



## Opracowanie konstrukcji pBIN19-PGIP do modyfikacji genomu truskawki dla uzyskania genotypów odpornych na szarą pleśń

Małgorzata Korbin, Jolanta Majka, Agnieszka Gruchała,  
Edward Żurawicz

Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa, Skierniewice

### Preparation of PGIP-based genetic construct for modification of strawberry genome to obtain genotypes resistant to grey mould

#### Summary

Polygalacturonase inhibiting protein (PGIP) cDNA was isolated using RT-PCR from fruit of apple 'Golden Delicious' which was previously wounded and inoculated with *Botrytis cinerea*. The sequence of the cDNA showed high level of homology with the published sequence of PGIP-cDNA from apple and pear (99,7 and 97,3%) and low similarity with the sequence of cDNA from tomato (51,5%). The obtained cDNA was cloned and used for the binary construct creation. The introduction of the pBIN19-PGIP construct into strawberry plant genome seems to be a promising strategy to obtain a genotype resistant to *B. cinerea*, causal agent of grey mould – the most economically important fungal disease of this species.

#### Key words:

strawberry, resistance to grey mould, polygalacturonase inhibitor, binary construct, transformation.

#### Adres do korespondencji

Małgorzata Korbin,  
Instytut Sadownictwa  
i Kwiaciarnictwa,  
ul. Pomologiczna 18,  
96-100 Skierniewice;  
e-mail:  
mkorbin@insad.pl

### 1. Wstęp

Szara pleśń, wywoływana przez *Botrytis cinerea*, jest jedną z najgroźniejszych chorób grzybowych roślin. Największe straty, sięgające w sprzyjających dla rozwoju choroby warunkach nawet 90%, powoduje szara pleśń w uprawie truskawki (*Fragaria x ananassa*

Duch.). Odmiany truskawki różnią się podatnością na zakażenie, jednak jak dotychczas, nie stwierdzono istnienia genotypów odpornych (1). Dużą podatnością na szarą pleśń charakteryzują się także malina, pomidor i fasola, podczas gdy inne rośliny, np. grusza czy niektóre odmiany jabłoni wykazują odporność na *B. cinerea* (2).

Patogeneza szarej pleśni jest związana z aktywnością enzymatyczną grzyba. W pierwszym etapie infekcji główną rolę odgrywają enzymy zaburzające gospodarkę związków pektynowych (3), co prowadzi do uszkodzenia ściany komórkowej i maceracji tkanek gospodarza (3,4). Należy do nich poligalakturonaza (PG), enzym powodujący depolimeryzację pektyn (5). Aktywność poligalakturonaz grzybowych może być zablokowana przez białka-inhibitory (PGIP), będące produktami metabolizmu roślin. Białka-inhibitory tworzą specyficzne kompleksy z poligalakturonazami grzybowymi, powodując ich inaktywację (6). W przeprowadzonej analizie struktury PGIP wykazano obecność powtórzeń bogatych w leucynę (LRRs) (7), typowych dla białek obronnych. Inhibitory poligalakturonaz wykryto w wielu roślinach (8-10), przy czym białka pochodzące z roślin różnych gatunków różniły się aktywnością i specyficznością wobec patogenów (11). Na tej podstawie powstała hipoteza, że wprowadzenie do genomu rośliny genu kodującego białko PGIP o większej aktywności i wyższej specyficzności wobec danego patogena niż jej własny inhibitor poligalakturonazy, może być jednym ze sposobów uzyskania genotypu odpornego w obrębie wrażliwych na szarą pleśń gatunków. Potwierdzenie tej tezy przyniosły badania nad modyfikacjami genetycznymi pomidora (12).

Celem badań było wyizolowanie cDNA inhibitora poligalakturonazy z genomu odpornej na *B. cinerea* jabłoni i utworzenie konstrukcji, która posłuży do modyfikacji genetycznej roślin szczególnie zagrożonych szarą pleśnią.

