. A viaszfedettség méréséhez három érettségi fázisban gyűjtöttünk mintákat. Ezt kivéve minden más vizsgálatot teljes biológiai érettségű almákkal és ugyanabban az időpontban szedett levelekkel végeztünk. A szedések napjait az érettség 62%, 76-80% és 100% állapothoz igazítottuk mindkét fajta esetén (1. ábra). Az áterméseket a lehető legkevesebb megfogással, ütődéssel szállítottuk és mértük. A minta előkészítési eljárásokat külön pontokban, a mérési módszerekkel együtt tárgyalom.

Alma átermések érési táblázata

Prima



Florina



1. ábra. Az alma átermések érési táblázata a mintagyűjtések időpontjaival.

5.3. Oldatok, reagensek

10x TBE

1 liter 10x TBE készítéséhez szükséges hozzávalók:

108 g Tris (Trisz-(hidroxi-metil)-amino-metán)

55 g bórsav

40 ml 0,5M EDTA pH 8.0

1 liter végtérfogatoz szükséges desztillált (DNS-hez) vagy MilliQ (RNS-hez) víz

Solution 1:

85% etanol

0,1% SDS

0,1% Na-tioszulfát

1 literre kiegészítve MilliQ vízzel.

Solution 2:

75% etanol

0,1% SDS

0,1% Na-tioszulfát

1 literre kiegészítve MilliQ vízzel.

Extrakciós puffer:

100 mM Tris-HCl pH 8,0	5 ml
20 mM EDTA pH 8,0	2 ml
2% Béta-merkaptoetanol	1 ml
2% CTAB	1 g
1,4 M NaCl	4,1 g
MilliQ vízzel 50 ml-re töltjük fel	

1,2%-os agaróz gél DNS-ek futtatásához:

112,5 ml 0,5% TBE
1,4 g agaróz
5 µl ethidium-bromid

1,5%-os agaróz gél RNS-ek futtatásához:

112,5 ml 0,5% TBE
1,7 g agaróz
5 µl ethidium-bromid

Auramin O oldat:

0,05 M Tris HCl-ben (pH 7,2) Auramin O port oldunk fel 0,01 w/v% koncentrációban.

Szudán IV oldat:

0,1% v/v törzsoldatot készítettem izopropil alkohollal, majd a kapott törzsoldatot 3:2 arányban hígítottam MilliQ vízzel. A kapott oldatot 30 percig szobahőmérsékleten állni hagytam, majd ALBET 400 szűrőpapíron keresztül leszűrtem a fel nem oldott festékszemcséket.

Fenol készítése

A növényi RNS kivonásához fenolra is szükségünk volt. A fenol szilárd, tűszerű kristályokba rendeződő sárga anyag, mely felhasználása folyadék formájában történik megfelelő pH-n. Ennek elkészítésekor fokozott elővigyázatossággal jártunk el, ugyanis a fenol erősen korrozív, maró anyag, a bőrrel való érintkezéskor súlyos és lassan gyógyuló égési sérüléseket okoz

a fehérjék elroncsolása miatt, karcinogén hatása is ismert. Épp emiatt volt szükséges védőszemüveg, dupla kesztyű, köpeny és elszívófülke használata az eljárás során.

A fenolt ekvibrálás (a pH beállítása) előtt felolvasztjuk, ezt 68 °C-ra való melegítéssel érjük el. A folyékony fenolhoz 0,1%-os végkoncentrációban hidroquinolint adunk, mely vegyület antioxidáns kapacitása révén gátolja a fenol oxidációját, fémvegyületekkel gyengén kelátokat képez.

A folyékony fenolt ezután 0,5 M Tris-HCl (pH=8,0) pufferrel, 1:1 térfogatarányban vegyítjük, és 15 percig mágneses keverőn keverjük. A vizes és a szerves fázis teljes szétválása után eltávolítjuk a vizes fázist, majd újabb 1:1 arányban elegyítjük a fenolt, ezúttal 0,1 M Tris-HCl-t használva (pH=8,0). Újabb 15 percig kevertetjük mágneses keverőn, és eltávolítjuk a vizes fázist. Ezt a legutóbbi lépést mindaddig ismételjük, amíg a fenol fázisának pH-ja (pH papírral mérve) 7,8 fölé kerül. Ekvibrálást követően az utolsó vizes fázist eltávolítjuk, és 0,1 tárfogatnyi 0,1 M-os Tris-HCl-t (pH=8,0) adunk a fenolhoz, mely 0,2% β -merkatoetanolt tartalmaz. Az így előállított fenol 100 mM-os Tris-HCl (pH=8,0) folyadékréteg alatt sötét üvegben tárolható 4 °C-on (Sambrook *et al.*, 1989).

5.4. Alma méret meghatározás

Minden érettségi fázisban gyűjtött átermés tömegét és „átmérőit” lemértük. Az almák tömegeit egy SARTORIUS MC1 Analytic AC 210 P mérleggel határoztuk meg. Az almák felszínének meghatározásához a következő módszert alkalmaztuk. Tolómérővel lemértük az almák szélességét, a csészelevelek helye és a kocsány által kijelölt tengelyre merőlegesen. Ezután 90°-al elforgattuk az almákat a tengely körül és ismét lemértük a szélességüket. Az átermések magasságát is meghatároztuk, az alma talppontjától a hús legtávolabbi pontjáig. Az almák alakját gömbnek tekintettük. A három átmérőt átlagoltuk és ezzel az értékkel számoltunk gömbfelszínt, az 'A' képlet alapján, további kalkulációinkban ezekkel a felületnagyságokkal dolgoztunk.

5.5. Vízvesztés meghatározás

Az átermések tömegét a szedést követően folyamatosan mértük. Az elvesztett tömeget az elpárologtatott víznek tudtuk be, ezért ezeket az értékeket a továbbiakban vízvesztésként szerepeltetjük. Az átermések vízvesztését a kezdeti, szedés utáni tömeg fokozatos csökkenéséből számítottuk ki. Egy hónapon keresztül mértük a mintáink tömegét, a mérés során, az almákat egy tálcán, laboratóriumi körülmények között, 22°C hőmérsékleten, 60-65% relatív páratartalmú helyiségben tároltuk. A keveredés elkerülése érdekében az almákat címkéztük, számozott papírtáblát (2 x 1 cm) kötöttünk a kocsányokra, valamint a kocsányokat vazelinnel kentük be, ezzel

megakadályozva, hogy a kocsányon keresztül veszítsenek vizet. Csupán kiváló egészségi állapotú növényanyaggal dolgoztunk, a sérült, beteg almákat az első tünetek jelentkezésénél kizártuk a vizsgálatokból. Ezt a méréssorozatot csak a 2011-es mintákon végeztük el. Minden alma esetén feljegyeztük a napi tömegvesztéseket (W_x), majd ezeket százalékosan kifejeztük az első napi mérés eredményéhez képest (W_0) a $DL=W_x/W_0 \cdot 100$ képlet segítségével. Ezután minden napi vízvesztési százalékot az előzőből rendre kivonva kaptuk a napi vízvesztés arányát (WLR) a $WLR=DL_x-1-DL_x$ képlettel számolva. Ez a WLR mutató adja meg, hogy egy-egy fajta vízvesztése milyen tendenciát mutatott a vizsgálat alatt, valamint a mérések közti változások alakulása is megmutatható (Díaz-Pérez *et al.*, 2007).

5.6. Kutikuláris viaszok leoldása és vizsgálata

Vizsgálataink során elsődleges célkitűzésünk az alma áltermések kutikulájának vizsgálata volt, amire több lehetőség is kínálkozott. Ahogyan azt az irodalmi áttekintés során már bemutattam, a növényi kutikula több komponensből felépülő struktúra, és számos elsődleges funkcióját apoláris részei töltik be. Ezért a kutikulán belül is az azt részben felépítő viaszokra fókuszáltunk. A kutikulát alkotó viaszréteg vizsgálható például a kutikula enzimes izolálásával (Riederer és Müller, 2006) vagy szerves oldószerbe mártással is kioldhatóak a kutikulából a viaszalkotók (Millar *et al.*, 1999). Mi az utóbbi módszert választottuk, mely során első lépésben meghatároztuk az áltermések felszínét, a későbbi felületegységre jutó viaszréteg kiszámításához, majd kloroformba mártva az almákat beoldottuk az oldószerbe a viaszokat. Ezt az oldatot bepárolva azután száraz tömegként, mérhető formában visszanyertük a kutikuláris viaszokat. Minden szedéskor a fajtákról szedett mintákat három párhuzamos csoportra osztottuk, a statisztikai összehasonlíthatóság érdekében, az almák viasztömegét is csoportonként határoztuk meg. Az almák érettségi fázisával együtt járó méretkülönbségekből adódóan, hogy minél kevesebb, de az almák befedéséhez elegendő kloroformot használjunk, 250, 300, 350 milliliter oldószert töltöttem egy-egy főzőpohárba. Az almákat egyenként, egy percen keresztül, lassú mozdulatokkal mártogattam, a kloroformot csoportonként cseréltem. A bemártás befejezésekor 5 gramm vízmentes NaSO_4 adtam az oldatokhoz, hogy az esetlegesen bekerült poláris alkotóelemeket megkössem. Ez az anyag ugyanis erős vízmegkötő képességgel rendelkezik, vízzel való érintkezéskor jól látható volt állagának megváltozása. Albet 400 típusú szűrőpapírral szűrve, zárható lombikokba töltöttem a főzőpohár tartalmát. Az eredmény átlátszó, látható szennyeződéstől és felszínen lebegő vízcseppektől mentes, de időnként enyhén színezett oldat volt. Mivel a halogénezett szénhidrogének, így a kloroform gőze is feltehetően rákkeltőek, a kloroform emellett kiszáritja a nyálkahártyát és bódító hatású is, több biztonsági óvintézkedést is szigorúan be kellett tartani. A leoldást csak jól működő elszívófülke

alatt végeztük, dupla gumikesztyűben, köpenyben és maszkban, figyelve az ezekkel az eszközökkel kapcsolatos munka során betartandó minden biztonsági intézkedésre.

A kloroformba oldott viaszok bepárlását és tömegének mérését a BCE Alkalmazott Kémia Tanszékén Gyepes Attila végezte. Roto Vapor készülékkel vákuum körülmények között 40°C-on az oldószer elpárolog a mintából és csak az abban oldott anyag marad az edényben. A viaszok tömegét a párologtatás utáni tömeg és a tisztára mosott, száraz lombikok tömegeinek különbségéből lehet meghatározni. Így kapjuk meg a mintagyűjtéskor kialakított csoportok összes viasztömegét és ebből tudtunk meghatározni felületegységre jutó viasztömeget. A vizsgálatokat a 2010-es és a 2011-es mintákon is elvégeztük.

5.7. Alkalmazott statisztikai módszerek

5.7.1 Egytényezős varianciaanalízis

Vizsgálataim ellenőrzésére egytényezős varianciaanalízist (One-Way ANOVA) végeztem a PASW 18.0 program segítségével. Ez a módszer akkor használható, ha egy faktort leszámítva a kísérleti terület teljesen homogénnek tekinthető. Ezen a modellen belül is a teljesen véletlen elrendezést (1TV) választottam, mert szabályosság, szándékosság nem volt a mintavételezések során. Az analízis során arra keressük a választ, hogy a k darab független, véletlen mintánk alapján elfogadható-e az a feltételezésünk, hogy a k darab minta k darab azonos várható értékű alapsokaságból származik. Más megfogalmazásban ez azt jelenti, hogy a kérdésünk arra irányul, hogy a mintáink elemzéséből megerősíthető-e, hogy a mintacsoportok közötti változás a véletlen műve-e. Nullhipotézisként ezt állítjuk, ellenhipotézisként pedig azt, hogy a különbség a csoportok között szignifikáns. Az analízis kiértékelése a számított értékekből készült ANOVA tábla segítségével valósítható meg (Harnos és Ladányi, 2005).

A kutikula vastagságának mikroszkópos meghatározására során több alkalommal is megmértük a kutikula vastagságát különböző metszetek eltérő pontjain, majd az ezekből felálló alapsokaságon (51 'Florina', 31 'Prima' minta) végeztük el az analízist. Az egyetlen faktor ebben az esetben a fajta maga lett. A kiértékelés során figyelembe kellett vennem, hogy a mintáink normális eloszlásúak-e, ezt Kolmogorov-Smirnov próbával (K-S teszt) ellenőriztem.

Az adatsoroknál megtörtént, hogy az adatok szórását egyes kiugró értékek miatt homogenizálni kellett, erre a logaritmizálás eljárását választottam. Ennek lényege, hogy az a mért adat 10-es alapú logaritmusát kiszámolva azzal folytatjuk az elemzést. A módszer azért alkalmazható nagy biztonsággal, mert nem változtat a végeredményen: a logaritmus függvény ugyanis monoton. Kisebb értékekből még kisebbé, a nagyobbak még nagyobbakká

transzformálódnak, tehát szignifikáns különbség is csak akkor kapható a logaritmizált eredmények között, ha az eredetiek között is volt.

5.7.2. Lineáris regresszió

Ezt a statisztikai módszert, a vízvesztéses mérések értékelésére használtuk. Az általános regressziós modell abból az alapfeltetelezésből indul ki, hogy az Y valószínűségi változó egy „f” függvénnyel leírható módon függ az X valószínűségi változótól, valamint kapcsolatuk véletlentől is függő. Egyváltozós, vagyis lineáris regresszióról akkor beszélünk, ha az „f” függvény lineáris. A modell általánosan így írható le: $Y = b_0 + b_1 X + e$, ahol b_0 és b_1 valós számok és „e” a hiba. Ez az egyenlet egy egyenest ad meg, mely általában nem illeszkedik pontosan a mérési eredményekre, csupán közelítő értéket ad. Végtelen sok ilyen görbe adható meg, ezek közül ki kell választani a mérési pontokra legjobban illeszkedőt. Az egyenes meredekségét és zérushelyeit a b_0 és b_1 értékek szabják meg, ezek becslésére a legkisebb négyzetek elvét használják. Az illeszkedés jóságát ebben a lineáris esetben a korrelációs együtthatóval jellemezhetjük. A korrelációs együttható becsülhető a

mintából: $r_{XY} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) * (y_i - \bar{y})}{(n - 1) * s_X * s_Y}$ ahol, x_i és y_i a minta elemei, $\bar{x}$ és $\bar{y}$ a minta átlagok, s_x és

s_y pedig a tapasztalati szórások ($s_n = \sqrt{\frac{n}{n-1} * \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$). Az együttható értékei lineáris összefüggés esetén 0 és 1 között lehetnek és minél nagyobb ez az együttható, annál jobb a modellválasztásunk (Harnos, Ladányi, 2005). A statisztikai módszereket számításait és az egyenesek illesztését a Microsoft Excel 2010 programmal végeztük el.

