



## Ingerencja w szlak biosyntezy etylenu na drodze transformacji

Jan Kępczyński<sup>1</sup>, Ewa Kępczyńska<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Fizjologii Roślin

<sup>2</sup>Zakład Biotechnologii

Uniwersytet Szczeciński, Szczecin

### Interference in Ethylene Biosynthetic Pathway Using Transformation

#### Summary

The biosynthesis of ethylene in plants and its regulation by manipulating the expression of ACC synthase or ACC oxidase genes are discussed. Ethylene synthesis can be reduced by the introduction of antisense ACC synthase or antisense ACC oxidase genes. Expression genes of SAM hydrolase from bacteriophage T3, which catalyze the conversion of SAM to methylthioadenosine, also diminished ACC availability. Another possibility of ethylene biosynthesis control is the expression of gene encoding ACC deaminase from *Pseudomonas*.

#### Key words:

ethylene biosynthesis, SAM hydrolase, ACC synthase, ACC oxidase, ACC deaminase, biotechnology, genes, antisense, transformation.

### 1. Wprowadzenie

Etylen jest wyjątkowym fitohormonem m.in. z powodu prostej budowy. Cząsteczka jest zbudowana tylko z dwóch atomów węgla i czterech wodorów, masa cząsteczkowa wynosi zaledwie 28 Da. Warto podkreślić, że etylen jest najprostszym dotychczas poznanym hormonem zarówno w świecie roślin jak też zwierząt. Niezwykłość etylenu, polega na występowaniu w formie gazu. Właśnie z tego powodu przez długi okres etylen nie był uznawany za hormon roślinny. Historia badań nad etylenem związana jest z nazwiskiem rosyjskiego badacza Neljubowa, który w 1901 r.

#### Adres do korespondencji

Jan Kępczyński,  
Zakład Fizjologii Roślin,  
Uniwersytet Szczeciński,  
ul. Wąska 13,  
71-415 Szczecin.

**biotechnologia**

2 (49) 72–82 2000

pierwszy opublikował informację, że etylen obecny w gazie świetlnym jest odpowiedzialny za modyfikację wzrostu roślin (1). Zauważył on, że pod wpływem etylenu dochodzi do zahamowania wzrostu elongacyjnego etiolowanych siewek grochu, zwiększenia ich średnicy oraz horyzontalnego wzrostu. Ta tzw. potrójna reakcja siewek grochu była przez długi okres wykorzystywana do oznaczania etylenu. Intensywny rozwój badań nad endogennym etylenem rozpoczął się dopiero od 1959 r. dzięki zastosowaniu chromatografii gazowej do analizy etylenu przez Burg i Stolwijk w Ameryce oraz Huelin i Kennett w Australii (2).

Obecnie wiadomo, że etylen wpływa na wiele różnych procesów fizjologicznych takich jak: ustępowanie spoczynku, kiełkowanie, wzrost i różnicowanie, geotropizm, epinastia, kwitnienie, determinacja płci, dojrzewanie, starzenie, opadanie organów (1-4).

Okazało się, że etylen może wywoływać diametralnie odmienne reakcje fizjologiczne u różnych roślin. Na przykład inicjuje kwitnienie roślin należących do *Bromeliaceae* (np. ananas), a indukuje opadanie kwiatów u większości innych roślin (np. jabłoń, róże). Proces elongacji pędu jest zwykle hamowany przez etylen, ale stymuluje on wydłużanie międzywęzła zatopionych roślin ryżu. Etylen stymuluje lignifikację i w konsekwencji „usztynienie” roślin asparagusa, natomiast w owocach stymuluje syntezę enzymów hydrolitycznych uczestniczących w mięknięciu owoców.