## 2. Materiał i metody

### 2.1. Materiał roślinny

Źródłem poszukiwanego genu była jabłoń (*Malus domestica*) odmiany Golden Delicious. W celu wyzwolenia ekspresji genu PGIP dojrzałe jabłka nacinano i miejsca zranienia inokulowano zawiesiną zawierającą grzyb *B. cinerea* w stadium konidialnym (13). Owoce przechowywano w temperaturze 28°C na zwilżanej bibule filtracyjnej przez 4-7 dni od terminu inokulacji (14). Do badań pobierano fragmenty owoców (4 g) sąsiadujące ze strefami zranienia (15).

### 2.2. Izolacja i identyfikacja genu PGIP

RNA wytrącano chlorkiem litu według zmodyfikowanej procedury Verwoerda i in. (16). Zawartość RNA w uzyskanej próbce oraz czystość preparatu określono po

elektroforezie w 0,9% żelu agarozowym. Do reakcji odwrotnej transkrypcji (RT) wprowadzano 2-4  $\mu\text{g}$  RNA. Reakcję RT przeprowadzono przy użyciu zestawu Super-script II (Gibco), zgodnie z procedurą opisaną przez producenta. Uzyskany cDNA amplifikowano w łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Reakcję prowadzono w objętości 25  $\mu\text{l}$  mieszaniny reakcyjnej zawierającej 0,25 U Platinum Tag Polymerazy (Gibco), 2,5  $\mu\text{l}$  buforu  $10 \times \text{PCR}$ , 0,5  $\mu\text{l}$  dNTP (10 mM), 0,75  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  (50 mM), 0,3  $\mu\text{l}$  starterów (5  $\mu\text{M}$  każdy). Startery do RT-PCR zaprojektowano na podstawie opublikowanej sekwencji cDNA genu PGIP gruszy (Genbank Nr L09264) i wyposażono w dodatkowe sekwencje końcowe, umożliwiające trawienie przez enzym restrykcyjny *BamH* I. Amplifikacja zachodziła podczas 30 cykli: 94°C/30s, 55°C/30s, 72°C/90s (termocykler PTC-200 MJ Research). Produkt amplifikacji obserwowano w świetle UV po elektroforezie w 1% żelu agarozowym i wybarwieniu bromkiem etydyny.

Produkt PCR wycinano z żelu agarozowego, oczyszczono za pomocą zestawu QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) i klonowano. Do klonowania używano wektora TOPO TA (Invitrogen), a uzyskany produkt ligacji wprowadzano do genomu ultra-kompetentnych bakterii *Escherichia coli* (Gibco), stosując szok termiczny. Transformowane bakterie inkubowano przez noc w temperaturze 37°C na stałej pożywce LB, zawierającej ampicylinę (50  $\text{mg l}^{-1}$ ), IPTG (2,38  $\text{mg ml}^{-1}$ ) oraz X-gal (40  $\text{mg ml}^{-1}$ ).

Plazmidy izolowano z losowo wybranych białych i niebieskich kolonii bakteryjnych. Każdą z kolonii mnożono w płynnej pożywce LB. Osad uzyskany po odwirowaniu całonocnej hodowli bakteryjnej zawieszano w buforze ekstrakcyjnym GTE zawierającym 0,3% Tris-HCl, 0,37% EDTA i 0,9% glukozy. Plazmidy izolowano, stosując liżę alkaliczną. Trawienie plazmidów enzymem *BamH* I (Gibco) przeprowadzono podczas 4 godzin inkubacji w temperaturze 37°C (2 U enzymu, 2  $\mu\text{g}$  DNA). Plazmidy wyizolowane z białych i niebieskich kolonii oraz produkty ich trawienia poddano elektroforezie w 1% żelu agarozowym, a następnie analizowano w świetle UV.

Sekwencjonowanie sklonowanego produktu PCR (system Alf-express) przeprowadzono w Instytucie Biochemii i Biofizyki w Warszawie. Sekwencje analizowano za pomocą programu komputerowego DnaStar.

