



(19) **HU**

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG
Magyar Szabadalmi Hivatal

(11) Lajstromszám: **226 212**

(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 00 02903**

(22) A bejelentés napja: **1998. 05. 29.**

(40) A közzététel napja: **2000. 12. 28.**

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2008. 06. 30.**

(51) Int. Cl.: **A01H 1/00** (2006.01)

C07K 14/01 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 5/04 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/EP 98/03215

(87) A nemzetközi közzétételi szám: **WO 9854961**

(30) Elsőbbségi adatok:

08/867,869 1997. 06. 02. US

(73) Jogosult:

Syngenta Participations AG, Basel (CH)

(72) Feltaláló:

**Hansen, Genevieve, Durham,
North Carolina (US)**

(74) Képviselő:

**Parragh Gáborné dr., S. B. G. & K. Budapesti
Nemzetközi Szabadalmi Iroda, Budapest**

(54)

Növénytranszformációs módszerek

(57) Kivonat

A találmány tárgyát növények, különösen a *Gramineae* családba tartozó növények javított transzformálási eljárása képezi *Agrobacterium*mal olyan körülmények között, mely meggátolja az *Agrobacterium* által kiváltott nektrózist (AIN). A transzformálást egy olyan szer jelenlétében hajtják végre, mely gátolja az AIN-t és/vagy egy olyan *Agrobacterium* törzs alkalmazásával, mely nem indukál nektrózist.

A találmány magában foglalja a heterológ AIN-szekvenciát tartalmazó növényeket, növényi sejteket és szöveteket, valamint a transzformálásnál alkalmazható, AIN-gátló szert tartalmazó tenyésztőközeget is.

A találmány tárgyát képezik az AIN-t nem vagy csak kismértékben kiváltó *Agrobacterium* törzsek és előállításuk is.

HU 226 212 B1

A találmány növények transzformálási eljárására vonatkozik *Agrobacterium* alkalmazásával, a transzformálást egy olyan szer jelenlétében hajtjuk végre, mely gátolja az *Agrobacterium* által kiváltott nektrózt és/vagy egy olyan *Agrobacterium* törzs alkalmazásával hajtjuk végre, mely nem indukál nektrózt.

Az idegen genetikai anyag növényekbe juttatásának első módszere, mely még mindig a leggyakrabban használt módszerek egyike, az *Agrobacterium spp.* természetes transzformációs rendszerét használja fel rekombináns Ti (tumorindukáló) vagy Ri (gyökérindukáló) plazmidokat alkalmazva, melynél a T-DNS tartalmazza a kívánt gént. A kívánt gén a növény genetikai anyagába ugyanolyan mechanizmussal épül be, mint ami az onkogének vagy opinbioszintézis-gének beépítésére szolgáló természetes rendszerben alkalmazásra kerül.

Míg az *Agrobacterium*-transzformáció azokban a növényekben jól működik, melyeket az *Agrobacterium* természetesen is fertőz és transzformál a természetben, hogy tumorokat és/vagy hajszálygyökereket képezzen, más növényekben nem működik jól. Például a pázsitfűvek családjának (Gramineae) tagjairól, mint például a kukoricáról tudjuk, hogy nem képeznek tumort amikor *Agrobacterium*mal fertőződnek, és általánosan bizonyított, hogy nagymértékben ellenállnak az *Agrobacterium*-transzformációnak. Ishida és munkatársai [Nature Biotechnology 14, 745–750 (1996)] egy adott kukoricavonaltól (A188) és hibridjeiből származó embriók transzformálásáról számolnak be „szuperbináris” vektorokkal rendelkező *Agrobacterium*ot alkalmazva, de ezeknek az eredményeknek a reprodukálhatósága, és ennek a rendszernek az alkalmazhatósága más kukoricavonalaknál és/vagy más vektorokat hordozó *Agrobacterium*ot alkalmazva nem tisztázott. Beszámoltak már kukorica olyan *Agrobacterium*-transzformációjáról is, melynél célszövetként az apikális merisztémát használták, viszont az apikális merisztéma célszövetként kevésbé alkalmas összehasonlítva például az embriogén kallusszal, és ezért ez a módszer nem annyira optimális. Bár néhány kétszíkű növény, mint például a szőlő, szója vagy paprika a természetben fogékony az *Agrobacterium*-fertőzésre és a tumorképzésre, transzformálásuk laboratóriumi körülmények között nehéznek bizonyult, mivel úgy tűnik, hogy a transzformációhoz és regenerációra szolgáló célszövet gyengén választ az *Agrobacterium*-fertőzésre. Az, hogy az *Agrobacterium*-fertőzéssel és -tumorképzéssel szembeni rezisztencia mechanizmusait nem értjük, megakadályozza, hogy megtaláljuk a megoldást, vagy akárcsak helyesen megbecsüljük az *Agrobacterium*-transzformáció problémáját az *Agrobacterium*-transzformációnak ellenálló növényekben, mint például a Gramineae-ban.

Meglepő módon felismertük, hogy az *Agrobacterium* képes apoptotikus nektrózt indukálására a növényi sejtekben, különösen a Gramineae családban, például kukoricában. Olyan eljárásokat is kidolgoztunk, melyekkel nektrózt kiváltására kevésbé kompetens *Agrobacterium*ok szelektálhatók és hozhatók létre, va-

lamint eljárásokat dolgoztunk ki a nektróztos válaszok gátlására a transzformálandó sejtekben.

Úgy tűnik, hogy az *Agrobacterium*-fertőzéskor a nektrózt a Gramineae-sejtenyészeten egy programozott sejthalál, mellyel a sejt, nyilvánvalóan egy szignáltranszdukciós mechanizmuson keresztül, saját halálát irányítja. Ez különbözik a passzív sejthaláltól, azaz a nektróztól, mely a membrán épségének felbomlásából és ezt követő duzzadásból áll, és lízist eredményez, például ahogy a különböző toxikus kezeléseknél látható. A programozott sejthalálon áteső sejtek jellegzetes morfológiai változásokat és DNS-fragmentációt mutatnak, melyek együttesen az apoptózis folyamatát határozzák meg, és ez egy olyan mechanizmuson keresztül hajtódik végre, mely *de novo* génexpressziót foglal magában. Az apoptózis állati sejteknél leírt sztereotíp jellemzői a zsugorodás, a sejt-sejt kapcsolat elvesztése a szervezett szövetekben, a sejtmag és a kromatin kondenzációja, a DNS fragmentációja (DNS „laddering”), és sejtmag- és membránhólyagosodás. Kimutattuk, hogy az *Agrobacterium* együtt tenyésztése kukorica- vagy búzaszövetekkel egy olyan folyamatot eredményez, mely erősen analóg az állati sejtekben előforduló apoptózissal, ahol a sejthalált a DNS oligonukleoszomális fragmentumokká hasadása és meghatározott morfológiai változások jellemzik. *Agrobacterium*-fertőzésnek kitett kukoricasejteknél a Ca^{2+} megnöveli a DNS-fragmentációt, míg a Zn^{2+} -nak ellenkező hatása van, mely párhuzamban áll az állati sejtekben ezeknek a kétértékű kationoknak a DNS-hasításért felelős endogén endonukleázokra gyakorolt hatásával az apoptózis alatt. Ezt a fragmentációt cikloheximid hozzáadása is megnöveli, mely bizonyítja, hogy a folyamat *de novo* génexpressziót igényel. Eddig még nem számoltak be programozott sejthalálról az *Agrobacterium*-fertőzésre adott válaszban.

Továbbá azt is felismertük, hogy a Gramineae-ban megfigyelt *Agrobacterium* által kiváltott nektrózt (AIN) AIN-gátló szerekkel, kémiai vegyületekkel, mint például ezüst-nitráttal, vagy a transzformálandó sejtbe stabilan integrált vagy átmenetileg működőképes nukleotidszekvenciákkal gátolható. *Agrobacterium*-gyűjtemény szűrésével azt is felismertük, hogy az *Agrobacterium* törzseknek változik a nektrózt kiváltási képességük, így kiválaszthatók azok a törzsek, melyek alkalmasak az ellenálló növények, mint például Gramineae transzformálására.

Következésképpen a találmány a következő, különböző megvalósítási módokat foglalja magában:

1. Eljárás növényi sejt transzformálására egy kívánt génnel, mely eljárás során az említett növényi sejtet *Agrobacterium*-fertőzésnek tesszük ki olyan körülmények között, mely meggátolja az AIN-t, azaz egy AIN-gátló szer vagy hősokk-kezelés jelenlétében, ahol az említett *Agrobacterium* egy vagy több kívánt gént tartalmazó plazmidot (vektort) tartalmaz.

1.1. Az előbb említett eljárás egyik megvalósítási módjában az AIN-gátló szer egy kémiai inhibitor. A kémiai inhibitor előnyösen a következőkből álló csoportból kiválasztott vegyület: etiléninhibitorok (például 2,5-

norbornadién, norbornén, ezüst-tioszulfát, és ezüst-nitrát), etilénszintézis-inhibitorok (például amino-etoxi-vinil-glicin (AVG), kobalt sók, acetil-szalicilsav vagy szalicilsav), gibberelinantagonisták (például abszcizinsav (ABA) és foszfatázinhibitorok (például okadainsav). Még előnyösebben a kémiai inhibitor egy etiléninhibitor, előnyösen ezüst-nitrát. A fehérjék és peptidok is működhetnek kémiai inhibitorokként. Természetben előforduló fehérjék például a DAD-1, az apoptózis bakulovírusinhibitorai (IAP-ok), bakulovírus p35, vagy az apoptózis kiváltására képes kaszpázok szintetikus peptidanalógjai. Egy kémiai inhibitor alkalmasan hatásos koncentrációban van jelen, például az ezüst-nitrát 0,1–20 mg/l, előnyösen 1–10 mg/l koncentrációban.

1.2.1. Ennek az eljárásnak egy alternatív megvalósítási módjában az AIN-gátló szer egy nukleotidszekvencia. Az AIN-gátló nukleotidszekvencia az AIN-t közvetlenül vagy egy AIN-gátló fehérjét kódoló AIN-gátló mRNS-t kódolva gátolhatja. Például ez egy antiszensz oligonukleotid vagy egy antiszensz mRNS-t kódoló gén lehet, mely antiszensz egy nekrozissal kapcsolatos enzimet (például proteázt, kinázt vagy foszfatázt) vagy szabályozófehérjét kódoló génnel. Alternatív lehetőségként egy olyan gén kódoló régióját tartalmazhatja, mely képes az apoptózis gátlására egy növényekben expresszálni képes promoter szabályozása alatt, például egy növényi expresszióra képes promoter által szabályozott emlős bcl-1 gén kódoló régiója, egy bakulovírusból származó apoptózisgátló gén kódoló régiója, mint például p35 vagy pIAP, vagy egy, a növényben a betegségválaszt gátolni képes gén, például nahG, dad-1 vagy mlo. Az AIN-gátló fehérjét kifejező AIN-gátló nukleotidszekvenciát adott esetben a gazdanövényben való expresszióhoz adaptálhatjuk ugyanezt a fehérjét kódoló szintetikus nukleotidszekvencia készítésével, de olyan kodonokat alkalmazva, melyeket a gazdanövény előnyben részesít, és elkerülve azokat a nukleotidszekvenciákat, melyek hatással vannak az optimális expresszióra a növényi gazdában, ilyenek például a poliadetilációs szignálók vagy a kódoló régió belüli splice helyek. Ezt az eljárást például az US 5 380 831 vagy US 5 610 042 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban leírt módszerekkel analóg módon hajthatjuk végre.

1.2.2. Az AIN-gátló nukleotidszekvencia a transzformálandó növény genomjába stabilan beépülhet, vagy átmenetileg lehet jelen, és azon időpont körül lehet működőképes, amikor a sejtet az *Agrobacterium*-fertőzésnek kitesszük. Átmeneti expressziót érhetünk el egy olyan agroinfekciós rendszert alkalmazva, amelyben a T-DNS egymás után két geminivírust hordoz, úgyhogy az AIN-gátló nukleotidszekvenciát hordozó virális replikon a sejtben replikálódhat. Ebben a rendszerben a vírus jellemzően nem integrálódik a növényi genomba, de nagy számban replikálódik, és magas szintű átmeneti expressziót biztosít. A sejteket, melyeket előkezeltünk abból a célból, hogy rezisztensek legyenek a nekrozissal szemben, ezután a kívánt gént tartalmazó Ti plazmidokkal rendelkező *Agrobacterium*-ot alkalmazva transzformálhatjuk, és a kívánt gén

a genomba fog integrálódni, míg a vírus a regeneráció során kihígul, és nem fog átjutni a magba. Így a fertőzött növény utódai és leszármazottai stabilan transzformáltak a kívánt génnel, de az AIN-gátló nukleotidszekvenciával nem. Átmeneti expresszió érhető el alternatív módon rövid AIN-gátló oligonukleotidszekvenciák, például antiszensz szekvenciák beépítésével a növénybe.

1.3. Egy további alternatív megvalósítási módban az AIN-t a transzformálandó növényi szövet hősokk-kezelésével csökkentjük vagy gátoljuk, mielőtt az *Agrobacterium*-mal együtt tenyésztjük. A hősokk-kezelést 40–50 °C-on, előnyösen 42–48 °C-on hajtjuk végre, kukoricánál az előnyös hőmérséklet 45 °C. A kezelés 2–10 percig és előnyösen 4–8 percig tart.

2. Eljárás fertilis, transzgenikus növény előállítására, mely során a növényi szövetet a fenti 1. eljárással transzformáljuk, és az így transzformált szövetet regeneráljuk. Előnyösen a szövetet éretlen embriók és embriogén kallusz közül választjuk ki, például a szövetkukorica I. típusú kallusz. Ahol a szövet éretlen embrió, az eljárás előnyösen tartalmazza az embriók kallusz iníciációs közegre helyezését is az *Agrobacterium*-os kitévés előtt vagy után, és az így kapott embriogén kalluszból a növény regenerálását. Előnyösen a kívánt gén (vagy közülük egy) egy szelektálható vagy jelző-(scorable) marker, mely lehetővé teszi a transzformált sejtek, transzformált szövetek és/vagy transzformált növények szelekcióját vagy azonosítását.

3. Egy AIN-gátló szer, például az AIN egy kémiai inhibitorának (például egy etiléninhibitornak, például ezüst-nitrátnak) vagy egy AIN-gátló nukleotidszekvenciának (például egy AIN-gátló mRNS-t vagy fehérjét kódolónak) alkalmazása egy növény, vagy annak szöveve vagy sejtje *Agrobacterium*-transzformációs eljárásában, vagy egy fertilis transzgenikus növény előállítási eljárásban, például egy fenti 1. vagy 2. eljárás szerint.

4. A fenti 2. eljárás szerint előállított transzgenikus növény, vagy annak magjai vagy utódai.

5. Növény, növényi szövet vagy növényi sejt, mely AIN-t gátló heterológ eredetű nukleotidszekvenciát, például egy szintetikus nukleotidszekvenciát, vagy egy eltérő fajba tartozó szervezet genomjából származó nukleotidszekvenciát tartalmaz.

