



Rendiconti  
Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL  
*Memorie di Scienze Fisiche e Naturali*  
119° (2001), Vol. XXV, pp. 415-425

CLAUDIO BONGHI \* – PIETRO TONUTTI \* – ANGELO RAMINA \*

### **Aspetti genetici e molecolari della maturazione del frutto \*\***

La maturazione coincide con la fase finale dello sviluppo del frutto e da un punto di vista fisiologico presenta molte analogie con la senescenza. Si tratta di una sindrome fisiologica complessa, nel corso della quale il frutto è caratterizzato da alcuni processi chimico-fisici quali l'aumento del grado zuccherino, l'idrolisi dell'amido, la diminuzione di acidità, il rammollimento della polpa, lo sviluppo del colore e della componente aromatica, caratteri che in linea generale ne aumentano il grado di appetibilità. Nel corso della maturazione oltre a modificazioni con connotazioni positive il frutto acquisisce anche caratteristiche negative che si compendiano in un eccessivo rammollimento della polpa che rende problematica la manipolazione del prodotto, in una diminuzione del valore nutrizionale (diminuzione di antiossidanti), e, per certe tipologie di frutto, in un aumento del potenziale allergenico ed in una maggiore suscettibilità allo sviluppo di fisio- e fitopatie. Interventi di tipo biotecnologico possono essere indirizzati ad esaltare i caratteri positivi, ed a ridurre o annullare quelli negativi.

Utilizzando criteri tassonomici specifici i frutti vengono distinti in diverse tipologie, mentre da un punto di vista fisiologico si distinguono in climaterici e non climaterici. Nei primi, in prossimità della maturazione si ha un aumento della biosintesi di etilene e del ritmo respiratorio che raggiungono un massimo (climaterio) e quindi decadono, mentre nei frutti non climaterici si ha assenza del climaterio etilenico e di quello respiratorio. La maggior parte delle conoscenze di tipo genetico e molecolare sono relative ai frutti climaterici ed in particolare al pomodoro, e

\* Dipartimento di Agronomia ambientale e Produzioni vegetali, Università degli Studi di Padova.

\*\* Relazione presentata al Primo Convegno Nazionale della U.N.A.S.A. su «Biotecnologie agroalimentari, industriali, ambientali: problemi e prospettive», Roma, 1-2 ottobre 2001.

riguardano il rammollimento della polpa, lo sviluppo del colore, e la biosintesi e percezione dell'etilene.

#### *Metabolismo della parete cellulare e rammollimento della polpa*

Le poligalatturonasi (PG) rappresentano le idrolasi di parete maggiormente studiate in relazione alla maturazione. Ciò è dovuto al fatto che la loro attività aumenta in modo drammatico nel corso della maturazione del frutto di pomodoro [24]. L'analisi di piante transgeniche della stessa specie ha successivamente dimostrato che le PG da sole non sono in grado di controllare il processo del rammollimento [23, 46, 47]. Un loro coinvolgimento più diretto è stato ipotizzato nell'aumento della suscettibilità del frutto a fitopatie normalmente associate alla maturazione [33]. Altre idrolasi di parete studiate sono state le pectinmetilesterasi [PME, 53] e le endo- $\beta$ -1,4-glucanasi [10, 35]. Anche in questo caso l'analisi dei transgeni ha consentito di accertare che nessuno dei due enzimi è in grado di controllare da solo il rammollimento della polpa [26]. L'ipotesi formulata è che il processo implichi l'azione sequenziale di diversi enzimi che attaccano componenti specifici della parete cellulare. Non è da escludere infine che, in presenza di una famiglia multigenica, siano coinvolti geni frutto-specifici espressi esclusivamente nel corso della maturazione.

I risultati più interessanti nello studio della consistenza del frutto di pomodoro sono relativi alle espansine [14]. Si tratta di proteine strutturali di parete associate a numerosi tessuti e a diversi stadi di sviluppo, che vanno incontro a modificazioni rapide di dimensione e di forma. La repressione delle espansine di maturazione (*EXP1*) in pomodoro porta ad una riduzione del rammollimento della bacca. Al contrario, una sovrpressione dello stesso gene porta al risultato opposto [11].

Sulla base di tali risultati si è ipotizzato che le espansine svolgano un ruolo determinante nel controllo del processo di rammollimento; è da precisare tuttavia che il grado di consistenza della polpa viene oggi misurato con tecniche rudimentali (resistenza della polpa alla penetrazione) e che non sono in grado di cogliere singoli aspetti che, nel loro insieme, definiscono il rammollimento. È probabile che con la messa a punto di tecnologie più avanzate si riesca ad individuare dei parametri singoli in grado di valutare aspetti specifici che concorrono a definire la perdita di consistenza della polpa ed a precisare quindi il ruolo che le singole idrolasi di parete possono svolgere sulla evoluzione degli stessi parametri.