### 2.3. Przygotowanie konstrukcji binarnej z genem PGIP

Plazmid pBIN19 zawierający gen *npt* II oraz wprowadzoną kasetę z miejscem restrykcyjnym dla enzymu *BamH* I ligowano (zestaw Stratagene) z produktem PCR, o określonej uprzednio sekwencji. Produkt ligacji wprowadzono do ukompetentnionych bakterii *Agrobacterium tumefaciens* szczep LBA<sub>4404</sub> (17) stosując elektroporację (Elektro Cell Manipulator ECM, 1,7 kV). Bakterie kontrolne transformowano plazmidem pBIN19, bez dodatkowej wstawki. Po elektroporacji bakterie inkubowano w płynnej pożywce LB (1 godz.), po czym przenoszono na szalki z pożywką stałą zawierającą kanamycynę (50  $\text{mg l}^{-1}$ ) i kontynuowano inkubację w temperaturze 28°C (1-2 dni). Plazmidy z wybranych bakterii izolowano i trawiono enzymem *BamH* I

(Gibco). Plazmidy trawione, nie poddawane trawieniu oraz kontrolny plazmid pBIN19 (bez wstawki) analizowano w świetle UV po elektroforezie w 1% żelu agarozowym.

Wybrane bakterie z płynnej hodowli oraz wyizolowane z nich plazmidy były używane jako matryca w reakcji amplifikacji (PCR) ze starterami specyficznymi dla genu PGIP gruszy.

### 3. Wyniki i dyskusja

W wyniku reakcji RT-PCR przeprowadzonej na matrycy RNA z jabłoni 'Golden Delicious' ze starterami specyficznymi dla genu białka inhibitora poligalakturonazy (PGIP) gruszy otrzymano produkt o długości około 1 kb. Analiza porównawcza sekwencji uzyskanego produktu PCR i cDNA genu PGIP gruszy (GeneBank nr L09264) oraz opublikowanej w tym czasie sekwencji PGIP z jabłoni (GeneBank nr U77041) wykazała homologię nukleotydów odpowiednio 97,3 i 99,7% (rys.). Równocześnie homologia sekwencji badanego cDNA oraz cDNA genów PGIP pomidora (GeneBank nr L26529) i cytryny (GeneBank nr AB015198) wynosiła odpowiednio 51,5 i 70,4%, co sugerowało znaczną odmienność porównywanych fragmentów. Zróznicowanie sekwencji genu PGIP pochodzącego z roślin różnych gatunków jest zjawiskiem znanym, znajdującym odbicie w aktywności kodowanych przez nie białek (9-11,18-20). Wysoki stopień homologii sekwencji uzyskanej i opisanej dla genu PGIP z gruszy, rośliny odpornej na szarą pleśń, umożliwia zidentyfikowanie wyizolowanego fragmentu DNA jako cDNA genu należącego do grupy kodującej białka-inhibitory poligalakturonaz grzybowych (PGs). Silne zahamowanie rozwoju grzyba przez białko PGIP wydzielone z gruszy wykazano w badaniach nad porównaniem aktywności w warunkach *in vitro* inhibitorów PGs roślin różnych gatunków (11). Aktywność genu PGIP i kodowanego przezeń białka w warunkach *in vivo* potwierdzono w otrzymanych wynikach transformacji genetycznej. Wprowadzenie cDNA-PGIP gruszy do genomu pomidora spowodowało wzrost odporności stransformowanej rośliny na *B. cinerea* (12), a także na inne patogeny grzybowe (21). Istnieje przypuszczenie, że gen PGIP uczestniczy również w odpowiedzi rośliny na działanie abiotycznych czynników stresowych (8). Podobieństwo sekwencji cDNA wyizolowanego z 'Golden Delicious' do cDNA-PGIP gruszy dało podstawę do przypuszczenia, że uzyskany fragment DNA może być użyteczny w wyzwalaniu odporności na *B. cinerea* w genotypach nieodpornych metodami inżynierii genetycznej.

