

55.167/SM

# KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

## K I V O N A T

Eljárás <sup>n</sup>Növények transzformálása <sup>ra</sup>Agrobacterium fajok alkalmazásával  
 PIONEER Hi-Bred International, Inc., DES MOINES, Iowa, USA  
 A bejelentés napja: 1991. 11. 13.  
 Uniós elsőbbsége: 1990. 11. 14. (07/614.403) USA

A találmány eljárás egy növény sejtjeinek transzformálására.

A találmány szerinti eljárást az jellemzi, hogy

- a) egy Agrobacterium fajba tartozó baktériumokat állítunk elő, amely baktériumokat oly módon transzformálunk, hogy tartalmazzák Ti plazmidjukban a növény-sejtek genomjába beillesztendő genetikai anyagot;
- b) a baktériumokat mikrorészecskékre visszük fel, és;
- c) a kiválasztott szövetet mikrorészecske bombázásnak vetjük alá; ~~olyan mikrorészecskéket alkalmazva, amelyekre felvittük a baktériumokat~~

ennek következtében a baktériumok képesek szövetben lévő sejtekhez kapcsolódni, és át tudják adni a T-DNS-üket, beleértve a beleépített genetikai anyagot is, a sejtek genetikai anyagának.

Földvár

3555/91

4709  
198

55.167/SM

ST. LOUIS  
MISSOURI  
U.S.A.  
1991

**KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY**

A

NR05 C12N15/87  
C12N5/14  
C12N15/84

Eljárás <sup>n</sup> Növények transzformálása <sup>v</sup> Agrobacterium <sup>f</sup> fajok alkalmazásával

PIONEER Hi-Bred International, Inc., DES MOINES, Iowa, USA

Feltaláló: BIDNEY Dennis, DES MOINES, Iowa, USA

A bejelentés napja: 1991. 11. 13.

Uniós elsőbbsége: 1990. 11. 14. (07/614,403) USA

A jelen találmány tárgya Agrobacterium felhasználása  
növények transzformálására.



A növényi molekuláris biológia területén jelenleg a legtöbb kutatás arra irányul, hogy rekombináns DNS technika alkalmazásával megnöveljék a növények változatosságát. Történelmileg, a növénynevelők klasszikus genetikai technikákat alkalmaztak a keresett tulajdonságokkal rendelkező vonalak azonosítására, megőrzésére és keresztezésére. Ujabban új növényvariánsokat kémiai vagy besugárzásos kezeléssel indukálnak, hogy mutáltassák a növénysejteket, amelyeket azután szövettenyésztő technika alkalmazásával regenerálnak. Ezeknek a véletlenszerű vagy megjósolhatatlan megközelítéseknek nyilvánvaló hátrányaik vannak. A rekombináns DNS technika alkalmazásával a specifikus fehérjét termelő specifikus géneket, például azokat, amelyek rovar-rezisztenssé teszik őket, bejuttathatjuk a növénybe, hogy előállítsuk a kívánt variánst, amely a keresett tulajdonságokkal rendelkezik.

A növényeket különböző módszerekkel transzformáltak idáig. A kétszikű növények transzformálásának általános módszere a hatástalanított *Agrobacterium* fajok alkalmazása, amelyek viszonylag jóindulatú, természetes kórokozói a kétszikű növényeknek. Az *Agrobacterium*ok megfertőzik a növényeket, és a fertőzés helyén egy tumorszövet kallusz differenciálatlan növekedését okozzák. A tumort indukáló anyag a Ti plazmid, amely úgy működik, hogy a DNS-ének egy részét a növényi gazdaszervezet genomjába integrálja. Ez a plazmid ideális vektor a növények transzformálására. A Ti plazmid DNS-nek azt a részét, amelyet az *Agrobacterium* fertőzés során a gazdasejt kromoszómájába bevisz, transzformáló ("T") DNS-nek nevezik /Watson, J.D.