6. Növényi sejtek vagy szövetek tenyésztése, például Gramineae transzformálásában való felhasználásra, mely tartalmaz

a) egy AIN kémiai inhibitor,

b) egy kívánt gént tartalmazó plazmidot tartalmazó *Agrobacterium*-ot, és

c) vizet és létfontosságú sókat.

A kémiai inhibitor alkalmasan nekrozisgátló koncentrációban van jelen. A kémiai inhibitor előnyösen a következőkből álló csoportból kiválasztott vegyület: etiléninhibitorok (például 2,5-norbornadién, norbornén, ezüst-tioszulfát, és ezüst-nitrát), etilénszintézis-inhibitorok (például amino-etoxi-vinil-glicin (AVG), kobaltsók, acetil-szalicilsav vagy szalicilsav), gibberelinantagonisták (például abszcizinsav (ABA)) és foszfatázinhibito-

rok (például okadainsav). Legelőnyösebben a kémiai inhibitor ezüst-nitrát, például 0,1–20 mg/l, előnyösen 1–10 mg/ml koncentrációban. Az létfontosságú sók optimális összetétele és koncentrációja a szakterületen ismert, és az valamennyit változhat a fajtól, a sejt vagy szövet típusától és fejlődési állapotától függően, és általában a tápközeg ion- és tápanyag-koncentrációját (például nitrátok, káliumionok, foszfátok, kalciumionok, magnéziumionok, nátriumionok és klórionok) olyan szinten tartjuk, melyet a növénysejtek és az *Agrobacterium* jól tolerál. A tenyésztő tápközeg tetszőlegesen tartalmazhat még egyéb tápanyagokat (például cukrokat, például szacharózt), vitaminokat, aminosavakat, hormonokat és más komponenseket (például 2,4-D-t), melyek a növénysejt- vagy szövettenyésztés szakterületén ismertek. A növény előnyösen a Gramineae család tagja, például kukorica. A sejtek és a szövetek előnyösen embriogén kalluszból, például I. típusú vagy II. típusú kalluszból állnak.

7. Eljárás egy Gramineae családba tartozó növény totipotens sejtjének transzformálására, mely során a totipotens sejtek populációját vagy totipotens sejteket tartalmazó szövetet olyan *Agrobacterium*-fertőzésének tesszük ki, mely egy vagy több kívánt gént tartalmazó, egy vagy több plazmidot tartalmaz, ahol az *Agrobacterium* egy olyan törzsbe tartozik, mely nem indukál jelentős mértékű nekrozist az említett populációban a kitévés ideje alatt, és olyan koncentrációban, mely elegendő az említett sejt transzformációjának végrehajtásához. A szövet előnyösen nem apikális merisztéma, például előnyösen differenciálatlan szövet, például kihelyezett zigóta állapotú embriók vagy embriogén kallusz, előnyösen iniciációs fázis alatti embriogén kallusz (például az iniciációs tápközegre helyezéstől 28. napig, előnyösen a 14. napig) vagy sorozatosan szaporítható embriogén kallusz, például I. típusú vagy II. típusú kallusz.

8. Eljárás egy *Agrobacterium* törzs alkalmazásának meghatározására, hogy egy Gramineae családba tartozó növény regenerálható sejtjének transzformálásában felhasználható-e, oly módon, hogy a növény regenerálható sejtjeinek említett populációját az *Agrobacterium* törzs fertőzésének kitesszük, és megfigyeljük vagy meghatározzuk a nekrozis mennyiségét az említett sejtpopulációban.

9. *Agrobacterium* törzs, melyet genetikailag úgy módosítottunk, hogy lecsökkenjen vagy megszűnjön az *Agrobacterium* nekrozisfaktor-expressziója; vagy egy ilyen módosított törzs származéka. Az *Agrobacterium*-nekrozisfaktor egy olyan hólabilis faktor, melyet nekrozis, például programozott sejthalál indukálására képes, koncentrált felülszóban figyeltek meg kukoricaembriókban.

Az *Agrobacterium* és kukoricasejtek közötti inkompatibilitás valószínűleg több genetikai komponenst tartalmaz. Találmányunk három olyan *Agrobacterium*-ból származó gént ír le, mely a kukoricaszövetek sejthalál-válaszában részt vesz. Ezeket az *Agrobacterium* BAC-könyvtárának szűrésével azonosítottuk. 3 független BAC-ról állapítottuk meg, hogy sejthalált váltanak ki, és

homológiát mutatnak a *xylA-xylB*, *virB1* és *acvB*-vel. Lehetséges, hogy az ismertett gének az *Agrobacterium* kukoricaszövettel szembeni inkompatibilitásáért felelős géneknek csak egy alcsoportját alkotják. A találmány szerinti eljárásokban alkalmazott növénysejt előnyösen egy olyan növényfajból vagy fajtából származik, mely nem képez gyökérgolyvát vagy hajszálgököket az *Agrobacterium*os transzformációkor. Előnyösen a növényfaj a pázsitfűfélék családjának (Gramineae) tagja, legelőnyösebben kukorica vagy búza, különösen kukorica. A növénysejt előnyösen egy totipotens sejt, azaz egy olyan sejt, mely képes növényre regenerálódni, előnyösen egy fertilis növényre. Totipotens sejtek vannak jelen például az éretlen embriókban és az embriogén kalluszból. A célszövet előnyösen az apikális merisztémától eltérő. Előnyösebben a célszövet nem differenciált szövetet, például kihelyezett zigótás embriókat vagy embriogén kalluszt tartalmaz. Az embriogén kallusz lehet az embrióhoz kapcsolódó kallusz a kallusziniciációs fázis alatt (például az éretlen embrió iniciációs tápközegre helyezésétől számított 28. napig tartó időszak alatt, előnyösen a 14. napig), vagy lehet sorozatosan szaporítható embriogén kallusz, például I. vagy II. típusú kallusz. A találmányban történő felhasználásra a kukorica I. típusú kalluszát részesítjük előnyben, mely totipotens sejteket tartalmaz.

Az *Agrobacterium*ot előnyösen *A. tumefaciens* és *A. rhizogenes* közül választjuk ki. Előnyösen az *Agrobacterium* törzs egy *A. tumefaciens* törzs, legelőnyösebben egy nopalinasznosító törzs. Amikor az *Agrobacterium* törzs egy *A. rhizogenes* törzs, az előnyösen egy agropin- vagy mannopinasznosító törzs. Legelőnyösebben az *Agrobacterium* egy olyan *Agrobacterium*, mely nem indukál nekrozist a Gramineae-ban, például az *A. tumefaciens* A és B törzse közül kiválasztott *Agrobacterium*. Az A és B *Agrobacterium* törzseket az American Type Culture Collectionnál (ATCC), 12 301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20 852/USA, ATCC 55 964, illetőleg 55 965 számokon 1997. május 2-án, a Budapesti Szerződés szerint letétbe helyeztük.

A kívánt gén előnyösen egy herbicidrezisztencia, betegségrezisztencia vagy inszekticidrezisztencia génje, vagy egy szelektálható vagy jelzőmarker, és egy növényben működőképes promotert, egy kódolórégiót és egy 3' terminátorrégiót tartalmaz. A herbicidrezisztencia-gének az AHAS-gént foglalják magukban imidazolinl vagy szulfonil-karbamid-herbicidekkel szembeni rezisztenciához, a pat- vagy bar-gént a bialafosz vagy glufoszináttal szembeni rezisztenciához, EPSP-szintáz-gént a glifozáttal szembeni rezisztenciához stb. A betegségrezisztencia-gének antibiotikumszintézis-enzimeket, például pirolnitrinszintézis-enzimeket, növényi eredetű rezisztenciagénjeiket, és hasonlókat foglalnak magukban. A rovarrezisztencia-gének *Bacillus thuringiensis*-ből származó inszekticid fehérjék génjeit foglalják magukban.

A szelekciós markerek herbicidrezisztencia-géneket és antibiotikum- (például higromicin vagy kanamicin) rezisztencia-géneket foglalnak magukban, valamint pozitív szelekciós markereket, mint például a

mannóz foszfátizomeráz-génjét. A jelzőmarkerek könnyen mérhető enzimek génjeit foglalják magukban, mint amilyen például a gus-gén és a cat-gén. A plazmid több mint egy kívánt gént tartalmazhat, és/vagy az *Agrobacterium* különböző kívánt génekkel rendelkező, különböző plazmidokat tartalmazhat.

Az *Agrobacterium* által indukált nekrosis (AIN) kifejezés, ahogy a leírásban használjuk, bármilyen *Agrobacterium* által közvetített sejthalálra vonatkozik, és különösen az *Agrobacterium* által indukált programozott sejthalált foglalja magában.

Példák

1. példa A nekrosis hatásmechanizmusa

Agrobacterium-fertőzésnek kitétt kukoricában

a) Kukoricanekrosis kimutatása *Agrobacterium* jelenlétében, a nekrosis dohányban nem mutatható ki

A kukorica-embriogénkallusz és -embriók különösen nehezen kezelhető szövetnek bizonyultak az *Agrobacterium* transzformáció szempontjából. A következő kísérletekben HE/89 kukorica beltenyésztett vonalakat (*Zea mays* L.) és egy itt Elite 1-nek nevezett vonalat használunk. A HE/89 kukoricavonal morzsalékos embriogén kalluszát Gunter Donn bocsájtotta rendelkezésünkre. A HE/89-t Mórocz S., Donn, G., Németh J. és Dudits D. írta le [Theor. Appl. Genet. 80, 721–726 (1990)]. Az Elite 1 egy Novartis tulajdonú B73-rokon elit vonal. Az Elite 1 szuszpenziós tenyészetét éretlen embriókból kiválasztott morzsalékos embriogén kalluszból iniciáljuk. A HE/89 vonalat egy módosított folyékony N6 tápközegben növesztjük, mely 500 mg/ml Bacto triptonnal, 30 g/l szacharózzal és 0,5 mg/ml 2,4-diklór-fenoxi-ecetsavval (2,4-D) van kiegészítve (N6M).

Az Elite 1 vonalat 30 g/l szacharózzal és 2 mg/l 2,4-D-vel kiegészített N6 folyékony tápközegben [Chu et al. (1975)] növesztjük (2N63S). 2 mg/l 2,4-D-vel és szacharózzal (30 g/l) kiegészített Murashige és Skoog tápközegben (MS3S) növesztett NT-1 *Nicotiana tabacum*-sejtvonalat használunk *Agrobacterium*-érzékeny kontrollként. A szuszpenziós tenyészeteket folyékony tápközegben tartjuk fenn egy forgó rázókészülékben (120 rpm), és 7 naponta altenyészetekbe vesszük át.

A baktériumokat YP tápközegben (5 g/l élesztő kivonat, 10 g/l pepton, 5 g/l NaCl, pH=6,8) 24 órán át 28 °C-on növesztjük. A baktériumokat lecentrifugáljuk, és megfelelő növényi tápközegben újraszuszpendáljuk. Az Elite 1, HE/89 és NT-1 növénysejtek inokulálásához a baktériumokat 2N63SM, N6M, illetve MS3S folyékony tápközegben újraszuszpendáljuk.

Nem sokkal a kukorica-embriogénkallusz inokulálása után, a sejtek közül sok nekrotikussá válik (1. táblázat). Nekrozist figyelünk meg a kezelt embriogén kalluszoknak egy baktériumoktól mentes, cefotaxim-tartalmú tápközegbe történt átvitele után is. A kukoricasejteknek az *Agrobacterium* nagyon híg tenyészeivel nagyon rövid idejű együtt tenyésztése is elegendő ahhoz, hogy az az Elite 1 beltenyésztett kukorica nekrotikus válaszát vagy növekedésének gátlását váltsa ki. A HE/89 embriogén kalluszoknál a rövid együtt tenyésztési idő a nekrotikus változást valamilyen mértékben lecsökkentette, de teljesen nem gátolta meg a nekrozist. A kontrollkísérletekben a cefotaxim nem okozza a kukoricaszövet nekrotikussá válását. Tehát úgy tűnik, hogy a nekrotikus hatás az *Agrobacterium* és a kukoricakalluszok közötti kölcsönhatás következménye. Kontrollként NT1 dohánysejteket is *Agrobacterium*mal inokulálunk, és nem figyelünk meg nekroge-nezist.

1. táblázat

Szuszenziós növénysejtek együtt tenyésztése LBA4404-gyel

	HE/89			Elit		
	2 nap	4 nap	7 nap	2 nap	4 nap	7 nap
Nincs <i>Agrobacterium</i>	–	–	–	–	–	–
OD=0,2						
10 perc	–	–	+	–	+	+
1 óra	–	–	+	–	+	++
24 óra	–	+	+	+	+	++
48 óra	+	+	++	+	++	+++
OD=1						
10 perc	–	+	+	+	+	+
1 óra	–	+	+	+	+	++
24 óra	+	+	++	+	++	++++
48 óra	+	+	++	++	+++	++++

Folyékony tápközegben fenntartott HE/89 kukorica és egy saját elit beltenyésztett kukorica morzsalékos

embriogén kalluszát *Agrobacterium*mal inkubáljuk 10 percig, 1 órán, 24 órán vagy 48 órán át, mielőtt ce-

fotaximtartalmú táptalajra helyezzük. A jelölt optikai sűrűségnél ($OD=600$ nm) $50\ \mu\text{l}$ baktériumot adunk az 10 ml pakolt sejttérfogatot tartalmazó szövettenyésztési tápközeghez. Ha a tenyészetet két napnál tovább akarjuk inkubálni, a baktériumokat kimossuk, és a növénysejteket ugyanilyen, cefotaximmal ($250\ \text{mg/l}$) kiegészített tápközegben újraszuszpendáljuk. A nekrosis meglétét vagy hiányát az inokulálás utáni 2., 4. és 7. napon feljegyezzük, és nekrosis intenzitását a következőképpen fejezzük ki: + a nekrosis ritkán alakul ki; ++ gyenge nekrosis; +++ erős nekrosis; ++++ nagyon erős nekrosis.

b) A programozott sejthalál bizonyítékai

Az *Agrobacterium* által indukált sejthalál mechanizmusának meghatározására kukoricaszövetben, genomi DNS-t extrahálunk növényi szuszpenziós sejtekből, melyeket az *Agrobacterium*os inokulálás után 24 vagy 48 órával gyűjtünk össze. Az *Agrobacterium*-fertőzés DNS-fragmentációt okoz mindkét kukoricavonalban, egy internukleosomális fragmentációra jellemző mintázattal, melyet a programozott sejthalál korai jelének tekintjük. A kontroll-kukoricasejtek és dohánysejtek, melyeket csak tenyésztőközegben tartunk fenn, nem mutatnak DNS-fragmentációt ezek között a körülmények között. A kukoricasejtek inokulálása *E. coli*-val vagy autoklávozott *Agrobacterium*-sejtekkel, nem okoz DNS-fragmentációt. Továbbá a programozott sejthalálon áteső kukoricasejtek nem képesek friss kukoricaembriogéniszövetek sejthalálát kiváltani.