5.8. Genomi DNS izolálás

Molekuláris vizsgálataink során azt vizsgáltuk, hogy a feltehetően viasz-bioszintézissel kapcsolatos génjeink kifejeződnek-e. Az izolált RNS minőségének ellenőrzésekor szükség volt arra, hogy eldönthessük, vajon a különböző szövetájából kinyert RNS minták tartalmazznak-e genomi eredetű DNS szennyeződést (gDNS) (Albert et al., 2011). Ehhez kontrollként „tisztá” alma genomi DNS-t kellett izolálnom, melynek kinyeréséhez a DNeasy Plant Mini Kit-et (QIAGEN) választottuk, amivel viszonylag gyorsan lehet növényi szövetekből tiszta DNS-t kinyerni. Az így kinyert DNS-t kontrollként használtuk vizsgálatainkban, a reverz transzkripcióval előállított termékek amplifikálása során nyert specifikus termékek genomi DNS-hez történő hasonlításához. A kivonást bármiféle változtatás nélkül, a kitben leírt protokoll alapján végeztük.

5.9. RNS izolálás

Mindhárom általunk vizsgált szövetéből egy etanolos kicsapási módszerrel vontunk ki RNS-t, amely módszert Asif és munkatársai tették közé (Asif *et al.*, 2006). A BCE soroksári Kísérleti Üzem és Tangazdaságból begyűjtött mintáinkat a Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszékre történő szállítását követően azonnal feldolgoztuk. A levélmintákat a helyszínen 50 ml-es Falcon csövekbe helyeztük, feliratoztuk, majd folyékony nitrogénben szállítottuk be az egyetemre. Az áltermés szövetét már az egyetemen dolgoztuk fel, ahol először a héjat és a húst elkülönítettük egymástól. Ügyeltünk arra, hogy a héj szövetéjébe maximum csak kevés hús kerülhessen, fordítva azonban ez ne legyen igaz, vagyis a hús szövetéjébe ne kerülhessen héj eredetű minta. A felszeletelt mintákat azután 50 ml-es Falcon csövekbe, majd -80 °C-os hűtőbe helyeztük, hogy a minták bomlását, az RNS-ek károsodását megelőzzük. A héj szövetének elkülönítésére mikroszkóposan is megvizsgáltuk a fent leírt módon végzett metszésünket a 'Prima' fajtán, és ez alapján elmondhatjuk, hogy az RNS kivonáshoz a kutikula, az epidermisz sejtrétege és az alatta található 6-10 parenchimális sejtsor szolgáltatott mintát, ennek három reprezentatív képe az 2. ábrán látható. A mintákat itt festés és fixálás nélkül vizsgáltuk, a mikroszkópos vizsgálatok alatt leírtak szerint.



2. ábra. A 'Prima' fajtán végzett mikroszkópos ellenőrzés a héj szövetáj vastagságának meghatározásához.

Az RNS kivonás lépéseinél követtük Asif és munkatársai módszerét. A szövetmintáinkat Solution 1 oldattal kevertük, majd centrifugáltuk. A csapadékot Solution 2 oldattal ismételtelen feloldottuk, majd centrifugáltuk. A csapadékhoz extrakciós puffert adtunk, majd a mintát ismét homogenizáltuk. Az oldatot kloroform:izoamil-alkoholt (24:1) eleggyel extraháltuk, majd az RNS-t 10M LiCl-al kicsaptuk. Centrifugálás után a csapadékot MilliQ vízben oldottuk, és ismételtelen extraháltuk. A felülúszóból nátrium-acetát és etanol segítségével csaptuk ki a tisztított RNS-t. A csapadékokat tartalmazó Eppendorf-csőket levegőn szárítottuk, majd RNáz -mentes vízben

oldottuk. Az RNS kivonás során végig nagyon fontos volt a steril, RNáz mentes körülmények biztosítása.

Az így kinyert RNS-t a reverz transzkripcióig -20°C -on tároltuk, azután -80°C -ra helyeztük, hogy minimalizáljuk az RNS-ek bomlását. Minden további RNS-t érintő vizsgálatot ezekkel a mintákkal végeztünk.

5.10. NanoDrop, spektrofotometria

A spektrofotometria olyan kolorimetriás analitikai módszer, amely egy mintán áthaladó fénynyaláb intenzitásának változását méri. Alaptörvénye a Lambert-Beer törvény $A = \alpha \cdot l \cdot c$. Ez a törvény a legtöbb anyagra jellemző a megfelelő koncentrációtartományban. Az alfa egy anyagra jellemző állandó, az úthossz nem változik a mérés során, így az abszorbancia egyenesen arányos a koncentrációval. Egy ismert hígítási sor alapján felvett kalibrációs görbe alapján a mért abszorbanciákból tudunk a koncentrációra következtetni. Ezzel mennyiségi meghatározásra van lehetőségünk. Anyagi jellemző a teljes spektrumon vett fényelnyelés. Ha két mintának azonos az abszorpciós spektruma, akkor a mintákban egyező minőségű anyagok találhatók. Az abszorpciós spektrum felvétele általában látható és UV tartományba eső fénnel történik, több hullámhosszon. A fényintenzitás változást a hullámhosszak függvényében ábrázolva kapjuk meg az abszorpciós spektrumot, ez képezi a kvalitatív vizsgálatok alapját. Az abszorpciós görbe maximumához tartozó hullámhosszon mérhetünk a legnagyobb érzékenységgel kvantitatívan. Figyelembe kell azonban vennünk, hogy a szennyező anyagok abszorpciója zavarhatja méréseink pontosságát, ezért olyan hullámhosszt kell választanunk, amely a mérendő anyagra jellemző, és a lehető legkisebb az átfedés a szennyező anyagok és a mérendő anyag abszorpciós spektrumai között. A kinyert RNS-t, a koncentráció-kiegyenlített RNS-t, majd a későbbiekben a szintetizált cDNS-eket is megmértük NanoDrop készülékkel, és leolvastuk a 260 nm-hez tartozó abszorbanciát. A kivonás során zavaró lehet a szintén kinyert szennyező fehérjék (280 nm), illetve a kivonáskor használt szerves oldószerek 230 nm környékén történő elnyelése. Mintáinkban ezek nem voltak zavaróak, ezért nem mutatjuk be ezen adatokat.

5.11. DNáz kezelés

Az általunk választott RNS izolálási módszer nem biztos, hogy szigorúan szelektív az RNS-re nézve, így megeshet, hogy valamennyi gDNS is lesz a mintáinkban. Ezért szükséges a DNáz kezelés, mellyel a genomiális DNS eltávolítható a mintáinkból. A DNáz (dezoxiribonukleáz) egy olyan enzim, amely képes hidrolizálni a dezoxiribonukleinsavak foszfodiészter kötéseit, ezáltal a

DNS-t mono- és oligonukleotidokra darabolni. Az általunk használt Fermentas kit olyan DNázt tartalmaz (DNáz I), amelynek működéséhez Ca^{2+} ionokra van szükség, és aktivátora a Mg^{2+} .

A recept szerint az enzim egy mikroliterje 10 perc alatt 1 μg DNS-t bont el 37°C -on. Azt feltételeztük, hogy a mintáink 1:1 arányban tartalmaznak RNS-t és DNS-t, ez a feltételezés tapasztalataink alapján túlmutat a várható DNS koncentráción, így várhatóan a jelenlévő DNS-ek megemésztődnek a kezelés végére. Az előzetes nukleinsav koncentráció mérések alapján az eredeti receptet úgy módosítottuk, hogy annyi enzimet adtunk a mintákhoz, hogy a feltételezett DNS mennyiséget teljesen elbontsák 30 perc alatt. Az inkubáció után, az enzim aktivitását le kell állítani, a DNáz I fehérjét ki kell csapni és ki kell vonni a mintából. Ez az RNS izolálás utolsó lépéseire hasonlóan történt.

A DNáz I eltávolításához minden mintához 200 μl fenolt adtunk, és 10 percen keresztül 10000g -n centrifugáltunk. A felülúszót leszívtuk és hozzáadtunk 24:1 arányú kloroform:izoamil-alkoholt. 10 percen keresztül 10000g -n centrifugáltunk. A vizes fázis kinyerése után 1/10 rész 3 M Na-acetátot és 3/10 rész etanolt adtunk hozzá. Egy órán át inkubáltuk -20°C -on, ezután 4°C -on centrifugáltunk 20 percig 14500g -n. A következő lépésben a felülúszót öntöttük le és a csapadékot 1 ml 70%-os etanollal mostuk, majd az előző pontban említett módon centrifugáltuk. Ismét leöntöttük a felülúszót és a csapadékot MilliQ vízben oldottuk.

A kivonás eredményeként létrejött oldatokban az RNS koncentráció különböző, ezt spektrofotométerrel mértük. Ez alapján végeztük a reverz transzkripciót. A cDNS előállítás után a cDNS-ek mennyiségét kell normalizálni. A legkisebb koncentrációjú oldathoz igazítottuk az összes többi oldat koncentrációját. A mérések helyességét szemikvantitatív módon, agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Addig igazítottuk a koncentrációkat, amíg a gélképeken közel egyenlő nagyságú sávokat mutatott minden szövetfaj, egy 30 ciklusos PCR után egy housekeeping-gén másolatainak mennyiségének tükrében. Housekeeping-gén működést mutatott tavalyi vizsgálataink során az ubiquitin és a tubulin. Az ilyen tulajdonságú génekre jellemző, hogy minden szövetben folyamatos a kifejeződésük, intenzitásuk állandónak vehető.

A koncentráció kiegyenlítésre azért van szükség, hogy a gének aktivitását össze tudjuk hasonlítani egymással szövetfajanként. Azonos cDNS koncentrációról feltételezhető, hogy a nukleinsavak reprezentálják a sejtek fehérje alapú folyamatait, a mintagyűjtés időpontjában.

5.12. Reverz transzkripció, cDNS szintézis

A reverz transzkripció lényege, hogy egy RNS molekula alapján DNS molekulát állítunk elő. A reverz transzkripciót a retrovírusok kapcsán fedezték föl, amikor azt tapasztalták, hogy egyes RNS vírusok képesek genetikai állományukat beépíteni gazdasejtek DNS-be. Ehhez szükséges a

ribonukleinsav transzformálása dezoxiribonukleinsavvá. Ezt a reverz transzkriptáz enzim teszi lehetővé, a folyamatot pedig reverz transzkripciónak nevezzük.

Vizsgálataink során a gének kifejeződését vizsgáljuk, amit az mRNS szintek vizsgálatával érünk el. A hírvívó RNS-ek ugyanis primer információt tartalmaznak az adott DNS szakasról, és ha sikerül izolálnunk a vizsgált gén szakaszt mRNS szinten, akkor kijelenthetjük, hogy az a gén működik, és az információ átíródik róla RNS-sé. Mivel azonban későbbi vizsgálataink során problémás lenne tovább dolgoznunk az RNS-ekkel, ezért lényeges, hogy DNS molekulákká alakítsuk őket.

A cDNS szintézis lehetővé teszi a fehérjét kódoló mRNS-ek alapján DNS molekulák előállítását. Az mRNS molekulák a transzkripció során állítódnak elő. Az mRNS-ek érése során az intron szekvenciák kivágódása mellett több változás is bekövetkezik. A cDNS szintézis szempontjából fontos változás a molekulák kiegészítődése egy poliadenin farokkal. Hogy a teljes RNS populációból szelektálni tudjuk a fehérjekódoló mRNS molekulákat és biztosítsuk az enzim működéséhez szükséges duplaszálú tapadási helyet minden molekulán, egy oligotimin (oligo dT) primert használunk, amely a vele komplementer poliadenin szakaszokra tapad be. Innen tudja elkezdni a másolást az enzim az 5'-3' irányban.

Fontosnak tartom megemlíteni, hogy a használt RNS izolálási módszer nem szelektív a ribonukleinsavak között. A RNS-ek sejten belül betöltött szerepük szerint lehetnek több fajták, tRNS, rRNS, mRNS, stb. Vizsgálataink során azokkal az RNS-ekkel foglalkozunk, amelyek fehérjét felépítő információkat hordoznak, ezeket a többitől a cDNS szintézis módszere válogatja ki. Mint azt már említettem, mindegyik mRNS rendelkezik egy poliA farokkal, amely egy tucatnál is több adenin bázis egymásutánja a lánc végén. Erre tapad be primerként az oligo dT primer, amely 18 timin bázist tartalmaz egymás után. Ez a primer a használt cDNS kit része. Így az alkalmazott PCR eljárás során csak olyan cDNS molekulák lesznek templatok, amelyek megfeleltethetők az almák olyan génjeinek, amelyekről érett mRNS (és így valószínűleg fehérje) állítódik elő.

Az reverz transzkriptáz enzim működéséhez a kitben használt pufferrel készített reakcióelegy szükséges. A DNS molekula felépüléséhez szükség van továbbá mind a négy nukleotid trifoszfát jelenlétére. Az mRNS molekulákról a szintetizált cDNS polimerek 70°C hatására denaturálódnak, azaz a templat és a másolat szétválik egymástól. A folyamat végeredménye az mRNS populációnak megfelelő cDNS populáció. A cDNS az intronmentes genomi szekvenciának megfelelő bázissorrenddel rendelkezik. Ez teszi lehetővé, hogy templatként használjuk polimeráz láncreakcióban, amely során DNS-eket tudunk felszaporítani.

A cDNS szintézishez a RevertAid M-Mulv RT. Kit-et használtam. A kit protokollként javasolt lépéseit az alábbiak szerint módosítottuk:

1. Jégen összemértük a következőket:
 - a) 0,5 µg RNS
 - b) 1 µl oligo(dT)₁₈ primer
 - c) MilliQ vízzel feltöltöttük 12 µl-re

Óvatosan kevertük, centrifugáltuk 3-5 másodpercig.

2. Inkubáltuk 70°C-on 5 percig, ezt követően azonnal jégen hűtöttük és pár másodperc centrifugálás következett.

3. Jégen tartva hozzáadtuk a következőket:
 - a) 4 µl 5x reakciós puffer
 - b) 1 µl RiboLock ribonukleáz
 - c) 2 µl 10mM dNTP mix

Óvatos keverést követően, centrifugáltuk 3-5 másodpercig.

4. Inkubáltuk 37°C-on 5 percig.

5. 1 µl RevertAid M-Mulv Reverse Transcriptase-t adtunk hozzá a reverz transzkripció megkezdéséhez.

6. Inkubáltuk 42°C-on 66 percig.

7. A reakciót 10 perces 70°C hőkezeléssel állítottuk le. Ezután jégre helyeztük.

5.13. Polimeráz láncreakció (PCR)

A gének működését, a sejtekben pillanatnyilag előállított géntermékek koncentrációját többféle kifejeződési szinten is vizsgálhatjuk. Minden fehérje előállításához szükséges mRNS, így az mRNS populáció vizsgálatával következtetéseket tudunk levonni egyes (fehérjék által működtetett) sejtfunkciók meglétéről és intenzitásáról. Az mRNS-ről cDNS-t állítottunk elő, de önmagukban ezek csekély koncentrációjuk miatt a rendelkezésünkre álló eszközökkel detektálhatatlanok. A polimeráz láncreakció lényege, hogy a sejtekben osztódáskor és génkifejeződéskor zajló nukleinsav másolást megvalósító polimeráz enzim működését élő sejteken kívül, ellenőrzött körülmények között megvalósítsuk tetszőlegesen sokszor, az élő szervezet nélkül (Hajós né 1999).