Zidentyfikowany fragment DNA wprowadzono do plazmidu pBIN19. Obecność wstawki w konstrukcji przeznaczonej do transformacji przez *A. tumefaciens* potwierdzono w uzyskanych wynikach elektroforezy i PCR. Plazmidy wyizolowane z bakterii wykazujących wzrost na selektywnej pożywce z kanamycyną i plazmidy pochodzące z bakterii kontrolnych (transformowanych „pustym” wektorem pBIN19) różniły się długością. Po trawieniu enzymem *BamH* I plazmidów z *A. tumefaciens* transformowanych pBIN19-PGIP uzyskano produkt o długości około 1 kb oraz wektor o długości

analogicznej do długości przeciętego tym samym enzymem macierzystego plazmidu pBIN19. Produktu tego nie obserwowano po trawieniu plazmidów bakterii kontrolnych. Równocześnie specyficzny produkt PCR o długości około 1 kb uzyskano w reakcji przeprowadzonej na matrycy DNA wyizolowanego z transformowanych bakterii i bezpośrednio z bakteriami z hodowli w płynnej pożywce LB. Nie obserwowano produktu amplifikacji w reakcjach, w których matrycę stanowiły plazmidy bakterii kontrolnych.

Odporność rośliny na zakażenie przez patogeny oparta jest na istnieniu barier fizycznych oraz na możliwości indukowania mechanizmu odporności, które ograniczają wzrost patogena w przestrzeniach apoplastu. System ten obejmuje produkcję rodników nadtlenkowych, syntezę metabolitów wtórnych, a także aktywację genów kodujących m.in. enzymy lityczne z grupy białek obronnych PR2, do których należy inhibitor poligalakturonazy (22). Białko-inhibitor poligalakturonazy wytwarzane w truskawce cechuje, sądząc po sekwencji genu PGIP (20, nie publikowane badania własne), niski poziom aktywności, czego konsekwencją jest brak reakcji odpornościowej na zakażenie przez *B. cinerea*. Biorąc pod uwagę wysoką homologię sekwencji uzyskanego cDNA i sprawdzonego podczas modyfikacji roślin cDNA gruszy, używana konstrukcja może być użyteczna w pracach nad wytwarzaniem genotypów truskawki, stanowiących cenny materiał wyjściowy w hodowli twórczej tego gatunku.