Az *Agrobacterium* által kiváltott DNS-fragmentáció további bizonyítékát kapjuk a folyamat Zn^{2+} - és Ca^{2+} -érzékenységének vizsgálatával. A HE/89 sejtvonalban a Ca^{2+} megnövelte a DNS-létrák intenzitását, míg a Zn^{2+} jelentősen lecsökkentette a genomi fragmentációt. Ezek a jellemzők teljesen összhangban állnak ezeknek a kétértékű kationoknak az apoptózis alatti DNS-hasadásért felelős endogén endonukleázokra gyakorolt hatással állati rendszerben. A DNS-létra intenzitását szintén lecsökkenti a cikloheximid hozzáadása, bizonyítva, hogy az eljárás *de novo* génextpressziót igényel. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy az *Agrobacterium* kukoricasejtekkel való érintkezése felelős a kukoricaszövetek sejthaláláért. Az apoptózis alatti DNS-fragmentációt *in situ* is kimutatjuk olyan reagensekkel, amelyek a nukleoszómaegységeken szabadbá tett hidroxilgyökökkel reagálnak. A saját tulajdonú Lancaster elit vonalból származó 12 napos kukoricaembriókat LBA4404-gyel inokuláljuk, és klorambenel kiegészített DG4 tápközegre helyezzük [Koziel, M. G. et al., Bio/Technology 11, 194–200 (1993)]. Az apoptotikus sejteket úgy mutatjuk ki, hogy TACS-1 kit-tel (Trevigen) festjük *in situ*, mely abból áll, hogy a DNS-fragmentumok végét megjelöljük Klenow-enzimmel detektálható markerhez konjugált dNTP-eket alkalmazva, mely a genomi fragmentációt jelző sötét oldhatatlan csapadékot eredményez [Culliver, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek P. G.; Coso, O. A., Gutking, J. S. és Spiegel, S., Nature 381, 800–803 (1996)]. Az embriókat 3,7%-os formaldehidoldatba áztatjuk, és a gyártó által leírt módon dolgozzuk fel. A DNS-hasadás

in situ kimutatásához a rögzített embriókat TACS-1 kit-tel kezeljük. A rögzített keresztmetszeteket először proteináz K-val kezeljük 5 percig szobahőmérsékleten, majd 5 percig 2% hidrogén-peroxidba merítjük, hogy eltávolítsuk az endogén peroxidázt. Miután rövid ideig Klenow-pufferrel mostuk, a szöveteket 1 órán át $37\ ^\circ\text{C}$ -on inkubáljuk Klenow-enzimmel, mely exogén módosított dezoxinukleotidokat képes beépíteni a hasított fragmentumok 5' végére. Az egyedi sejtekben feltűnő sötét oldhatatlan csapadék jelzi az apoptózist, mely mikroszkóppal kimutatható.

Az *Agrobacterium*mal kezelt sejtek sötétebbé is válnak, és eltorzul az alakjuk a 48 órás kitevés után. A kontrollembriók, melyeket csak tenyésztőközegben tartunk, vagy *E. coli*-val inokulálunk, nem mutatnak semmilyen csapadékot ilyen körülmények mellett. Szintén megállapítottuk, hogy nem mindegyik kukoricaszövet reagál ugyanolyan módon egy *Agrobacterium*-fertőzésre, a hajtások épek maradnak, míg az embriók nekrotikussá válnak. A DNS-fragmentáció azoknál az *Agrobacterium* törzsekkel is megfigyelhető, melyeket a patogén plazmidtól mentesítünk (A136 és LBA4402 törzsek), mely alapján feltételezhető, hogy a programozott sejthalált kiváltó faktor független a plazmidtól. Akkor is megfigyeltünk programozott sejthalált, amikor a kukoricaembriókat 20 percig *Agrobacterium* (LBA 4404) által indukált sejthalálból származó 20-szorosra koncentrált felülszóval inkubáljuk, de akkor nem, amikor az embriókat *E. coli*-ból származó, hasonló módon előállított felülszóval hozzuk érintkezésbe. Szintén nem fordul elő programozott sejthalál, ha a koncentrált *Agrobacterium*-felülszót 20 percig $100\ ^\circ\text{C}$ -ra hevítjük az inkubálás előtt.

A kukorica-embriogénkallusz gyakran tartalmaz még olyan területeket, melyek látszólag élő sejtekből állnak, és más olyan területeket, melyek nekrotikusak. Az a tény, hogy csak korlátozott területek pusztulnak el, még olyan helyzetekben is, melyekben a válaszreakgáló területen kívül eső sejtek ugyanakkor vannak kitéve a stimulussnak, azt sugallja, hogy a szervezett szövetben időszakos vagy folytonos diverzitás van jelen az egyedi sejtek különböző stimulusokra adott választát szabályozó elemekben. A programozott sejthalálon (PCD) áteső sejtek száma lehetséges, hogy kevés, összehasonlítva a teljes tömeggel, és a folyamat aszinkron lehet. A PCD indukciója egy vagy több sejten egy adott területen vagy szövetben a körülötte lévő sejtek gyors halálát válthatja ki, ahogy azt állati sejtekben megfigyelték, és az utóbbi sejtek, lehetséges, hogy nem mutatják a programozott sejthalál-fenotípust, de mégis elpusztulnak.

2. példa *Agrobacterium*mal kiváltott programozott sejthalál

Szövetek készítése az *Agrobacterium*os fertőzéshez

Éretlen embriókat ($1,2\text{--}2,2$ mm hosszúságú) hasítunk ki fertőzésmentesen 14–15 nappal a beporzás után a felszínén sterilizált, üvegházban növesztett csövekből, és a sziklevelükkel felfelé kallusziniciációs tápközegre,

2DG4+5 mg/l kloramben (2DG4–5Chl) helyezzük. A 2DG4 tápközeg Duncan-féle tápközeg, melyet úgy módosítottunk, hogy 20 mg/l szacharózt tartalmazzon.

Kalluszválasszal rendelkező embriók

Éretlen embriókat sterilizálunk, ahogy fentebb leírtuk, és kallusziniciációs tápközegre (2DG4–5Chl) helyezzük, és azon tenyésztjük 1–7 napon át. A kapott szövetet használjuk mintaként a fertőzéshez.

Fiatál I. típusú kallusz

Embriókat kallusziniciációs tápközegre (2DG4–5 kloramben) helyezünk 7–20 napra, hogy kalluszképződést idézzünk elő. Ezek a kalluszkok jellemzően beltenyésztett kukoricákhoz használt I. típusú kalluszkok, melyek a sejtek kompakt és viszonylag jól szervezett csoportjait alkotják. A kapott embriogén kalluszt kivágjuk az embriókból, és kalluszfenntartó tápközegre (2DG4+0,5 mg/l (2,4-diklórfenoxi)-ecetsav (2,4-D)) vesszük át, és a fertőzésnél mintaként alkalmazzuk.

I. típusú kallusz

A fent leírt módszerrel kapott I. típusú kalluszt fenntartó tápközegen tudjuk fenntartani (2DG4+0,5 mg/l 2,4-D), és minden két hétben alternatívákban tenyésztjük tovább.

Agrobacterium

Az *A. tumefaciens* LBA4404 törzset (pAL4404, pSB1) használjuk ezekhez a kísérletekhez. A pAL4404 egy ártalmatlanított helperplazmid. A pSB1 egy széles gazdakörrel rendelkező plazmid, mely tartalmaz egy pGIGUP-pal homológ régiót, és egy 15,2 kb-os KpnI-fragmentumot a pTiBo542 virulenciaregiójából [Ishida et al., Kukorica (*Zea mays* L.) *Agrobacterium tumefaciens* által közvetített nagy hatásfokú transzformálása; Nature Biotechnology 14, 745–750 (1996)]. A pGIGUP-plazmid elektroporációs bevitele az LBA4404-be (pAL4404, pSB1) a pGIGUP és a pSB1 kointegrációját eredményezi. Ennek a plazmidnak a T-DNS-e az ubiquitinpromoter által irányított, növényben expresszálnak Pat-gént tartalmaz a foszfinotricinnel szembeni rezisztencia biztosítására, és egy Gelvin-promoter által irányított GUS-gént egy intronnal, a kódoló szekvencia N-terminális kodonjánál. Ez az intron-GUS-gén GUS-aktivitást fejez ki a növénysejtben, de az *Agrobacterium*ban nem.

Baktériumszaporítás

Az *Agrobacterium*ot 3 napig YP tápközegen (5g/l élesztő kivonat, 10 g/l pepton, 5 g/l NaCl, 15 g/l agar, pH=6,8) növesztjük, mely 50 mg/l spektinomycin és 10 mg/l tetraciklinnel van kiegészítve. A baktériumokat egy oltóakccsal összegyűjtjük, és N6 folyékony tápközegbe szuszpendáljuk 10^9 – 5×10^9 sejt/ml közötti sűrűségben. Az *Agrobacterium*-sejteket egy egyéjszakás YP tápközegen növesztett tenyészetből is összegyűjthetjük, és N6 folyékony tápközegbe szuszpendálhatjuk.

Együtt tenyésztés ezüst-nitrát jelenlétében és nélküle

A fentebb leírt módon elkészített kukoricaszöveteket *Agrobacterium*mal fertőzzük. A kukoricaszöveteket baktériumszuszpenzióban áztatjuk 5–10 percig, és ezüst-nitrátot tartalmazó (1–10 mg/l) vagy nem tartalmazó tápközegre helyezzük. A szöveteket *Agrobacterium*-szuszpenzió egy, a szövet tetejére tett 5 µl-es

10^9 – 5×10^9 sejt/ml koncentrációjú cseppjével inokuláljuk. Inokulálás után a kukoricaszöveteket sötétben 25 °C-on tenyésztjük ezüst-nitrátos (1–10 mg/l) vagy a nélküli tápközegen. 2–3 nappal az inokulálás után a szöveteket ugyanilyen, cefotaximmal (250 mg/l) kiegészített, ezüst-nitrátot tartalmazó vagy nem tartalmazó tápközegre vesszük át.

Eredmények

A kukoricaembriók és a kukorica-embriogénkalluszkok érzékenysége *Agrobacterium*mal szemben:

Embriogén kallusz fejlődhet ki a kukoricaembriókból, amikor kallusziniciációs tápközegre helyezzük. Az embriókból kialakult sejtvonal erősen embriogén, amikor 2,4-D tartalmú tápközegen tartjuk fenn. Ennek az embriogén kallusznak és a kukorica beltenyésztett vonalból származó embrióknak az érzékenységet vizsgáljuk *Agrobacterium* LBA4404-gyel szemben. A szövetek kifejezett barnulása figyelhető meg az *Agrobacterium* és a kukoricaszövetek együtt tenyésztését követően. Ez a reakció az LBA4402-vel is megfigyelhető, mely mentesítve van a patogén plazmidtól. A kontroll-embriók és embriogén kalluszkok, melyeket *Escherichia coli*val tenyésztünk együtt, és ugyanannak az eljárásnak vetünk alá, nem mutatnak sejthalált vagy jelentős barnulást. Tehát úgy tűnik, hogy a sejthalál a kukorica-sejtek és az *Agrobacterium* közötti kölcsönhatás eredménye. Úgy tűnik, hogy az embriók sokkal érzékenyebbek az *Agrobacterium*ra mint az embriogén kallusz. Egy 10^9 sejt/ml-es koncentráció elegendő a sejthalál indukálásához. Továbbá egy rövid kitevési idő (5 perc) elegendő ennek a reakciónak az indukálásához.

Meghatározzuk a kokultivációs tápközeghez és a kallusziniciációs tápközeghez adott ezüst-nitrát hatását. Az ezüst-nitrát hozzáadása lehetővé teszi egészséges szövetek visszanyerését (2. és 3. táblázat). Az ezüst-nitrátot tartalmazó tápközegre helyezett embriók körülbelül 50%-a képes embriogén kalluszt létrehozni. Az optimális hatást akkor kapjuk, amikor az embriókat az *Agrobacterium*os inokulálás előtt legalább két napra kallusziniciációs tápközegre helyezzük. Ennek a két tényezőnek a kombinálása erőteljesen gátolja a kukorica-embriogénkalluszkok *Agrobacterium*os együtt tenyésztés utáni nekrozisát.

Az embriogén kalluszkok csökkent barnulása összefüggésben van az *Agrobacterium*-inokuláció utáni kallusziniciációval és a szöveti túléléssel. Az *Agrobacterium*mal nem kezelt kontroll-embriók körülbelül 80%-a eredményez embriogén kalluszt.

Az ezüst-nitrát hatását *Agrobacterium*mal inokulált I. típusú kalluszkokkal is megfigyeljük (3. táblázat). Úgy tűnik, hogy egy fiatal vonal sokkal rezisztensebb az *Agrobacterium*-fertőzéssel szemben, és egy ezüst-nitrátos előkezelés javítja az egészséges szövetek visszanyerését.

Annak igazolására, hogy az ezüst-nitrát jelenléte az együtt tenyésztés alatt nem csökkenti az *Agrobacterium* virulenciáját, dohánylevélkorongokat inokulálunk LBA4404(GIGUP)-pal 10^9 sejt/ml koncentrációban. A dohánylevelekben nem észleljük a GUS-aktivitás szignifikáns csökkenését.

2. táblázat

Kukoricaembriók inokulálása LBA4404-gyel

Embriókat és embriogénkallusz-válaszreakciót mutató embriókat inokulálunk *Agrobacterium* LBA4404(GIGUP)-pal (10^9 sejt/ml). Az alaptápközeg 2DG4+5 Chloramben (2DG4). Minden kezelést körülbelül 80–100 embrióon hajtjuk végre, és kétszer megismételjük. A kallusziniciációt két héttel az inokulálás után értékeljük.

Előkezelés (idő)	Koinokulációs tápközeg	Átvitel	Érték
Nincs előkezelés	2DG4	2DG4+Cef	1%
Nincs előkezelés	2DG4	2DG4+AgNO ₃ +Cef	30%
Nincs előkezelés	2DG4+AgNO ₃	2DG4+AgNO ₃ +Cef	55%
2DG4+AgNO ₃ (1 nap)	2DG4+AgNO ₃	2DG4+AgNO ₃ +Cef	43%
2DG4+AgNO ₃ (4 nap)	2DG4+AgNO ₃	2DG4+AgNO ₃ +Cef	27%
2DG4 (6 nap)	2DG4+AgNO ₃	2DG4+AgNO ₃ +Cef	65%
2DG4 (6 nap)+1 nap 2DG4+AgNO ₃	2DG4+AgNO ₃	2DG4+AgNO ₃ +Cef	88%

3. táblázat

I. típusú kukoricakallusz inokulálása

Embriókat inokulálunk *Agrobacterium* LBA4404(GIGUP)-pal (10^9 sejt/ml). Ezekben a kísérletekben használt alaptápközeg ezüst-nitrátot (AgNO₃) tartalmazó vagy a nélküli 2DG4+0,5 2,4-D (2DG4). Az összes kísérletet körülbelül 150 darab I. típusú kallusszal végezzük el. A szövetek túlélését 2 héttel az inokulálás után értékeljük.