A polimeráz másolásához szükséges egy templát DNS szakasz, amelyről a másolat készül, két primer reakciónként, amelyek a másolás kezdeti helyeit jelölik ki az enzim számára. Speciális puffer és MgCl₂ biztosítja a megfelelő kémiai környezetet a működéshez. Az elegynek tartalmaznia kell szabad nukleotidokat is, amelyek beépülhetnek a templát molekulák monomerjeivel szemben, a primerek és egymás mellé. A bázispárosodás szabályainak megfelelően és a természetes folyamathoz hasonlóan, itt is szemikonzervatív módon épülnek fel a molekulák. Így egy reakció végére kétszeres DNS mennyiség érhető el a kiinduláshoz képest. Ezt megfelelő mennyiségű

reagens mellett többször is elvégezhetjük. Ezzel növelhetjük a DNS-ek koncentrációját. Ha azonos körülmények között szaporítunk különböző nukleinsavakat, feltételezhető, hogy számuk növekedése hasonló tendencia szerint történik. Ha a detektálási határ fölé jutunk, és a különböző felszaporított DNS-ek különböző mennyiséget mutatnak, akkor feltételezhetjük, hogy a sejtben, a kivonás előtti pillanatokban az mRNS-ek koncentráció arányai hasonlóak voltak a láncreakció végén tapasztaltakkal. Hogy teljes képet kapjunk az amplifikáció kinetikájáról, ún. real-time PCR-t kell futtatnunk, egyébként kis ciklusszám mellett szemi-kvantitatív PCR-t végezhetünk. A teljes ciklusszámmal végzett hagyományos PCR módszerek kvalitatív vizsgálatok.

Az összehasonlítani kívánt gének kiválasztását a primerek végzik. A bázispárosodás szabályai szerint tapadnak be a templátokra. Úgy kell kiválasztani a primereket, hogy annyi bázist tartalmazzanak, hogy a betapadási hely specifikus legyen a felszaporítani kívánt génre nézve. 18-22 bázis hosszú primereket választottunk, mert ez a hosszúság már statisztikailag biztosítja a specifitást, az ennél hosszabb primerek már akadályozhatják a PCR gyors és helyes lefutását.

A reakció végrehajtásához a Promega GoTaq Flexi DNA Polymerase kit-et használtam a gyártó előírásai szerint. Minden eljárás során 30 ciklus futott le.

A protokoll a következő volt:

Inicializálás: 95°C 2 perc 30 másodperc

A 30-szor ismételt ciklus:

- | | | |
|----------------------------|-------|--------------|
| a) Denaturáció | 95°C | 30 másodperc |
| b) Primer betapadás | 55°C | 30 másodperc |
| c) Lánc hosszabbítás | 72 °C | 1 perc |
| 3. Végső lánc hosszabbítás | 72°C | 7 perc |
| 4. 4°C-ra hűtés | | |

A mintákat az alábbiak szerint készítettem el:

- | | |
|------------------------------|----------|
| 1. cDNS | 1 µl |
| 2. forward és reverse primer | 3-3 µl |
| 3. 5x GoTaq Puffer | 10 µl |
| 4. 25mM-os MgCl ₂ | 3 µl |
| 5. 2,5mM-os dNTP | 3 µl |
| 6. GoTaq Flexi DNA polimeráz | 0,25 µl |
| 7. MilliQ víz | 25,75 µl |

5.14. Agaróz gélelektroforézis

A gélelektroforézis módszerek töltéssel rendelkező makromolekulák méret szerinti szétválasztására alkalmasak. A módszerek lényege, hogy homogén elektromos térbe helyezve a molekulák átlagsebessége jellemző lesz méretükre, alakjukra és töltésük nagyságára, egy adott közegben. A közegnek vezetnie kell az áramot, a molekuláknak pedig egységesen pozitív vagy negatív töltésűnek kell lenniük, hogy egy azonos potenciálú helyről azonos irányba vándoroljanak, a töltésükkel ellenkező töltésű elektród felé. A közegbe helyezett gél, amelyben a mintáinkat futtatjuk, semleges töltésű, porózus szerkezetű, így molekulaszűrőként szolgál. A pórusokon a nagyobb molekulák lassabban, a kisebbek gyorsabban haladnak át. A gélelektroforézis alkalmas nukleinsavak és fehérjék méret szerinti szétválasztására is (Hajós, 1999). A gélelektroforézis módszerek egyik fajtája az agaróz gélelektroforézis. A gél fő alkotója az agaróz, amely tengeri algákból kinyert heteropolimer és meleg vízben jól oldódik. Kihűlve a lineáris polimerláncok hidrogénhid kötésekkel kapcsolódnak egymáshoz, így makropórusos, részlegesen kristályos szerkezetet képeznek. Az elektromos tér hatására megtett úthossz befolyásolja a gél agaróz tartalma. Két azonos méretű molekula egységnyi idő alatt ugyanakkora utat tesz meg a gélben, ez lehetővé teszi, hogy ismeretlen hosszúságú mintákat ismertekkel együtt futtatva meghatározzuk azok nagyságát (Hajós, 1999).

Vizsgálataink során Invitrogen agarózt használtunk. Nukleinsav mintáink gélben történő jelölésére 1 µg/ml ethidium-bromid koncentrációt használtunk. Ha ez a fluoreszcens jelölő festék beépül a nukleinsavakba, akkor UV-fény hatására fluoreszcenciája többszörösére emelkedik, és ez segít szabad szemmel detektálni a nukleinsavakat. Géljeink receptjeit az Oldatok és reagensek pontban leírtak szerint készítettem. Géljeinket a BCE Genetika és Növénynevelés Tanszéken a GelDoc rendszerrel fényképeztük és a hozzá tartozó program segítségével analizáltuk (Quantity One 4.6.9. verzió). A gélből szükség esetén a DNS fragmenseket GFX kittel izoláltuk (Amersham).

5.15. Primer tervezés és adataik

A polimeráz láncreakciókhoz szükséges forward és reverse primereket az alma genom szekvenciából (http://www.rosaceae.org/projects/apple_genome) kiválasztott géneken Primer Premier programmal terveztük és megrendelésünkre a Sigma Aldrich Kft. készítette el mindegyiket. A primerek adatai az alábbi II. táblázatban láthatóak. A gének megnevezései a baloldali oszlopban, az EST adatbázisbeli azonosítójuk a második oszlopban találhatóak. A tervezett forward és reverse szekvenciái 5' végüktől kezdve a harmadik és az általuk közbezárt amplifikátumok hossza a negyedik oszlopban szerepelnek.

II. táblázat. A PCR reakciókhoz használt primerek táblázata.

Gének nevei	Szekvenicia azonosító	Forward és reverse primerek szekvenciái	Termék hosszúság
UBQ11	DQ438989	5'AGTCCACTCTCCATTTGGTGTT	370 bp
		5' CCTTCCTTGCCTGAATCTTAG	
TUA5	GO555180	5'GTGCGAAAACACGTAAAAACCA	390 bp
		5'CCATCAAGACCAAGAGGACAAT	
EF1	AJ223969	5' GCTCAAGGCTGAGCGTGAACGT	398 bp / 600 bp
		5' CAGAAATGGGGACAAAGGGGAT	
KCS 4/2	CN880605	5'ACCCAGGCGGAGCAACCAATGT	364 bp
		5'ATTACGCCTGCTACCGCCCGCC	
KCS7/2	GO504155	5'CCCTAAAAACCAACATCACCAC	464 bp
		5'AGGCACCTCTACAGGAAACTCA	
KCS 14	GO522441	5'CCACTCGTCCTGCCGTTTACCG	294 bp
		5'GCCCCTCCCAACCCGACCTTTC	
FDH	DR993902	5'CAGCTCCTCTTCTTTGCCA	293 bp
		5'TTCACCTTCTCTTTTCGCT	
HTH	GO546350	5'CTAAGAATCAAACAACCAA	459 bp
		5'TGTAGTTTGTGAAATGTTC	
LCR	EG631303	5'GGCTTTACCCTTCTGTTCC	467 bp
		5'ATCGACGTCTTCTTTTCCG	
WIN1	GO498143	5'ACTGAAGAGAAGGGTGTGG	285 bp
		5'CATCTCCATCCATGACCTG	
CER1	CN879307	5'CTTGGAAGCTTTAAGCATGTGG	450 bp
		5'GGAGGAATGGTGATGTGAGTGG	
CER2	ES789986	5'CTTCTGCTTTTAATGGTCTTG	350 bp
		5'GAAATGTATGCGTCTTCGTCT	
CER4	CN860441	5'CTCTCAATACTTTGGGAGC	205 bp
		5'AGTTTTTCTTGGAGCAGCC	
CER5	CN948649	5'AATGTCCACCACAATGCTA	323 bp
		5'CTCAATCTCCCTCCTAAAG	
CER7	GO556217	5'AAGAAAAACACAAAGGGGG	379 bp
		5'GAGTCTATTCTTGCCTTGG	
CER10	GO497697	5'GACGATGAAGGTGACCGTAGTTT	237 bp
		5'TTGTCTGAGTTTCCGCTGATGTA	
KCR1	GO523303	5'GACCTGCCAAGAATCTCAAAAAG	281 bp
		5'AATCAAAAAGTCCCACATCCAACC	
LACS2	GO503886	5'CTCCCACAAGAAAAAGCAGCACC	337 bp
		5'CTCTCAGGCAAATCTCTCCACGG	
LTPG1	GO524970	5'AAATGATTGCGGTGTTGTT	261 bp
		5'TCCAGTAGTGGGAGTTGCT	
PAS2	GO566542	5'ATTCCATCTTACACACAAAACCG	521 bp
		5'GCAGTGTTGCTGTTATTGGAGAT	
WAX2	DR997009	5'CCTTTATATTACTGGGTGC	413 bp
		5'TTTGCGTTTAGTGTCTTCC	
WBC11	CN880528	5'ATCAATGGGCATAAACAAG	499 bp
		5'CAGAAGCAGGACCAAAATA	

5.16. Szekvenáltatás

A PCR során amplifikált termékeinket a BIOMI Kft-vel szekvenáltattuk a hozzájuk tartozó primerek segítségével.

5.17. Metszet készítés

A kutikula mikroszkópos vizsgálatához a lehető legvékonyabb héjmetszeteket kellett készítenünk. Az általunk választott módszer a krioszekcionálás, azaz fagyasztott metszetkészítés. Ennek a lényege, hogy egy rögzített szövetdarabot jégbe ágyazunk, és egy éles pengével a jégtömbbel együtt metsszük el, ezáltal lehetővé válik, hogy a minta, törés és sérülés nélkül kerüljön metszésre. A jégtömbbe rögzítés igen vékony, minimum 8 μm vastagságú metszetek készítését teszi lehetővé. Az általunk választott szöveteket nem kell külön dehidratálni, vagy bármilyen módon előkészíteni, roncsolni, rögtön a friss növényanyagot a megfelelő méretre vágás után lehet metszeni.

A módszer kivitelezésére a BCE Növénytan Tanszékén, Dr. Erős-Honti Zsolt segítségével volt lehetőségünk egy Leitz Wetzlar kriosztáton. A gép -25°C -os hőmérsékletre hűtött és tartott egy kb. 7x7 cm-es acéllapot. Almáinkon 1-2 cm^2 -es rést vágunk, erről leválasztottuk a héjat, az epidermisz sérülése nélkül, a lehető legkevesebb parenchimális „szennyeződéssel“. Ezeket merőlegesen egy vékony szűrőpapír alátéttel raktuk az acéllapra. A hőelvonást közvetítő közeg egy víz alapú gél a Shandon Cryomatrix volt. A metszést akkor kezdtük, amikor teljesen körbevette a megfagyott gél a mintát. A penge vágásmagassága mikrométerenként állítható. A levágott mintákat azonnal szobahőmérsékletű vízbe, a jég elolvadása után tárgylemezre helyeztük. 10 μm vastagságú metszeteket vágunk, ezek megfelelőnek bizonyultak a további mikroszkópos vizsgálatokhoz.

5.18. Fénymikroszkópos vizsgálatok

Célunk a fénymikroszkópos vizsgálatokkal az alapvető szöveti különbségek kimutatása, sejtek, szövetek, rétegek méreteinek meghatározása volt.

A mikroszkóp egy összetett lencserendszer, melynek alkatrészei összehangolt finommechanikai elemekkel mozgathatóak. A legtöbb mikroszkóp alapvető működési elve, hogy a tárgylemezre homogén, egy pontba (igen kis területre) fókuszált megvilágítás érkezik, mely a mintán keresztülhaladva, vagy visszaverődve, objektíven keresztül, a detektáló objektumban képet alkot. Az egyenletes fénysűrűségért egy kondenzor felel. A tárgyasztal vagy a tárgylemez mozgatható, hogy a minta egészét tudjuk felmérni. A fókuszszík magasságának állításával élesíthetjük a képet, illetve a minta rétegeit vizsgálhatjuk. A nagyításon, ami az alapvető célunk a mikroszkópos vizsgálatoknál, a különböző objektívek megválasztásával tudunk állítani. A képet irányíthatjuk

szemünkbe, fényképezőgépbe, egyéb digitális képfeldolgozóba. A képalkotást egy vizsgálat során a megvilágítás és a fókusz beállítása befolyásolja legjobban. A maximális közeli kontraszt elérése lényeges, ez az egymás mellett lévő különböző fényintenzitású pontok intenzitásbeli különbségének növelését jelenti, így jobban elkülöníthetők lesznek (Lovas, 1984).

Az egyes szövet-, illetve sejtkomponensek eredetileg csekély fénytörés különbségeit meg kell növelni a preparátumban, hogy az egyes alkotórészek jól felismerhetők, egymástól elkülöníthetők legyenek. Ezt a célt a fénymikroszkópiában különböző színű festékekkel érik el. A fénymikroszkópos festés elvi alapja az, hogy a különböző színű vegyületek meghatározott sejt-, illetve szövetkomponensekhez kötődnek.

5.19. Fixálás

A mikroszkopizáláshoz szükség volt a vizsgált szövettájak rögzítésére és jelölésére, ez a fixálás. A -20°C-os hűtőben tárolt mintákat óvatosan óraüvegre helyezzük, MilliQ vízben áztatjuk 5-10 percig. Ezt követően 40%-os glutáraldehid oldatba helyezzük 1 percre, majd MilliQ vízben öblítjük egy másik óraüvegen, később tárgylemezre helyezzük egy csepp 60%-os glicerolban.

5.20. Szudán festés

A krioszekcionált és fixált metszeteket azonnal MilliQ vízbe helyeztük, majd óraüvegben a Szudán IV festékben állni hagytuk szobahőmérsékleten 10 percig. Először 50%-os izopropil-alkoholban, majd MilliQ vízben mostuk. A metszeteket tárgylemezre helyeztük egy MilliQ cseppben. A fedőlemez széleit körömlakkal fedtük le. A lemezeket a lakk száradása után azonnal megvizsgáltuk egy Leitz Labovert mikroszkóppal. A metszeteket 10x és 20x nagyításban vizsgáltuk és egy Olympus E-450 fényképezőgéppel képeket készítettünk róluk. A Quickphoto camera 2.3 program segítségével dolgoztuk fel a képeket.

5.21. Konfokális mikroszkópia

A konfokális mikroszkóp fluoreszcensen jelölt minták vizsgálatára alkalmas. A mikroszkóp önmagában nem képes képalkotásra, pontonként mér fényintenzitást, és ebből rakja össze a képet egy számítógép. A mintáknak nemcsak a felszínén képes mérni, hanem belső pontjaiban is, pár száz mikrométeres vastagságig. Így tetszőleges szeleteket választhatunk ki a mintából, vagy akár háromdimenziós képet is alkothatunk.