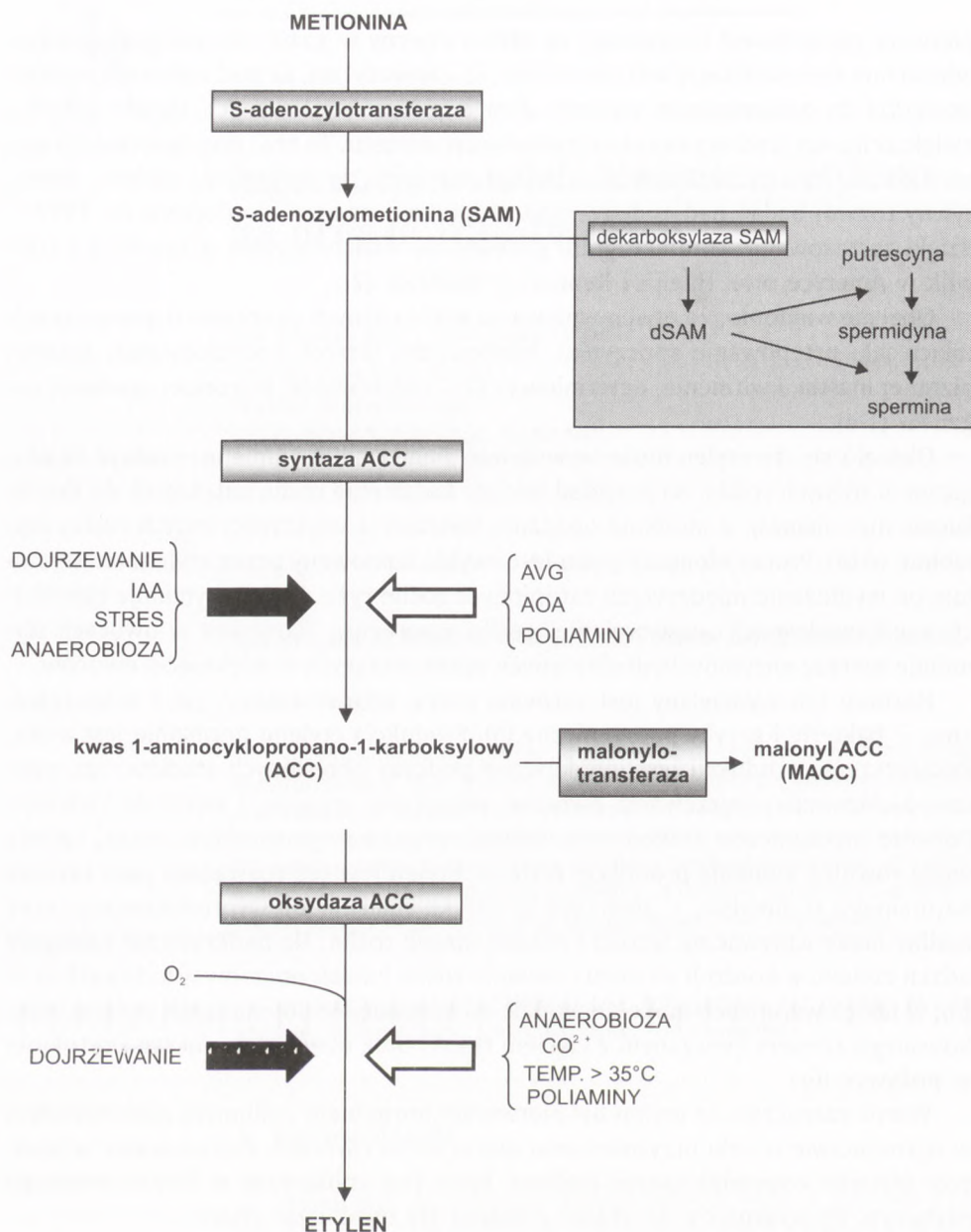
Hormon ten wydzielany jest zarówno przez zdrowe rośliny, jak i mikroorganizmy – bakterie i grzyby patogeniczne (5). Produkcja etylenu normalnie jest niska. Podwyższenie produkcji jest indukowane podczas określonych stadiów, np. podczas kiełkowania, dojrzewania owoców, odpadania organów i starzenia kwiatów. Ponadto mechaniczne uszkodzenia, infekcja przez patogeny, chłód, susza, zalanie wodą również indukują produkcję etylenu. Etylen jest też rozważany jako czynnik naturalnego środowiska – tworzony w wyniku spalania lub wyprodukowany przez rośliny może wpływać na wzrost i rozwój innych roślin. Na podkreślenie zasługuje udział etylenu w kontroli wzrostu i rozwoju roślin lub ich organów w kulturach *in vitro*, w takich warunkach może dochodzić do kumulacji w pojemnikach etylenu indukowanego stresem związanym z cięciem tkanki oraz obecnością auksyn i cytokinin w pożywce (6).

Warto zaznaczyć, że etylen był pierwszym hormonem roślinnym zastosowanym w ogrodnictwie w celu przyspieszania dojrzewania owoców. Zastosowanie w praktyce ułatwiło wyprodukowanie etefonu, który jest aplikowany w formie wodnego roztworu. Po wnikięciu do tkanki rozkłada się uwalniając etylen.