I. típusú kallusz	Előkezelés	Koinokulálás	Átvitel	Érték
1/2 hónapos	2DG4	2DG4+AgNO ₃	2DG4+AgNO ₃ +Cef	75%
	2DG4+AgNO ₃	2DG4+AgNO ₃	2DG4+AgNO ₃ +Cef	95%
	2DG4	2DG4	2DG4+Cef	22%
10 hónapos	2DG4	2DG4+AgNO ₃	2DG4+AgNO ₃ +Cef	55%
	2DG4+AgNO ₃	2DG4+AgNO ₃	2DG4+AgNO ₃ +Cef	66%
	2DG4	2DG4	2DG4+Cef	12%

3. példa Éretlen zigótás embriók *Agrobacterium*os transzformációja és a transzformált kallusz izolálása szelekciós szerként foszfinotricin, higromicin vagy mannóz alkalmazásával

Éretlen embriókat nyerünk ki körülbelül 10–14 nappal az önbeporzás után. Az éretlen zigótás embriókat különböző, az embriogén kallusz képződését indukáló és fenntartó tápközegre tartalmazó tálcákra osztjuk szét, körülbelül 25 éretlen embriót tálcaként. Az éretlen embriókat vagy a tálcákra, vagy a folyadékban inokuláljuk egy szelekciós markert tartalmazó Ti plazmiddal rendelkező *Agrobacterium*mal, ahogy a 2. példában leírtuk. Egy kísérletsorozattal kialakítjuk az éretlen embriók optimalizált körülményeit. Az egyik optimalizált körülménynél az éretlen embriókat az ezüst-nitrátot (10 mg/l) tartalmazó kallusziniciációs tápközegre helyezzük az *Agrobacterium*os inokulálás előtt vagy közvetlen utána. Mindegyik lemezre hozzávetőleg 25 éretlen embriót helyezünk. Az inokulálás után 16–72 órával az éretlen embriókat ezüst-nitrátot és cefotaximot tartalmazó kallusziniciációs tápközegre helyezzük.

A transzformált sejtek szelekcióját a következőképpen hajtjuk végre:

a) *PPT-rezisztencia-marker*: A transzformációt a T-DNS-régió foszfinotricinrezisztenciát kódoló génnel rendelkező plazmidot hordozó *Agrobacterium* törzssel

hajtjuk végre. A transzformált sejteket *in vitro* szelektáljuk 3 mg/l koncentrációjú foszfinotricinnel 2–20 nappal az inokulálás után, és összesen 2–12 hétig tartjuk fenn. Az így kapott embriogén kalluszt foszfinotricin jelenlétében vagy a nélkül regeneráljuk standard regenerációs tápközegben. Minden növényt PPT-rezisztenciára tesztelünk klór-fenolvörös (CR)-tesztel. Ez a vizsgálat egy pH-érzékeny indikátorfestéket használ annak kimutatására, hogy mely sejtek növekednek PPT jelenlétében. Azok a sejtek, amelyek növekednek, pH-változást hoznak létre a tápközegben, és a klór-fenolvöröst sárgává változtatják (vörösből). A PPT-vel szembeni rezisztenciát kifejező növények könnyen azonosíthatók ebben a tesztben. A CR-teszt-pozitív növényeket PCR-rel vizsgáljuk meg a PAT-gén jelenlétére. A PCR-tesztre pozitív növényeket Southern-foltanalízissel elemeztük.

b) *Higromicinrezisztencia-marker*: A transzformációt a T-DNS-régió higromicinrezisztenciát kódoló génnel (*hpt*, higromicin B foszfortranszferáz) rendelkező plazmidot hordozó *Agrobacterium* törzssel hajtjuk végre. A transzformált sejteket 3 mg/l koncentrációjú higromicinnel szelektáljuk 2–20 nappal az inokulálás után, és összesen 2–12 hétig tartjuk fenn. Az így kapott embriogén kalluszt a szelekciós szer jelenlétében vagy a nélkül regeneráljuk standard regenerációs tápközeg-

ben. Minden növényt higromicinrezisztenciára tesztelünk. A higromicinrezisztenciát kifejező növényeket könnyen azonosítjuk ebben a tesztben. Ebben a tesztben pozitív növényeket PCR-rel vizsgáljuk meg a *hpt*-gén jelenlétére. A PCR-tesztre pozitív növényeket Southern-folt-analízissel elemezzük.

c) *Pozitív szelekció mannózzal*: A transzformációt a T-DNS-régió mannóztoleranciát kódoló génnel (mannóz foszfát izomeráz) rendelkező plazmidot hordozó *Agrobacterium* törzzsel hajtjuk végre, a mannózt használjuk a transzformált sejtek *in vitro* szelektálására. Ezt a szelekciót 2 g/l koncentrációnál 2–20 napon át alkalmazzuk az inokulálást követően, és összesen 2–12 hétig tartjuk fenn. Az így kapott embriogén kalluszt mannóz jelenlétében vagy a nélkül lehet regenerálni standard regenerációs tápközegen. Minden növényt klór-fenolvörös (CR)-teszttel teszteltük a mannóztoleranciára. Ez a vizsgálat egy pH-érzékeny indikátorfestéket használ annak kimutatására, hogy mely sejtek növekednek mannóz jelenlétében. Azok a sejtek, amelyek növekednek, pH-változást hoznak létre a tápközegben, és a klór-fenolvöröst vörösből sárgává változtatják. A mannózzal szemben toleranciát kifejező növények könnyen azonosíthatók ebben a tesztben. A CR-teszt-pozitív növényeket PCR-rel vizsgáljuk meg a mannózgén jelenlétére. A PCR-tesztre pozitív növényeket Southern-folt-analízissel elemezzük.

4. példa *Éretlen zigótás embriókból származó kallusz Agrobacteriumos transzformációja és a transzformált kallusz izolálása szelekciós szerként foszfinotricint, higromicint és mannózt alkalmazva*

Éretlen zigótás embriókból I. típusú kalluszt nyerünk standard tenyésztési módszerekkel. Hozzávetőleg 25 darab I. típusú kalluszt helyezünk ezüst-nitrátot tartalmazó fenntartó tápközegre az *Agrobacterium*mal végzett inokuláció előtt vagy után. Az inokulálást úgy hajthatjuk végre, ahogy a 2. példában leírtuk. Az inokulálás után körülbelül 16–72 órával a kalluszt ezüst-nitrátot és cefotaximot tartalmazó standard tenyésztőközegrre visszük át. A szelekciót közvetlenül erre a tápközegrre történő átvitel után vagy 1–20 nap múlva alkalmazhatjuk. A kalluszt ezután a szelekció mellett altenyészítjük körülbelül 2–12 héten át, ami után a túlélő és növekedő kalluszt standard regenerációs tápközegre visszük át a növények előállításához.

A szelekciót úgy hajtuk végre, mint az előző példában a foszfinotricinrezisztencia, higromicinrezisztencia vagy mannóz foszfátizomeráz-génjeivel transzformált sejteknél.

5. példa *I. típusú kallusz transzformálása Agrobacteriummal történő inokulálással, és a transzformált kallusz izolálása szelekciós szerként foszfinotricint, higromicint és mannózt alkalmazva*

A kallusz elit genotípusú éretlen embriók kihelyezéséből származik. A tenyészeteket kéthavonta altenyészetekbe visszük át fenntartó tápközegen (2DG4+0,5 mg/l 2,4-D), és az altenyészet létrehozása után 2–3 nappal sejtsomókat veszünk ki, és 2DG4 táp-

közegrre helyezjük. Az *Agrobacterium*mal végzett inokulálás után vagy előtt a sejtsomókat ezüst-nitrátot tartalmazó 2DG4 tápközegrre helyezjük. Az *Agrobacterium*-inokulálást úgy hajthatjuk végre, mint a 2. példában. 16–72 órás inkubálás után a kalluszt cefotaximot és ezüst-nitrátot tartalmazó friss fenntartó tápközegrre helyezjük. A kalluszt szelekció mellett összesen 2–12 hétig altenyészetben tenyésztjük a szelekciós szerrel, majd a túlélő és növekedő kalluszt standard regenerációs tápközegrre helyezjük a növények előállításához. A szelekciót úgy hajtuk végre, mint az előző példában a foszfinotricinrezisztencia, higromicinrezisztencia vagy mannóz foszfátizomeráz-génjeivel transzformált sejteknél.

6. példa *A hősokk-kezelés meggátolja az Agrobacterium által kiváltott apoptózist Éretlen embriók*

Kukorica beltenyésztett vonalakat nevelünk üvegházban. Éretlen embriókat (0,8–2,2 mm hosszúságú) hasítunk ki fertőzésmentesen a környezeti tényezőktől függően 8–15 nappal a beporzás után a felszínükön sterilizált csövekből. Az embriókat a sziklevelükkel felfelé kallusziniciációs tápközegrre helyezjük. A legtöbb beltenyésztett vonalnál az embriókat LS tápközegrre helyezjük [Linsmaier és Skoog, *Physiol. Plant.* 18, 100–127 (1965)]. A CG00526 embriókat 2DG4+5 mg/l klorambenre (2DG4–5Chl) helyezjük. A 2DG4 tápközeg olyan Duncan-féle tápközeg, melyet úgy módosítottunk, hogy 20 mg/l szacharózt tartalmazzon [Kozziel et al., *Bio/Technology* 11, 194–200 (1993)].

I. típusú kallusz

Éretlen embriókat a fent leírt módon sterilizálunk, és kallusziniciációs tápközegrre (2DG4–5Chl) helyezünk, és itt tenyésztjük 1–7 napig. Az embriókat kallusziniciációs tápközegrre (2DG4+5Chl) helyezjük 7–20 napra, hogy kalluszképződést idézzünk elő. Ezek a kalluszkok jellemzően I. típusú kalluszkok. Az I. típusú kalluszkok a sejtek kompakt és viszonylag jól szervezett csoportjait alkotják. A kapott embriogén kalluszt kivágjuk az embriókból, és kalluszfenntartó tápközegrre (2DG4+0,5 mg/l (2,4-diklór-fenoxi)-ecetsav (2,4-D)) visszük át, és a fertőzésnél alkalmazzuk. A fent leírt módszerrel kapott I. típusú kalluszt fenntartó tápközegen tudjuk fenntartani (2DG4+2,4D 0,5 mg/l), és minden két hétben altenyészetekben tenyésztjük tovább.

Agrobacterium

Az alkalmazott törzs *A. tumefaciens* LBA4404 (pAL4404, pSB1). A pAL4404 egy ártalmatlanított helperplazmid (Ooms et al., 7, 15–29, 1982). A pSB1 egy széles gazdakörrel rendelkező plazmid, mely tartalmaz egy pGIGUP-pal homológ régiót, és egy 15,2 kb-os KpnI fragmentumot a pTiBo542 virulenciaregiójából [Isihida et al., *Nature Biotechnology* 14, 745–750 (1996)]. A pGIGUP-plazmid elektroporációs bevitele az LBA4404-be (PAL4404, pSB1) a pGIGUP és a pSB1 kointegrációját eredményezi. A pGIGUP az ubiquitinpromoter által irányított, növényben expresszálható foszfinotricin-acetil transzferáz (PAT)-gént tartalmazza, a foszfinotricinnel szembeni rezisztencia bizto-

sítására (Christensen et al., Plant Mol. Biol. 18, 675–689 (1992)). Szintén tartalmaz egy β -glükuronidáz-expresszió (GUS)-gént egy intronnal a kódoló-szekvencia N-terminális kodonjánál, mely gént az oktopin- és mannopinsintáz-génekből származó kimérápromoter (az oktopinsintáz-promoter upstream aktiváló szekvenciájának trimerje a mannopinsintáz-promoter egy doménjével, Ni et al., Plant J. 7, 661–676 (1995) irányításával. Ez az intron-GUS-gén GUS-aktivitást fejez ki növényi sejtben, de *Agrobacterium*ban nem. Az *Agrobacterium*ot 3 napig YP tápközegen (5g/l élesztő-kivonat, 10 g/l pepton, 5 g/l NaCl, 15 g/l agar, pH=6,8) növesztjük, mely 50 mg/l spektinomycin és 10 mg/l tetraciklinnel van kiegészítve. A baktériumokat egy ol-tó-kacccsal összegyűjtjük, és N6 folyékony tápközegbe szuszpendáljuk 10^9 – 5×10^9 sejt/ml közötti sűrűségben. Az *Agrobacterium*-sejteket alternatív megoldásként egy egyéjszakás YP tápközegen növesztett tenyészetből gyűjthetjük össze, és N6 folyékony tápközegbe szuszpendálhatjuk. Előindukálhatjuk 4–6 órán át *Agrobacterium*-indukciós tápközegben (AIM; 10,5 g K_2HPO_4 , 4,5 g KH_2PO_4 , 1,0 g $(NH_4)_2SO_4$, 0,5 g Na-citrát, $2H_2O$, 1 ml 1 M $MgSO_4 \cdot H_2O$, 2,0 g glükóz, 5,0 g glicerin, 10 mM MES, 50–100 μ M Acetosyringone; pH=5,6).

A szövetek hősokk-kezelése

Az együtt tenyésztés előtt a kukoricaszöveteket Eppendorf-csőbe, N6 folyékony tápközegbe helyezük, és 4 percig 45 °C-on vízfürdőben inkubáljuk. A tápközegre ezután a fenti módon elkészített *Agrobacterium*-szuszpenzióval cseréljük ki. 5 perc szobahőmérsékleten való állás után a szöveteket megfelelő szilárd tápközegre helyezük. Három nappal az együttes inokulálás után a szöveteket X-Glu-val festjük az US-aktivitás kimutatására, vagy cefotaximos (250 mg/l) tápközegre helyezük. A kukoricaszöveteket ezután megvizsgáljuk, hogy kimutassuk a kalluszválaszt, az *Agrobacterium*-inokulációt túlélő szövetek százalékában.

Együtt tenyésztés

A fentebb leírt módon elkészített kukoricaszöveteket *Agrobacterium*mal fertőzzük. A kukoricaszöveteket baktériumszuspenzióban áztatjuk 5–10 percig, és ezután tápközegre helyezük. Az inokulálás után a kukoricaszöveteket sötétben 25 °C-on tenyésztjük. 2–3 nappal az inokulálás után a szöveteket ugyanilyen, de cefotaximmal (250 mg/ml) kiegészített tápközegre visszük át.

A DNS-fragmentáció in situ kimutatása

Az embriókat 3,7%-os formaldehidoldatban áztatjuk, és a gyártó (Trevigen) által leírt módon dolgozzuk fel. A genomi DNS-hasítás in situ kimutatásához a rögzített embriókat TACS-1 kittel kezeljük [Culliver et al., Nature 381, 800–803 (1996)]. A rögzített keresztmetszeteket először proteináz K-val 5 percig szobahőmérsékleten kezeljük, és ezután 5 percre 2%-os hidrogén-peroxidba merítjük, hogy eltávolítsuk az endogén peroxidázt. Miután rövid ideig Klenow-pufferral mostuk, a szöveteket 1 órán át 37 °C-on Klenow-enzimmal inkubáljuk, mely exogén módosított dezoxinukleotidokat tud beépíteni a hasított fragmentumok 5' végére. Egy sötét oldha-

atlan, egyedi sejtekben előforduló csapadék detektálható mikroszkóppal, mely az apoptózist jelzi.