A konfokális képalkotás során a detektor csak a fókuszsíkból érkező fényt detektálja. Ennek az oka, hogy a lencséken keresztül érkező fénynyalábokat szűri egy konfokális rés. Így érhető el,

hogy a minta egy kiterjedt felületéről érkező, egymást zavaró, lencsékkel nem egészen szétválasztható jeleket nem kell egyszerre feldolgozni. A hagyományos mikroszkópok viszont egy kiterjedt területet ért megvilágítást detektálnak. Az előbbi esetben képalkotás csak akkor valósul meg, ha a gerjesztő fénnel végigpásztázzuk a vizsgált felület egészét és így állítunk össze képet. Az egymás mellett lévő, de különálló pontok száma határozza meg a képek élességét és felbontását, ez ennél a technológiánál jobb, mint a hagyományos mikroszkópiában. A konfokális mikroszkóp által érzékelt kép nem színt és intenzitást, csupán intenzitást mér. A gerjesztő fény egy monokromatikus fényt adó lézerből érkezik, ennek hatására a fluoreszcens festékek hosszabb hullámhosszú fényt bocsájtanak ki, mint a beérkező fény. A mintáinkat több jelölő festékkel is elláthatjuk, ha az eszközünk több detektorral és szűrővel rendelkezik. A detektálásnál szűrni kell a gerjesztő hullámhosszokat, mert több fluoreszcens által kibocsájtott spektrum lefedheti őket. Ez lehetőséget ad a fluoreszcenciák egyidejű és független vizsgálatára. Így olyan szöveteket és szövetrészeket tudunk vizsgálni amiket egyszerre több fluoreszcens alkalmazásával tudunk jól megfigyelni. Zavarhatja azonban a detektálást az, hogy a fluoreszcens válasz nem egy meghatározott hullámhosszon érkezik, hanem a festékekre jellemző spektrumokon. Ezek maximuma közelében érdemes mérni, ekkor a legnagyobb az érzékenység, de figyelniük kell arra, hogy több festék esetén a mért tartományok egybeesése esetén fals, összegződött intenzitás értékeket kapunk. Számunkra a BCE Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszéken lévő Olympus Fluoview FV1000 konfokális lézerpásztázó mikroszkóp esetén két hullámhossz (405 nm, 458 nm) áll rendelkezésre, és ezekkel csak bizonyos kromofórok gerjeszthetőek megfelelően, így nem használhattunk bármilyen fluoreszcens festéket.

A képalkotás során a számítógép és a kezelő program lehetőséget ad zajszűrésre (zavaró, kismértékben előforduló intenzitású pontok intenzitásának módosítása), kontrasztváltoztatásra, jelerősítésre, stb. Az észlelt jelet bármely szín árnyalataiként megjeleníthetjük, sőt az árnyalatoknak megfelelően színskálákat is bevezethetünk a jobb szemléltetés érdekében. A korábban említett pásztázást a féligáttetsző, pár száz mikrométeres metszetek esetén a minta „teljes térfogatában” elvégezhető, a mikroszkóp felbontási keretein belül. E technika segítségével háromdimenziós testként tudjuk rekonstruálni a mintát és a testnek bármely általunk vett síkkal való metszetét, mint képet elemezhetjük.

Két festéket alkalmaztunk vizsgálataink során. A Calcofluor White M2R a cellulóz tartalmú szöveti részeket festi, ez főként a sejtfalakra jellemző. Gerjesztése 405 nm-en történt, emissziója 415-448 nm közötti. Az Auramin O, a kutikulát festi, 458 nm-es hullámhosszú fénnel gerjesztettük. Emissziója 491-563 nm tartományú (Buda *et al.*, 2009).

5.22. Auramin O festés

A fixált 10 µm-es metszeteket 15 percig sötétben áztatattuk Auramin O oldatban tárgylemezen. Ezután MilliQ desztillált vízzel mostuk. 60%-os glicerol oldatot adtunk hozzá, fedőlemezzel lefedtük, majd körömlakkal rögzítettük légmentesen a fedőlemezt a tárgylemezen. Mikroszkópizálás előtt megszárítottuk és meggyőződünk róla, hogy nem mozognak vagy eresztenek-e a minták.

5.23. Calcofluor White festés

A fixált 10 µm-es metszeteket 5 percig sötétben áztatattuk Calcofluor oldatban tárgylemezen. Ezután MilliQ-val mostuk. 60%-os glicerol oldatot adtunk hozzá, fedőlemezzel lefedtük, majd körömlakkal rögzítettük légmentesen a fedőlemezt a tárgylemezen. Mikroszkópizálás előtt megszárítottuk és meggyőződünk róla, hogy nem mozognak vagy eresztenek a minták. Ha mindkét festéket használtuk, akkor a 60%-os glicerol oldat hozzáadása előtt végeztük el a festéseket egymás után, a Calcofluort követően az Auramin O-t.

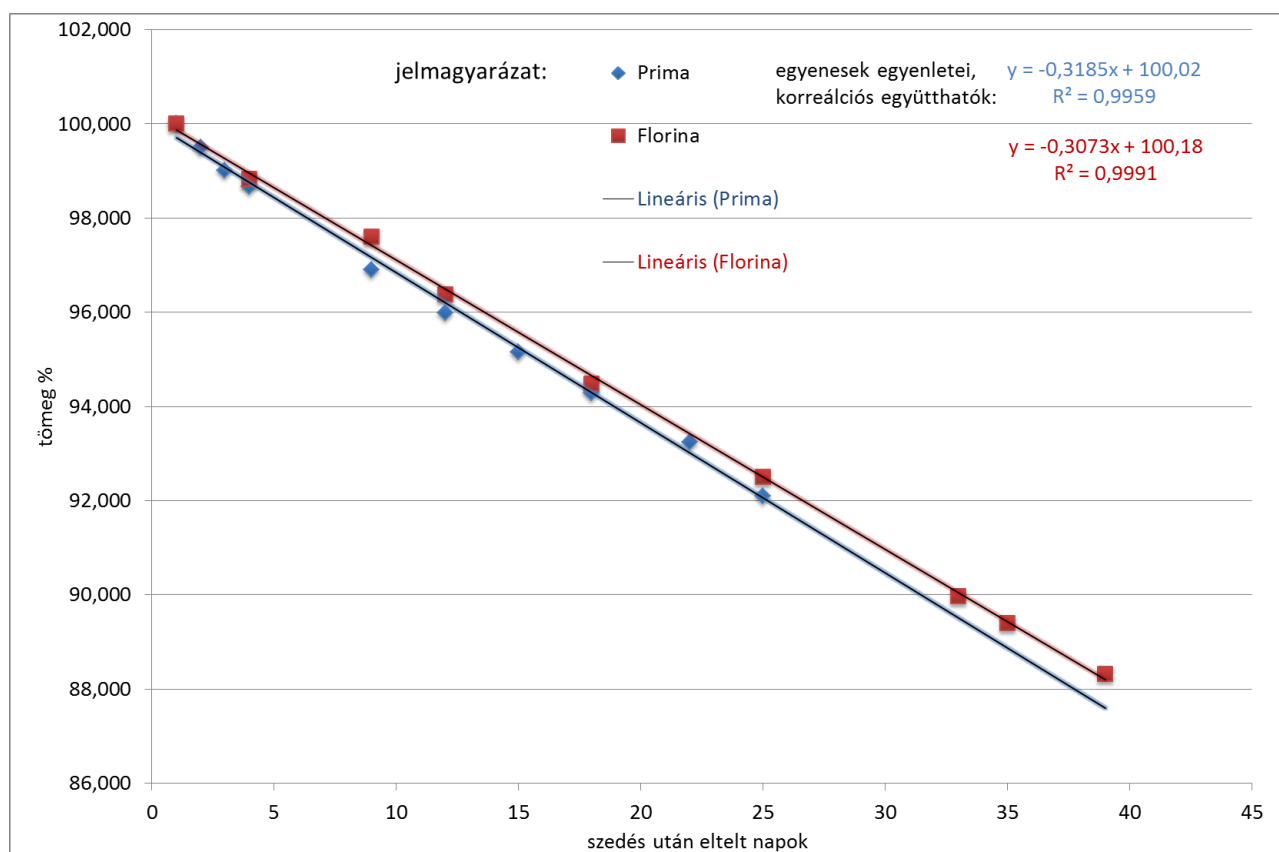
6. EREDMÉNYEK

6.1. Vízvesztés

A vízvesztéses vizsgálatainknál mindkét fajtát 100%-os érettségben vizsgáltuk. A 'Prima' fajta vízvesztését 2011.08.22-én kezdtük el mérni. Húsz darab áltermést vizsgáltunk. Először meghatároztuk a felszínük nagyságát három különböző átmérőjük segítségével. Ezután lemértük a tömegüket, kezdetben naponta, majd a nem túl jelentős csökkenések miatt később csak 3 naponta. A 'Florina' fajtát 2011.09.16-án vontuk be, huszonnyolc mintával. Ugyanígy jártunk el, azonban a tömegméréseket csak 3-6 naponta végeztük. Az áltermések szobai körülmények között, egy tálcán voltak. Pár darab a tárolás során egy-egy foltban rohadni kezdett (fogyasztásra alkalmatlanná vált), ezeket a lehető leggyorsabban eltávolítottuk, hogy ne rontsák az állomány állapotát.

A kezdeti tömegeket 100%-nak vettük, és ehhez viszonyítva százalékban adtuk meg a csökkenéseket. A mérési eredményeket fajtánként átlagoltuk, majd pontonként ábrázoltuk. Mindkét mintacsoport csökkenő tendenciát mutatott. Regressziós egyenest illesztettünk rájuk a Microsoft Excel 2010 programmal, melyben az kiértékelést végeztük. Legjobb közelítő görbét, és a legnagyobb R^2 értékeket egyenes esetén kaptuk. A 'Prima' egyenesének adatai: $y = -0,3185x + 100,2$, korrelációs együtthatója: $R^2 = 0,9959$. A Florinára vonatkozó eredmények: $y = -0,3073x + 100,18$, $R^2 = 9991$. Az egyenesek indulási értékeit a 100%-nak tekintettük. A 'Prima' trendvonala meredekebb, mert egyenletében az „x” együtthatója 112 tízezreddel, azaz több mint 1 századdal

nagyobb. A regressziós egyenesek és a Microsoft Excel programmal számolt eredményeink a 3. ábrán láthatóak.

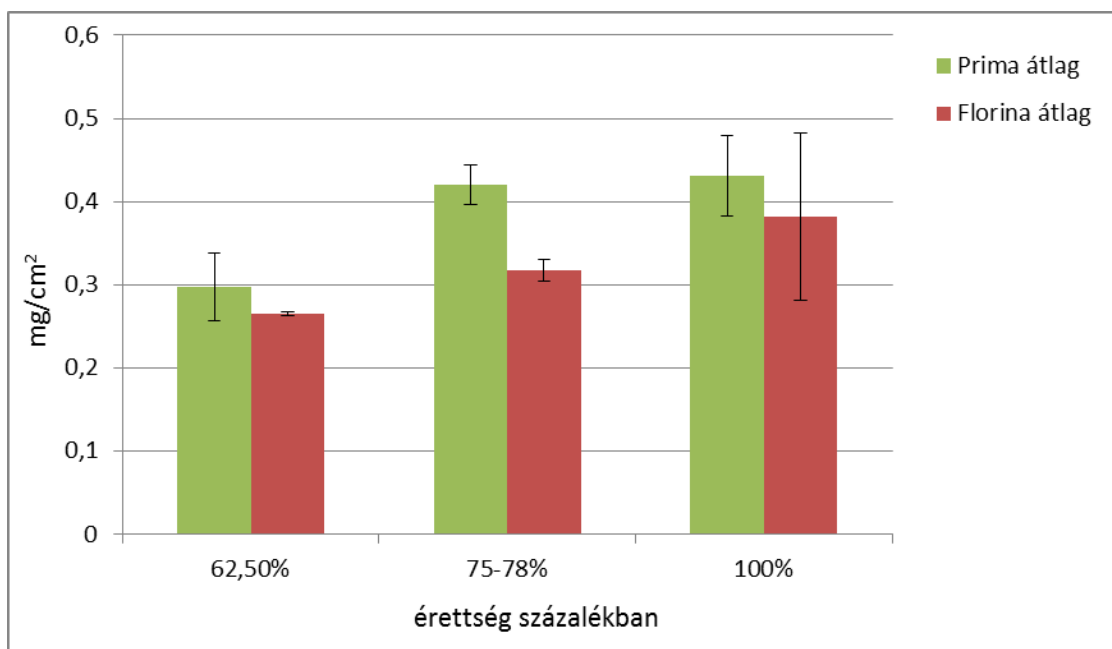


3. ábra. A vízvesztések százalékos ábrázolása mérésenként és a rájuk illesztett regressziós egyenesek. Kékkel a 'Prima', pirossal a 'Florina' adatai.

6.2. Viaszleoldások

A viasztömeg meghatározásokat három érettségi fázisban végeztük mindkét fajta esetén. Először 62%, másodszor 76-80%, végül 100%-os érettségben. Két fajtánk eltérő hosszúságú éréséből adódóan különböző időpontokban kellett mintát gyűjtenünk. A mintavételek időpontjai 'Prima' ültetvényben: VII. 5. VII. 21, VII. 20. 'Florina' fajtánál: VII. 20., VII. 20., IX. 15. A gyűjtés során három, hat-hét darabos csoportokat szedtünk és ezeket oldottuk külön lombikba. Így minden mérés során fajtánként három viasztömeg mérésre volt lehetőségünk. Ezeket az eredményeket abszolút módon nem tudjuk egymáshoz viszonyítani, csak felületegységre vonatkoztatva állíthatjuk valamelyik almáról, hogy ebben az évjáratban melyik fajta termelt több viaszt. Ezért minden leoldás előtt kiszámoltuk a korábbiakban említett módon az almák felszínét. A bepárlás után kiszámoltuk a csoportok felületegységre jutott viasztömegét, ezek szórását és átlagoltuk őket. A leoldott viaszok mennyisége felületegységre vonatkoztatva, időrendben egymás után: 'Prima': 0,3418 mg/cm², 0,4201 mg/cm², 0,4308 mg/cm²; 'Florina': 0,2667 mg/cm², 0,3178

mg/cm², 0,3816 mg/cm². Ezeket az értékeket és a szemléltető oszlopdiagramokat szórásokkal kiegészítve az 4. ábra mutatja.

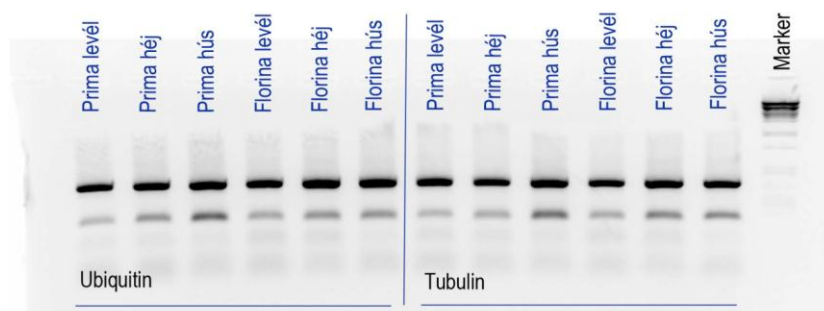


4. ábra. Oszlopdiagram a négyzetcentiméternyi felületegységre jutó viasztömegekről, a minták szórásával feltüntetve. A három oszlopcsoport, a három érettségi fázisban gyűjtött átermések külön értékelt eredményeit mutatja.