#### *Luce ed accumulo di carotenoidi nel frutto*

Gli studi condotti a livello molecolare in tale settore riguardanti quasi esclusivamente il pomodoro hanno messo in evidenza che la luce esercita il maggior effetto nello sviluppo della pigmentazione del frutto, mentre ha uno scarso effetto su altri aspetti della maturazione [2].

Il viraggio dal verde al rosso tipico del pomodoro è dovuto alla evoluzione dei cloroplasti in cromoplasti; parallelamente alla degradazione delle membrane fotosintetiche, si assiste ad una metabolizzazione della clorofilla ed a un accumulo di carotenoidi, tra cui il  $\beta$ -carotene ed il licopene [27]. La regolazione della sintesi di carotenoidi nel corso della maturazione del pomodoro [26, 37] e del melone [31] è controllata almeno in parte da geni legati alla maturazione ed indotti dall'etilene. Recentemente in pomodoro è stato isolato il gene codificante la licopene- $\epsilon$ -ciclasi che controlla il livello di  $\beta$ -carotene e licopene [44]. Ciò ha portato a chiarire le basi molecolari dei mutanti di pomodoro  $\beta$  (*beta*) e *cr* (*crimson*), caratterizzati per avere la pathway spostata verso un accumulo di  $\beta$ -carotene o fitoene, a secondo che si abbia una sovra- o sotto-espressione della ciclasi. Analisi genetiche condotte in peperone [52] indicano che numerosi loci responsabili della pigmentazione in pomodoro sono in esso conservati; è probabile che ciò accada anche in altre specie.

Una mutazione recessiva particolarmente interessante per l'accumulo dei carotenoidi è *high pigment-1* (*hp-1*). Tale mutazione in contrasto con la maggior parte delle altre mutazioni di pomodoro che interessano i carotenoidi, porta ad un aumento nell'accumulo di licopene e  $\beta$ -carotene, oltre che ad un più elevato livello di clorofilla negli organi verdi [54]. Recentemente è stata descritta una mutazione *hp-2* simile ad *hp-1*, ma a questa non allelica [55].

Semenzali di pomodoro omozigoti per l'allele *hp-1* mostrano una tendenza esagerata al de-eziolamento [42]. Tali semenzali (*hp-1/hp-1*) presentano una inibizione dell'allungamento dell'asse ipocotile ed un accumulo di antocianine. Il de-eziolamento è un processo controllato dal fitocromo (luce rossa), e che può essere accelerato da luce blu; ciò suggerisce che il mutante *hp-1* interagisce con l'azione recettoriale e/o trasduttiva del fitocromo e del criptocromo. La sovrpressione del fitocromo A di avena in pomodoro porta ad un fenotipo simile a quello del mutante *hp-1*, incluso un aumento di carotenoidi nel frutto maturo [9]. Il fenotipo *hp-1* risulta represso quando associato al mutante *aurea*, confermando il ruolo svolto da *hp-1* nelle risposte controllate dal fitocromo [41]. La quantificazione dei livelli di fitocromo in semenzali normali e *hp-1/hp-1* indica che le risposte di tipo fitocromico amplificate che si osservano nel mutante *hp-1* avvengono in un contesto di livello e stabilità della proteina cromofora del tutto normali. Ciò suggerisce che il prodotto del gene *HP-1* agisce come regolatore negativo del segnale trasduttivo del fitocromo. Tale ipotesi è compatibile con i risultati ottenuti in *Arabidopsis*, specie nella quale sono stati isolati e caratterizzati il maggior numero di geni coinvolti nella traduzione del segnale fotomorfogenetico [13]. I prodotti della maggior parte di tali geni funzionano da effettori negativi. Recentemente è stato dimostrato che il gene di pomodoro *hp-2* è omologo al gene *DE-ETIOLATED1* di *Arabidopsis*, coinvolto nella fotomorfogenesi [39, 40]. Questi risultati confermano il significato assolutamente generale del meccanismo trasduttivo della luce anche nell'accumulo dei pigmenti nel corso della maturazione, e suggerisce che una migliore comprensione di tali processi possa portare a migliorare in modo significativo il valore nutrizionale e la qualità dei frutti.