Eredmények

- Nagyfokú barnulásos tünetet figyeltünk meg az *Agrobacterium* és a kukoricaszövetek együtt tenyésztését követően, és 10 sejt/ml koncentráció képes volt sejthalált indukálni. Úgy tűnt, hogy az embriók érzékenyebbek voltak az *Agrobacterium*ra, mint az embriogén kallusz.
- Embriókat és embriogén kalluszt hősokkknak vetünk alá, és ezután *Agrobacterium*mal inokuláljuk 10^9 sejt/ml koncentrációban. Háromnapos együtt tenyésztés és egyhetes tenyésztés után a szöveteket megvizsgáljuk. A hősokk-előkezelés által nyújtott védelem mértékét mennyiségileg úgy határozzuk meg, hogy megszámoljuk az inokulációt túlélő szövetek számát. Az összes *Agrobacterium*mal inokulált embrió a hősokk-kezelés után kalluszképződést mutat, míg azokból az embriókból, melyek nem kaptak hősokk-kezelést, nem keletkezett kallusz (4. táblázat).

4. táblázat

Embriókat inokulálunk 10^9 sejt/ml *Agrobacterium* LBA4404(pGIGUP)-pal, és ezután kallusziniciációs tápközegre helyezük. Az alaptápközeg 2DG4+5Chl (2DG4). Az összes kezelést körülbelül 80–100 embrióon végezzük el, és kétszer megismételjük. A kallusziniciációt két héttel az inokulálás után értékeljük.

Előkezelés	Kalluszválasszal rendelkező embriók/inokulált embriók
Kontroll	137/150 (91%)
Nincs hősokk+ <i>Agrobacterium</i>	3/150 (2%)
Hősokk+ <i>Agrobacterium</i>	1 126 150 (75%)

A hősokk-kezelés ugyanilyen kedvező hatását figyeljük meg kallusznál (5. táblázat).

5. táblázat

I. típusú kalluszt inokulálunk 10^9 sejt/ml *Agrobacterium* LBA4404(pGIGUP)-pal, és ezután kallusziniciációs tápközegre helyezük. Az alaptápközeg 2DG4+0,5 5Chl (2DG4). Az összes kezelést körülbelül 100 darab kalluszon végezzük el. A szövetek túlélését két héttel az inokulálás után értékeljük ki.

Előkezelés	Túlélési érték
3 hónapos I. típusú kalluszvonal	
<i>Agrobacterium</i>	0/1000
<i>Agrobacterium</i> +hősokk	≈1000/1000
10 hónapos I. típusú kalluszvonal	
<i>Agrobacterium</i>	0/1000
<i>Agrobacterium</i> +hősokk	≈1000/1000

Úgy tűnik, hogy a hősokk-kezelés után megfigyelt védelem a hősokkhoz kapcsolódik, mivel a fő hősokk-fehérjék RT-PCR-rel amplifikálhatók.

- Nem mutatunk ki DNS-fragmentációt a hősokk-kezelésnek alávetett embriókban.
- Különböző kukoricavonalakból származó, AIM-oldatban indukált, hősokkal előkezelt vagy nem előkezelt embriókat inokulálunk LBA4404(GI-GUP) *Agrobacterium* törzsszel. Háromnapos együtt tenyésztés után az embriókat GUS-aktivitásra festjük. Az eredményeket a 6. táblázatban mutatjuk be. Úgy tűnik, hogy a hősokk-előkezelés kedvező hatású az átmeneti expresszióra.

6. táblázat

Származás	Kezelés	GUS-pozitívak az összes %-ában*	GUS-érték**
0F502	–	15	0,3
	HS	74	1,8
FNU007	–	90	2,0
	HS	96	3,4
HAF031	–	0	0,0
	HS	67	0,9
2N217A	–	13	0,1
	HS	46	0,4
1NJ20	–	5	0,1
	HS	38	0,4
JEF091	–	59	1,2
	HS	81	1,4

–: Nincs hősokk

*: A GUS-százalékok hozzávetőleg 50 éretlen embrióból álló mintamennyiségen alapulnak

** : A GUS-érték egy 1-től 5-ig terjedő skálán alapul (0=nincs GUS-festődés, 1=1–5 folt/embrió, 2=5–15 folt, 3=15–30 folt, 4=az embrió felszínének ~25%-a GUS-festődésű, 5=az embrió felszínének ~50%-a GUS-festődésű).

7. példa Búza transzformálása *Agrobacterium*mal

Éretlen zigótás embriókat (0,75 mm–1,25 mm) vágunk ki, és 3 mg/l 2,4-D-t, 300 mg/l glutamint, 150 mg/l aszparagint és 3% szacharózt tartalmazó MS-alapú tápközegre helyezjük 0, 3, 4, 5, 6, 7, 8 vagy 21 napra, mielőtt *Agrobacterium*mal inokulálnánk. A 21. napra az explantátumok egy embriogén sejtömeget képeznek, melyre háromhetes kalluszként hivatkozunk.

Együttes tenyésztés

A búzaszöveteket a 6. példában leírt *Agrobacterium*okkal inokuláljuk. A búzaszöveteket a baktérium-szuszenzióban áztatjuk 5–10 percig, majd szilárd tápközegre helyezjük. Az inokulálás után a búzaszöve-

ket sötétben tenyésztjük 25 °C-on. 2 vagy 3 nappal az inokulálás után a szöveteket ugyanerre, de cefotaxim-mal (250 mg/l) kiegészített tápközegre visszük át. Az explantátumokat inokuláljuk, vagy anélkül, hogy előkezelést kaptak volna, vagy úgy, hogy hősokkal kezeljük 42–48 °C-on 4–8 percig. A hősokk-kezelést az inokuláció előtt hajtjuk végre. Az embriókat a hősokknak 3MS inf-ben, vagy 100 mM As-t tartalmazó AIM-folyadékban vethetjük alá, ahol a kalluszokat „szárazon” hősokkoljuk.

Inokulálás

Az explantátumokat Eppendorf-csövekben vagy tálcákban inokuláljuk. Amikor csövekben inokuláljuk, 1 ml *Agrobacterium*-oldatot pipetázunk a csőbe, kézi vortexeljük vagy rázatjuk, és hagyjuk leülepedni 5–15 percen át. Az *Agrobacterium*-oldatot és az explantátumanyagot ezután egy 100 mM AS-t tartalmazó 3MS3S lemezre öntjük, és a folyadékot egy eldobható elkeskenyedő hegyű transzferpipettával eltávolítjuk. Amikor az inokulálást tálcákban hajtjuk végre, az *Agrobacterium*ot közvetlenül az explantátumokra pipetázzuk, és 5–15 perccel később távolítjuk el. Az embriókat úgy rendezzük el, hogy az embriónális tengely érintkezésben legyen a tápközeggel.

Kallusziniciáció, -szelekció és -regeneráció

Embriókat növesztünk antibiotikumot tartalmazó kalluszindukciós tápközegen (3MS3S) 3 héten át. Az embriogén kalluszokat feldaraboljuk, és 5 mg/l GA3-t és 1 mg/l NAA-t és szelekciós szert és antibiotikumot tartalmazó MS3S-re helyezjük, majd áttesszük antibiotikumot és a szelekciós szer nagyobb koncentrációját tartalmazó MS3S-re hozzávetőleg 4 hétre. A csíranövényeket ezután 1/2 MS sókat és 0,5 mg/l NAA-t tartalmazó Magenta dobozokba visszük át, miközben ugyanakkora szelekciósszer-koncentrációt tartunk fenn, mint az utolsó lépésben. A kallusznál a szelekciós és regenerációs rendszer hasonló, kivéve, hogy a kalluszokat az embrió kihelyezése után legfeljebb 6 hétig növesztjük, azaz a 3 hetes kalluszokat inokuláljuk, együtt tenyésztjük és maximum 3 további héten át növesztjük, mielőtt a szelekció és a regeneráció elkezdődik.

Eredmények

– A DNS-fragmentációt a 6. példában leírt módon *Agrobacterium*mal inokulált embriókban vizsgáljuk. Nem mutatunk ki DNS-fragmentációt azokban az embriókban, melyeket hősokk-előkezelésnek vetettünk alá.

– Az *Agrobacterium*-inokuláció előtti hősokk-előkezelés meggátolja az apoptózis kitörését.

8. példa *Agrobacterium* által indukált apoptózis szuppresszállása kukoricasejtekben p35-tel és iap-pal

Vektorok a „biolistic” transzformációhoz

A Biolistic készülékkel történő kukoricatranszformáláshoz használt vektorok mindegyike a pUC származéka. A pUbiPAT a foszfinotricinnel (PPT) szembeni rezisztencia biztosítására egy növényben expresszállható, foszfinotricin-acetil transzferázt (PAT) kódoló bar-

gént tartalmaz, melyet a kukorica-ubiquitinpromoter [Christensen et al., 1992] irányít. A *p35*, *iap* és *dad-1* kódoló régiókat úgy klónozzuk, hogy a kukorica metallothioneinszerű génpromotere (MTL) [de Framond (1991) szabályozása alatt álljanak. A *p35*-t és *iap*-ot Lois Miller (University of Georgia, Athens, Georgia) biztosította.

A *p35* kódoló régiót magában foglaló PstI-EcoRI fragmentumát kivágtuk a pHSP35VI⁺-ból [Clem és Miller (1994)], és a pBluescript (Stratagene, La Jolla, California) megfelelő helyeire klónozzuk, majd PstI-Asp718 fragmentumként a pMTL megfelelő helyeire klónozzuk. A pMTL-MTL promotert és CAMV35S terminátort tartalmaz. Az *iap* kódoló régióját magában foglaló Sall-SpeI fragmentumot a pHSCplAPVI⁺-ból [Clem and Miller (1994)] a pMTL XhoI-SpeI helyeire klónozzuk.

A *dad-1* kódoló szekvenciáját a 12T7 Arabidopsis cDNS-klónból (University of Michigan) Sall-XbaI fragmentumként klónoztuk.

Vektorok az Agrobacterium-transzformációhoz

Az MTL-promoter által irányított *p35*, *iap*, és *dad-1* kódoló régiókat a szuperbináris pSB11 vektor border-szekvenciái közé klónozzuk.

A kódoló szekvencia N-terminális kodonjánál egy intronnal rendelkező β -glükuronidáz (GUS)-gént az oktopin- és mannopinsintáz-génekből származó kimerapromoter [mas; az oktopinsintáz-promoter upstream aktiváló szekvenciájának trimerje a mannopinsintáz-promoter egy doménjével, Ni et al. (1995)] irányítja. A Mas-GUS-t, mely GUS-aktivitást fejez ki a növénysejtben, de az *Agrobacterium*ban nem, pSB11-be klónozzuk, hogy a pMasGUS-t megkapjuk.

Ezeket a vektorokat ezután az LBA4404(pAL4404,pSB1)-be visszük be elektroporációval, melyhez 0,2 cm-es Bio-Rad küvetákat használunk 2 kV/cm télerősségnél, 600 ohmos ellenállásokat és egy 25 μ F-os kapacitást. A pSB1 egy széles gazdákörű plazmid, mely egy pSB11-gyel homológ régiót és egy, a pTiBo542 virulenciaregiójából származó 15,2 kb-os fragmentumot tartalmaz [Ishida et al. (1996)]. A pSB11 plazmid elektroporációs bevitelével az LBA4404 (pAL4404, pSB1)-be a pSB11 és pSB1 kointegrálódását eredményezi.

Kukoricaembriók inokulálása Agrobacteriummal

Éretlen embriókat (0,8–2,2 mm) hasítunk ki fertőzésmentesen 12–15 nappal a beporzás után, és a sziklevelükkel felfelé kallusziniciációs tápközegre [2DG4+5 kloramben; Duncan et al., (1985)] helyezük. Az embriókat 10^9 sejt/ml sűrűségű *Agrobacterium*mal inokuláljuk 5 percig, majd kallusziniciációs tápközegen tenyésztjük 3 napon át. A szöveteket ezután cefotaxim-mal (250 mg/l) kiegészített ugyanilyen tápközegre helyezük. A szövetek túlélését 2 héttel az inokulálás után értékeljük ki.

I. típusú kallusz iniciálása

Embriókat kallusziniciációs tápközegre helyezünk 7–20 napra, hogy kalluszképződést idézzünk elő. Ezek a kalluszok jellemzően I. típusú kalluszok, melyek a sejtek kompakt és viszonylag jól szervezett csoportjait

alkotják [Suttie et al. (1994)]. A kapott embriogén kalluszt kivágjuk az embriókból, és kalluszfenntartó tápközegre (2DG4+0,5 mg/l (2,4-diklór-fenoxi)-ecetsav (2,4-D)) visszük át. A fent leírt módszerrel kapott I. típusú kalluszt fenntartó tápközegen tudjuk fenntartani (2DG4+2,4D 0,5 mg/l), és minden két hétben altényszetekben tenyésztjük tovább. Az I. típusú kalluszt *Agrobacterium*mal végzett inokulációs kísérletekben és „biolistic” készülékkel végzett transzformációnál használjuk fel.

Transzformációs kísérletek

A plazmid DNS-t 0,3–1 μ m-es aranymikrohordozóra csapjuk ki, ahogy a DuPont Biolistic kézikönyve leírja. Az antiapoptotikus gén 2 μ g-ját és 2 μ g pUbiPAT-ot használunk 50 μ l mikrohordozónként. Talcánként 16 darab I. típusú kalluszt bombázunk PDS-1000/He „biolistic” készülékkel (DuPont) alkalmazva. A szöveteket a leállítóernyő polca alatt 8 cm-re lévő polcra helyezük, és egy 10 $\times$ 10 μ m-es rozsdamentes acélernyőt alkalmazunk 650 psi értékű robbantási lemezekkel. A bombázás után a szöveteket sötétben tenyésztjük egy napig 25 °C-on, majd kalluszfenntartó tápközegre (2DG4+0,5 mg/l 2,4-D) visszük át. 10 nappal később a szöveteket ugyanilyen, 100 mg/l PPT-vel kiegészített tápközegre tesszük át. Hat-nyolc héttel később, a szöveteket 40 mg/l PPT-re visszük át. A szövetek közül néhányat ezután inokulációs kísérletekben használunk fel, néhányat pedig regenerációs tápközegre [Murashige és Skoog, mely 3% szacharózt, 0,25 mg/l ancimitolt és 5 mg/l kinetint tartalmaz] helyezzünk, naponta 16 óras megvilágítás mellett. A transzformált növényeket úgy azonosítjuk, hogy klór-fenolvörös (CR)-assay-t alkalmazunk, hogy teszteljük a PPT-rezisztenciát [Cramer et al. (1993)], és ezután PCR-rel igazoljuk azt.

Transzgenikus I. típusú kallusz inokulálása

Agrobacteriummal

A fenti módon kapott transzgenikus I. típusú kalluszt *Agrobacterium*mal inokuláljuk. A kukoricaszöveteket 5–10 percre baktériumsuszpenzióba áztatjuk. Inokulálás után a kukoricaszöveteket sötétben tenyésztjük 25 °C-on 2DG4+0,5 mg/l 2,4-D-ben. Két vagy három nappal az inokulálás után a szöveteket ugyanilyen, cefoxim-mal (250 mg/l) kiegészített tápközegbe visszük át.