## 2. Biosynteza etylenu

Ustalenie szlaku biosyntezy etylenu przez rośliny zawdzięczamy przede wszystkim zespołowi Yanga (rys. 1) (7). Prekursorem etylenu jest metionina; z niej powstaje S-adenozylometionina (SAM), następnie syntetyzowany jest bezpośredni prekur-





Rys. 1. Regulacja biosyntezy etylenu; ➔ indukcja, ⇨ inhibicja.

synetylenu kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy (ACC), z którego powstaje etylen. Synteza SAM z metioniny jest katalizowana przez S-adenozylotransferazę, w kolejnym etapie syntezy uczestniczy syntaza ACC, ostatnia reakcja jest katalizo-

wana przez oksydazę ACC. Produkcja etylenu może być kontrolowana poprzez regulację różnych etapów szlaku biosyntezy. Wspomniana indukcja produkcji etylenu w określonych stadiach związana jest z określonym ogniwem drogi syntezy. Na przykład podczas dojrzewania, starzenia, mechanicznego uszkodzenia lub w warunkach oddziaływania chłodu, suszy lub zatopienia ma miejsce podwyższona produkcja ACC, co prowadzi do zwiększenia syntezy etylenu. Proces dojrzewania jest również związany z podwyższeniem przekształcania ACC do etylenu.

Produkcję etylenu można kontrolować poprzez regulację aktywności enzymów uczestniczących w szlaku biosyntezy etylenu lub dostarczenie tkance prekursora biosyntezy etylenu. Aplikacja ACC zwykle wywołuje znaczne zwiększenie produkcji etylenu. Świadczy to zatem o niedoborze endogennego ACC i jednocześnie o obecności w tkance aktywnej oksydazy ACC. Przyjmuje się, że syntaza ACC jest enzymem warunkującym produkcję etylenu w tkankach. Biosynteza etylenu jest związana z biosyntezą poliamin; wspólnym prekursorem jest SAM. Ulega on dekarboksylacji przy udziale dekarboksylazy SAM, otrzymany związek jest substratem dla biosyntezy spermidyny i sperminy. Inhibicja aktywności dekarboksylazy SAM przez metyloglioksal-*bis*-guanylohydrazonu (MGBG) zwiększa pulę SAM wykorzystywanej do syntezy ACC, tym samym podwyższa syntezę etylenu. Potraktowanie kwiatów goździka MGBG spowodowało zwiększenie produkcji etylenu i przyspieszyło ich starzenie. Wykazano, że egzogenne poliaminy hamują aktywność syntazy ACC wywołując w ten sposób obniżenie zawartości ACC, a zatem też produkcji etylenu. W doświadczeniach z wykorzystaniem kwiatów goździka, poliaminy hamowały produkcję etylenu i w ten sposób opóźniały ich starzenie.

Aktywność syntazy ACC można zahamować aminoetoksywinyloglicyną (AVG), wtedy brak odpowiedniej ilości prekursora uniemożliwia lub ogranicza produkcję etylenu. Konsekwencją zastosowania AVG było, np. obniżenie produkcji etylenu i przedłużenie trwałości kwiatów, opóźnienie dojrzewania owoców, kiełkowania nasion. Produkcję etylenu, a zatem też procesy kontrolowane przez ten hormon można regulować również poprzez wpływ na aktywność oksydazy ACC. Jony kobaltu, warunki beztlenowe oraz wysoka temperatura hamują syntezę etylenu.

Produkcja etylenu w tkankach roślinnych jest również regulowana w wyniku malonylacji ACC do malonylu ACC (MACC) katalizowanej przez N-malonylotransferazę ACC (8). Konsekwencją malonylacji jest obniżenie zawartości ACC i produkcji etylenu. MACC jest uznawany jako nieaktywny końcowy produkt, który jest kumulowany w wakuoli. Przyjmuje się, że MACC nie jest przekształcany do ACC i wykorzystywany do produkcji etylenu. Uważa się, że konwersja MACC do ACC zachodzi tylko w warunkach нефизиologicznych, jednak w nasionach orzecha ziemnego 2% MACC było wykorzystane do syntezy etylenu. Reakcja malonylacji umożliwia usuwanie nadmiaru ACC. Proces ten można zahamować stosując D-aminokwasy. Wtedy podwyższa się zawartość endogennego ACC i oczywiście zwiększa się produkcja etylenu. Ostatnio (9) wykazano, że podczas rozwoju i dojrzewania pomidorów ACC jest przekształcany do związanej formy – 1-( $\gamma$ -L- glutamiloamino) pochodnej ACC (GACC).