*Biosintesi dell'etilene e percezione del segnale ormonale*

All'etilene viene riconosciuto un ruolo fondamentale nella regolazione della sindrome della maturazione dei frutti climaterici. Tale ruolo è stato dimostrato in modo inequivocabile mediante l'introduzione dell'approccio genetico e molecolare nello studio della biosintesi, percezione e trasduzione dell'ormone [22, 30].

La biosintesi dell'etilene è catalizzata da due enzimi chiave, l'1-amminociclopropanocarbossilato (ACC) sintetasi (ACS) e l'ACC ossidasi (ACO). L'ACS catalizza la conversione di S-adenosilmetionina (AdoMet) ad ACC, mentre ACO regola la ossidazione di ACC ad etilene. Entrambi gli enzimi svolgono un ruolo regolativo e sono codificati da due famiglie multigeniche. La transizione dal sistema I, responsabile della produzione basale di etilene nelle parti vegetative della pianta e nei frutti in fase preclimaterica, al sistema II, presente nei frutti in fase climaterica e caratterizzato da una azione autocatalitica dell'ormone, sarebbe dovuta alla attivazione di geni specifici di ACS [7] e di ACO [8, 45], espressi esclusivamente in fase di maturazione.

La comprensione dei meccanismi di percezione e trasduzione dell'etilene deriva da studi condotti su mutanti di *Arabidopsis* [32, 48]. L'approccio genetico molecolare ha portato alla identificazione di geni coinvolti nella percezione dell'ormone (*ETR*, Ethylene Resistant ed *ERS*, Ethylene Receptor Sensor) e nella catena trasduttiva (*CTR*, Constitutive Triple Response ed *EIN*, Ethylene Insensitive). La delezione anche di un singolo amminoacido nella porzione recettoriale di *ETR* porta ad una perdita irreversibile di sensibilità all'etilene.

La delucidazione degli aspetti molecolari relativi alla biosintesi ed al metabolismo dell'ormone ha consentito di mettere a punto interventi di tipo biotecnologico, basati sulla sovrappressione o sottopressione di geni specifici. Tali interventi sono stati finalizzati prevalentemente alla riduzione del livello di etilene mediante la sottopressione dei geni di ACS ed ACO, o riducendo la disponibilità di AdoMet ed ACC, precursori dell'etilene, mediante la sovrappressione dei geni che codificano rispettivamente AdoMet idrolasi ed ACC deaminasi [26].

La riduzione del livello di etilene si è dimostrata una via più efficace nel controllo della maturazione nel suo complesso, rispetto alla riduzione dell'attività poligalatturonasica, via perseguita nella costituzione del primo pomodoro transgenico. Al momento attuale interventi biotecnologici sul sistema di percezione dell'ormone appaiono più problematici, probabilmente per la ridondanza del sistema recettoriale.

La possibilità di controllare per via biotecnologica la maturazione del frutto e di modificarne le caratteristiche qualitative, nutrizionali e salutistiche è appena agli albori. I risultati ottenuti manipolando la via biosintetica e di percezione dell'etilene possono costituire esempi paradigmatici, che mettono in evidenza come la comprensione dei meccanismi regolativi di un fenomeno sia la premessa indispensabile per mettere a punto interventi biotecnologici mirati in grado di controllarlo, riducendo al minimo effetti collaterali non desiderati.

*Verso un modello comune di regolazione della maturazione climaterica e non-climaterica*

La sottoppressione dei geni di ACS e di ACO, unitamente alla manipolazione del sistema recettoriale, se da una parte hanno consentito di precisare il ruolo che l'etilene svolge sulla maturazione, hanno messo in evidenza che esistono aspetti della maturazione climaterica che sono etilene indipendente. D'altra parte l'etilene esogeno è in grado di stimolare la colorazione dell'albedo nell'arancia, tipico frutto non climaterico [3]. Inoltre, molti dei processi che concorrono a definire la maturazione di frutti climaterici e non climaterici sono gli stessi, anche se presentano pattern regolativi differenti. Sulla base di tali considerazioni e tenendo conto del discreto grado di omologia che si riscontra a livello genetico tra le diverse tipologie di frutto, si potrebbe ipotizzare che i due modelli fisiologici di maturazione climaterica e non climaterica derivino da un modello di regolazione comune che si è evoluto nel corso della filogenesi e del processo di addomesticamento [15, 21, 38].

Tale ipotesi potrebbe essere verificata su pomodoro, *Arabidopsis* e fragola, i cui frutti si pongono come altrettanti modelli rappresentativi di programmi di sviluppo e maturazione specifici. Inoltre, per la facilità di trasformazione e rigenerazione tutte le specie, mediante integrazione stabile di transgeni, possono essere utilizzate in studi di genomica funzionale.