Tooze, J. et Kurtz, D.T., Recombinant DNA: A Short Course, 169 (W. H. Freeman (1983)/

Bár az *Agrobacterium* korai vizsgálatai azt sugallták, hogy a kétszikűek teljesen érzéketlenek erre a patogénre, ezek a következtetések azon alapultak, hogy nem volt megfigyelhető tumor-képződés a beoltott növényeken. Ujabban azt találták, hogy a kétszikűekben a tumorképződés a Ti plazmid által okozott auxin és citokinin túltermelésnek köszönhető, ennélfogva ez a szimptóma nem mindig megfelelő indikátora a transzformálásnak. Az újabb, érzékenyebb vizsgálatokkal kimutatták az opalin és nopalin képződését *Agrobacterium*mal oltott egyikszűekben, ami szintén a Ti plazmidnak tulajdonítható, és génszészeti úton megváltoztatott marker géneket, például a GUS és NPTII géneket találták az *Agrobacterium*mal transzformált kukoricánövényekben. Ennek a módszernek a sikeres és megbízható alkalmazása azonban továbbra is genotípus specifikusnak tűnik, mind a növényeket, mind az *Agrobacterium* fajokat illetően, valamint tenyésztáptalaj specifikusnak is tűnik. Még megfelelő körülmények között is a transzformáció frekvenciája bizonyos fajokban viszonylag alacsony.

Emellett, az *Agrobacterium*ok általában sebkörnyezetet igényelnek ahhoz, hogy a transzformáláshoz szükséges DNS-transzfer beindítsák. Például levél-lukákat és szár-szegmenseket használnak általában, mivel ezek a baktériumok számára egy vágott és sebzett felületet jelentenek, amelyek tartalmazhatnak a növény regenerálására képes sejteket. Vannak azonban olyan esetek, amikor a célterület egy szervezett, többrétegű szövet, például a

merisztéma, ami nem férhető könnyen hozzá az *Agrobacterium* fertőzés és transzformálás számára, és nem könnyen sebezhető anélkül, hogy a szerveződését és a funkcióját megsértenénk. Még akkor is, amikor levél-lukakat és szár-szegmentumokat használunk, akkor is csak korlátozott régiókat használhatunk, például egy levél-korong kerületét, amely sérült. Kívánatos lenne a korong teljes felületét alkalmazni potenciális transzformációs felületként.

Egy másik módszer a növények transzformálására a növényi sejtek bombázása genetikai anyagot, úgymint DNS szekvenciákat vagy plazmidokat hordozó nagysűrűségű mikroszkópikus részecskékkel. Ez a módszer kevésbé genotípus specifikus, de a stabil transzformáció frekvenciája ezzel a módszerrel is alacsony. Ez részben annak a következménye, hogy nincs meg a természetes mechanizmus a bevitt genetikai anyagnak a növényi genomba való integrálására. Ezzel szemben az *Agrobacterium* fajok aktívan befolyásolják ezeket a transzformációs eseményeket, a növényi sejt megfertőzése természetes folyamatának részeként. Tehát folyamatos szükség van olyan transzformációs módszerre, amely csökkenti a genotípus specifitást és megnöveli a megbízhatóságot, mind az egyszikű, mind a kétszikű növényekben.

Az 1-4. ábrákon a pPHI158, pPHI167, pPHI419 és pPHI413 plazmidok térképét láthatjuk.

A jelen találmány tárgya eljárás baktériumoknak mikro-részecskékre való felvitelére, oly módon, hogy a baktériumok megtartják életképességüket és virulenciájukat a mikrorészecske bombázással kapcsolatos leszárítási folyamat során.

A jelen találmány lehetővé teszi egy javított transzformációs módszer gyakorlatának alkalmazását, amely során a növényi sejteket Agrobacterium fajba tartozó mikroorganizmusokat hordozó mikrorészecskékkel bombázzuk, és a baktériumok a T-DNS-ükben a számukra fontos genetikai anyagot hordozzák. Az Agrobacterium így képes arra, hogy a sérülést nem szenvedett szövetek sejtjeihez kötődjön és ezekbe a célsejtekbe állandó jelleggel bejuttassa a genetikai anyagot, az esemény frekvenciája lényegesen magasabb mint amit a szokványos mikrorészecske bombázás során el lehet érni. Ez a módszer lehetővé teszi a szervezett szövetek transzformációját. Tehát a jelen találmány tárgya eljárás növényi sejtek stabil transzformálására, azzal jellemezve, hogy

(a) egy Agrobacterium fajba tartozó baktériumokat állítunk elő, amely baktériumokat oly módon transzformáltunk, hogy tartalmazzák T-DNS-ükben a növény-sejtek genomjába beillesztendő genetikai anyagot;

(b) a baktériumokat mikrorészecskékre visszük fel, és;

(c) a kiválasztott szövetet mikrorészecske bombázásnak vetjük alá, olyan mikrorészecskéket alkalmazva, amelyekre felvittük a baktériumokat; ennek következtében a szövetbe bejuttatott baktériumok át tudják adni a T-DNS-üket, beleértve a beleépített genetikai anyagot is, a szövetben lévő életképes sejtekbe.