A transzgenikus anyag elemzése

100 mg kalluszból genomi DNS-t extrahálunk Isoquick kittel (Microprobe, CA), és 20 μ l vízben újrászuszpendáljuk. A PCR-reakcióhoz 1 μ l-t használunk. A PCR-reakciókat Perkin–Elmer hő ciklizátoraiban 25 μ l-es reakció-térfogatban hajtjuk végre 1 $\times$ PCR-pufferrel, 0,5 egység AmpliTaq-ot, mindegyik dNTP-ből 200 μ M-t, mindegyik primerből 0,2 μ M-t alkalmazva. A *pat*-gén jelenlétének kimutatására a szövetekben, a PCR-reakciókat PAT-primerekkel hajtjuk végre 55 °C-os anneálási hőmérsékleten. Az *iap*, a *p35* és *dad-1* gén kimutatásához a transzgenikus szövetekben mindegyik reakciónál a használt primerek a P és I, P és 35, P és D, 55 °C, 55 °C, illetőleg 48 °C anneálási hőmérsékleten.

PAT1: 5'-TGTCTCCGGAGAGGAGACC-3' (1. azonosító számú szekvencia)

PAT2: 5'-CCAACATCATGCCATCCACC-3' (2. azonosító számú szekvencia)

MTL (P): 5'-AGGTGTCCATGGTGTCTCAAG-3' (3. azonosító számú szekvencia)

iap (I): 5'-ACAATCGAACCGCACACGTC-3' (4. azonosító számú szekvencia)

p35 (35): 5'-CCAGGTAGCAGTCGTTGTGT-3' (5. azonosító számú szekvencia)

dad-1 (D): 5'-CCTTGTTTCCTTTGTTCACT-3' (6. azonosító számú szekvencia)

p35- és iap-RT-PCR

Transzgenikus kalluszból teljes RNS-t vonunk ki Tripure izolációs reagenssel (Boehringer Mannheim), RNáz mentes DNázal kezeljük, és 0,5 µg-ot veszünk belőle a cDNS-szintézishez RT-PCR-t (Clontech) és oligo-dT primert alkalmazva. A második szál szintézise után, a huszadik reakció termékét használjuk templátként a Taq DNS-polimerázzal végzett PCR-reakcióhoz.

Az RT-PCR-hoz használt *p35* primerek

5'-GGTCTATACGAAGCGTTAC-3' (7. azonosító számú szekvencia) és 5'-CCACGTAGCAGTCGTGTGT-3' (8. azonosító számú szekvencia), melyek 300 bp-os transzkriptumot amplifikálnak.

Az RT-PCR-hez használt *iap*-primerek: 5'-CATGTCTGACTTGCATTGG-3' (9. azonosító számú szekvencia) és 5'-ACAATCGAACCGCACACGTC-3' (10. azonosító számú szekvencia) melyek 300 bp-os transzkriptumot amplifikálnak.

A genomi DNS-szennyeződés kizárására, párhuzamosan olyan kontroll-DNS-reakciókat végzünk, melyekben a reverz transzkriptázt kihagyjuk.

Eredmények

– A legtöbb embrió és embriogén kallusz nem éli túl az *Agrobacterium*-inokulációt. Egy rövid fertőzés (5 perc) elegendő ennek a reakciónak a kiváltásához. Azok a szövetek, melyeket *Escherichia coli*-val tenyésztettünk együtt, és ugyanilyen eljárásoknak vetettünk alá, nem mutatnak károsodást.

A *p35*-öt, *iap*-ot és *dad-1*-et növényi expressziós kazettába klónoztuk a T-DNS borderszekvenciái közé. Ha ezeket az antiapoptotikus géneket a T-DNS hordozza, azoknak az inokuláció idején a kukoricasejtekhez kell jutniuk. A kukoricaszöveteket sejthalál-szuppresszorgéneket (zárójelek között) tartalmazó és nem tartalmazó *Agrobacterium* LBA4404-gyel (10^9 sejt/ml) inokuláljuk. Az együtt tenyésztés után a kukoricaembriókat vagy az I. típusú kalluszt megvizsgáljuk, hogy meghatározzuk a szöveti túlélés mértékét, mely az antiapoptotikus gének kifejeződésével biztosított védelem mértékét jelzi. Mindegyik kezelést 50–80 kukoricaexplantátummal hajtjuk végre, és kétszer megismételjük. A szöveteket 3 nappal az inokulálás után ugyanolyan, de cefotaximot tartalmazó tápközegre visszük át. Az *Agrobacterium* hatását az inokulálás után két héttel értékeljük. Az eredményeket a 7., illetve a 8. táblázatban mutatjuk be.

7. táblázat
(embriók)

	A válaszreagáló szövetek száma/vizsgált szövetek száma (%)	
	1. kísérlet	2. kísérlet
Nincs baktérium	52/63 (82%)	25/31 (80%)
LBA4404	2/55 (3%)	3/89 (3%)
LBA4404(<i>p35</i>)	19/75 (25%)	18/74 (24%)
LBA4404(<i>iap</i>)	22/89 (24%)	21/75 (28%)
LBA4404(<i>dad-1</i>)	4/48 (8%)	10/66 (15%)

8. táblázat
(I. típusú kallusz)

	A válaszreagáló szövetek száma/vizsgált szövetek száma (%)	
	1. kísérlet	2. kísérlet
Nincs baktérium	76/80 (95%)	72/80 (90%)
LBA 404	8/80 (10%)	6/80 (7,5%)
LBA4404 (<i>p35</i>)	23/80 (29%)	27/80 (33%)
LBA4404 (<i>iap</i>)	35/80 (31%)	30/80 (37%)
LBA4404 (<i>dad-1</i>)	15/80 (18%)	13/80 (16%)

Az embriók körülbelül 80%-a embriogén kalluszt eredményez, amikor nem kezeljük *Agrobacterium*-mal. A *p35*-öt vagy *iap*-ot hordozó *Agrobacterium*-mal kezelt embriók körülbelül 25%-a eredményez embriogén kalluszt, míg az *Agrobacterium*-mal inokulált embrióknak csak 3%-a mutat kallusziniciációt. Hasonló hatást figyelünk meg a *p35*-öt vagy *iap*-ot hordozó *Agrobacterium*-mal inokulált I. típusú kallusszal (2. táblázat). A *dad-1* mindegyik rendszerben csak kismértékű védelmet nyújt.

– Úgy tűnik, hogy a *p35* és *iap* átmeneti expressziója lecsökkenti a szövetek barnulását bizonyos mértékben, de a jelenséget nem gátolja meg teljesen. Ez a kukoricasejtekbe irányuló T-DNS-transzfer kis hatékonyságával magyarázható. A GUS átmeneti expressziójából következően úgy tűnik, hogy a célszövet nem transzformálódik egységesen. Ez azt is jelezheti, hogy nagyon kevés sejt fogadja be a T-DNS-t.

– A *p35*-öt vagy *iap*-ot tartalmazó *Agrobacterium*-mal inokulált embriókból felbukkanó embriogén kallusz szerkezete nem olyan kompakt, mint a kontrolloké. Ez a tény magyarázható, hogy csak az antiapoptotikus gént hordozó T-DNS-t kapó sejtek élik túl a fertőzést, és az egyenként transzformált sejtek nem szükségszerűen adják át a szignált a szomszéd sejteknek. A szöveti növekedésnek ez a típusa azt bizonyíthatja, hogy a sejthalál-szuppresszorgének a pusztulásra ítélt sejteket nagyon hatásosan meg-

mentik, de a rövid ideig tartó expressziójuk nem biztosít teljes védelmet az *Agrobacterium* hatásával szemben.

- A *p35*-re, *iap*-ra és *dad-1*-re transzgenikus embriogén kallusz annak az eredménye, hogy az említett, növényben expresszálnak promotor által szabályozott géneket mikrorészecskebombázással I. típusú kalluszba juttatjuk. A szerkezeteket együtt bombázzuk be a *bar*-génnel, a szöveteket PPT-n szelektáljuk, és ezeknek a kalluszoknak a transzformált állapotát először PCR-rel igazoljuk (9. táblázat).

9. táblázat

Transzformációs kísérlet	Pozitív PCR-ek száma
UbiPAT	5 PAT+
MTLp35, UbiPAT	9 PAT+, 3 <i>p35</i> +
MTLiap, UbiPAT	7 PAT+5 <i>iap</i> +
MTLdad, UbiPAT	11 PAT+, 4 <i>dad-1</i> +

Az *Agrobacterium*mal szembeni érzékenységet ezután független eseteken vizsgáljuk meg. Kalluszt inokulálunk *Agrobacterium* LBA4404-gyel (10^9 sejt/ml). Két független transzgenikus kalluszvonalat tesztelünk. Mindegyik kezelést kétszer megismételjük. A szöveteket három nappal az inokulálás után ugyanolyan, de cefotaximot tartalmazó tápközegbe visszük át. A kukoricaszövetek túlélését az *Agrobacterium*-inokuláció után két héttel értékeljük (10. táblázat).

10. táblázat

Transzformációs kísérlet	Az LBA4404-re rezisztens kalluszok száma	
	1. vonal	2. vonal
UbiPAT	1/24 (4%)	1/32 (3%)
MTLp35, UbiPAT	22/25 (88%)	25/28 (89%)
MTLiap, UbiPAT	20/22 (90%)	19/25 (76%)
MTLdad, UbiPAT	12/27 (44%)	9/22 (41%)

5

A *p35*-re és *iap*-ra transzgenikus embriogén kalluszok nem mutatnak sejthalált, amikor *Agrobacterium*-inokulációnak vetjük alá, mivel a nagyobb barnulások tünetet a kontrollszöveteken figyeljük meg az együtt tenyésztés után. A *dad-1* gén jelenléte késlelteti az apoptózis kitörését, de nem gátolja meg a sejthalált úgy, mint az *iap* és a *p35*. Az eredmények több független kísérletben reprodukálhatók.

10

- A *p35* és *iap* védőhatása szintén nyilvánvaló oligonukleoszomális DNS-fragmentációs elektroforézissel mérve.

15

- Úgy tűnik, hogy a *dad-1* hatása akkor nyilvánvalóbb, amikor stabilan expresszálnak a szövetekben.

20

- Nyilvánvaló összefüggés van az antiapoptotikus gének expressziója és a sejthalál hiánya között. A *p35* és *iap*-gének kifejeződnek a transzgenikus kalluszban, ahogy azt a reverz transzkripció PCR-rel (RT-PCR) igazoltuk. A kontroll egységesen negatív volt.

25

9. példa Olyan *Agrobacterium* törzsek szűrése és azonosítása, melyek nem váltanak ki sejthalált a kukoricasejtekben

25

Egy jól tanulmányozott kukoricavonal (A188) és egy saját elit vonal (Elite 2) embriogén kalluszának és embrióinak érzékenységét vizsgáljuk meg az *Agrobacterium* 40 vad típusú törzsekből álló panelt alkalmazva. Ezeket a sejteket először az A188 és Elite 2 embriogén kallusszal és embriókkal való kompatibilitásukra teszteljük. Ezek közül, a 40-ből 6 nem teljesen gátolta a kukoricaszövetek növekedését, és ezeket tovább teszteljük kallusziniciációs tápközegre helyezett, és 10^9 sejt/ml koncentrációban inokulált Elite 2 embriókkal. A kallusziniciációt 2 héttel az inokulálás után értékeljük ki, és a válaszreakciót adó embriók százalékában fejezzük ki.

30

35

40

Ezeket a törzseket hormonmentes tápközegre helyezett dohányleveleken tovább teszteljük virulenciára, és megjegyezzük, hogy a törzseknek az a képessége, hogy programozott sejthalált indukálnak a kukoricasejtekben, nincs összefüggésben a virulenciával. A 11. táblázatban lévő százalékok a tumoros levéllemezek számát mutatják.

11. táblázat

A nem nekrotikus törzsek virulenciájának összehasonlítása

Törzsek	Forrás	Opin	Dohányon tesztelt virulencia	2DG4+5Chl (%)
1	rózsa	?	100	37
2	őszibarack	nopalín	82	25
3	ezüstlevelű nyár	agropin	66	50
4	krizantém	L,L Sap	100	63
A	rózsa	nopalín	92	66**
B	nyírfa	nopalín	76	58**

** Jó I. típusú kallusz

Az A és B *Agrobacterium* törzset az ATCC-nél helyeztük letétbe 1997. május 2-án a Budapesti Szerződésnek megfelelően 55 964 illetőleg 55 965 nyilvántartási számon.

10. példa Kukoricasejtekben apoptózist kiváltó

Agrobacterium-gének

Egy BAC-könyvtár (mesterséges baktériumkromoszóma) szerkesztünk hozzávetőleg 100–2000 kb-os *Agrobacterium* genomi DNS-fragmentumokkal egy kísérletben, hogy azonosítsuk a kukorica-embriogénzövetekben a sejthalálválaszért felelős genetikai elemeket. A könyvtár *Escherichia coli*-ba visszük be. Abból a célból, hogy ellenőrizzük, vajon egy ilyen háttér alkalmas-e a BAC-könyvtár szűrésére, csak BIBAC-vektort tartalmazó *E. coli*-t viszünk be kukoricaembriókba. Úgy találtuk, hogy az *E. coli* nem indukál jellegzetes apoptotikus választ.

Megbecsültük, hogy körülbelül 25–30, 150–200 kb-os inszertumot hordozó BAC klón elegendő ahhoz, hogy lefedje a teljes *Agrobacterium*-genomot, feltételezve, hogy genommérete majdnem azonos az *E. coli*-éval ($4,6 \times 10^6$ bp). A klónokat viszonylag nagy számban (200) egy *Agrobacterium*-kromoszomális próbával (*chvD*) hibridizáljuk azért, hogy az *E. coli*-ban készített BAC-könyvtár az *Agrobacterium*-genomot teljesen reprezentálja. A 200 vizsgált klón közül 5 világosodott ki a *chvD*-próbával (adatok nem mutatunk).

Az egyik megoldandó probléma az, hogy az *Agrobacterium*-ból származó genetikai komponensek némák lehetnek *E. coli*-ban. Ezenkívül további növényekből és/vagy *Agrobacterium*-ból származó faktorok lehetnek szükségesek egy ilyen klón kifejeződéséhez. Ezért a BAC-vektor tartalmaz egy *Agrobacterium*-ban működőképes replikációs origót is, és könnyen transzformálható *Agrobacterium*-ba egy ilyen kísérletben.

Baktérium szaporítása

Az *Agrobacterium*-ot 3 napon át YP tápközegben (5g/l élesztő kivonat, 10 g/l pepton, 5 g/l NaCl, 15 g/l agar, pH=6,8) növesztjük, melyet, amikor szükséges, 100 mg/l kanamicinnel egészítünk ki. A baktériumokat egy oltókaccsal összegyűjtjük, és N6 folyékony tápközegbe szuszpendáljuk 10^9 – 5×10^9 sejt/ml sűrűségben. Az *Agrobacterium*-sejteket egy egyéjszakai YP tápközeges tenyészetből is összegyűjthetjük, és N6 folyékony tápközegben újrászuszpendálhatjuk.

Az *E. coli* DH10B-t LB tápközegben (1% Bakto-tripton, 0,5% Bakto élesztő kivonat, 170 mM NaCl, pH=7,0) növesztjük. Transzformálás után SOC-oldatban (2% Bakto-tripton, 0,5% Bakto élesztő kivonat, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glükóz, pH=7,0).