Il pomodoro, per la sua importanza economica e duttilità, è stato utilizzato come modello per lo studio della maturazione dei frutti climaterici. Da un punto di vista genetico esso presenta il vantaggio di possedere un genoma relativamente piccolo (0,9 pg/genoma apolide, [6]) e sono disponibili più di 1000 marker molecolari, con una spaziatura genetica inferiore a 2cM [51]. La mappa genetica conseguente è risultata particolarmente utile per l'identificazione e localizzazione di QTL con loci che controllano lo sviluppo, la maturazione e la qualità del frutto [12, 16, 25, 34]. È in allestimento con fondi messi a disposizione dalla National Science Foundation USA un database che comprenderà 30.000 sequenze allestite da frutti in diverse fasi dello sviluppo, delle quali si presume che circa 1000 siano non ridondanti e specifiche del frutto. Inoltre, agli approcci molecolari sopra ricordati, nel caso del pomodoro il miglioramento genetico e la mutagenesi hanno portato ad un ampliamento del germoplasma, nell'ambito del quale sono disponibili geni che influenzano aspetti molteplici dello sviluppo e della maturazione del frutto. L'introggressione di tipi selvatici in varietà coltivate potrà portare alla costituzione di linee fenotipiche varianti anche per aspetti che riguardano lo sviluppo e la maturazione del frutto [17].

*Arabidopsis* si pone come modello insuperato per lo studio oltre che di tutti gli aspetti genetici e molecolari della pianta, anche di quelli che riguardano lo sviluppo del frutto deiscete. Sfruttando programmi di mutagenesi di vaste proporzioni e studi di genomica funzionale, recentemente è stato possibile individuare geni del tipo MADS-box, simili ad *AGAMOUS* (*AGL*), che controllano diversi aspetti dello sviluppo e della maturazione della siliqua [19].

Tra i frutti non climaterici quello che si presta maggiormente ad essere assunto come modello è la fragola. Lo screening differenziale ha portato infatti alla identificazione di numerosi geni legati alla maturazione. Più recentemente utilizzando la tecnica dei microarrays sono stati identificati geni che controllano lo sviluppo delle caratteristiche aromatiche [1].

L'identificazione di elementi genetici di regolazione comuni a frutti climaterici e non-climaterici rappresenta una tappa fondamentale per la comprensione della maturazione. Gli stessi elementi potrebbero essere condivisi o in qualche modo collegati a quelli che regolano la maturazione dei frutti deiscenti. Anche se tali elementi regolativi comuni rimangono per lo meno elusivi, i geni che controllano lo sviluppo della siliqua di *Arabidopsis*, e tra questi quelli che codificano per fattori di trascrizione della famiglia MADS-box [19], potrebbero costituire punti di partenza per la ricerca di meccanismi di controllo comuni. A tale riguardo la espressione ectopica (nei sepali) del gene *AGAMOUS* di pomodoro (*TAG1*) normalmente espresso nel carpello, determina l'evoluzione dei sepali in organi carnosì, l'instaurarsi di un metabolismo parietale tipico della bacca in maturazione e l'accumulo di carotenoidi [29]. Tali risultati potrebbero indicare che *TAG1* funziona come fattore di controllo ridondante della maturazione. In alternativa, *TAG1* potrebbe non regolare la maturazione in vivo, ma mimare, quando sovraespresso nei sepali, l'azione di un gene regolatore specifico, con struttura simile ad *AGAMOUS*. L'individuazione di altri mutanti di pomodoro con maturazione bloccata ed insensibili all'etilene (*nor* e *rin*), potrà costituire un'altra via per la ricerca di elementi regolativi comuni alla maturazione climaterica e non-climaterica.

#### *Analisi molecolare dello sviluppo del frutto*

In figura 1 sono riportati i geni che regolano lo sviluppo e la maturazione di diverse tipologie di frutto. I geni omeotici della fioritura, quali i geni MADS-box *AGAMOUS* e *SQUAMOSA* di *Arabidopsis*, rappresentano determinanti molecolari per lo sviluppo degli organi fiorali, compresi i carpelli. L'analisi molecolare dei 45 geni MADS-box di *Arabidopsis* [5], ha portato alla individuazione di membri con attività frutto specifica. I geni MADS-box sono caratterizzati dalla presenza di un dominio altamente conservato, denominato MADS-box, seguito da tre domini (I, K e C) meno conservati. I domini I e K sarebbero coinvolti nella formazione di omo-etero-dimeri con altre proteine MADS, mentre il dominio C, il più variabile, sarebbe responsabile della specificità funzionale [43]. L'inattivazione del gene MADS-box *FRUITFUL* porta alla produzione di una siliqua che non si espande interamente, anche se non esercita alcun effetto sullo sviluppo del seme [28]. Altri due geni simili ad *AGAMOUS* (*AGL1* e *AGL5*), e recentemente ridenominati *SHATTERPROOF 1* (*SHP1*) e *SHATTERPROOF2* (*SHP2*), controllano la formazione dello strato di separazione cellulare responsabile della deiscenza della siliqua [36]. *SHP1* ed *SHP2* sono negativamente regolati da *FRUITFUL* [18]. Fattori