Ez a módszer alkalmas arra, hogy állandóan, örökölhetően transzformált növényi sejteket állítsunk elő, amelyek alkalmasak teljes egész, termékeny növényekké regenerálni.

A szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy az említett módszer alkalmas arra is, hogy a növény-kutatáshoz tranziens transzformációkat és tranziens vizsgálati módszereket hozzunk létre.

A jelen találmány szerinti eljárással előállított transzformált sejtek azután a szakterületen jártas szakember számára ismert módszerekkel regenerálhatók teljes, termékeny növényekké, amelyek sejtmagjuk genomjában tartalmazzák a baktériumok hatására bevitt genetikai anyagot. A jelen találmány tárgya tehát eljárás teljes, termékeny, transzformált növények előállítására, amely a következő lépésekből áll:

a) a transzformálandó genotípusú fajt szövettenyésztetben tenyésztjük;

b) egy olyan Agrobacterium fajt készítünk, amely baktériumot a növényi sejt genomjába illesztendő genetikai anyagot tartalmazó T-DNS-sel transzformáltunk;

c) a baktériumokat mikrorészecskékre visszük fel;

d) a kiválasztott szövetet mikrorészecske bombázásnak vetjük alá, azokat a mikrorészecskéket alkalmazva, amelyekre felvittük azokat a baktériumokat, mikor is a baktériumok a beépített genetikai anyaggal együtt beépítik a T-DNS-üket a sejtek genomjába, transzformált sejtek előállítása közben;

e) regeneráljuk a transzformált sejteket, így állítunk elő teljes növényeket.

Számos esetben kívánatos lenne, ha a növényeket olyan tenyészetekből regenerálnánk, amelyek teljes egészükben, vagy túlnyomó többségükben a transzformált sejtekből állnak, hogy ne kapjunk kiméra növényeket. Ezt úgy végezhetjük el, hogy a bombázott, *Agrobacterium*mal kezelt szövetet a regenerálás előtt olyan szelekciós táptalajon növesztjük, amelyen csak a transzformált sejtek nőnek ki. Ezt úgy érhetjük el, hogy egy szelektálható genetikai bélyeget, például kanamicin vagy Basta rezisztenciát biztosító genetikai bélyeget építünk be a sejtekbe, a 2. ábra szerint. Amikor a kezelt sejteket az antibiotikumot vagy herbicidet tartalmazó táptalajban növesztjük, akkor a vegyszer elpusztítja a nem-transzformált sejteket, és a túlélő tenyészet kizárólag a transzformánsokból áll, amelyeket azután transzformálni lehet, hogy olyan növények keletkezzenek, amelyek nem kimérák.

Jóllehet nem szándékunk, hogy korlátozzon bennünket az elmélet, a normális mikrorészecske bombázási séma megköveteli, hogy a részecskék egyenként, vagy nagyon kis csoportokban belépjenek a kiválasztott sejtekbe, oly módon és olyan helyen, hogy a sejtek képesek maradjanak az osztódásra. Ezzel szemben, az az általános vélemény, hogy az *Agrobacterium* transzformáció akkor következik be, ha a baktériumok a kiválasztott sejt fel-színéhez tapadnak. A Ti plazmidből csak a bakteriális T-DNS "injektálódik" a sejtbe, ha egyszer a baktériumot a sérült környezet arra indukálja, hogy aktiválja a virulencia és transfer funkciót. Ebből nyilvánvaló, hogy a jelen találmány szerinti bombázás célja inkább az, hogy bizonyos mértékig a sejtek sérülését és halálát indukálja, ahelyett hogy minimalizálná a sé-

rülést, amint az a tiszta plazmid DNS-sel borított részecskéket alkalmazó szokásos kivitelben kívánatos. Ha egyszer egy terület megsérült, és kibocsátja azokat a sejt-metabolitokat és seb-nedveket, amelyeket az Agrobacteriumok felismernek, akkor az ebben a seb-régióban lévő megmaradt ép sejtek a transzformáció célsejtjei, inkább mint a részecskék által eltalált sejtek. Tehát a jelen találmány megvalósítási módja szerint a részecskék által eltalált részecskéknek nem kell feltétlenül túlélniük a bombázási lépést, és nincs szükség olyan technikákra, amelyekkel felszabadíthatóan kötjük a tiszta plazmid preparátumot a mikrorészecskékhez.