Genomi DNS készítése Agrobacteriumból

Az LBA4404 törzset használjuk a könyvtár elkészítéséhez. Az alkalmazott eljárás, anyagok és reagensek az Imbed kitből (BioLabs, USA) származnak. 4×10 ml *Agrobacterium*-tenyészetet növesztünk egy éjszakán át 28 °C-on. Egy órával az összegyűjtésük után 180 mg/ml klór-amfenikolt adunk hozzá, hogy a kromoszómákat sorba állítsuk. A sejteket 800 g-n 4 °C-on

15 percig centrifugáljuk, és a pelletet levegővel megszárítjuk. A sejteket 0,5 ml sejtszuszpenziós oldatban (10 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 100 mM EDTA, pH=7,2) 42 °C-ra előmelegítjük, mielőtt agarózba ágyazzuk. Az *Agrobacterium*-sejteket agarózzrudakba ágyazzuk, hogy a sejtfal lebontását és a fehérjementesítést úgy hajtsuk végre, hogy elkerüljük a DNS elvesztését. A sejtek agarózzrudakba ágyazásához a sejteket 42 °C-ra lehűtött ddH₂O-ban lévő, 1%, alacsony oldaspontú agaróz azonos mennyiségével összekeverjük, majd hagyjuk megszilárdulni egy Gel Syringe présben. Az agaróz megszilárdulása után a dugókat 3 térfogat lizozimoldatba (1 mg/ml lizozim, 10 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 100 mM EDTA, 0,2% nátrium-dezoxikolat, 0,5% N-lauril-szarkozin, pH=7,2) tesszük át, és 2 órán át 37 °C-on inkubáljuk óvatosan rázva. A lizozimoldatot eltávolítjuk, és a rudakat kétszer mossuk 3 ml mosóoldatban 15 percig. A rudakat ezután 3 ml Proteináz K-oldatban (1 mg/ml proteináz K, 100 mM EDTA, 1% N-lauril-szarkozin, 0,2% nátrium-dezoxikolat, pH=8,0) inkubáljuk 20 órán át 42 °C-on óvatosan rázva. A proteináz K-oldatot kiszívással eltávolítjuk, és a rudakat kétszer 5 ml mosóoldattal (20 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH=8,0) szemben dializáljuk 15 percig, majd 3 ml PMSF-oldattal (20 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 1 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid, pH=8,0) szemben egy órán át, ezt két mosás követi mosóoldattal. A rudakat ezután kétszer 5 ml tárolóoldattal (2 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH=8,0) 15 percig mossuk, majd újra GelSyringe-ekbe töltjük. 1 mm hosszúságú (10–20 ml) mintákat vágunk egy borotvapengével, és NotI restrikciós endonukleázpufferrel (BioLabs, USA) szemben 30 percig 4 °C-on dializáljuk. A restrikciós endonukleázpuffert friss pufferrel helyettesítjük, és inkubálást hajtunk végre egy éjszakán át 37 °C-on 20 egység NotI enzimmal (BioLabs, USA). Az *Agrobacterium*-DNS részleges emésztését NotI-t, egy ritka hasítóenzimet alkalmazva hajtunk végre. A NotI elméletileg 18 kb hosszúságú fragmentumokat eredményez teljes emésztés után, feltételezve, hogy az *Agrobacterium*-genom 60%-os G/C tartalommal rendelkezik (ezeket az eredményeket különböző *Agrobacterium*-génekből extrapoláltuk). Aliquotokat terhelünk a géle egy levágott hegyű pipettával. A DNS-t pulzálómezőjű gél (PFG)-elektroforézissel különítjük el 1%-os agarózzgélben 0,5×TBE-ben 14 °C-on egy BioRad CHEF Mapper-t alkalmazva 6 V/cm feszültségnél 32 órán át. A gél 20 percig 1 mg/ml EtBr-ddH₂O fürdőben festjük, a gélről a 100–200 kb-nak megfelelő fragmentumokat tartalmazó agarózszeleteket kivágjuk. Az agarózszeleteket kétszer TE-vel szemben dializáljuk egy órán át 4 °C-on, és kétszer agarózpufferral (BioLabs, USA) szemben 1 órán át 4 °C-on, majd 65 °C-on 10 percen át megolvastjuk, és 100 mg agarózonként egy egység agarózzal (BioLabs, USA) emésztjük. A DNS-koncentrációt fluorometrikusan becsüljük meg DyNA Quant 200-at (Hoefer, USA) alkalmazva.

BIBAC-vektor készítése

A BIBAC-vektort Dr. Carol M. Hamilton (Cornell University, Ithaca) volt szíves rendelkezésünkre bocsá-

tani [Hamilton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 93, 9975–9979 (1996)]. A BIBAC-ot úgy tervezték meg, hogy *E. coli*-ban és *Agrobacterium*-ban is replikálódjon, és a sacBII gént is tartalmazza, mely lehetővé teszi a klónozott inszertumok közvetlen szelektálását szacharóz tápközegen. A BIBAC-vektor az F-faktor episzomaorigót is hordozza, mely egy vagy két másolat stabil fennmaradását teszi lehetővé a legfeljebb 300 kb-os inszertumokkal sejtenként [Shizuya et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89, 8794–8797 (1992)]. A plazmidot Wizard® Plus Maxiprep kitet (Promega, USA) használva izoláljuk. Egy fenol-kloroformos extrakciót hajtunk végre az izopropanolos kicsapás előtt. A plazmidot Nottl-gyel emésztjük, és 1 egység garnélarák alkalikus foszfatázzal (Boehringer Mannheim) defoszforilezzük 37 °C-on egy órán át. A ligálást 40 ml-ben hajtjuk végre, melyben 150 ng *Agrobacterium*-DNS-t inkubálunk 17 ng hasított vektorral (a becsült molarány 10:1 a feleslegben lévő vektorral), 400 egység T4 DNS-ligázzal (Boehringer) 17 °C-on egy éjszakán át. Transzformálás előtt a ligációs elegyet TE-vel és Micro-Collodion zacskókban (Sartorius, Németország) lévő 1/10 TE-vel szemben dializáljuk 4 °C-on 2 órán át.

A DH10B transzformálása pBAC-könyvtárral

Kompetens *E. coli* DH10B sejtek (F⁻, recA1; Elektromax, Gibco-BR) transzformálását hajtjuk végre elektroporációval előhűtött Gene Pulser küvettákban (BioRad, USA) Gene-Pulser™-mel (BioRad, USA) a következő beállításokat alkalmazva: feszültség: 2,5 kV, kapacitás: 25 mF, és ellenállás: 200 Ω. A kompetens sejtek 25 ml-ét 1 ml ligációs oldattal keverjük össze mindegyik elektroporációnál. Az elektroporáció után a sejteket 0,5 ml SOC-oldatba visszük át, és 37 °C-on inkubáljuk egy forgó korongon 45 percig. A sejtek 150 ml-es aliquotjait kanamicint (40 mg/ml) és szacharózt (5%) tartalmazó LB tápközegre szélesztjük.

BAC-DNS izolálása és a BAC-klónok DNS-inszertum-méretének meghatározása

BAC-klónokat növesztünk egy éjszakán át folyamatos mozgatás mellett 10 ml, kanamicint (50 mg/ml) tartalmazó LB-ben. DNS-t vonunk ki a lúgos lízis módszernek megfelelően (Sambrook et al., 1989) a következő változtatásokkal: 30 mg/ml RN-áz adunk a szuszpenziós oldathoz, és egy fenol-kloroformos tisztítást hajtunk végre az izopropanolos kicsapás előtt. A nukleinsavpelleletet 50 ml ddH₂O-ban oldjuk fel. A DNS-t PFG-elektroforézissel különítjük el egy 1%-os agarózgélben 0,5×TBE-ben 14 °C-on egy BioRad CHEF Mapper-t alkalmazva 6 V/cm-nél 32 órán át.

Kukoricaembriók inokulálása *Agrobacterium*-mal

Éretlen embriókat (0,8–2,5 mm hosszúságú) hasítunk ki fertőzésmentesen 12–15 nappal a beporzás után, és a sziklevelelükkel felfelé kallusziniciációs tápközegre (2DG4+5 Chloramben) (Duncan-féle „D” tápközeg-glükózzal: N6 major, B5 minor, MS vas, 20 g/l szacharóz, 5 mg/l klóramben, 8 g/l tisztított agar, G4 adalékok és 10 mg/l glükóz, pH=5,8) [Duncan et al. (1985)] helyezzük. A baktériumsejteket 2N63SM-ben (3,97 g/l N6 sók, N6 vitaminok, 30 g/l szacharóz, 2 mg/l 2,4-D, 8 g/l tisztított agar, pH=5,8) szuszpendáljuk. Az emb-

riókat *Agrobacterium*-mal vagy *E. coli*-val inokuláljuk 10⁹ sejt/ml sűrűségben 5 percig, majd kallusziniciációs tápközegen tenyésztjük 3 napig. A szöveteket ezután ugyanilyen, de cefoxaminnal (250 mg/l) kiegészített tápközegre visszük át. A szövetek túlélését 2 héttel az inokulálás után értékeljük ki.

Agrobacterium transzformálása

Agrobacterium-transzformációt hajtottunk végre a korábban leírt módon [Wen-jun és Forde, Nucleic Acids Research 20, 8385 (1989)] egy 0,2 cm-es elektroporációs küvettában (BioRad Laboratories Ltd., USA) egy Gene Pulser™-t (BioRad) alkalmazva 10 kV/cm (2,00 kV) télerősségnél, 25 mF kapacitásnál és 600 Ω ellenállásnál.

Vektorok a Biolistic-transzformációhoz

A Biolistic készülékkel történő kukoricatranszformáláshoz használt vektorok mindegyike a pUC származéka. A pMTL a kukorica metallothioneinszerű génpromotérét (MT-L) tartalmazó növénytranszformációs vektor [de Framond (1991)]. A *virB1* kódoló régióját polimeráz-láncreakcióval amplifikáljuk templátként a BAC-klónt alkalmazva az A törzsből, a következő primerekkel: 5'-GGAGAGGCGGTGTTAGTT-3' (11. azonosító számú szekvencia); 5'-CATCATCGCATTCGAGAG-3' (12. azonosító számú szekvencia). A PCR-reakciókat Perkin-Elmer hőciklizátorban hajtjuk végre, 55 °C-os annealási hőmérsékleten 25 µl-es reakció-térfogatban, mely tartalmaz 1×PCR-puffert, 0,5 egység AmpliTaq-ot, 200 µM-t mindegyik dNTP-ből, 0,2 µM-t mindegyik primerből. A PCR-terméket először a TA-klónozáshoz való pCR2.1 vektorba (Invitrogen, San Diego, USA) klónozzuk. Majd egy XbaI-SpeI kettős emésztéssel kihaladjuk, és a pMTL-vektor XbaI-helyére klónozzuk szensz- és antiszensz-orientációban, mely a pMTL-*virB1*-et, illetőleg a pMTL-*virB1*as-t eredményezi. Hasonlóan, az A törzsből amplifikált PCR-terméket pMTL-be klónozzuk szensz- és antiszensz-orientációban, mely a pMTL-*virB1A*-t, illetőleg a pMTL-*virB1A*as-t eredményezi.

Az *acvB*-t a pMTLsense és pMTLantisense XbaI-XhoI helyére klónoztuk, mely a pMTL-*acvB* és pMTL-*acvB*as-t eredményezte.

A pGUS a β-glükuronidáz (GUS)-gént tartalmazza egy intronnal a kódoló szekvencia N-terminális kodonjánál, és melyet az oktopin- és mannopinsintáz-gének-ből származó kimérapromoter (az oktopinsintáz-promoter upstream aktiváló szekvenciájának trimerje a mannopinsintáz-promoter egy doménjével) [Ni et al., (1995)] irányítja.

Kukoricaszuszpenziós sejtek

Zea mays cv Black Mexican Sweet (BMS) szuszpenziós tenyészetét 30 g/l szacharózzal és 2 mg/l 2,4-diklór-fenoxi ecetsavval (2,4 D) kiegészített N6 tápközegben (Chu et al. (1975)) (2N63S) tartjuk fenn. A bombázásos kísérletekhez használt kukoricasejt-suszpenziókat 3 napos, gyorsan növekvő tenyészetekből vesszük. A bombázás előtt hozzávetőleg 0,5 ml pakolt térfogat sejtet vákuumszűrünk 7 cm-es szűrőkön (Whatman, No.4). A szélesztett sejteket 4 órán át 25 °C-on tartjuk phytagarral szilárdított, 120 g/l szacharózt tartalmazó 2N6 tápközegen a bombázást megelőzően.

A növénysejtek bombázása: A szöveteket olyan aranymikrolövedékekkel bombázzuk, melyekre a plazmidok keverékét precipitáltuk. A pGUS-plazmid-DNS-t alkalmaztuk belső kontrollként az átmeneti expressziós vizsgálatokban. A kotranszformációs kísérletekhez az aranyrészecskék mindegyik plazmid DNS azonos mennyiségét (0,5 µg mindegyik plazmid DNS-ből céllemezekenként) hordozza. Mindegyik DNS megfelelő mennyiségét elegyítjük 10 µl-es össztérfogatban, és 50 µl 2,5 M CaCl₂-vel és 20 µl 0,1 M spermidinmentes bázissal 50 µl 0,3 µm-es aranymikrohordozóra (60 mg/ml) csapjuk ki. Mikrolövedékbombázást hajtunk végre PDS-1000 He Biolistic készülékkel (DuPont) a mintát tartalmazó 1100 psi robbantási lemezeket alkalmazva, melyeket a leállítóernyő polca alatt 8 cm-re helyezünk el.

Átmeneti expressziós vizsgálatok: β-glükuronidáz-aktivitást határozzuk meg egy kemilumineszcens assay-vel GUS-Light kittel (Tropix). A β-glükuronidáz-aktivitásokat fényegységekként fejezzük ki, melyet egy Analitical Luminescence model 2001 Luminométerrel mutatunk ki, mely 10 másodpercenként összegezve 25 °C-on.

Telephibridizálás: Egynapos BAC-klónokat nejlon-filterekre (Hybond-N, Amersham Lie Sciences, UK) emelünk át a radioaktívan jelölt *Agrobacterium*-eredetű próbákkal történő hibridizáláshoz. A DNS-próbákat [³²P]dCTP-vel jelöljük a Pharmacia oligojelölő kitjét alkalmazva. A *chvG*-próba és a *virD1*-próba egy PCR-amplifikációs fragmentumnak felel meg. A könyvtárfiltreket előhibridizáljuk a hibridizációs oldatban 65 °C-on 2 órán át (5×SSPE, 5×Denhardt-oldat, 0,5% SDS, 0,1 mg/ml lazacsperma-DNS). A hibridizációt ugyanebben a pufferben hajtjuk végre 65 °C-on egy éjszakán át. A szűrőket 1×SSC-vel, 0,1% SDS-sel öblítjük 15 percig 65 °C-on, ezt követően 0,1×SSC és 0,1% SDS elegyében 15 percig inkubáljuk 65 °C-on. A szűrőket gyorsan szárazra leitatjuk, és a filmet egy éjszakán át exponáljuk -70 °C-on egy erősítőernyőt alkalmazva.