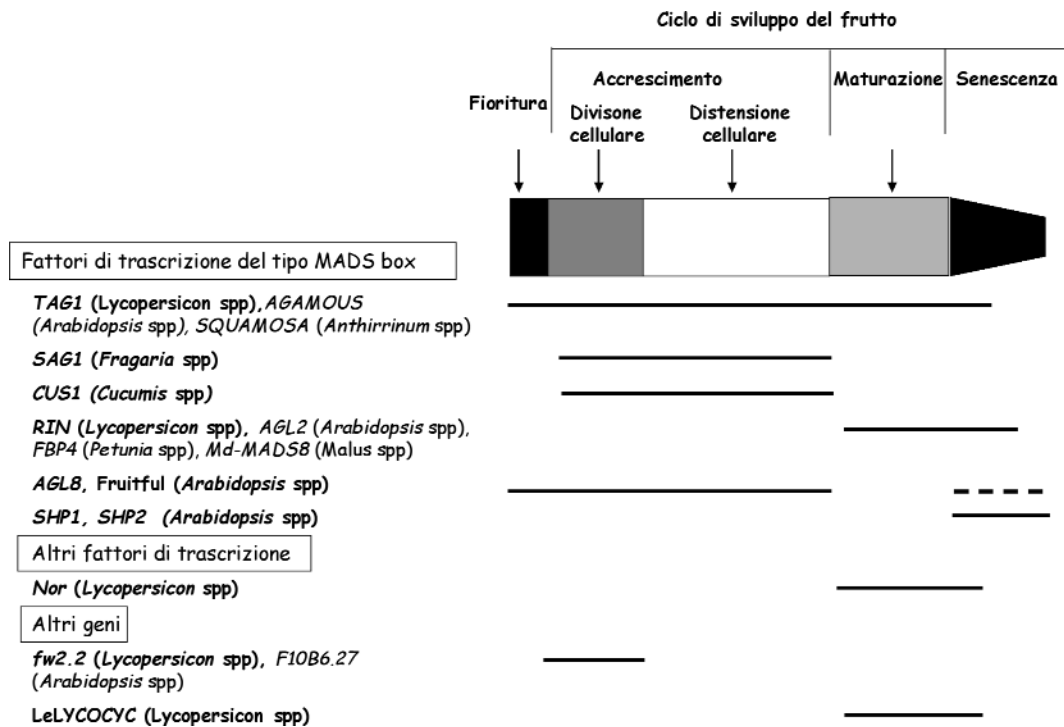


Fig. 1. L'analisi genetica ha consentito di individuare in differenti tipologie di frutto numerosi geni, alcuni dei quali codificano per fattori di trascrizione. *In alto* sono schematizzate le diverse fasi del ciclo di sviluppo del frutto, mentre *a sinistra* sono riportati i geni con probabile funzione regolativa. A fianco di ogni gene (carattere in grassetto) sono riportati eventuali geni ad esso ortologhi (carattere normale). La linea continua indica le fasi dello sviluppo in cui il gene è espresso mentre quella tratteggiata, un suo eventuale controllo indiretto.

di regolazione del tipo MADS-box controllano lo sviluppo del frutto anche in pomodoro, melo, fragola e nelle cucurbitacee [49, 50, 56, 20].

In pomodoro attraverso la individuazione di QTLs che controllano aspetti della qualità e della maturazione del frutto, e la selezione di linee quasi isogeniche – nearly isogenic lines (NILs) – per il tratto considerato è stato possibile individuare un locus *fruit weight 2.2* (*fw 2.2*) che controlla la massa del frutto attraverso una modulazione della divisione cellulare a livello del carpello in fase di pre-antesi [4]. Tenendo conto che il gene *fw2.2* agisce come regolatore negativo del fenomeno, nel corso del processo di addomesticamento della specie è stato operata una selezione verso le forme alleliche più deboli il che ha consentito di incrementare notevolmente la massa della bacca. Omologhi del gene *fw2.2* sono presenti anche in *Arabidopsis*; rimane tuttavia da dimostrare se anche nella stessa specie tali geni controllano la massa o altri aspetti dello sviluppo del frutto, e come interagiscono con i geni MADS-box specifici.