1	ATGGAACTCA	AGTTCTCCAT	CTTCCTCTCC	CTAACCCCTAC	TCTTCTCCTC	CGTCCTAAAA	Jabłoń
1	ATGGAACTCA	AGTTCTCCAT	CTTCCTCTCC	CTAACCCCTAC	TCTTCTCCTC	CGTCCTAAAA	U77041
1	ATGGAACTCA	AGTTCTCCAC	CTTCCTCTCC	CTAACCCCTAC	TCTTCTCCTC	CGTCCTAAAC	L09264
1	AT-AACTTGA	--TCTC----	-TTCTTCTTG	-TAGTTATTT	TTCTTTGGCTT	TGCTTC---T	L26529
61	CCCGCTCTCT	CCGATCTCTG	CAACCCCGAC	GACAAAAAAG	TCCTCTTACA	AATCAAGAAA	Jabłoń
61	CCCGCTCTCT	CCGATCTCTG	CAACCCCGAC	GACAAAAAAG	TCCTCTTACA	AATCAAGAAA	U77041
61	CCCGCTCTCT	CCGATCTCTG	CAACCCCGAC	GACAAAAAAG	TCCTCTTACA	AATCAAGAAA	L09264
49	CCTTCACTAT	CAGTAAGATG	CAATCCGAAA	GACAAAAAAG	TCCTTCTACA	AATAAAGAAA	L26529
121	GCCTTCGGCG	ACCCCTACGT	CTTGACCTCA	TGGAAATCAG	ACACTGACTG	TTGTGATTGG	Jabłoń
121	GCCTTCGGCG	ACCCCTACGT	CTTGACCTCA	TGGAAATCAG	ACACTGACTG	TTGTGATTGG	U77041
121	GCCTTCGGCG	ACCCCTACGT	CTTGACCTCA	TGGAAATCAG	ACACTGACTG	CTGCGATTGG	L09264
109	GACTTAGGCA	ATCCTTACCA	TTTAGCTTCA	TGGGATCCAA	ACACAGATTG	CTGTTACTGG	L26529
181	TACTGCGTCA	CCTGTGACTC	CACCACAAC	CGCATCAACT	CCCTCACCAT	CTTCGCCGGC	Jabłoń
181	TACTGCGTCA	CCTGTGACTC	CACCACAAC	CGCATCAACT	CCCTCACCAT	CTTCGCCGGC	U74401
181	TACTGCGTCA	CCTGTGACTC	CACCACAAC	CGCATTAACT	CCCTCACCAT	CTTCGCCGGC	L09264
169	TACGTCATAA	AATGTGACCG	GAAAACCAAC	CGGATAAATG	CTCTCACCGT	CTTC-CAAGC	L26529
241	CAG-GTATCC	GGCCAAATCC	CAGCCCTAGT	CGGAGACTTG	CCATACCTTG	AAACCCTTGA	Jabłoń
241	CAG-GTATCC	GGCCAAATCC	CAGCCCTAGT	CGGAGACTTG	CCATACCTTG	AAACCCTTGA	U74401
241	CAG-GTGTCA	GGCCAAATCC	CAGCCCTAGT	CGGAGACTTG	CCATACCTTG	AAACCCTTGA	L09264
228	CAATATCTCC	GTCCAAATTC	CGGCAGCCGT	CGGAGACCTT	ACATACTCTG	AAACATTGGA	L26529
300	ATTCCACAAG	CAACCTAATC	TCACTGGCCC	AATCCAACCC	GCCATTGCCA	AGCTCAAAGG	Jabłoń
300	ATTCCACAAG	CAACCTAATC	TCACTGGCCC	AATCCAACCC	GCCATTGCCA	AGCTCAAAGG	U70441
300	ATTCCATAAG	CAACCTAATC	TCACTGGCCC	AATCCAACCC	GCCATTGCCA	AGCTCAAAGG	L09264
288	ATTTCATCAT	GTTACTAATC	TCACCGGAAC	AATTCACCTT	GCAATTGCGA	AGCTCACAAA	L26529
360	ACTCAAGTTT	CTCAGGCTCA	GCTGGACCAA	CCTCTCAGGC	TCTGTCCCTG	ACTTCTCTAG	Jabłoń
360	ACTCAAGTTT	CTCAGGCTCA	GCTGGACCAA	CCTCTCAGGC	TCTGTCCCTG	ACTTCTCTAG	U70441
360	ACTCAAGTCT	CTCAGGCTCA	GCTGGACCAA	CCTCTCAGGC	TCTGTCCCTG	ACTTCTCTAG	L09264
348	TCTCAAATG	TTAAGGCTCA	GCTTCACTAA	CCTTACAGGT	CCGATCCCTG	AATTCCTTAG	L26529