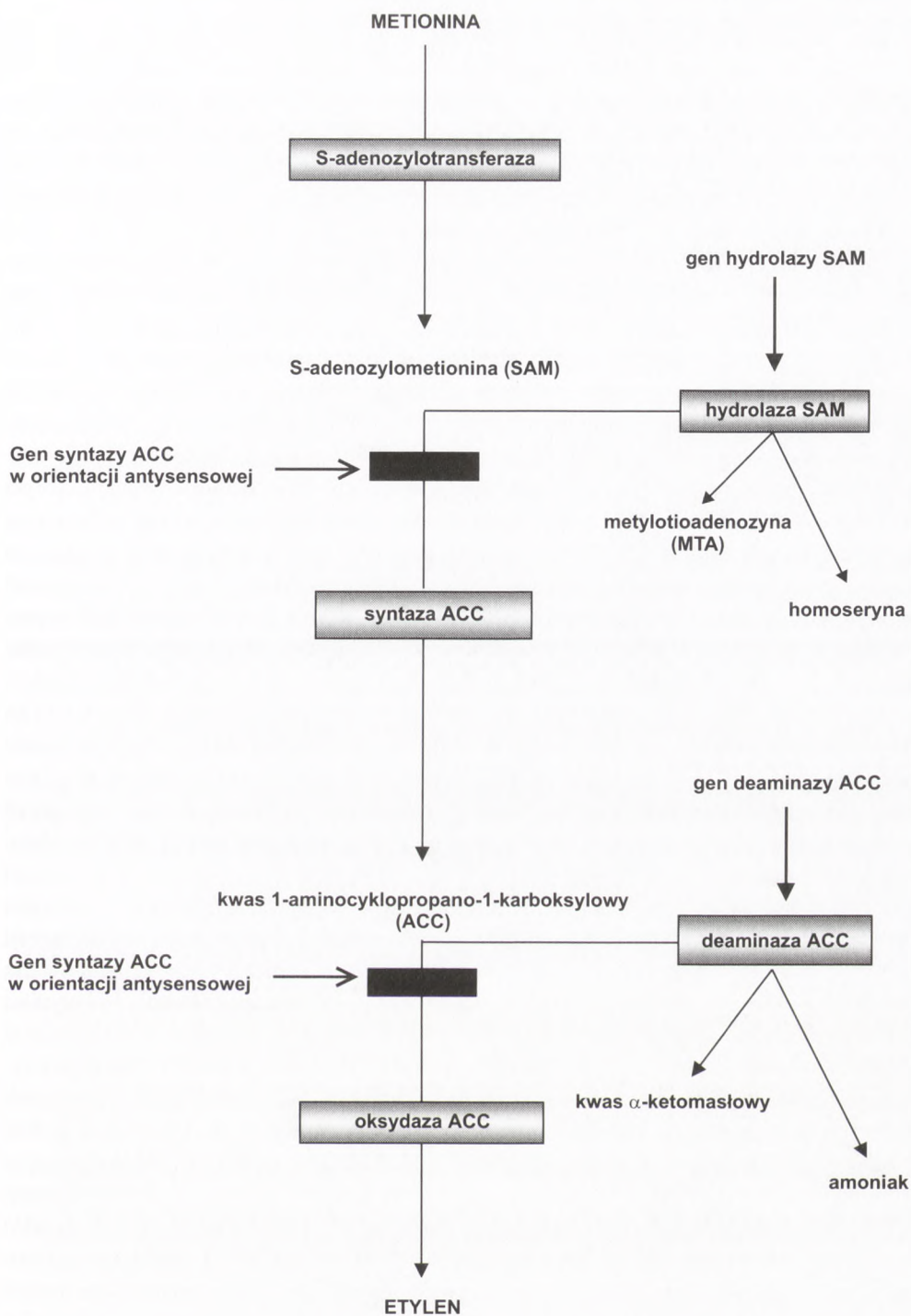
Reasumując poznanie szlaku biosyntezy etylenu, zidentyfikowanie prekursorów, poznanie inhibitorów aktywności enzymów uczestniczących w syntezie etylenu umożliwia regulację produkcji tego hormonu. Zostało to wykorzystane w badaniach mających na celu poznanie fizjologicznej roli etylenu w różnych procesach oraz w praktyce do sterowania niektórymi procesami.

### 3. Inżynieria genetyczna biosyntezy etylenu

Poznano geny kodujące enzymy uczestniczące w poszczególnych etapach szlaku biosyntezy etylenu u roślin wyższych. Ponadto zidentyfikowano geny, nie występujące w roślinach, kodujące enzymy degradujące związki stanowiące ogniwa pośrednie łańcucha biosyntezy etylenu. Pojawiła się zatem możliwość modyfikacji różnych etapów szlaku biosyntezy etylenu na drodze transformacji. Można podwyższyć produkcję etylenu przez zwielokrotnienie genów kodujących enzym odpowiedzialny za syntezę prekursora etylenu. Jednak najczęściej celem transformacji jest obniżenie lub zablokowanie produkcji etylenu. Cel ten jest realizowany przez wprowadzanie do genomu rośliny, genów kodujących enzymy degradujące jeden ze substratów szlaku biosyntezy lub przez wprowadzanie genów, kodujących enzymy łańcucha biosyntezy etylenu, w orientacji antysensowej.