Ez előtt a transzformálási módszer előtt nem voltak módszerek arra, hogy Agrobacteriumokat vigyenek fel mikrorészecskékre, de ezek fontosak a jelen találmány szerinti transzformációs technika szempontjából. Azt fedeztük fel, hogy a Agrobacteriumok sikeresen felvihetők a részecskékre oly módon, hogy megtartsák aktivitásukat akkor is, ha mikrorészecske bombázással növényekbe juttatjuk őket. Ez módszer a következő lépésekből áll:

(a) a baktériumot lényegében teljes erősségű tenyésztő táptalajban növesztjük, amely bacto-peptont, élesztőkivonatot és nátrium-kloridot tartalmaz;

(b) a táptalajban lévő baktériumokat körülbelül 0,6  $\mu\text{m}$  - 2,0  $\mu\text{m}$  átmérőjű arany-részecskékkel kombináljuk és;

(c) a kombinált baktériumokat és részecskéket körülbelül 10-15 percig levegőn szárítjuk. Az előnyös teljes erősségű táptalajok közé tartozik az LB és az YEP táptalaj, amint

azt az alábbiakban ismertetjük. A legelőnyösebb a YEP táptalaj. Az előnyös aranyrészecskék az Engelhardt Al570 Flakeless részecskék, amelyek részecskeeloszlása körülbelül 1,2 - 1,5  $\mu\text{m}$  között van.

#### Növények és növényi sejtek

Ezt a módszert bármely kiválasztott agronómiai vagy virágkertészeti fajra alkalmazhatjuk, beleértve az egyszikűeket és a kétszikűeket is. Amint azt a napraforgóval elért eredmények igazolják, az ezzel a felfedezéssel elért magasabb transzformációs frekvenciákat részben csökkenti a számos nehezen transzformálható genotípus vagy faj transzformálásának alacsony frekvenciája. A kiválasztott egyszikű faj előnyösen lehet kukorica, cirok, triticale, árpa, a zabok, az olasz perje, búza, hagyma és rizs, a kétszikű faj előnyösen lehet szójabab és más babok; lucerna, dohány, a káposzták, például a repcemag, brokkoli és a karfiol; napraforgó; a tökfélék, például a dinnyék, uborkák és a tök; valamint a burgonyafélék, például a burgonyák, borsok és paradicsomok. A virágokból, úgymint az orchideából, rózsából, szekfűből, petuniából, ciniából, őszirózsából, liliumból, nagy büdöskéből, nebáncsvirágból, Afrikai és egyszerű violából és árvácskából, anthuriumból, gladióluszból, jácintból, gerániumból, levendulából, bazsarózsából, tulipánból, mákból, krizantémból, sárga nárciszból és begónia variánsokból, valamint más dísznövényekből, korlátozás nélkül, de beleértve a tiszafát, a borókafenyőt, rododendront, filodendront, fikuszt, repkényt, pothost, orgonát, kaktuszt, dizygothecát, kutyatejet, fatsiát, repkényféléket, coleust és más variánsokat, valamint

fűszereket, például a petrezselymet, zsályát, rozmaringot, kakukkfűvet, bazsalikomot, oreganót, fokhagymát, mentolt, édesköményt, majorannát, koriandert, kaprot és a hasonlókat, kivett szöveteket is alávethetjük a jelen találmány szerinti módszernek.

A használt szövet bármely növényi részből jöhet, beleértve a gyökereket, a hím portokokat, szárazakat, kotiledonokat, hipokolitokat és virágokat. Az előnyös szövetek közé tartoznak a levél explantumok, a levéldarabok, a levélkorongok és éretlen embriók. Egy különösen előnyös szövet a hasított merisztéma explantum. Ez utóbbi szövetet a szakirodalomban B.Schrammeijer és munkatársai írták le /"Meristem Transzformation of Sunflower via Agrobacterium," Plant Cell Reports, 9, 55-60 (1990)/.