Összegezve azt mondhatjuk, hogy minden érettségi fázisban a 'Prima' fajta termelt több viaszkomponenst.

6.3. RNS izolálás

Az RNS izolálás után, mértem a nukleinsav mintáink koncentrációját NanoDrop készülékkel. A cDNS szintézis esetén tartalmaznak az oldatok szabad nukleotidokat. Transzmissziójuk és emissziójuk nagyjából egyezik polimerjeikkel, ezért méréseink pontosságát nagyban befolyásolják. Ezért kellett a végső, kiegyenlítettnek tekinthető koncentráció beállításához agaróz-gélelektroforézist alkalmaznom. A legutolsó mérés során a legalacsonyabb koncentrációhoz igazítottam minden szövettáj cDNS koncentráció értékeit. Ezt hagyományos PCR után gélképen ellenőriztük, majd korrigáltuk, az anyag és módszer fejezetben említett Ubiquitin és Tubulin intronmentes housekeeping gének kifejeződésének vizsgálatával. A javított és véglegesített koncentrációval végzett kimutatási folyamat eredményét az 5. ábra mutatja.



5. ábra. A koncentráció kiegyenlítés ellenőrzése végett végzett PCR DNS amplifikátumainak képe agaróz-gélelektroforézissel láthatóvá téve.

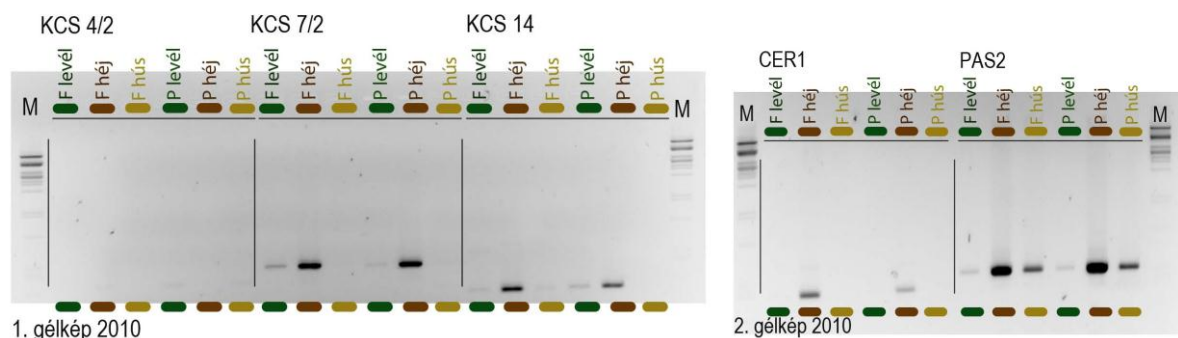
A megjelenő sávok egyazon terméktartományban vannak és megközelítőleg ugyanakkorák, ez alapján kijelenthetjük, hogy a kiindulási cDNS koncentrációk is közel azonosak.

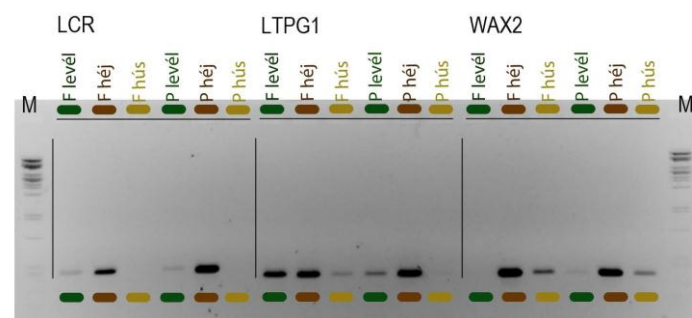
A tavalyi, 2010-es mintákkal végzett mérések alapanyagát szolgáltató cDNS-ek előállítását és koncentráció kiegyenlítését Albert Zsolt és Molnár Attila végezték. Ezen eredményeit, valamint a VLCFA szintézis korábbi, kiindulási lépéseit elemző 2010-es TDK dolgozatában tárgyalja. (Albert Zsolt, személyes közlés).

6.4. Hagyományos polimeráz láncreakció során kapott eredmények

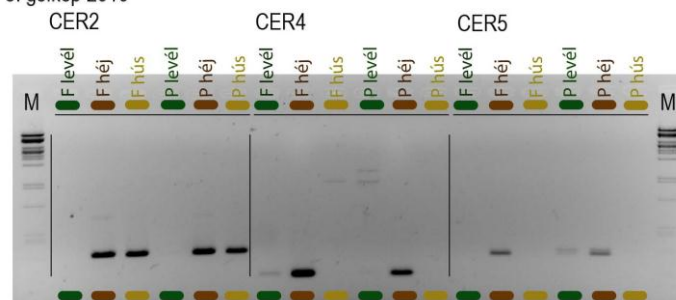
Vizsgálataimat az utóbbi két évben (a tavalyi év 2010., és az idei 2011.) előállított cDNS-kel végeztem el. Az eredményeket képek formájában és szöveges is bemutatom.

A 6. és 7. ábrákon találhatóak a 2010-es és 2011-es évi mintákkal végzett reakciók végeredményei láthatóak. A géleken génenként, hatosával csoportosítottam a mintákat. A géntermékek eredetének sorrendje minden esetben ugyanaz: 'Florina' levél, 'Florina' héj, 'Florina' hús, 'Prima' levél, 'Prima' héj, 'Prima' hús. A képekhez utólag hozzáadott színes jelölések a szövettájakat, a fekete „M” betűk, pedig a molekulák hosszúságának becsléséhez használt, restriktóisan emésztett λ -fág molekulasúly-markereket jelölik. Továbbá feltüntettem a keresett gének neveit, a gélképek számát és minták évjáratát.

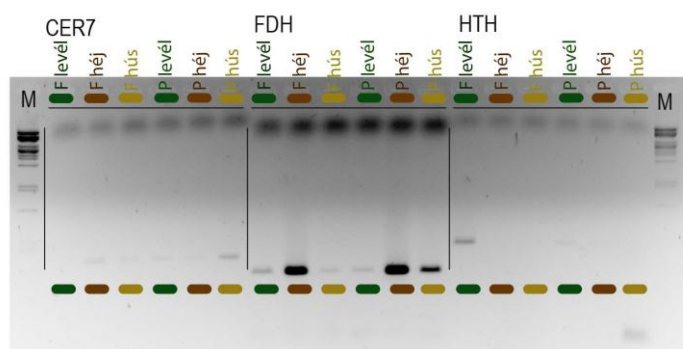




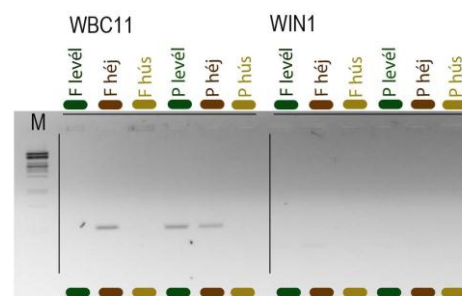
3. gélkép 2010



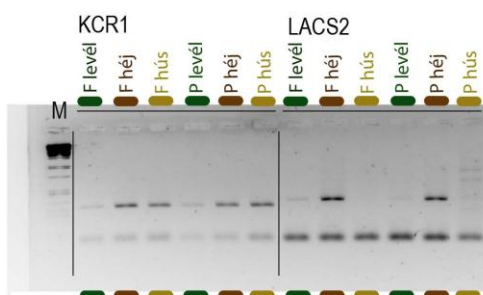
4. gélkép 2010



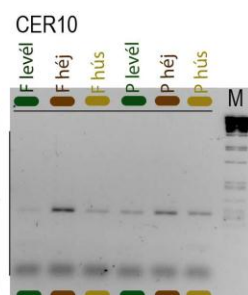
5. gélkép 2010



6. gélkép 2010



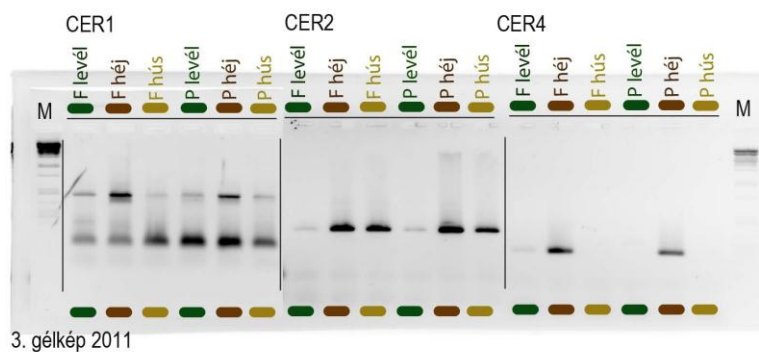
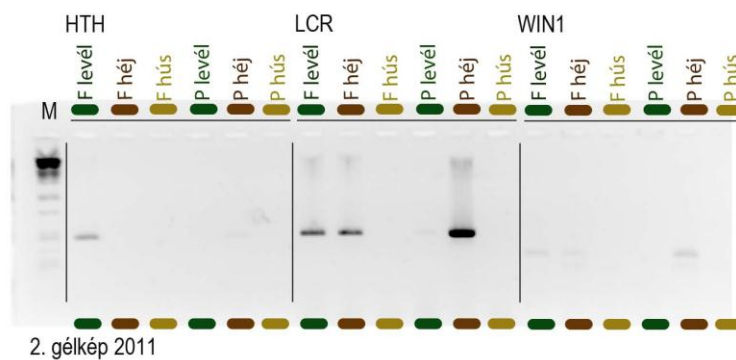
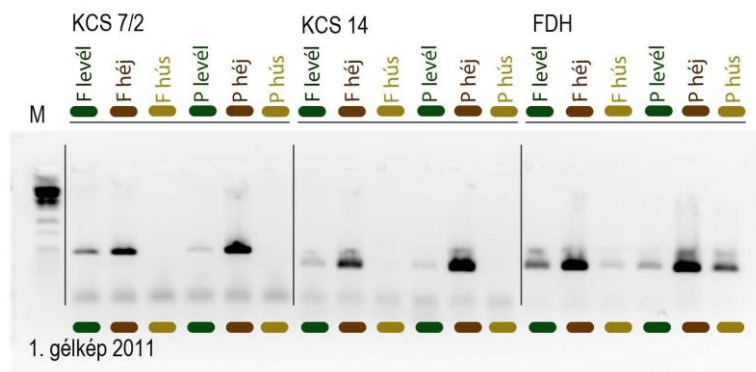
7. gélkép 2010

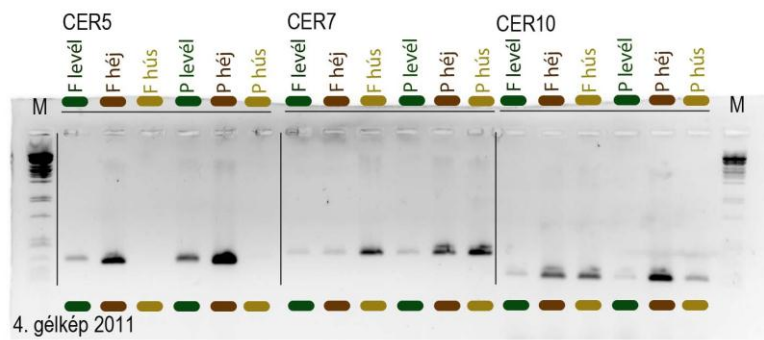


8. gélkép 2010

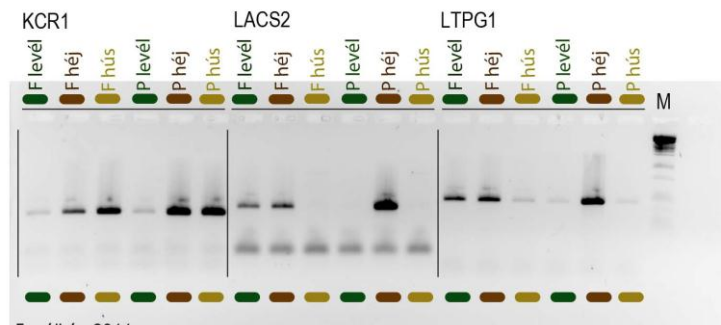
6. ábra. A 2010-es hagyományos PCR eljárásaink után agaróz-gélektroforézissel szétválasztott, ethidiumbromiddal jelölt mintáink, UV fényvel gerjesztett fényképei. Színkóddal és rövidítésekkel a szövettájak jelölései szerepelnek fajtánként. „P” a 'Prima' fajtát, „F” pedig a 'Florina' fajtát jelenti. Vonalakkal hatos csoportokra tagolt gélképek fölött a vizsgált gének nevei vannak feltüntetve.

A gélekpeken hatosával csoportosított gének primerei minden szövettájon ugyanakkora méretű termékeket hoznak fel, ha van az adott szövettájban az expresszió „eredményeként” templát. Ha mindkét fajtánál ugyanolyan erősségű sávokat látunk ugyanazon oszlopokban, akkor az adott gén nem mutat fajtaspecifikus kifejeződést, ellenkező esetben igen. Ugyanezt az összehasonlítást megtehetjük az évjáratokkal is. Ha egy gén az egyik, vagy akár mindkét fajtánál ugyanolyan mértékben fejeződik ki ugyanazoknál a szövettájaknál mindkét évben, akkor azt mondhatjuk, hogy az adott gén expressziója nem évjárat függő.

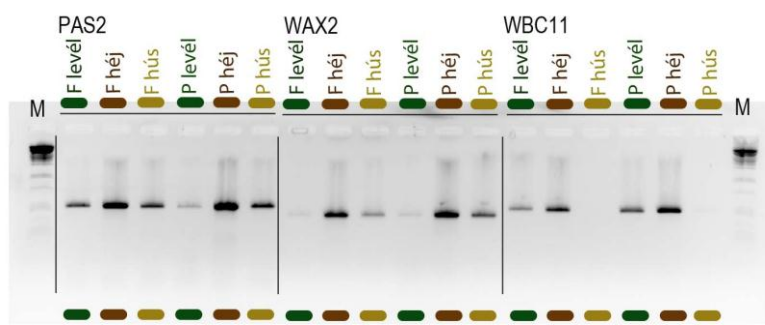




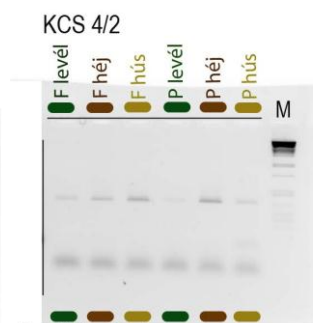
4. gélkép 2011



5. gélkép 2011



6. gélkép 2011



7. gélkép 2011

7. ábra. A 2010-es hagyományos PCR eljárásaink után agaróz-gélektroforézissel szétválasztott, ethidiumbromiddal jelölt mintáink, UV fényen gerjesztett fényképei. Színkóddal és rövidítésekkel a szövettíjak jelölései szerepelnek fajtánként. „P” a 'Prima' fajtát jelenti, „F” pedig a 'Florinát'. Vonalakkal hatos csoportokra tagolt gélképek fölött a vizsgált gének nevei vannak feltüntetve.