### *Conclusioni*

Le indagini molecolari condotte sullo sviluppo e la maturazione del frutto, unitamente alla messa a punto recente di tecniche di genomica comparata e funzionale, lasciano intravedere sviluppi significativi del settore nei prossimi anni.

Nel decennio trascorso sono stati chiariti in modo definitivo la biosintesi dell'etilene, la sua percezione e il suo meccanismo di azione, unitamente ad aspetti del metabolismo della parete cellulare e di variazioni della consistenza della polpa associati alla maturazione.

Più recentemente, la caratterizzazione dei geni più importanti coinvolti nella biosintesi dei carotenoidi unitamente alla definizione dell'azione che la luce svolge sulla maturazione potranno consentire di modificare la qualità del frutto migliorandone anche le caratteristiche nutrizionali. È da precisare che anche in tale settore, analogamente a quanto è successo per l'etilene, i maggiori risultati saranno conseguenti solo ad una più completa comprensione delle basi regolative di tali processi.

L'adozione di approcci di tipo genomico e proteomico consentirà inoltre di chiarire il grado di inter-regolazione e di sinergia che esiste tra i diversi processi che insieme concorrono a definire la sindrome della maturazione, aspetti questi che rimangono a tutt'oggi quasi del tutto sconosciuti. Infine, altri indirizzi della futura attività di ricerca riguarderanno lo studio delle fasi iniziali dello sviluppo del frutto, l'identificazione di meccanismi di regolazione comuni a frutti climaterici e non-climaterici, unitamente alla caratterizzazione da un punto di vista molecolare di tratti distintivi discreti, caratteristici della maturazione dei frutti delle singole specie.



BIBLIOGRAFIA

- [1] Aharoni A., Keizer L.C.P., Bouwmeester H.J., Sun Z., Alvarez H.M., *et al.* (2000). Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell*, 12, 647-61.
- [2] Alba R., Cordonnier-Pratt M.M. & Pratt L.H. (2000). Fruit-localized phytochromes regulate lycopene accumulation independently of ethylene production in tomato. *Plant Physiol.*, 123, 363-70.
- [3] Alonso J.M., Chamaro J. & Granell A. (1995). Evidence for the involvement of ethylene in the expression of specific RNAs during maturation of the orange, a non-climacteric fruit. *Plant Mol. Biol.*, 29, 385-90.
- [4] Alpert K.B., Grandillo S. & Tanksley S.D. (1995). Fw2.2: a major QTL controlling fruit weight is common to both red- and green fruited tomato species. *Theor. Appl. Genet.*, 91, 994-1000.
- [5] Alvarez-Buylla E.R., Pelaz S., Liljegren S.J., Gold S.E., Burgeff C., *et al.* (2000). An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 5328-33.
- [6] Arumuganathan K. & Earle E. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 9, 208-18.
- [7] Barry C.S., Llop-Tous I. & Grierson D. (2000). The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. *Plant Physiol.*, 123, 979-86.
- [8] Blume B. & Grierson D. (1997). Expression of ACC oxidase promoter-GUS fusions in tomato and *Nicotiana plumbaginifolia* regulated by developmental and environmental stimuli. *Plant J.*, 12, 731-46.
- [9] Boylan M.T. & Quail P.H. (1989). Oat phytochrome is biologically active in transgenic tomatoes. *Plant Cell*, 1, 765-73.
- [10] Brummell D.A., Hall B.D. & Bennett A.B. (2000). Antisense suppression of tomato endo-1,4-beta-glucanase Cel2 mRNA accumulation increases the force required to break fruit abscission zones but does not affect fruit softening. *Plant Mol. Biol.*, 40, 615-22.
- [11] Brummell D.A., Harpster M.H., Civello P.M., Palys J.M., Bennett A.B. & Dunsmuir P. (1999). Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *Plant Cell*, 11, 2203-16.
- [12] Bucheli P., Voirol E., De La Torre R., Lopez J., Rytz A., *et al.* (1999). Definition of volatile markers for flavor of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as tools in selection and breeding. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 659-64.
- [13] Chory J. (1993). Out of darkness: mutants reveal pathways controlling light regulated development in plants. *Trends Genet.*, 9, 167-72.
- [14] Civello P.M., Powell A.L.T., Sabehat A. & Bennett A.B. (1999). An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. *Plant Physiol.*, 121, 1273-79.
- [15] Clough S.J. & Bent A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 16, 735-43.
- [16] Doganlar S., Tanksley S.D. & Mutschler M.A. (2000). Identification and molecular mapping of loci controlling fruit ripening time in tomato. *Theor. Appl. Genet.*, 100, 249-55.
- [17] Eshed Y. & Zamir D. (1994). A genomic library of *Lycopersicon pennellii* in *L. esculentum*: a tool for fine mapping of genes. *Euphytica*, 79, 175-79.
- [18] Ferrandiz C., Liljegren S.J. & Yanofsky M.F. (2000). Negative regulation of the SHATTER-PROOF genes by FRUITFULL during Arabidopsis fruit development. *Science*, 289, 436-38.