420	CCAACCTCAAG	AACCTCACAT	TCCTCGACCT	CTCCTTCAAC	AACCTCACCG	GCGCCATCCC	Jabłoń
420	CCAACCTCAAG	AACCTCACAT	TCCTCGACCT	CTCCTTCAAC	AACCTCACCG	GCGCCATCCC	U70441
420	CCAACCTCAAG	AACCTCACAT	TCCTCGACCT	CTCCTTCAAC	AACCTCACCG	GTGCCATCCC	L09264
408	TCAGCTGAAG	AATTTGACGT	TGCTCGAGTT	GAATTACAAT	CAATTTACCG	GAACAATCCC	L26529
480	CAGCTCGCTT	TCTCAGCTCC	CAAACCTCAA	CGCTCTTCAT	CTAGACCGCA	ATAAGCTCAC	Jabłoń
480	CAGCTCGCTT	TCTCAGCTCC	CAAACCTCAA	CGCTCTTCAT	CTAGACCGCA	ATAAGCTCAC	U70441
480	CAGCTCGCTT	TCTCAGCTCC	CAAACCTCGG	CGCTCTTCAT	CTAGACCGCA	ATAAGCTCAC	L09264
468	TTCTTCCCTC	TCTCAGCTTC	CGAATTTGCT	AGCGATGTAC	TTAGATCGTA	ACAACCTCAC	L26529
540	AGGTCATATT	CCGAAATCGC	TTGGGAGATT	CATTGG--CA	A-CGTTCCAG	ACCTGTATCT	Jabłoń
540	AGGTCATATT	CCGAAATCGC	TTGGGAGATT	CATTGG--CA	A-CGTTCCAG	ACCTGTATCT	U70441
540	AGGTCATATT	CCGATATCGT	TTGGGAGATT	CATTGG--CA	A-CGTTCCAG	ACCTGTATCT	L09264
528	CGGAACAATA	CCGGAATCGT	TTGGGAGATT	TAAAGGACCA	AATATACCAG	ATCTCTACCT	L26529
597	CTCCACAAC	CAGCTCTCTG	GCAACATTCC	AACCTCATT	GCTCAGATGG	ACTTCACCAG	Jabłoń
597	CTCCACAAC	CAGCTCTCTG	GCAACATTCC	AACCTCATT	GCTCAGATGG	ACTTCACCAG	U70441
597	CTCCACAAC	CAGCTTCTTG	GCAACATTCC	AACCTCATT	GCTCAGATGG	ACTTCACCAG	L09264
588	TTACACAAC	AGCTTGACCG	GACATGTGCC	GGCATCTTTA	GGTGAATTTG	ATTTTTCAC	L26529
657	CATAGACTTA	TCACGGAACA	AGTTCGAAGG	TGACGCATCC	GTGATATTTG	GGCTGAACAA	Jabłoń
657	CATAGACTTA	TCACGGAACA	AGTTCGAAGG	TGACGCATCC	GTGATATTTG	GGCTGAACAA	U70441
657	CATAGACTTA	TCACGGAACA	AGTTCGAAGG	TGACGCATCC	GTGATATTTG	GGCTGAACAA	L09264
648	GCTTGATTTT	TCCAGGAATA	AGCTTGAAGG	AGATGTTTTG	TTTTTGTTCG	GGAAGAATAA	L26529
717	GACAACCAG	ATTGGGGACC	TGTCCAGGAA	CTTGCTGGAA	TTTAACTGT	CAAAGGTGGA	Jabłoń
717	GACAACCAG	ATTGTGGACC	TGTCCAGGAA	CTTGCTGGAA	TTTAACTGT	CAAAGGTGGA	U70441
717	GACAACCAG	ATTGTGGACC	TGTCCAGGAA	CTTGCTGGAA	TTTAACTGT	CAAAGGTGGA	L09264
708	GACGAGTCAG	GTAAT GATT	TATCGAGGAA	TTTATTGGAG	TTTGTATATT	CGAATTCGGA	L26529
777	GTTTCCGACA	AGCTTGACCT	CGCTGGATAT	CAACCACAAT	AAGATCTACG	GGAGTATCCC	Jabłoń
777	GTTTCCGACA	AGCTTGACCT	CGCTGGATAT	CAACCACAAT	AAGATCTACG	GGAGTATCCC	U70441
777	GTTTCCGACA	AGCTTGACCT	CGCTGGATAT	CAACCACAAT	AAGATCTACG	GGAGTATCCC	L26529
768	GTTTGTGAG	AGCTTGATAT	CATTGGATTT	GAATCATAAT	CGAATTTTTG	GTAGCTTACC	L09264
837	AGTGGAGTTT	ACCCAAGCTG	ATTTCCAGTT	CCTGAACGTG	AGCTACAACA	GGCTGTGTGG	Jabłoń
837	AGTGGAGTTT	ACCCAAGCTG	ATTTCCAGTT	CCTGAACGTG	AGCTACAACA	GGCTGTGTGG	U70441
837	AGTGGAGTTT	ACGCAACTGA	ATTTCCAGTT	CCTGAACGTG	AGCTACAACA	GGCTGTGTGG	L09264
828	ACCAGGATTG	AAAGGATGAC	CATTGCAGTT	TTTCAATGTG	AGTTATAATA	GACTTTGTGG	L26529
897	TCAGATTCCA	GTGGGTGGAA	AGTTGCAGAG	CTTCGACGAG	TATTCTTATT	TCCATAACCG	Jabłoń
897	TCAGATTCCA	GTGGGTGGAA	AGTTGCAGAG	CTTCGACGAG	TATTCTTATT	TCCATAACCG	U70441
897	TCAGATTCCCT	GTGGGTGGAA	AGTTGCAGAG	CTTCGACGAG	TATTCTTATT	TCCATAACCG	L09264
888	ACAGATTCCA	CAAGGTGGAA	CGTTGCAGAG	CTTTGATATT	TACTCTTATT	TGCATAACAA	L26529
957	ATGCTTGTGC	GGTGCTCCAC	TCCCAAGCTG	CAAGTAA			Jabłoń
957	ATGCTTGTGC	GGTGCTCCAC	TCCCAAGCTG	CAAGTAA			U70441
957	ATGCTTGTGC	GGTGCTCCAC	TCCCAAGCTG	CAAGTAA			L09264
948	ATGCCTTTGT	GGCTCTCCCT	TGCCGAAATG	TAAGTAG			L26529