A képeken szürke-fekete sávként jelennek meg a felszaporított DNS-ek. Minél sötétebb és vastagabb egy jel, annál több molekulát jelöl. Ezekből nem vonhatunk le pontos számbeli következtetést, csupán azt, hogy a reakció elején, a normalizált mintákban melyik gén termékei voltak nagyobb koncentrációban. Ha nincsen jel, akkor feltételezhetjük, hogy nem volt, vagy csupán igen csekély mennyiségben a keresett RNS az adott szövettíjban. A jelintenzitás további következtetések levonására ad lehetőséget. Mint azt említettem, ugyan ez nem tekinthető kvantitatív módszernek, de az eredmény alkalmas arra, hogy az expresszió-beli jelentős különbségeket kimondhassunk. A sávok megjelenését három csoportba osztottam: gyenge, közepes, és erős

intenzitású jel. Ezen szintek között teszünk különbséget. Az így megállapított eredményeket a III. és IV. táblázatba foglaltam, szövegesen a továbbiakban tárgyalom.

2010	FLORINA				PRIMA			
GÉN	nincs	gyenge	közepes	erős	nincs	gyenge	közepes	erős
KCS 4/2	mind				mind			
KCS 7/2	hús	levél	héj		levél, hús		héj	
KCS 14	levél, hús	héj			levél, hús	héj		
FDH	hús	levél		héj	levél	hús		héj
HTH	héj, hús	levél			mind			
LCR	levél	hús	héj		levél	hús		héj
WIN1	mind				mind			
CER1	levél, hús	héj			levél, hús	héj		
CER2	levél		héj, hús		levél		héj, hús	
CER4	levél, hús			héj	levél, hús		héj	
CER5	levél, hús	héj			levél, hús	héj		
CER7	mind				levél, héj	hús		
CER10		levél, hús	héj		levél	héj, hús		
KCR1		levél	héj, hús			levél	héj, hús	
LACS2	hús	levél	héj		levél, hús		héj	
LTPG1		hús		levél, héj	hús	levél		héj
PAS2	levél		hús	héj	levél		hús	héj
WAX2	levél	hús		héj	levél	hús		héj
WBC11	levél, hús	héj			hús	levél, héj		

III. táblázat. A 2010-es mintákból készített PCR-ek szemikvantitatív értékelése táblázatba foglalva. A bal oldali oszlopban a gének nevei szerepelnek. 'Prima' és a 'Florina' fajtákra bontva négy expressziós kategóriába sorolva találhatóak a vizsgált szövettípusok nevei.

2011	FLORINA				PRIMA			
GÉN	nincs	gyenge	közepes	erős	nincs	gyenge	közepes	erős
KCS 4/2		mind			levél	héj, hús		
KCS 7/2	hús	levél	héj		hús	levél		héj
KCS 14	hús	levél	héj		hús	levél		héj
FDH		hús	levél	héj		levél	hús	héj
HTH	héj, hús	levél			mind			
LCR	hús	levél, héj			levél, hús			héj
WIN1	mind				mind			
CER1		levél, héj	hús			levél, hús	héj	
CER2		levél		héj, hús		levél		héj, hús
CER4	levél, hús		héj		levél, hús		héj	
CER5	hús	levél	héj		hús	levél		héj
CER7		levél, héj	hús			levél	héj, hús	
CER10		levél	héj, hús		levél	hús		héj
KCR1		levél, héj	hús		levél			héj, hús
LACS2	hús	levél	héj		hús, levél			héj
LTPG1		hús	levél, héj		levél, hús			héj
PAS2		levél	hús	héj		levél	hús	héj
WAX2	levél	hús	héj		levél	hús	héj	
WBC11	hús	levél	héj		hús	levél	héj	

IV. táblázat. A 2010-es mintákból készített PCR-ek szemikvantitatív értékelése táblázatba foglalva. A bal oldali oszlopban a gének nevei szerepelnek. 'Prima' és a 'Florina' fajtákra bontva négy expressziós kategóriába sorolva találhatóak a vizsgált szövettájak nevei.

KCS 4/2 A 2010-es gélkép alapján nincsen géntermék egyik fajtánál sem. 2011-ben a 'Florina' és a 'Prima' minden vizsgált szövettája mutat gyenge expressziót. Ez ugyan nem erős évjáratbeli különbség, de az mindenképpen elmondható, hogy az ismétlés segítette kimutatni a gén jelenlétét.

KCS 7/2 Mindkét évjáratban látható szöveti specifitás. A hús szövettájánál semelyik év mintáinál sem ad jelet. A tavalyi évben a két héj szövettájánál közel azonos mértékű a kifejeződés. Gyenge jelet látunk 'Florina' levélnél. Idén 'Florina' levél és héj oszlopokban gyenge és közepes a sáv, 'Prima' héj szövettájánál erős a jel.

KCS 14 Azonosnak tekinthető az eredmény 2010-ben mindkét fajtánál, csak a héj szövettájak oszlopai mutatnak gyenge jelet. A hús szövettájak 2011-ben továbbra sem mutatnak semmit. A héj szövettájak sávjai erősödtek, 'Florina'-nál közepes, 'Prima'-nál erős, így ebben az évjáratban ez különbségnek mondható. A levelek azonos, gyenge intenzitásúak, az előzőekkel együtt, ez évjáratok közötti különbség.

FDH 2010-ben mindkét héj szövettáj erős expressziót mutat. A hús szövettáj 'Florina'-nál nem ad jelet, a 'Prima' gyengét. Leveleknél fordítva, a 'Florina' levél oszlopa csekély intenzitásra utal, a 'Prima'-é nem aktív. 2011-ben a héjszövetek erős expressziót mutatnak. 'Florina' levélnél közepes, hús szövettájánál gyenge intenzitású a jel, 'Prima' esetén fordítva. Összességében azt mondhatjuk, hogy mindkét évben a héjban fokozott az aktivitás, a többi szövettáj nagy szórást mutat.

HTH Mindkét évben csak a 'Florina' levélnél detektálható alacsony intenzitású jel, sőt 2011-ben szinte üresnek mondható a gél.

LCR Nem mondható el, hogy komoly különbség lenne a két évjárat között. 'Prima' héj szövettájánál erős expresszió, 'Florina' levél és héj szövettájánál gyenge, azonban 2010-ben a levél oszlopban sincsen, csak éppen észlelhető jel.

WIN1 Ennél az egy általunk vizsgált génnél mondható el, hogy nem látni sehol sem DNS-t, a gélek üresek.

CER1 2010-ben mindkét héj szövettájánál gyenge kifejeződési szint. 2011-ben a két fajtánál egyformának tekinthető jelsorozat, levél és hús szövettáj gyengén fluoreszkál, a héj szövetei közepesen. 2011-ben minden szövettáj aktív, és a korábban működő héj szövettájak is intenzívebbek.

CER2 2010-es évjáratban a két fajta azonos intenzitást mutat szövetenként. A héj és hús oszlopokban közepes jelek szerepelnek, a levélnél nincsen termék. 2011-ben sincs különbség a fajták között, a levél gyenge, a héj és a hús szövettájuk erős expressziós szintet mutatnak. A különbség a két évjárat között a héj és hús szövettájuk együttes intenzitás növekedése, és a levelekben expresszió megjelenése 2011-ben.

CER4 Kevés különbség észlelhető a két évjárat között, 2010-ben a 'Florina' héj oszlopban közepes jel látható, az összes többi héj szövettáj gyenge, ezeket kivéve nincsen jel.

CER5 2010-ben csak héj szövettájánál látható mindkét fajtánál vékony sáv. A 2011-es évjáratban 'Florina' levélnél gyenge, héj szövettájánál közepes erősségű jel. 'Prima' levélnél szintén gyenge, héj szövettájánál erős jel. Héj szövettájában kimutatható a gén működése, az átermés húsában nem, a levelekben eltérés van az évjáratok között.

CER7 2010-ben csak a 'Prima' hús szövettája volt gyengén aktív. 2011-ben 'Florina' levél és héj szövettáj oszlopában felismerhető gyenge sáv, hús szövettájánál pedig közepes erősségű. A 'Prima' szövettájuk közül, a levél gyenge kifejeződése mellett a héj és a hús oszlopok adnak közepes jelet.

CER10 A 2010-es évben mindkét fajta héj szövetei közepes, a levél és hússzövetek alacsony jelet adnak. 2011-ben eltérő kifejeződést mutat a két fajta. 'Florina' levél oszlopban vékony a nukleinsavak sávja, héj és hús szövettájuknál köztes méretű. 'Prima' levélben nem mutattunk ki terméket, hús szövettájánál keveset, héj szövettájánál pedig sokat. Érdekes módon 2010-es évben nem látszik jelentős különbség a fajták között, 2011-ben viszont egyik szövet expressziós szintje sem egyezik.

KCR1 A korábbi évjáratban azonos aktivitást mutatnak a fajták szövettájai. A levelek gyengét, a hús és héj szövettájuk közepeset. 2011-ben a 'Florina' levelei és héj szövettájai a 'Prima' leveleivel együtt alacsony szinten expresszálódnak. Továbbá a 'Florina' átermésének húsában közepes aktivitás, 'Prima' héj és hús szövettájaiban erős a gén termékeinek jelenléte. A gén kifejeződése 2010-ben hasonló a két fajtában, a rákövetkező évben eltérőek a fajták eredményei.

LTPG1 2010-ben 'Florina' levél és héj szövettájánál erős kifejeződés látható, hús szövettájánál pedig gyenge. A 'Prima' héj oszlopában szintén erős a jel, levélnél gyenge, a hús szövettáj nem mutat aktivitást. A 2011-es évjáratban 'Florina' levél és héj szövetek egyaránt közepes kifejeződési szintbe sorolhatóak, a hús szövetek pedig alacsonyabba. A 'Prima' levele szintén alacsony intenzitást jelöl, a héj szövettáj igen magasat. A hús szövettájánál viszont nem észlelni sávot. 'Florina' esetén egy kategóriát csökkent a jelintenzitás, a hús szövettáj kivételével, ami nem változott. Ennek a génnek az aktivitása 'Prima' levelében 2011-ben alacsony alá csökkent.

PAS2 2010-ben a két fajta azonosan erős héj szövettáji aktivitást, közepes hús szövettájit és nem detektálható aktivitást mutat a levelekben. A 2011-es évjáratban hasonlóak az eredmények, a levelekben tapasztalt gyenge expressziót kivéve.

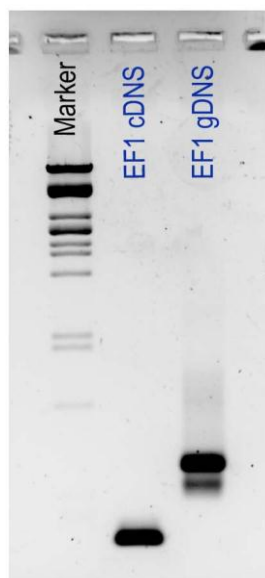
WAX2 A 2010-es évjáratban 'Prima'-ban és 'Florina'-ban is erős héj szövettáji és gyenge hús szövettáji expresszió volt. A levelekben nem látható amplifikátum. 2011-ben a levelekben szintén nem látható termék, a hússzövetekben gyenge, a héjszövetekben pedig közepes működés mutat a gén.

WBC11 A 2010-es évben éppen észlelhető jelek láthatóak 'Florina' héj, 'Prima' levél és héj oszlopokban. A 2011-es minták között a két héj szövettáj közepes, a levelek gyenge, a hús szövettájak pedig nem mutatnak aktivitást.

LACS2 A 2010-es évjáratban mindkét héj szövettáj közepes aktivitású, 'Florina'-nál látható még alacsony kifejeződés a levelekben. 2011-ben 'Florina' levelekben és héj szövettájakban látható jeleket közepes kategóriába sorolom. 'Prima' héj szövettájban erős az aktivitás, a nem említett mintáknál viszont nem látható DNS. Az egyetlen különbség a 'Florina' fajta levelek aktivitásának detektálási szint alá csökkenése 2011-ben.

6.5. Genomi DNS izolálás és gDNS ellenőrzés

Ezt a két módszer a hagyományos PCR termékek és a szelektív primerek ellenőrzésére alkalmaztuk. A teljes genomi DNS izolálás eredménye a cDNS-sekkel ellentétben intront tartalmazó DNS sokaság. Az általunk tervezett primerek intronmentes régiókra tapadnak be, emiatt működniük kell RNS és DNS kivonás esetén is. Azok a gének, amelyek tartalmazznak intront, hosszabb másolatok készülnek a PCR folyamán, ha a primerek közrefognak kivágódó szakaszokat. Ha összehasonlítjuk az RNS izolálás után elállított cDNS-ről készült másolatok méretét a genomi DNS-ek ugyanazon primerrel készült termékeivel, akkor a gDNS-nek az intronok hosszával többnek kell lenniük. Az erre vonatkozó eredményeinket az alábbi 8. ábra tartalmazza.



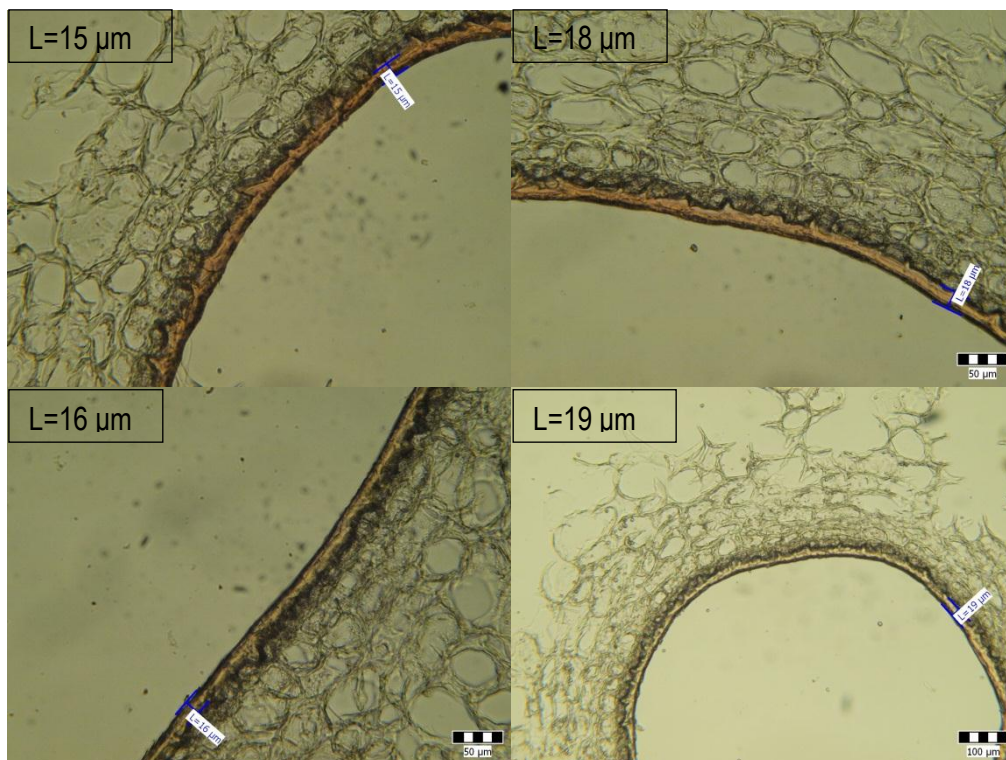
8. ábra. Az intront tartalmazó EF1 gén amplifikátumai cDNS és gDNS templátokkal.