#### 3.1. Gen hydrolazy SAM

Przykładem genów kodujących enzymy degradujące substraty szlaku biosyntezy etylenu jest gen hydrolazy SAM (rys. 2) (10). Wykorzystano informację, że bakteriofag T3 posiada hydrolazę SAM, która rozkłada SAM do homoseryny i metyltioadenozyny. Stosując *Agrobacterium* jako wektor wprowadzono gen kodujący hydrolazę SAM, pochodzący z bakteriofaga *E. coli* do genomu pomidora. Gen hydrolazy SAM wprowadzono pod kontrolą specyficznego promotora E8 dzięki temu ekspresja zachodziła tylko w dojrzewających owocach pomidora, a zatem tylko w dojrzewających owocach obniżona została pula SAM potrzebnego do syntezy ACC. W wyniku transformacji ograniczono w znacznym stopniu produkcję etylenu oraz zahamowano dojrzewanie pomidorów. Wykazano, że hydrolaza SAM występuje w owocach transgenicznym pomidorów w ekstremalnie małych ilościach, nie jest toksyczna i jest łatwo degradowana w temperaturze 37°C już po 30 sekundach. Przypuszcza się, że ekspresja genu hydrolazy SAM w określonym stadium może znaleźć zastosowanie w praktyce w produkcji bezpiecznej żywności.



Rys. 2. Regulacja biosyntezy etylenu na drodze transformacji.



### 3.2. Geny syntazy ACC

W pięciu niezależnych zespołach badawczych sklonowano geny syntazy ACC z owoców cukinii, kabaczka, pomidora i jabłek (11-16). Porównując wydedukowaną sekwencję aminokwasów syntazy ACC wykazano 40% identyczności i około 80% podobieństwa pomiędzy enzymami. Stwierdzono występowanie 7 konserwatywnych regionów wykazujących przeszło 80% identyczności (16).

Większość badań dotyczących genetycznej kontroli syntazy ACC przeprowadzono z wykorzystaniem owoców pomidora. Znaczne zwiększenie zawartości ACC i podwyższenie produkcji etylenu jest związane z ekspresją genów LE-ACS2 i LE-ACS4. cDNA tych genów zostały opisane po raz pierwszy przez van der Straeten i wsp. (13). Ekspresja tych genów jest indukowana bezpośrednio przed i podczas klimakterycznego dojrzewania owoców (14,17,18). Obydwa geny mogą być indukowane w zielonych owocach w wyniku traktowania ich 0,1 ppm etylenu przez 2 dni. Obydwa posiadają w promotorach elementy podobne do elementu występującego w genie E4 indukowanym przez etylen (19). Stwierdzono, że za produkcję etylenu podczas klimakterycznego dojrzewania w znacznie większym stopniu odpowiedzialny jest LE-ACS2 niż LE-ACS4 (14, 20). Wykazano 10 razy więcej „produktów” tego genu niż genu LE-ACS4. Okazało się, że LE-ACS2 ulega też ekspresji w starzejących kwiatach, w kulturach zawieszinowych, zainfekowanych liściach oraz zatopionych korzeniach pomidora (17,18,21-23). Zaobserwowano, że w zatopionych korzeniach pomidora ekspresja LE-ACS2 była poprzedzona ekspresją LE-ACS3 (22). Stwierdzono, że rośliny pomidora posiadają co najmniej 7 różnych genów kodujących syntazę ACC. W badaniach z wykorzystaniem kultur zawieszinowych pomidora wykazano, że elicytory drożdży stymulują ekspresję aż 7 genów w tym jednego aż około 10-krotnie, a aktywność 3 innych genów uległa podwyższeniu prawie 3-krotnie (23).

W dotychczasowych badaniach udowodniono, że syntaza ACC jest kodowana przez rodzinę genów. Przedstawiciele tej rodziny ulegają preferencyjnej ekspresji pod wpływem endogennych sygnałów lub czynników środowiska. Zróżnicowana ekspresja różnych genów syntaz ACC ma miejsce podczas dojrzewania, w wyniku zranienia lub po aplikacji IAA (18).

Sklonowanie genów uczestniczących w szlaku biosyntezy umożliwiło wykorzystanie biotechnologii do otrzymania roślin ze zredukowaną produkcją endogennego etylenu i owoców o przedłużonym okresie przechowywania. Gen syntazy ACC został wykorzystany do manipulacji syntezą etylenu w roślinach. Wykorzystując *A. tumefaciens* jako wektor wprowadzono gen syntazy ACC w orientacji odwróconej. Ekspresja genu LE-ACS2 w orientacji antysensowej w owocach pomidora spowodowała redukcję produkcji etylenu o około 99% w porównaniu do produkcji przez pomidory pochodzące z roślin nie transformowanych (24). Natomiast liście roślin transgenicznych charakteryzowały się taką samą produkcją etylenu jak roślin nie-transgenicznych. Transgeniczne owoce pozostawione na roślinie lub zerwane nie