- [19] Ferrandiz C., Pelaz S. & Yanofsky M.F. (1999). Control of carpel and fruit development in Arabidopsis. *Annu. Rev. Biochem.*, 99, 321-54.
- [20] Filipecki M.K., Sommer H. & Malepszy S. (1997). The MADS-box gene *CUS1* is expressed during cucumber somatic embryogenesis. *Plant Sci.*, 125, 63-74.
- [21] Fillatti J., Kiser J., Rose B. & Comai L. (1987). Efficient transformation of tomato and the introduction and expression of a gene for herbicide tolerance. In *Tomato Biotechnology*, ed. D. Nevins, R. Jones, pp. 199-210. New York: Liss.
- [22] Fluhr R. & Mattoo A.K. (1996). Ethylene: biosynthesis and perception. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 15, 479-523.
- [23] Giovannoni J.J., Della Penna D., Bennett A.B. & Fischer R.L. (1989). Expression of a chimeric polygalacturonase gene in transgenic rin (ripening inhibitor) tomato fruit results in polyuronide degradation but not fruit softening. *Plant Cell*, 1, 53-63.
- [24] Giovannoni J.J., Della Penna D., Bennett A. & Fischer R. (1991). Polygalacturonase and tomato fruit ripening. *Hortic. Rev.*, 13, 67-103.
- [25] Grandillo S., Ku H.M. & Tanksley S.D. (1999). Identifying the loci responsible for natural variation in fruit size and shape in tomato. *Theor. Appl. Genet.*, 99, 978-87.
- [26] Gray J.E., Picton S., Giovannoni J.J. & Grierson D. (1994). The use of transgenic and naturally occurring mutants to understand and manipulate tomato fruit ripening. *Plant Cell Environ.*, 17, 557-71.
- [27] Grierson D., Purton M., Knapp J. & Bathgate B. (1987). *Tomato ripening mutants. Developmental Mutants in Higher Plants*, ed. H. Thomas, D. Grierson, pp. 73-94. London: Cambridge Univ. Press.
- [28] Gu Q., Ferrandiz C., Yanofsky M.F. & Martienssen R. (1998). The fruitfull MADS-box gene mediates cell differentiation during Arabidopsis fruit development. *Development*, 125, 1509-17.
- [29] Ishida B.K., Jenkins S.M. & Say B. (1998). Induction of AGAMOUS gene expression plays a key role in ripening of tomato sepals in vitro. *Plant Mol. Biol.*, 36, 733-39.
- [30] Johnson P.R. & Ecker J.R. (1998). The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. *Annu. Rev. Genet.*, 32, 227-54.
- [31] Karvouni Z., John I., Taylor J.E., Watson C.F., Turner A.J. & Grierson D. (1995). Isolation and characterisation of a melon cDNA clone encoding phytoene synthase. *Plant Mol. Biol.*, 27, 1153-62.
- [32] Kieber J.J. (1997). The ethylene response pathway in Arabidopsis. *Annu. Rev. Plant Physiol., Plant Mol. Biol.*, 48, 277-96.
- [33] Kramer M., Sanders R., Sheehy R., Melis M., Kuehn M. & Hiatt W. (1990). Field evaluation of tomatoes with reduced polygalacturonase by antisense RNA. In *Horticultural Biotechnology*, ed. A. Bennett, S. O'Neill, pp. 347-55. New York: Liss.
- [34] Ku H.M., Doganlar S., Chen K.Y. & Tanksley S.D. (1999). The genetic basis of pear-shaped tomato fruit. *Theor. Appl. Genet.*, 99, 844-50.
- [35] Lashbrook C.C., Giovannoni J.J., Hall B.D., Fischer R.L. & Bennett A.B. (1998). Transgenic analysis of tomato endo-beta-1,4-glucanase gene function. Role of cell1 in floral abscission. *Plant J.*, 13, 303-10.
- [36] Liljegren S.J., Ditta G.S., Eshed Y., Savidge B., Bowman J.L. & Yanofsky M.F. (2000). SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in Arabidopsis. *Nature*, 404, 766-70.
- [37] Lois L.M., Rodriguez C.M., Gallego F., Campos N. & Boronat A. (2000). Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-Dxylulose 5-phosphate synthase. *Plant J.*, 22, 503-13.
- [38] Mathews H., Wagoner W., Kellogg J. & Bestwick R. (1995). Genetic transformation of strawberry: stable integration of a gene to control biosynthesis of ethylene. *In Vitro. Cell. Dev. Biol. Plant*, 31, 36-43.