A PCR-amplifikáláshoz egy oltókacsnyi LBA4404-t szuszpendálunk ddH₂O-ban, 15 percig 95 °C-ra melegítjük, lecentrifugáljuk, és 1 ml-t használunk fel a PCR-reakcióhoz a következő körülményeknél: 5 perc 95 °C-on, és ezután 30 ciklus: 45 másodperc 95 °C-on, 45 másodperc 55 °C-on, és 45 másodperc 72 °C-on.

Eredmények

Hozzávetőleg 20 kukoricaembriót inokulálunk a BAC-könyvtár egy klónjával, és kallusziniciációs tápközegre helyezük. Az együtt tenyésztést követően az embriókat ugyanilyen, 250 mg/ml cefotaximmal kiegészített tápközegre visszük át. Az embriókat ez után megvizsgáljuk, hogy a rekombináns baktérium által okozott károsodást felbecsüljük. 160 szűrt klón közül 4 független BAC-klónt azonosítunk (BAC1, BAC2, BAC3, BAC4). A kukoricaszövetek sejthaláláért felelős BAC-klónokon lévő terület további lokalizálásához a BAC-klónok HindIII fragmentumait egy Bluescript-vek-

torba alklónozzuk. Ezeknek a klónoknak mind-egyikét kukoricaszöveteken teszteljük, hogy meghatározzuk melyik az az egy, ami megőrizte a sejthalálkiváltó képességet.

- A DNS-szekvenciákat alklónok és oligonukleotidok alkalmazásával meghatározzuk. A BAC1–2, BAC2–2 és BAC3–2 szekvenciák homológiát mutatnak a *virB1*-gyel *xylA*-*xyI*B-vel, illetőleg az *acvB*-vel. A BAC-4 azonos a BAC3–2-vel.
- Az *acvB*-t (BAC3 és BAC4), *virB1*-t (BAC1) és *xylA*-*xyI*B-t (BAC2) hordozó BAC-klónokat A törzsbe visszük be, ami A(*acvB*), A(*virB1*) és A(*xylA*) törzseket eredményezi. Ezeket a törzseket használjuk kukoricaszövetek inokulálására. Az LBA4404-gyel inokulált szövetek egy jellemző sejthalálmintázatot mutatnak, míg az A törzsszel való fertőzés nem tud ilyen tüneteket létrehozni. Az A(*acvB*), A(*virB1*) és A(*xylA*) különböző mértékben indukál sejthalált, az A(*acvB*)-vel a legerősebb. Ezeknek a géneknek a jelenléte így az A törzs és a kukorica közötti kölcsönhatást átala-kítja, és a kukoricaszöveteket érzékenyebbé teszi a fertőzéssel szemben (12. táblázat).

12. táblázat

Törzsek	1. kísérlet	2. kísérlet	3. kísérlet
Nincs baktérium	19/22 (86%)	15/18 (83%)	16/18 (88%)
LBA4404	2/20 (10%)	1/17 (6%)	3/20 (15%)
<i>E. coli</i>	17/20 (85%)	16/19 (84%)	17/21 (81%)
A törzs	19/20 (95%)	17/21 (81%)	17/20 (85%)
<i>E. coli</i> (BAC1)	5/20 (25%)	5/17 (30%)	4/18 (22%)
<i>E. coli</i> (BAC2)	10/19 (52%)	10/20 (50%)	9/19 (47%)
<i>E. coli</i> (BAC3)	3/18 (16%)	4/17 (24%)	3/20 (15%)
<i>E. coli</i> (BAC4)	4/19 (21%)	3/19 (16%)	2/21 (9%)
A törzs (BAC1)	5/19 (26%)	6/17 (35%)	8/25 (32%)
A törzs (BAC2)	9/22 (41%)	10/23 (43%)	8/19 (42%)
A törzs (BAC3)	3/20 (15%)	2/18 (11%)	3/21 (14%)
A törzs (BAC4)	2/20 (10%)	3/19 (16%)	4/20 (20%)

A Southern-analízisben A136, LBA4404, LBA4402, A és B *Agrobacterium* törzsek HindIII-mal emésztett genomi DNS-ét próbázzuk mérsékelt szigorú körülmények között a *xylA*-t vagy az *acvB*-t hordozó fragmentummal. *XylA*-val homológ fragmentumok vannak jelen az összes vizsgált törzsben. Az *acvB*-vel hibridizáló szekvenciák találhatóak az LBA4404-ben, LBA4402-ben és az A136-ban, melyek sejthalált indukálnak a kukoricaszövetekben. Érdekes módon az *acvB* hiányzik az A és B *Agrobacterium* törzsekből. Az *acvB* tehát korlátozott eloszlású. Ahogy korábban beszámoltak róla, az *acvB* viszonylag kevés *Agrobacterium* törzsben van jelen [Wirawan et al., Biosci. Biotech. Biochem. 60, 44–49 (1993)]. A *xylA*-t és az *acvB*-t nem a Ti plazmid hordozza, mivel azok jelen voltak a Ti-mentesített LBA4402 törzsben.

– Annak meghatározására, hogy az *acvB* és *virB1* expressziója a kukoricasejtekben letális-e, ezeket a géneket egy növény-expressziósvektorba klónoztuk, és a β -glükuronidázt (GUS) kifejező pGUS-vektorral együtt transzformáljuk. Abban az esetben, amikor a tesztgén letális, a GUS-aktivitás lecsökken vagy megszűnik [Mindrinos et al. (1994)]. A két gén kódolórégióját szensz- és antiszensz-orientációban egy MTL-promotert tartalmazó növényi expressziós vektorba klónozzuk, és bioliztikusan kukoricasejtekbe juttatjuk a pGUS-vektorral együtt. 30 óra múlva a GUS-aktivitást mérjük a kukoricasejtekben. Az eredményeket a 13. táblázatban mutatjuk be. A GUS-aktivitás körülbelül felére csökkent, amikor a *virB1*-et együtt bombáztuk be a pGUS-sal. Az *acvB*-vel és pGUS-sal együttesen bombázott kukoricasejtek következetesen egy 35-szörös csökkenést mutatnak a GUS-aktivításban. Ez azt jelzi, hogy az *acvB* nagymértékű expressziója a kukoricasejtekben ártalmas.

13. táblázat

A plazidszerkezeteket a kukoricasejtekbe Biolistic készülékkel juttatjuk be. 30 perces inkubálást követően a szöveteket homogenizáljuk, és a GUS-aktivitásokat meghatározzuk. Az aktivitásokat fényegység/ μ g fehérjeként fejezzük ki. Független bombázásokat elemeztük, és az adatokat az öt megismételt kísérlet átlagértéke $\pm$ SD-ként mutatjuk be.

Plazmid+pGUS	Átlag $\pm$ SD (Fényegység/ μ g fehérje)
pUC	2082 $\pm$ 199
pMTL- <i>virB1</i>	1014 $\pm$ 106
pMTL- <i>virB1as</i>	2543 $\pm$ 176
pMTL- <i>virB1K6</i>	1738 $\pm$ 330
pMTL- <i>virB1K6as</i>	2168 $\pm$ 282
pMTL- <i>acvB</i>	61 $\pm$ 19
pMTL- <i>acvBas</i>	2378 $\pm$ 292

Szekvencialista

(1) Általános információk:

(i) Bejelentő:

- (A) Bejelentő: NOVARTIS AG
 (B) Utca: Schwarywaldallee 215.
 (C) Város: Bazel
 (E) Ország: Svájc
 (F) Postai irányítószám: 4058
 (G) Telefon: + 41 61 324 11 11
 (H) Telefax: + 41 61 322 75 32

(ii) A találmány címe: Növénytranszformációs eljárások

(iii) A szekvenciák száma: 12

(v) Számítógéppel feldolgozható forma:

- (A) Hordozó típusa: flopilemez
 (B) Számítógép: IBM PC kompatibilis
 (C) Operációs rendszer: PC-DOS/MS-DOS
 (D) Szoftver: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

(2) Információ az 1. azonosító számú szekvenciához:

(i) Szekvenciajellemzők:

- (A) Hossza: 19 bázispár
 (B) Típusa: nukleinsav
 (C) Száltípus: egyszálú
 (D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: DNS (genomi)

(iii) Hipotetikus: nem

(iii) Antiszensz: nem

(vii) Közvetlen forrás:

- (B) Klón: PAT1

(xi) A szekvencia leírása: 1. azonosító számú szekvencia:

TGTCTCCGGA GAGGAGACC

19

(2) Információ a 2. azonosító számú szekvenciához:

(i) Szekvenciajellemzők:

- (A) Hossza: 20 bázispár
 (B) Típusa: nukleinsav

- (C) Száltípus: egyszálú
- (D) Topológia: lineáris
- (ii) Molekulatípus: DNS (genomi)
- (iii) Hipotetikus: nem
- (iii) Antiszensz: nem
- (vii) Közvetlen forrás:
- (B) Klón: PAT2
- (xi) A szekvencia leírása: 2. azonosító számú szekvencia:

CCAACATCAT GCCATCCACC

20

(2) Információ a 3. azonosító számú szekvenciához:

- (i) Szekvenciajellemzők:
 - (A) Hossza: 20 bázispár
 - (B) Típusa: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) Molekulatípus: DNS (genomi)
- (iii) Hipotetikus: nem
- (iii) Antiszensz: nem
- (vii) Közvetlen forrás:
- (B) Klón: MTL (P)
- (xi) A szekvencia leírása: 3. azonosító számú szekvencia:

AGGTGTCCAT GGTGCTCAAG

20

(2) Információ a 4. azonosító számú szekvenciához:

- (i) Szekvenciajellemzők:
 - (A) Hossza: 20 bázispár
 - (B) Típusa: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) Molekulatípus: DNS (genomi)
- (iii) Hipotetikus: nem
- (iii) Antiszensz: nem
- (vii) Közvetlen forrás:
- (B) Klón: iap (I)
- (xi) A szekvencia leírása: 4. azonosító számú szekvencia:

ACAATCGAAC CGCACACGTC

20

(2) Információ az 5. azonosító számú szekvenciához:

- (i) Szekvenciajellemzők:
 - (A) Hossza: 20 bázispár
 - (B) Típusa: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) Molekulatípus: DNS (genomi)
- (iii) Hipotetikus: nem
- (iii) Antiszensz: nem
- (vii) Közvetlen forrás:
- (B) Klón: P35 (35)
- (xi) A szekvencia leírása: 5. azonosító számú szekvencia:

CCAGGTAGCA GTCGTTGTGT

20

(2) Információ az 6. azonosító számú szekvenciához:

- (i) Szekvenciajellemzők:
 - (A) Hossza: 20 bázispár
 - (B) Típusa: nukleinsav

- (C) Száltípus: egyszálú
- (D) Topológia: lineáris
- (ii) Molekulatípus: DNS (genomi)
- (iii) Hipotetikus: nem
- (iii) Antiszensz: nem
- (vii) Közvetlen forrás:
 - (B) Klón: dad-1 (D)
- (xi) A szekvencia leírása: 6. azonosító számú szekvencia:

CCTTGTTTCC TTTGTTCACT

20

(2) Információ a 7. azonosító számú szekvenciához:

- (i) Szekvenciajellemzők:
 - (A) Hossza: 19 bázispár
 - (B) Típusa: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) Molekulatípus: DNS (genomi)
- (iii) Hipotetikus: nem
- (iii) Antiszensz: nem
- (xi) A szekvencia leírása: 7. azonosító számú szekvencia:

GGTCCTATAC GAAGCGTTAC

20

(2) Információ a 8. azonosító számú szekvenciához:

- (i) Szekvenciajellemzők:
 - (A) Hossza: 20 bázispár
 - (B) Típusa: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) Molekulatípus: DNS (genomi)
- (iii) Hipotetikus: nem
- (iii) Antiszensz: nem
- (xi) A szekvencia leírása: 8. azonosító számú szekvencia:

CCACGTTAGCA GTCGTTGTGT

20

(2) Információ a 9. azonosító számú szekvenciához:

- (i) Szekvenciajellemzők:
 - (A) Hossza: 19 bázispár
 - (B) Típusa: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) Molekulatípus: DNS (genomi)
- (iii) Hipotetikus: nem
- (iii) Antiszensz: nem
- (xi) A szekvencia leírása: 9. azonosító számú szekvencia:

CATGTCTGAC TTGCGATTGG

20

(2) Információ a 10. azonosító számú szekvenciához:

- (i) Szekvenciajellemzők:
 - (A) Hossza: 20 bázispár
 - (B) Típusa: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) Molekulatípus: DNS (genomi)
- (iii) Hipotetikus: nem
- (iii) Antiszensz: nem

(xi) A szekvencia leírása: 10. azonosító számú szekvencia:

ACAATCGAAC CGCACACGTC

20

(2) Információ a 11. azonosító számú szekvenciához:

- (i) Szekvenciajellemzők:
 - (A) Hossza: 18 bázispár
 - (B) Típusa: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) Molekulatípus: DNS (genomi)
- (iii) Hipotetikus: nem
- (iii) Antiszensz: nem
- (xi) A szekvencia leírása: 11. azonosító számú szekvencia:

GGAGAGGCGG TGTTAGTT

18

(2) Információ az 12. azonosító számú szekvenciához:

- (i) Szekvenciajellemzők:
 - (A) Hossza: 18 bázispár
 - (B) Típusa: nukleinsav
 - (C) Száltípus: egyszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) Molekulatípus: DNS (genomi)
- (iii) Hipotetikus: nem
- (iii) Antiszensz: nem
- (xi) A szekvencia leírása: 12. azonosító számú szekvencia:

CATCATCGCA TTCGAGAG

18

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás növényi sejt egy kívánt génnel való transzformálására, *azzal jellemezve*, hogy

i) az említett növényi sejtet *Agrobacterium*mal együtt tenyésztjük olyan körülmények között, amelyek gátolják az *Agrobacterium* által indukált nektrózt (AIN), ahol az *Agrobacterium* egy, az említett kívánt gént tartalmazó vektort foglal magában, és ahol az említett növényi sejt *Agrobacterium*mal együtt való tenyésztését ezen növényi sejt hősokk-kezelése után hajtjuk végre, majd

ii) kiválasztjuk az így transzformált sejtet.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hősokk-kezelést 40–50 °C-on végezzük.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hősokk-kezelést 42–48 °C-on végezzük.

4. A 2. vagy 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hősokk-kezelést 2–10 percen át végezzük.

5. Az 1–4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az említett növényi sejt egy Gramineae sp.-be tartozó növény sejtje.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a sejt kukorica- vagy búzasejt.

7. Eljárás fertilis transzgenikus növény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy növényi szövetet transzformálunk oly módon, hogy a szövetet *Agrobacterium*mal együtt tenyésztjük az *Agrobacterium* által indukált nektrózt (AIN) gátló körülmények között, és az így transzformált szövetet regeneráljuk, ahol az említett *Agrobacterium* egy, a kívánt gént tartalmazó vektort foglal magában, és ahol az említett szövet *Agrobacterium*mal együtt való tenyésztését ezen szövet hősokk-kezelése után végezzük.