zmieniały koloru, ponieważ nie następowała degradacja chlorofilu oraz nie zachodziła akumulacja likopenu. Pomidory nie przechodziły klimakteryki, nie miękły, nie uzyskiwały aromatu i nigdy nie dojrzewały. Pomidory transgeniczne i nie transgeniczne posiadały taką samą ilość mRNA odpowiedzialnego za syntezę oksydazy ACC. Dopiero traktowanie etylenem przez 6 dni umożliwiło dojrzewanie pomidorów transgenicznych. Krótszy okres traktowania nie wystarczał, zatem ciągła obecność etylenu przez 6 dni była niezbędna dla procesu dojrzewania.

Dzięki wykorzystaniu roślin transgenicznych z antysensowym genem syntazy ACC udowodniono, że etylen jest induktorem dojrzewania owoców pomidora.

### 3.3. Geny oksydazy ACC

Davies i Grierson (25) badali ekspresję genów podczas dojrzewania owoców i wyizolowali cDNA nazwany pTOM13. Okazało się, że wprowadzenie tego genu do pomidorów w orientacji antysensowej spowodowało znaczne obniżenie aktywności oksydazy ACC w roślinach pomidora (26). Pojawiła się zatem sugestia, że produktem genu jest oksydaza ACC. Później wykazano, że ekspresja pTOM13 w drożdżach powoduje pojawienie się aktywności oksydazy ACC (27). Stwierdzono, że podobnie jak syntaza ACC również oksydaza ACC jest kodowana przez rodzinę genów. Z roślin pomidora wyizolowano 3 geny LE-ACO1, LE-ACO2 i LE-ACO3 kodujące oksydazę ACC (28). Geny te posiadają bardzo podobną strukturę i regiony o bardzo wysokim stopniu identyczności, jednakże zawierają też sekwencje wykazujące niewielką homologię. Transkrypty LE-ACO1 występowały w niskich stężeniach w młodych zielonych liściach jednak zawartość ich podwyższała się 11-krotnie 2 godziny po ich uszkodzeniu. LE-ACO1 – jest głównym genem ulegającym ekspresji podczas starzenia liści, poziom transkryptów ulegał podwyższeniu aż 27 razy. Podczas starzenia liści akumulacja transkryptów trwa około 2 tygodni. Ekspresja tego genu przebiegała w niewielkim natężeniu w zielonych owocach, a zwiększała się podczas dojrzewania. Transkrypty – LE-ACO2 i LE-ACO3 – są nieobecne w zielonych liściach i nie pojawiają się po zranieniu. LE-ACO3 ulega ekspresji podczas starzenia w dwukrotnie mniejszym natężeniu niż LE-ACO1.

Podobnie jak w przypadku syntazy ACC, technika antysens została wykorzystana do wprowadzania genu oksydazy ACC w odwróconej orientacji w celu obniżenia produkcji etylenu (rys. 2). Owoce transgenicznych roślin pomidora otrzymanych w wyniku transformacji genem pTOM13 z antysensową sekwencją charakteryzowały się obniżoną produkcją etylenu; inhibicja wynosiła około 95% (26). Owoce transgeniczne wykazywały odporność na przejrzenie i wysychanie podczas przechowywania w pokojowej temperaturze, charakteryzowały się zredukowaną akumulacją karotenoidów szczególnie likopenu, nie dojrzewały w pełni (29). Egzogenny etylen tylko częściowo umożliwił dojrzewanie (30). Prawdopodobnie jakieś inne czynniki pochodzące z rośliny macierzystej są razem z etylenem potrzebne do normalnego



przebiegu dojrzewania. Przypuszcza się również, że po zerwaniu większość etylenu ulega dyfuzji przez „miejsce”, w którym przerwany został ogonek; w ten sposób dodatkowo dochodzi do obniżenia wewnętrznego stężenia etylenu. Jeśli owoce pozostawiono na roślinie dojrzewały normalnie jednak nie przejrzały. Dodatkowo stwierdzono że liście roślin transgenicznych starzały się około 7-10 dni później w porównaniu do liści roślin nietransgenicznych.