- [39] Mustilli A.C., Fenzi F., Ciliento R., Alfano F. & Bowler C. (1999). Phenotype of the tomato high pigment-2 mutant is caused by a mutation in the tomato homolog of *DEETIOLATED1*. *Plant Cell*, 11, 145-57.
- [40] Pepper A., Delaney T., Washburn T., Poole D. & Chory J. (1994). *DET1*, a negative regulator of light-mediated development and gene expression in Arabidopsis, encodes a novel nuclear-localized protein. *Cell*, 78, 109-16.
- [41] Peters J.L., Schreuder M.E.L., Verduin S.J.W. & Kendrick R.E. (1992). Physiological characterization of a high-pigment mutant of tomato. *Photochem. Photobiol.*, 56, 75-82.
- [42] Peters J.L., van Tuinen A., Adamse P., Kendrick R.E. & Koornneef M. (1989). High pigment mutants of tomato exhibit high sensitivity for phytochrome action. *J. Plant Physiol.*, 134, 661-66.
- [43] Riechmann J.L., Krizek B.A. & Meyerowitz E.M. (1996). Dimerization specificity of Arabidopsis MADS domain homeotic proteins *APETALA1*, *APETALA3*, *PISTILLATA*, and *AGAMOUS*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 4793-98.
- [44] Ronen G., Carmel G.L., Zamir D. & Hirschberg J. (2000). An alternative pathway to beta-carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of Beta and old-gold color mutations in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 11102-7.
- [45] Ruperti B., Bonghi C., Rasori A., Ramina A. & Tonutti P. (2001). Characterization and expression of two members of the peach 1-aminocyclopropane carboxylate oxidase gene family. *Physiol. Plantarum*, 111, 336-44.
- [46] Sheehy R., Kramer M. & Hiatt W. (1988). Reduction of polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 8805-9.
- [47] Smith C., Watson C., Ray J., Bird C., Morris P., et al. (1988). Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Nature*, 334, 724-26.
- [48] Stepanova A.N. & Ecker J.R. (2000). Ethylene signalling: from mutants to molecules. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 3, 353-60.
- [49] Sung S.K., An G. (1997). Molecular cloning and characterization of a MADS-Box cDNA clone of the Fuji apple. *Plant Cell Physiol.*, 38, 484-89.
- [50] Sung S.K., Yu G.H., Nam J., Jeong D.H. & An G. (2000). Developmentally regulated expression of two MADS-box genes, *Md-MADS3* and *MdMADS4*, in the morphogenesis of flower buds and fruits in apple. *Planta*, 210, 519-28.
- [51] Tanksley S.D., Ganai M.W., Prince J.P., de Vicente M.C., Bonierbale M.W., et al. (1992). High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics*, 132, 1141-60.
- [52] Thorup T.A., Tanyolac B., Livingstone K.D., Popovsky S., Paran I. & Jahn M. (2000). Candidate gene analysis of organ pigmentation loci in the *Solanaceae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 11192-97.
- [53] Tieman D.M., Harriman R.W., Ramamohan G. & Handa A.K. (1992). An antisense pectin methylesterase gene alters pectin chemistry and soluble solids in tomato fruit. *Plant Cell*, 4, 667-79.
- [54] van Tuinen A., Cordonnier-Pratt M.M., Pratt L.H., Verkerk R., Zabel P. & Koornneef M. (1997). The mapping of phytochrome genes and photomorphogenic mutants of tomato. *Theor. Appl. Genet.*, 94, 115-22.
- [55] Wann E.V., Jourdain E.L., Pressey R. & Lyon B.G. (1985). Effect of mutant genotypes hp og<sup>c</sup> and dg og<sup>c</sup> on tomato fruit quality. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 110, 212-15.
- [56] Yao J.L., Kvarnheden A. & Morris B. (1999). Seven MADS-box genes in apple are expressed in different parts of the fruit. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 124, 8-13.