6.6. Szekvenáltatás

A fragmensek azonosságának ellenőrzésére minden gén esetében egy PCR terméket gélből izoláltunk, és szekvenálásra küldtünk. A Biomi cégtől kapott, PCR termékeinkről készült szekvencia analízisek eredményei egyeznek az általunk választott gének EST adatbázisbeli bázis sorrendjével.

6.7. Fénymikroszkópos megfigyelések

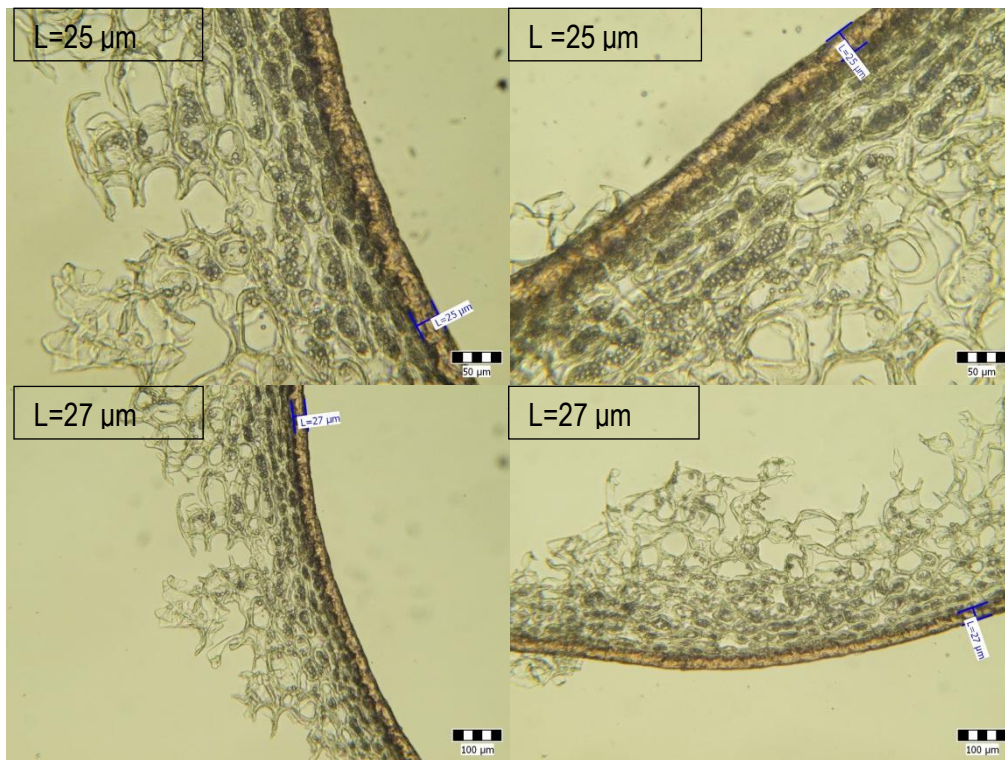
Fénymikroszkóppal ellenőriztem az RNS kivonásnál feldolgozott epidermisz hús szövettájjal való szennyezettségét. A metszeteket szikével készítettem az izolálás során, ahogyan az almákat hámoztam. A vizsgálat szerint héj mintáink az epidermisz sejtrétegét és az alatta található 6-10 parenchimális sejtsort tartalmazta. A konfokális mikroszkóp megelőző vizsgálataiként Szudán IV-gyel festettem fagyasztva metszett mintákat, hogy a kutikula vastagságát többféle módszerrel meg tudjuk határozni. Úgy véltem, hogy az általam használt konfokális képalkotás során az esetleges hibák, illetve képek értelmezésében segít ez a módszer.



9. ábra. 'Prima' átermés fénymikroszkópos képei Szudán IV-festékkel festve.

A 9. ábra négy képe közül a felső kettőn nagyobb, az alsó kettőn pedig kisebb nagyításban láthatóak a 'Prima' átermésrészletek. A 10. ábrán hasonló módon a 'Florina' fajta szerepel. A képekhez Quickphoto camera 2.3 program segítségével méretarányos vonalzókat adtunk hozzá, és megmértük a kutikula vastagságát. A vastagságok átlaga 'Prima' esetében 17,9 mikrométer, szórás 2,1. A 'Florina' értékei: 24,2 mikrométeres átlag, ami 2,3 szórással jellemezhető. Eredményeink ellenőrzésére egytényezős varianciaanalízist végeztünk, mellyel megerősítést nyert, hogy szignifikáns különbséget fedeztünk fel a két fajta kutikulájának vastagságában.

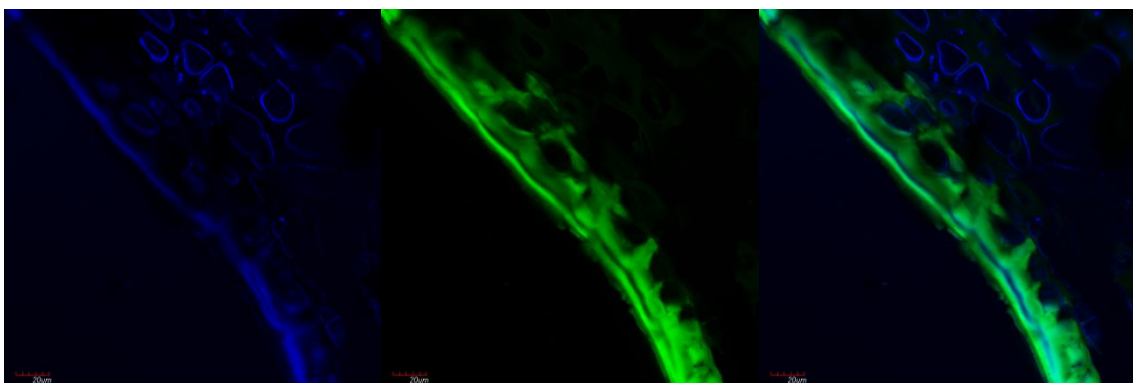
A Szudán által festett területek vörös színűek. A festésről elmondható, hogy szelektíven a kutikulát festette és használatával könnyebb a képlet fénymikroszkópos megfigyelése. Mindegyik mintán megfigyelhető, hogy a bőrszövet legkülső sejt sorának sejtjei kisebbek mint az átermés belseje felé található sejtek. A cellák nem szabályos gömb vagy téglalap alakúak. Nagy felületen érintkeznek egymással, de a sejtek között vannak üregek. A belsőbb szövetekben a sejtek nem tapadnak olyan erősen egymáshoz, ez a termés érése során, különösen a teljes biológiai érettséghez közeledve egyre erősödő aktivitású sejtfallazító enzimeknek köszönhető. A húsból a szomszédos sejt falakat egybetartó pektin és hemicellulóz szálak szerkezetét módosító enzimek aktivitása okozza nagyrészt a termések természetes puhulását. A külső sejt sorra jellemző az is, hogy az általuk is termelt kutikula a sejt falak közé, esetenként a külső sejt sor alá is beépül.



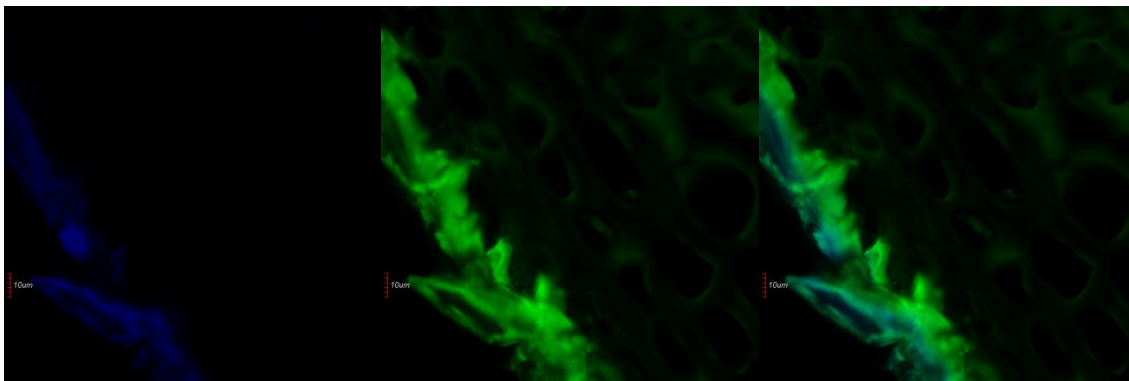
10. ábra. 'Florina' áltermés fénymikroszkópos képei Szudán IV-festéssel festve.

6.8. Konfokális mikroszkópia eredményei

A konfokális mikroszkópnak több előnye is van a fénymikroszkópokkal szemben. Alapvető különbség, hogy jobb a felbontóképessége, fényintenzitást mér és a szövetek mélyét is fel tudja térképezni. Fluoreszcens jelölőfestékek egyidejű és szétválasztható észlelésére is képes. Megfelelően szelektív festékekkel detektálható sejtrészletek térbeli megfigyelése is lehetséges. Az alábbi képeken (11-14. ábrák) fagyasztva metszett héjszöveteket a jelzett festékekkel kezeltem.

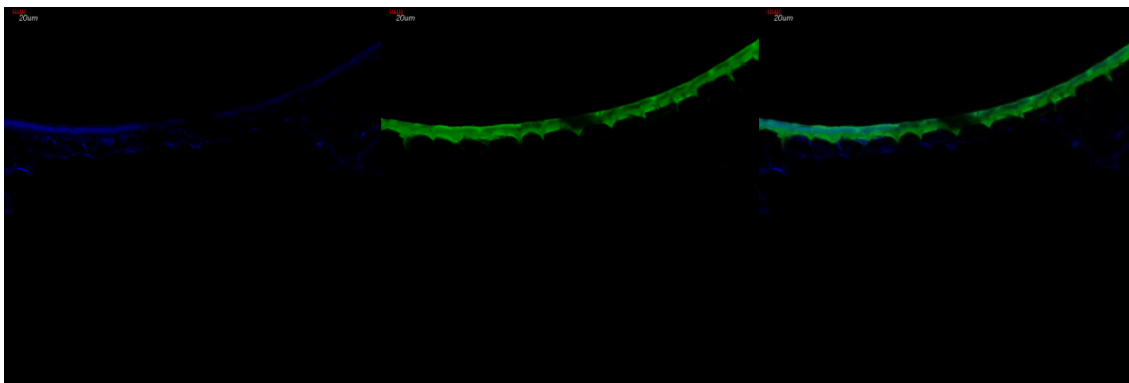


11. ábra: 'Florina' fajta áltermésének fluoreszcens festése Calcofluor White-tal festve (bal oldali kép), Auramin O-val festve (középső kép), egymásrillesztett képek (jobb oldali kép); 20x nagyításban.

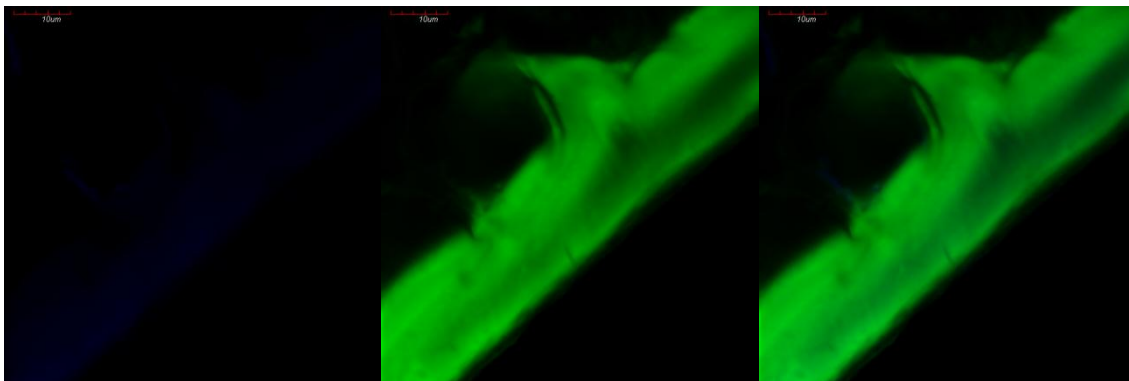


12. ábra: 'Florina' fajta termésének fluoreszcens festése Calcofluor White-tal festve (bal oldali kép), Auramin O-val festve (középső kép), egymásrillesztett képek (jobb oldali kép); 20x nagyításban.

Ahogy azt már leírtam, a Calcofluor White a cellulóz tartalmú szöveteket, az Auramin O pedig a kutikulát festi. Előbbi kék színként, utóbbi zöldként jelenik meg. A sejtek körvonalai Calcofluor festéssel minden esetben látszódtak, ez a sejtfaalak cellulóz tartalma miatt van. Változó mértékben a kutikulában is fellelhető, ami kutikulát alkotó kutin réteg poliszacharid tartalma miatt lehet, ez Florinánál jellemzőbb. Az Auramin O-val kimutatható, hogy az epikutikuláris viaszok és „kutikula anyag” nem csupán az epidermisz sejtek felszínén, hanem azok között is megtalálható. A 12. ábrán egy metszés során felszakadozott héjrészlet is szerepel.



13. ábra: 'Prima' fajta átermésének fluoreszcens festése Calcofluor White-tal festve (bal oldali kép), Auramin O-val festve (középső kép), egymásrillesztett képek (jobb oldali kép); 20x nagyításban.



14. ábra: 'Prima' fajta átermésének fluoreszcens festése Calcofluor White-tal festve (bal oldali kép), Auramin O-val festve (középső kép), egymásrillesztett képek (jobb oldali kép); 20x nagyításban.

A 13. ábra 'Prima' héjszövet képein a Calcofluor által kibocsájtott jel kevésbé intenzív. A 14. ábrán egy nagyobb felbontással készült felvétel látható, melyen a kutikulából kiálló és a kép síkja mögé kanyarodó sejtfal rajzolódik ki. A kutikula vastagságok meghatározásáról elmondható, hogy ugyanazokat a méreteket mértem a fluoreszcens képalkotással is, mint a Szudán IV-el.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

Vízvesztéses vizsgálataim során mért eredményeket a kezdeti értékekhez viszonyítva százalékosan dolgoztam fel, csoportonként átlagoltam őket, és ábrázoltam az eltelt idő függvényében. Lineáris regressziós modellt alkalmazva, közelítő egyeneseket illesztettem a mérési pontjaimra, fajtánként. Ezzel sikerült megállapítanom, hogy a 'Prima' fajta gyorsabban veszít tömegéből, ami megegyezik az előzetes várakozásainkkal. Az eredmény alátámasztja azt az elképzelést, hogy az alma gyümölcsök lassú vízvesztése összefügg a jó tárolhatósággal, mely eredmény megfelel az irodalmi adatok alapján vártaknak, miszerint egy-egy almafajta között a betakarítás utáni vízvesztés mértékében nagy különbségek adódhatnak (Maguire *et al.*, 2001).