#### Agrobacterium fajok

A növények transzformálásában alkalmazható Agrobacterium fajok közé tartozik az Agrobacterium tumefaciens és az Agrobacterium rhizogenes. Az előnyben részesített a nopalin, bináris típusú Agrobacterium tumefaciens. Különösen előnyös a széles körben hozzáférhető Agrobacterium tumefaciens EHA101 törzs. Ez a törzs tartalmaz egy C58 baktérium kromoszómát, és a Ti plazmidnak egy legyengített változatát, amelyet a szakirodalomban TiB0542-nek ismernek /Hood, E.E. Helmer, G.L., Fraley R. T. és Chilton M-D., "The hypervirulence of Agrobacterium tumefaciens A281 is encoded in a region of TiB0542 outside of T-DNA", Journal of Bacteriology, 168, 1291-1301 (1986)/.

Jóllehet az Agrobacterium szelektálása és transzformálása nem képezi alapvető részét a jelen találmánynak, egy előnyös megvalósítási mód szerint az EHA101 törzset a pPHI158 és

pPHI167 plazmiddal transzformáljuk, amint az az 1. és 2. ábrán látható, a fagyasztás-olvasztás transzformációt alkalmazva. A pPHI158 plazmidot (1. ábra) úgy állítjuk elő, hogy az EcoRI restrikciós enzimmel emésztett, linearizált pPHI419 plazmidot (3. ábra), amely a növényben expresszálható NPTII markert hordozza a 11,6 kb méretű bináris pPHI6 jobb oldalához közel. A pPHI6 tartalmazza még az RK2 replikációs origót és egy ampicillin rezisztencia markert. A pPHI167-et hasonlóképpen állítjuk elő, azzal a különbséggel, hogy a linearizált, EcoRI restrikciós enzimmel emésztett pPHI413 fragmentet (4. ábra) amely a GUS gént hordozza, építjük be a pPHI6-ba. Ezt a szakirodalomban bináris vektor-rendszernek hívják /Hoekama A., Hirsch P.R., Hooykaas, P.J.J. és Schilperoort, R.A., "A Binary Plant Vector Strategy Based on Separation of Vir- and T-regions of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid", Nature, 303 179-180 (1983)/.

#### A baktériumok felvitele a részecskékre

##### 1. példa

Az Agrobacterium tumefaciens EHA101 törzset, amelyet 50 µg/ml kanamicinnel és 100 µg/ml karbenicillinnel kiegészített YEP táptalajon növesztünk  $OD_{600} = 0,5-1$  értékig, friss YEP táptalajban szuszpendáljuk különböző koncentrációkban (az  $OD$  értékek alapján), és különböző erősségű YEP táptalajban. A baktériumokat összekeverjük az aranyrészecskékkal (Engelhard A1570 Flakeless), és 1,5 µl-es cseppekben a mikrokilövőkre visszük, ahol hagyjuk megszáradni őket (körülbelül 10 perc a laminárboxban), majd a YEP lemezekre lőjük őket. A lemezeket inkubáljuk, majd a visszánövő telepeket megszámláljuk, ezzel határozzuk meg a baktériumok életképességét a kilövés után.

OD	YEP koncentráció	Telepek száma
0,5	1/10	2,5
	1/4	1
	1/2	88
	teljes	337
2,0	1/10	144
	1/4	136
	1/2	431
	teljes	468

Ezekből az eredményekből az határozható meg, hogy teljers erősségű leszárító táptalajra van szükség ahhoz, hogy segítsük a túlélést, de e megfelelő erősségű táptalajban a növekvő koncentrációjú baktérium nem adott arányos növekedést a túlélő telepek számában.