Wykazano, że w melonach oksydaza ACC jest również kodowana przez trzy geny (31). CMe-ACO1 ulega ekspresji w dojrzewających owocach, prawdopodobnie spełnia ważną funkcję w autokatalitycznej produkcji etylenu podczas dojrzewania owoców. Egzogenny etylen stymuluje ekspresję tego genu. Gen ten ulega też ekspresji w liściach, ekspresja ulega znacznemu podwyższeniu w wyniku zranienia, suszy, zasolenia lub traktowania egzogennym etylenem. Niewielki poziom ekspresji CMe-ACO2 stwierdzono w hipokotylach. CMe-ACO3 ulega ekspresji w kwiatach, nie jest indukowany przez zranienie lub egzogenny etylen. Transformacja genem CMe-ACO1 w orientacji antysensowej spowodowała redukcję produkcji etylenu o przeszło 99% oraz inhibicję dojrzewania owoców na roślinie jak też po ich zerwaniu (32). Nie tworzyła się warstwa odcinająca, owoce pozostawały na roślinie i dzięki temu kumulowały więcej cukrów, które polepszały ich jakość, zahamowany został rozkład chlorofilu, nie obserwowano zmian w zawartości karotenoidów, owoce nie traciły jędrności. Traktowanie etylenem (50 ppm) owoców transgenicznych przez 4 dni umożliwiło ich dojrzewanie. Jest zatem możliwość przechowywania, transportowania niedojrzałych owoców transgenicznych w pokojowej temperaturze, a następnie indukcji ich dojrzewania w celu osiągnięcia odpowiedniej jakości konsumpcyjnej.

Etylen pełni istotną funkcję w regulacji procesu starzenia kwiatów. Przedłużenie trwałości kwiatów ciętych ma ogromne znaczenie dla praktyki. Dlatego podjęto próbę genetycznej modyfikacji biosyntezy etylenu. Używając różnych promotorów oraz genu oksydazy ACC w orientacji odwróconej zahamowano syntezę etylenu w całych roślinach goździka lub tylko w płatkach (33).

### 3.4. Gen deaminazy ACC

Odkryto, że niektóre bakterie posiadają enzym deaminazę ACC, która przekształca ACC do kwasu  $\alpha$ -ketomasłowego (34). Enzym ten został po raz pierwszy wyizolowany i oczyszczony z bakterii *Pseudomonas putida*, a także innych bakterii glebowych. Nie występuje on w roślinach. Wyizolowano też gen kodujący ten enzym i wykorzystano go do transformacji roślin pomidora. Stwierdzono, że w wyniku ekspresji tego genu transgeniczne owoce produkowały o około 90-97% mniej etylenu niż owoce roślin nie transformowanych (35). Owoce zerwane z roślin nietransgenicznych wybarwiły się całkowicie już po 7 dniach oraz były miękkie po 14 dniach. Natomiast owoce transgenicznych pomidorów czerwony kolor uzyskały dopiero po 24 dniach i zachowały jędrność. Jeśli owoce transgeniczne były pozostawione na ro-



ślinie wolniej miękły i nie opadały nawet po 40 dniach. Natomiast owoce roślin nie-transgenicznych opadały po 14 dniach.

Wykorzystując wiedzę na temat fizjologicznej funkcji etylenu można przewidzieć kiedy genetyczna kontrola etylenu pozwoli uzyskać korzyści, np. związane z przedłużeniem okresu przechowywania i zabezpieczenia przed uszkodzeniem owoców, warzyw i kwiatów. Niskie stężenie etylenu jest korzystne dla dojrzewania owoców, a w wysokich etylen doprowadza do uszkodzeń. Dla poszczególnych gatunków należy wyznaczyć optymalne stężenie etylenu. Zatem nie zawsze zachodzi konieczność prawie całkowitego zablokowania syntezy etylenu, etylen powinien być syntetyzowany w ilości umożliwiającej opóźnione dojrzewanie owoców. Istnieje możliwość otrzymywania transgenicznych roślin charakteryzujących się różnym natężeniem biosyntezy etylenu. Na przykład owoce pomidorów transgenicznych otrzymanych w wyniku wprowadzenia genu deaminazy produkowały mniej etylenu niż otrzymane w wyniku wprowadzenia antysensowego genu syntazy ACC. Dodatkowe możliwości w sterowaniu procesami fizjologicznymi stworzyła genetyczna modyfikacja wrażliwości tkanek na etylen.

Badania szlaku biosyntezy etylenu, z wykorzystaniem inżynierii genetycznej do otrzymywania transgenicznych roślin charakteryzujących się zmodyfikowaną produkcją etylenu, są przykładem jak biologia molekularna umożliwi lepsze zrozumienie regulacji procesów fizjologicznych przez etylen oraz otwierają nowe możliwości dla polepszenia jakości owoców, warzyw i kwiatów (36).