A viaszfedettség vizsgálatát érettségi fázisonként elvégeztem, eredményemet szintén átlagoltam, és szórásokkal együtt oszlopdiagramokkal ábrázoltam. Ez alapján kijelenthetjük, hogy a mérési időpontokban a 'Prima' fajta tartalmaz nagyobb mennyiségű leoldható viaszkomponenst felületegységre vonatkoztatva. Azt is megállapíthatjuk azonban, hogy a viaszmenység növekedése bár magasabb értéket ér el végül a 'Prima' esetén, a 'Florina' esetében dinamikusabb. Elképzelhető, hogy a posztharvest időszakban ez a tendencia folytatódik, így a 'Florina' almák hamar nagyobb fedettséget érhetnek el. Korábbi irodalmi adataink arra utalnak, hogy pusztán a kutikula mennyisége vagy vastagsága nincs egyértelmű korrelációban a vízvesztés szabályozásával, a komponensek és a strukturális elemek változása azonban befolyásolható tényezőként jelenhet meg a mi esetünkben is (Riederer és Müller, 2006). A kérdés további, ilyen irányú kísérletekkel dönthető el.

A mikroszkópos vizsgálatok Szudán IV festék alkalmazásával azt mutatják, hogy a 'Florina' kutikula rétege a 100% érettség fázisában jelentősen (6,3 mikrométerrel) vastagabb volt. Ez a teljes 24,2 mikrométeres vastagságot figyelembe véve komoly eltérés. A konfokális mikroszkópia eredménye alátámasztotta a hagyományos mikroszkóppal látottakat. A módszer felbontása révén alkalmat ad a kutikula esetleges szerkezeti különbségeinek vizsgálatára is, ami jelen kísérletsorozat egy lehetséges folytatása lehet, és alátámasztja Buda és munkatársainak korábbi eredményeit a fluoreszcens képalkotás kutikulát érintő alkalmazhatóságáról (Buda *et al.*, 2009).

A génkifejeződés eredményei a viasz bioszintézishez kapcsolható géneknél meggyőzőek. A kísérletbe vont gének nagy részénél ki tudtam mutatni génexpressziót a héjban, továbbá a gének egy része döntő módon a héjban nyilvánult meg mindkét vizsgált fajtában, vagy legalább azok egyikében. (CER1, CER4, WAX2, WBC11, stb. gének homológjai). Az így azonosított szekvenciák jó eséllyel az alma viasz bioszintézisben résztvevő géneknek bizonyulhatnak, számos esetben érdekes vagy a lúdfűhöz képest épp nem várt expressziós mintázatokat kaptunk egy-egy gén esetén, mely további vizsgálatokra adhat okot.

A két fajta gyümölcs héja közötti génexpressziós különbség a *Lacerata* homológ gén esetében egyértelmű volt. Ez a gén mindkét évben a Florina fajta héjában nyilvánult meg erősebben. A különbséget a későbbiekben real-time PCR módszerrel tervezzük igazolni. Későbbi kísérletekben az ilyen fajtaspecifikus génkifejeződési különbségeket összefüggésbe próbáljuk majd hozni a kutin illetve viasz összetétel eltéréseivel a két fajtában.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteimben két almafajta, a nyári 'Prima' és a téli 'Florina' átermések vizsgálatával jellemezni kívántam viaszoltságukat, és annak kapcsolatát a párologtatással, melyről korábban nem rendelkezünk pontos adatokkal.

Vizsgálataimban kimutattam, hogy a 'Prima' gyümölcsén szignifikánsan nagyobb mennyiségű viasz található, mint a 'Florina' áterméseken, bár utóbbi viaszosodása dinamikusabb az érés időszakában.

Vizsgáltam a két fajta gyümölcsének betakarítás utáni párologtatását, melyben jelenlegi ismereteink szerint a kutikulának meghatározó szerepe van. A posztharvest párologtatás tekintetében a 'Prima' fajta bizonyult kevésbé jó vízmegtartónak, ez a fajta nagyobb mennyiségű vizet párologtatott, ami valószínű magyarázatot ad rosszabb tárolhatóságára.

Mikroszkópos megfigyeléseim szerint a kutikularéteg vastagsága a 'Florina' áterméseken volt nagyobb. Ez utóbbiban szerepet kap a kutikula komponensei közül a kutin rétegének vastagsága is, mely fluoreszcens mikroszkópos vizsgálataink alapján a 'Florina' fajtánál volt

kiterjedtebb. A fluoreszcens képalkotás során egyéb eltéréseket is megfigyeltem, így például a kutikula rétegében található lipofil komponenseket, ami további vizsgálatok tárgya lehet.

Emellett arra is kerestem a választ, hogy a növény életében fontos szerepet játszó kutikuláris viaszok bioszintézisében mely gének játszhatnak szerepet. Olyan géneket választottam vizsgálataim alapjául, melyek működése a lúdfű modellnövényben ismert, és a kutikuláris viaszok szintézisétől azok szabályozásán át a folyamatos transzportjáig terjed.

Vizsgálataimat két éven keresztül végeztem, mely alapján elmondható, hogy a kutikuláris viaszok szintézisében feltehetően szerepet játszó, vizsgálatba vont gének többsége jelentős expresszióbeli különbséget mutat az alma héj, hús és levél szövetei között. A gének egy része döntő módon a héjban nyilvánult meg mindkét vizsgált fajtában, vagy legalább azok egyikében. A vizsgált téli alma héjában egy gén (*Lacerata* homológ) kifejeződése mindkét tenyésztéskorban erőteljesebb volt, mint a nyári almáéban.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Lukács Noémi tanszékvezető asszonynak, hogy a Tanszéken lehetőséget biztosított kísérleteim elvégzésére.

Ezúton szeretnék köszönetet nyilvánítani Albert Zsolt PhD. hallgatónak, aki végig irányította és figyelemmel kísérte munkám.

Köszönettel tartozom Dr. Tóth Magdolnának és munkacsoportjának, a rendelkezésünkre bocsátott növényanyagért és tudományos információkért.

Továbbá szeretném megköszönni Dr. Papp István tanár Úrnak értékes tanácsait, észrevételeit és támogatását.

Szeretném megköszönni a Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszék dolgozóinak támogatását és segítségét.

Szeretnék köszönetet mondani családomnak és barátaimnak a lelkes és gondos támogatásért, amivel segítették munkámat.

10. IRODALOMJEGYZÉK

AARTS, M.G.M., KEIJZER, C.J., STIEKEMA, W.J., PEREIRA, A. 1995. Molecular characterization of the CER1 gene of *Arabidopsis* involved epicuticular wax biosynthesis and pollen fertility. The Plant Cell 7. 2115-2127.

ALBERT, ZS., DEÁK, CS., MISKÓ, A., TÓTH, M., PAPP, I. 2011. Development of cDNA normalization system and preliminary transcription analysis of KCS genes in apple tissues. Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis 59(3): 9-12.

- ASIF, M., TRIVEDI, P., SOLOMOS, T., TUCKER, M. 2006. Isolation of High-Quality RNA from Apple (*Malus domestica*) Fruit. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 5227-5229
- BACH, L., MICHAELSON, L.V., HASLAM, R., BELLEC, Y., GISSOT, L., MARION, J., DA COSTA, M., BOUTIN, J.-P., MIQUEL, M., TELLIER, F., DOMERGUE, F., MARKHAM, J.E., BEAUDOIN, F., NAPIER, J.A., FAURE, J.-D. 2008. The very-long-chain hydroxy fatty acyl-CoA dehydratase PASTICCINO2 is essential and limiting for plant development. *PNAS* 105. (38.) 14727-14731.
- BEREND, M., FAZEKAS, Gy. 2001. *Biológia II. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest.*
- BEAUDOIN, F., WU, X., LI, F., HASLAM, R.P., MARKHAM, J.E., ZHENG, H., NAPIER, J.A., KUNST, L. 2009. Functional characterization of the *Arabidopsis* β -ketoacyl-Coenzyme A reductase candidates of the fatty acid elongase. *Plant Physiology* 150. 1174-1191.
- BEISSON, F., KOO, A.J.K., RUUSKA, S., SCHWENDER, J., POLLARD, M., THELEN, J.J., PADDOCK, T., SALAS, J.J., SAVAGE, L., MILCAMPS, A., MHASKE, V.B., CHO, Y., OHLROGGE, J.B. 2003. *Arabidopsis* genes involved in acyl lipid metabolism. A 2003 census of the candidates, a study of the distribution of expressed sequence tag in organs, and a web-based database. *Plant Physiology* 132. 681-697.
- BIRD, D., BEISSON, F., BRIGHAM, A., SHIN, J., GREER, S., JETTER, R., KUNST, L., WU, X., YEPHREMOV, A., SAMUELS, L. 2007. Characterization of *Arabidopsis* ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion. *The Plant Journal* 52. 485-498.
- BISIO, A., CORALLO, A., GASTALDO, P., ROMUSSI, G., CIARALLO, G., FONTANA, N., DE TOMASSI, N., PROFUMO, P. 1999. Glandular hairs and secreted material in *Salvia blepharophylla* Brandege ex epling grown in Italy. *Annals of Botany* 83:441-452.
- BROUN, P., POINDEXTER, P., OSBORNE, E., JIANG C.-Z., RIECHMANN, J.-L. 2004. WIN1, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in *Arabidopsis*. *PNAS* 101. (13.) 4706-4711.
- BUDA, G. J., ISAACSON, T., MATAS, A. J., PAOLILLO, D. J., ROSE, J. K. C. 2009. Three-dimensional imaging of plant cuticle architecture using confocal scanning laser microscopy. *The Plant Journal* 60: 378-385.
- CHEN, X., GOODWIN, S.M., BOROFF, V.L., LIU, X., JENKS, M.A. 2003. Cloning and characterization of the WAX2 gene of *Arabidopsis* involved in cuticle membrane and wax production. *The Plant Cell* 15. 1170-1185.

- DEBONO, A., YEATS, T. H., ROSE, J. K. C., BIRD, D., JETTER, R., KUNST L., SAMUELS, L. 2009. *Arabidopsis* LTPG Is a Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Lipid Transfer Protein Required for Export of Lipids to the Plant Surface. *The Plant Cell* 21:1230-1238.
- DÍAZ-PÉREZ, J. C., MUY-RANGEL, M. D., MASCORRO, A. G. 2007. Fruit size and stage of ripeness affect postharvest water loss in bell pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). *J Sci Food Agric* 87:68-73.
- JETTER, R., KUNST, L. 2008. Plant surface lipid biosynthetic pathways and their utility for metabolic engineering of waxes and hydrocarbon biofuels. *The Plant Journal* 54. 670-683.
- JOUBÉS, J., RAFFAELE, S., BOURDENX, B., GARCIA, C., LAROCHE-TRAINEAU, J., MOREAU, P., DOMERGUE, F., LESSIRE, R. 2008. The VLCFA elongase gene family in *Arabidopsis thaliana*: phylogenetic analysis, 3D modeling and expression profiling. *Plant Mol Biol* 67. 547-566.
- KROLIKOWSKI, K.A., VICTOR, J.L., WAGLER, T.N., LOLLE, S.J., PRUITT, R.E. 2003. Isolation and characterization of the *Arabidopsis* organ fusion gene HOTHEAD. *The Plant Journal* 35. 501-511.
- KUNST, L., SAMUELS, A.L. 2003. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in Lipid Research* 42. 51-80.
- KUNST, L., SAMUELS, L. 2009. Plant cuticles shine: advances in wax biosynthesis and export. *Current opinion in Plant Biology* 12. 721-727.
- LOVAS, B. 1984. Mikroszkóp-mikrokozmosz. Gondolat kiadó, Budapest.
- MAGUIRE, K. M., BANKS, N. H., OPARA, L. U. 2001. Factors affecting weight loss of apples. *Horticultural reviews* (25)
- MILLAR, A.A., CLEMENS, S., ZACHGO, S., GIBLIN, M., TAYLOR, D.C., KUNST, L. 1999. CUT1, an *Arabidopsis* gene required for cuticular wax biosynthesis and pollen fertility, encodes a very-long-chain fatty acid condensing enzyme. *The Plant Cell* 11. 825-838.
- POLLARD, M., BEISSON, F., LI, Y., OHLROGGE, J.B. 2008. Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trend sin Plant Science* 13. (5.) 236-246.
- PRUITT, R.E., VIELLE-CALZADA, J.-P., PLOENSE, S.E., GROSSNIKLAUS, U., LOLLE, S.J. 2000. FIDDLEHEAD, a gene required to suppress epidermal cell interactions in *Arabidopsis*, encodes a putative lipid biosynthetic enzyme. *PNAS* 97. (3.) 1311-1316.
- RIEDERER, M., MÜLLER, C. 2006. Biology of the plant cuticle. *Annual plant reviews* (23). Blackwell publishing, Oxford.

ROWLAND, O., ZHENG, H., HEPWORTH, S.R., LAM, P., JETTER, R., KUNST, L. 2006. CER4 encodes an alcohol-forming fatty acyl-coenzyme A reductase involved in cuticular wax production in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 142. 866-877.

SALADIÉ, M., MATAS, A. J., ISAACSON, T., JENKS, M. A., GOODWIN, S. M., NIKLAS, K. J., XIAOLIN, R., LABAVITCH, J. M., SHACKEL, K. A., FERNIE, A. R., LYTOVCHENKO, A., O'NEILL, M. A., WATKINS, C. B., ROSE, J. K.C. 2007. A reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. *Plant Physiology*. Vol. 144. pp. 1012-1028.

SAMBROOK, J., FRITT SCH, E. F., MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning – A laboratory manual* (2nd edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

SAMUELS, L., KUNST, L., JETTER, R. 2008. Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59. 683-707.

SIMON, G. 2006. Review on rain induced fruit cracking of sweet cherries (*Prunus avium* L.), its causes and possibilities of prevention. *International Journal of Horticultural Science* 12(3):27-35.

TÓTH, M. 2009. Gyümölcsfaj- és fajtaismeret. Budapesti Corvinus Egyetem, Budapest.

VASS, I., STYRING, S., HUNDAL, T., KOIVUNIEMI, A., ARO, E., ANDERSSON, B. 1992. Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II: stable reduced QA species promote chlorophyll triplet formation. *PNAS* 89(4):1408-1412.

WELLESEN, K., DURST, F., PINOT, F., BENVENISTE, I., NETTESHEIM, K., WISMAN, E., STEINER-LANGE, S., SAEDLER, H., YEPHREMOV, A. 2001. Functional analysis of the LACERATA gene of *Arabidopsis* provides evidence for different roles of fatty acid ω -hydroxylation in development. *PNAS* 98. (17.) 9694-9699.

XIA, Y., NIKOLAU, B.J., SCHNABLE, P.S. 1997. Developmental and hormonal regulation of the *Arabidopsis* CER2 gene that codes for a nuclear-localized protein required for the normal accumulation of cuticular waxes. *Plant Physiol.* 115. 925-937.

URL hivatkozások:

HAJÓSNÉ NOVÁK M. 1999. Genetikai variabilitás a növénynevelésben - Molekuláris diagnosztika. <http://www.tankonyvtar.hu/site/upload/pdf/b154.pdf> , 2011. November 14.

HARNOS, ZS., LADÁNYI, M. 2005. *Biometria agrártudományi alkalmazásokkal*. Aula kiadó, Budapest.