### 2. példa

Egy második kísérletsorozatban vizsgáltuk a leszárító pufferl és a részecske-típus szerepét a baktériumok túlélésében, miután kilőttük őket a részecskeágyúból. A táptalajok összetétele az alábbi:

AB

3 g/liter  $K_2HPO_4$   
 1 g/liter  $NaH_2PO_4$   
 0,3 g/liter  $MgSO_4 \times 7H_2O$   
 0,15 g/liter KCl  
 0,01 g/liter  $CaCl_2$   
 2,5 mg/liter  $FeSO_4 \times 7H_2O$

YEP

10 g/liter élesztőkivonat  
 10 g/liter Bacto-pepton  
 5 g/liter NaCl

LB

5 g/liter élesztőkivonat  
 10 g/liter Bacto-pepton  
 10 g/liter NaCl  
 pH nagyobb mint 7,0

Inokuláló puffer

12,5 mmól MES pH = 5,7  
 1 g/liter NH<sub>4</sub>Cl  
 0,3 g/liter MgSO<sub>4</sub>

Indukáló puffer

1/4 erősségű AB táptalaj  
 3 % szacharóz  
 20 mmól MES pH=5,5  
 200 umól acetosyringon

Az eredmények az alábbiak:

Leszáritó táptalaj	Részecske-típus	Átlagos telepszám
víz	arany	0
	wolfram	0
AB	arany	8
	wolfram	2,5
Inokulálás	arany	26,5
	wolfram	6

Leszárító táptalaj	Részecske-típus	Átlagos telepszám
Indukálás	arany	53
	wolfram	31
LB	arany	668
	wolfram	363
YEP	arany	790
	wolfram	384

A fentiekből azt lehet megállapítani, hogy az arany lényegesen kevésbé toxikus a baktériumokra a leszárított állapotban mint a wolfram, és a puffer összetétele is fontos.

### 3. példa

Az 1. és 2. példák alapján egy harmadik kísérletsorozatot is végeztünk, ahol vizsgáltuk a leszárítás idejének hatását, teljes erősségű YEP táptalajt és arany részecskéket (Engelhard A1570 Flakeless) alkalmazva. Az eredmények az alábbiak:

A leszárítás időtartama	A telepek száma
0 perc	884
5	nem számlálhatóan sok
10	457
15	489
20	252
30	223

A leszárítás időtartama az az idő, ami alatt a laminárboxban a légáram éri a részecskéket a kilövés előtt. A csöppeket a makrokilövőekben 1,5 ul térfogatban alkalmazzuk. 5 percnél a cseppek ragadósak és félszárazak, míg 10 percnél teljesen száraz pornak látszanak.

Az előbbi kísérlet az életképességet csak a leszárítás függvényében vizsgálta. Az nyilvánvaló, hogy a leszárítás utáni életképesség nem áll közvetlen kapcsolatban a transzformáló képességgel. Más kísérletekben 10 percnél rövidebb ideig szárított baktériumokat alkalmazva, nem kaptunk transzformált sejteket, jóllehet a baktériumok látszólag életképesek voltak.

#### 4. példa

Napraforgó magvakat a felületükön híg hipoklorit oldattal sterilizzük, majd éjszakán át (18 óra) sötétben, nedves szűrőpapíron nedvesítjük, hogy a sarjadzást beindítsuk. A következő reggelen a kotiledonokat és a kinyúló gyökérgyököket eltávolítjuk, és a merisztémát tartalmazó explantumot éjszakán át 374B-GA táptalajon növesztjük, amely Murashige et Skoog ásványi sókat, Shepard vitaminokat, 3 % szacharózt, 0,8 % agart (Phytagar) és BAP (0,5 mg/liter), IAA (0,25 mg/liter) és GA (0,1 mg/liter) hormonokat tartalmaz pH = 5,6-on. 24 órával később a primer leveleket eltávolítjuk, ezzel az apikális merisztémákat felszínre hozzuk. A merisztémát egy merev vizes agartáptalajt tartalmazó Petri csésze közepén egy 2 cm-es átmérőjű körben elrendezzük, úgy, hogy a merisztémák a bombázás céljára felfelé álljanak. Agrobacterium tumefaciens EHA101/pPHI167 baktériumokat tenyésztünk külön, teljes erősségű YEP táptalajban, majd összekeverjük, az

aranyrészecskékkel, amelyek mérete 1,2 és 1,5 um között változik. Ebből az elegyből 1,5 ul-es cseppeket használunk szokványos makroprojektilekben, majd 10-15 percig laminárboxban szárítjuk. Ezeknek a projektileknek a felhasználásával a merisztémákat kétszer bombázzuk egy mikrorészecske bombázó berendezésben /az általános felépítését Sandord és munkatársai írták le, Európai szabadalmi bejelentés, publikációs száma 331 885, prioritása az 1988. február 29-én bejelentett 161 807 sorszámú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés, amelyre a bejelentésben hivatkozunk/. A transzformációt úgy értékeljük ki, hogy megszámláljuk a festett szektorokat x-gluc-kal való kezelés után. Az eredmények az alábbiak:

A merisztémák száma	Transzformált szektorok	%
121	4	3,3
125	3	2,4

SZABDALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás egy növény sejtjeinek transzformálására, azzal j e l l e m e z v e , hogy

a) egy Agrobacterium fajba tartozó baktériumokat állítunk elő, amely baktériumokat oly módon transzformáltunk, hogy tartalmazza Ti plazmidjukban a növény-sejtek genomjába beillesztendő genetikai anyagot;

b) a baktériumokat mikrorészecskékre visszük fel, és;

c) a kiválasztott szövetet mikrorészecske bombázásnak vetjük alá, olyan mikrorészecskéket alkalmazva, amelyekre felvittük a baktériumokat;

ennek következtében a baktériumok képesek szövetben lévő sejtekhez kapcsolódni, és át tudják adni a T-DNS-üket, beleértve a beleépített genetikai anyagot is, a sejtek genetikai anyagának.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szövet egy merisztéma explantum.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szövetet a következő csoportból választjuk: teljes levél explantum, részleges levélhasítékok, és levélkorongok.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szövet éretlen embrió.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a növény egy egyszikű növény, melyet az alábbi csoportból választunk: kukorica, triticales, cirok, árpa, zabok, olasz per-

je, búza, hagymák és rizs.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a növény egy kétszikű növény, melyet az alábbi csoportból választunk; szójabab, lucerna, dohány, káposztafélék, napraforgó, tökfélék, burgonyafélék, borsok, és paradicsomok.

7. Eljárás egész, termékeny növények előállítására, amelyeknek sejtjeit transzformáltuk oly módon, hogy genetikai anyagot építünk a genomjukba azzal jellemezve, hogy

a) egy *Agrobacterium* fajba tartozó baktériumokat állítunk elő, amely baktériumokat oly módon transzformáltunk, hogy tartalmazzák T-DNS-ükben a növény-sejtek genomjába beillesztendő genetikai anyagot;

b) a baktériumokat mikrorészecskékre visszük fel;

c) a transzformálandó fajú és genotípus<sup>ű</sup>szövetet mikrorészecskére bombázásnak vetjük alá, olyan mikrorészecskéket alkalmazva, amelyekre felvittük a baktériumokat; ennek következtében a baktériumok beépítik a T-DNS-üket, beleértve a beleépített genetikai anyagot is, a sejtek genomjába, így állítva elő transzformált sejteket; és

d) a transzformált sejteket regeneráljuk teljes növények előállítására céljából.

8. A 6. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy azt a további lépést tartalmazza, amely szerint a bombázott szövetet szelekciós táptalajon növesztjük, amelyen csak a transzformált sejtek életképesek a regenerálás előtt.



9. Eljárás az Agrobactérium nemzetségbe tartozó mikro-organismuskok mikrorészecskékre való felvitelére oly módon, hogy megtartsák aktivitásukat akkor is, ha mikrorészecske bombázással bejuttatják őket növényi szövetekbe, azzal jellemezve, hogy

a) a baktériumokat lényegében teljes erősségű táptalajban tenyésztjük, amely bacto-peptont, élesztőkivonatot és nátrium-kloridot tartalmaz;

b) a táptalajban lévő baktériumokat összekeverjük körülbelül 0,6 - 2,0 um átmérőjű aranyrészecskékkal; és

c) a kombinált baktérium-részecske keveréket körülbelül 10-15 percig szárítjuk.