Rys. Porównanie sekwencji cDNA wyizolowanego z jabłoni odmiany 'Golden Delicious' oraz sekwencji cDNA-PGIP jabłoni (nr U77041), gruszy (nr L09264) oraz pomidora (nr L26529) z Banku Genów.

## Literatura

1. Żurawicz E., (2003), *Pomologia*, PWRiL, Warszawa, 230.
2. Jarvis W. R., (1977), *Botryotinia and Botrytis species: taxonomy, physiology, and pathogenicity*, Research Branch Canada Department of Agriculture, Ontario, Mon.15.
3. Collmer A., Keen N. T., (1986), *Phytopathol.*, 24, 383-409.
4. Cooper R. M., (1984), *Plant Diseases: Infection, Damage and Loss*, Eds. R. K. S. Wood, G. J. Jellis, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 13-27.
5. Hadfield K. A., Bennett A. B., (1998), *Plant Physiol.*, 117, 337-343.
6. de Lorenzo G., Cervone F., (1997), *Plant-Microbe Interact.*, 3, 76-93.

7. Kobe B., Deisenhofer J., (1994), *Trends Biochem. Sci.*, 19, 415-421.
8. Cervone F., de Lorenzo G., Degra L., Salvi G., Bergami M., (1987), *Plant Physiol.*, 85, 631-637.
9. Johnston D. J., Ramanathan V., Williamson B., (1993), *J. Exp. Bot.*, 44, 971-976.
10. Stotz H. U., Powell A. L. T., Damon S. E., Greve L. C., Bennet A. B., Labavitch J. M., (1993), *Plant Physiol.*, 102, 133-138.
11. Stotz H. U., Cantos J. J., Powell A. L. T., Bennet A. B., Labavitch J. M., (1994), *Plant Physiol.*, 25, 607-617.
12. Powell A. L. T., D'Hallewin G., Hall B. D., Stotz H., Labavitch J. M., Bennett A. B., (1994), *Plant-Microbe Interact.*, 3, 399-402.
13. Conway W. S., (1982), *Plant Dis.*, 66, 402-403.
14. Bulger M. A., Ellis M. A., Madden L. V., (1987), *Phytopath.*, 77, 1225-1230.
15. Bergmann C. W., Ito Y., Singer D., Albersheim P., Darvill A. G., Benhamou N., Nuss L., Salvi G., Cervone F., de Lorenzo G., (1994), *Plant J.*, 5, 625-634.
16. Verwoerd T. C., Dekker B. M. M., Hoekema A., (1989), *Nucl. Acid Res.*, 17, 2362.
17. Hoekema A., Hirsch P. R., Hooykas P. J., Schilperroot R. A., (1983), *Nature*, 303, 179-180.
18. Favaron F., D'Ovidio R., Porceddu E., Alghisi P., (1994), *Planta*, 195, 80-87.
19. Mehli L., (2002), *Plant Protection Science*, 18, 504-506.
20. Nalumpang S., Gotoh Y., Tsuboi H., Gomi K., Yamamoto H., Akimitsu K., (2002), *Plant Pathol.*, 68, 118-127.
21. Desiderio A., Aracri B., Leckie F., Mattei B., Salvi G., Tigelaar H., van Roekel J. S. C., Baulcombe D. C., Melchers L. S., de Lorenzo G., Cervone F., (1997), *Mol. Plant Microbe Interact.*, 10, 852-860.
22. Hammond-Kosack K. E., Jones J. D. G., (1997), *Plant Mol. Biol.*, 48, 575-607.