## Literatura

1. Abeles F. B., Morgan P.W., Saltveit, (1992), *Ethylene in Plant Biology*, Academic Press, New York.
2. Abeles F. B., (1973), *Ethylene in Plant Biology*, Academic Press, New York.
3. Kępczyński J., (1988), *Wiad. Bot.*, 32, 47-60.
4. Kępczyński J., Kępczyńska E., (1997), *Physiol Plant.*, 101, 720-726.
5. Kępczyńska E., Zielińska S., Kępczyński J., (2000), *Biotechnologia*, 1, 147-155.
6. Kępczyński J., Florek I., (1995), *Materiały Ogólnopolskiej Konferencji: Zastosowanie kultur in vitro w fizjologii roślin*, Zakład Fizjologii Roślin PAN, Kraków, 37-44.
7. Adams D. O., Yang S. F., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 170-174.
8. McKeon T. A., Fernandez-Maculet J. C., Yang S. F., (1995), *Plant Hormones*, Ed. P. J. Davies, 118-139, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
9. Martin M. M., Saftner R. A., (1995), *Plant Physiol.*, 108, 1241-1249.
10. Kramer M. G., Kellogg J., Wagoner W., Matsumura W., Good X., Peters S., Clough G., Bestwick R. K., (1997), *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene*, Eds A. K. Kanellis, C. Chang, H. Kende, D. Grierson, 34, 307-319, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
11. Sato S., Theologis A., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 6621-6625.
12. Sato S., Oeller P. W., Theologis A., (1991), *J. Biol. Chem.*, 266, 3752-3759.
13. van der Straeten D., van Viemeersch L., Goodman H. M., Montagu M., (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 4859-4863.
14. Olson D. C., White J. A., Edelman L., Harkins R. N., Kende H., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 5340-5344.



15. Nakajima N., Mori H., Yamazaki K., Imaseki H., (1990), *Plant Cell Physiol.*, 31, 1016-1021.
16. Dong J. G., Kim W. T., Yip W. K., Thompson G. A., Li L., Bennett A. B., Yang S. F., (1992), *Planta*, 185, 38-45.
17. Rottmann W. H., Peter G. F., Oeller P. W., Keller J. A., Shen N. F., Nagy B. P., Taylor L. P., Campbell A. D., Theologis A., (1991), *J. Mol. Biol.*, 222, 937-961.
18. Yip W. K., Moore T., Yang S. F., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 2475-2479.
19. Cordes S., Deikmann J., Margossian L. J., Fischer R. L., (1989), *EMBO J.*, 7, 3315-3320.
20. Lincoln J. E., Campbell A. D., Oetiker J., Rottmann W. H., Oeller P. W., Shen N. F., Theologis A., (1993), *Biol. Chem.*, 267, 5964-5967.
21. Spanu P., Boller T., Kende H., (1993), *J. Plant Physiol.*, 141, 557-562.
22. Olson D. C., Oetiker J. H., Yang S. F., (1995), *J. Biol. Chem.*, 270, 14056-14061.
23. Oetiker J. H., Olson D. C., Shiu Q. Y., Yang S. F., (1997), *Plant Mol. Biol.*, 34, 275-286.
24. Oeller P. W., Li M. W., Taylor L. P., Pike D. A., Theologis A., (1991), *Science*, 254, 437-439.
25. Davies K. M., Grierson D., (1989), *Planta*, 179, 73-80.
26. Hamilton A. J., Bouzayen M., Grierson D., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 7434-7437.
27. John I., Drake R., Farrell A., Cooper W., Lee P., Horton P., Grierson D., (1995), *Plant J.*, 7, 483-490.
28. Hamilton A. J., Lycett G. W., Grierson D., (1990), *Nature*, 346, 284-287.
29. Picton S. J., Barton S. L., Bouzayen M., Hamilton A. J., Grierson D., (1993), *Plant Journal*, 3, 469-481.
30. Bouzayen M., Hamilton A. J., Picton S., Barton S., Grierson D., (1992) *Biochem. Soc. Trans.*, 20, 76-79.
31. Lasserre E., Bouguin T., Hernandez J. A., Bull J., Pech J.C., Balague C., (1996), *Mol. Genet.*, 251, 81-90.
32. Ayub R., Guis M., Ben Amor M., Gillot L., Roustan J. P., Latche A., Bouzayen M., Pech J. C., (1996), *Nature Biotechnology*, 14, 862-866.
33. van Altvorst A. C., Bovy A. G., Angenot G. C., Dons J. J. M., (1997), *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene*, Eds. A. K. Kanellis, C. Chang, H. Kende, D. Grierson, 34, 339-345, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
34. Penrose D. M., Glick B. R. (1997), *Indian J. Exp. Biol.*, 35, 1-17.
35. Klee H. J., Hayford M. B., Kretzer K. A., Barry G. F., Kishore G. M., (1991), *Plant Cell*, 3, 1187-1193.
36. Yang F. Y., Oetiker J. H. (1998), *J. Japan Soc. Hort. Sci.*, 67, 1209-1214.