10. A 8. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a táptalaj összetétele az alábbi:

5-10 g/liter élesztőkivonat

10 g/liter bacto-pepton

5-10 g/liter NaCl

pH = 7,0

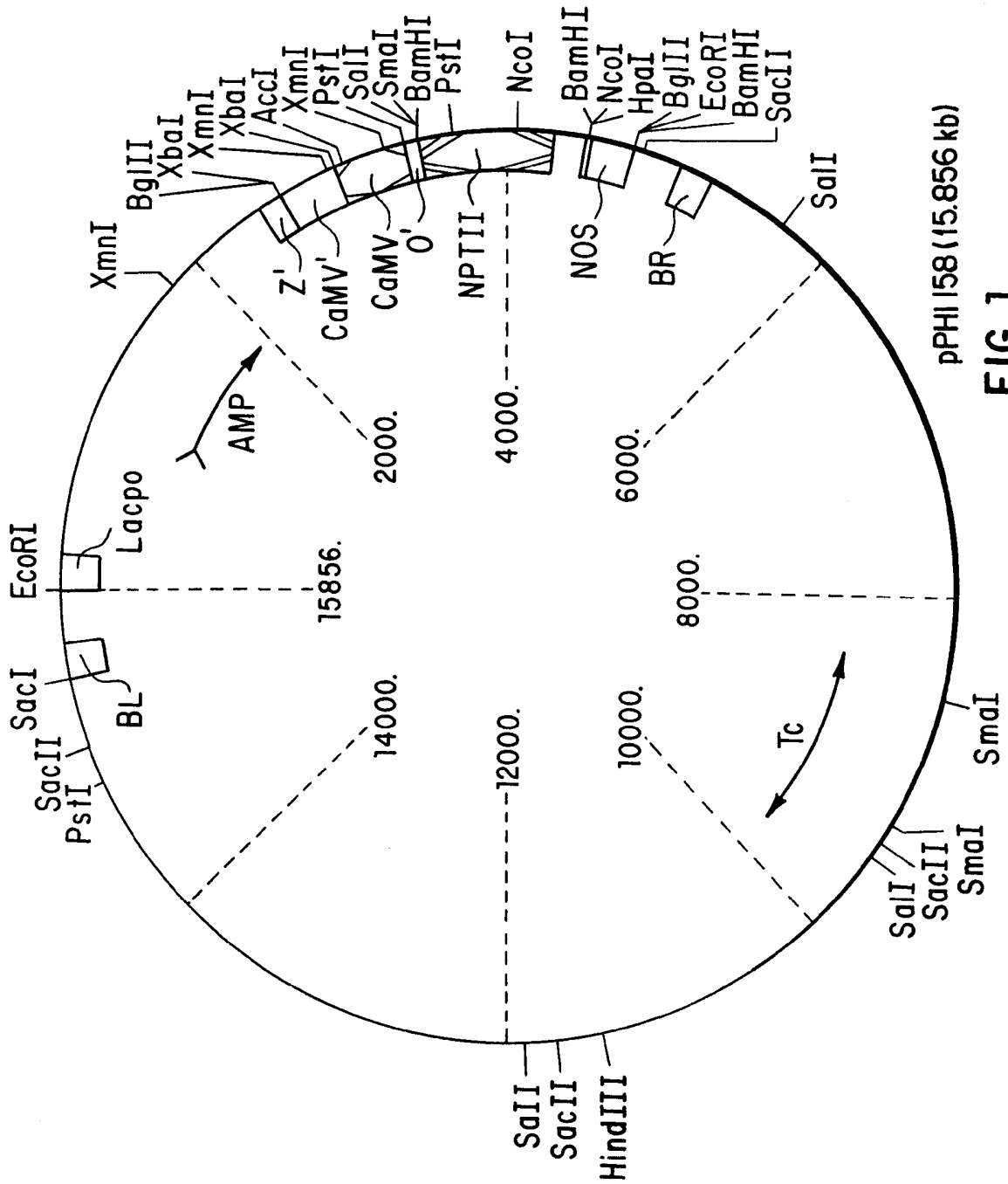
11. A 8. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kombinált baktériumokat és csöppeket in situ szárítjuk macro-projectileken.

A meghatalmazott

  
Somlai Mária  
szabadalmi ügyvivő  
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi  
Szabadalmi Iroda tagja  
H-1051 Budapest, Dalszínház u. 10.  
Telefon: 153-3723, Fax: 153-3664

19 oldal + kárvisszafizetés  
Tóthvári

# KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



pPHI158 (15.856 kb)

FIG. 1

*Szalai*  
 Szalai Mária  
 szabadalmi ügyvivő  
 az S.H.G. & T. Budapesti Nemzetközi  
 Szabadalmi Iroda tagja  
 H-1067 Budapest, Daiszínház u. 10.  
 Telefon: 153 2733, Fax: 153 3664

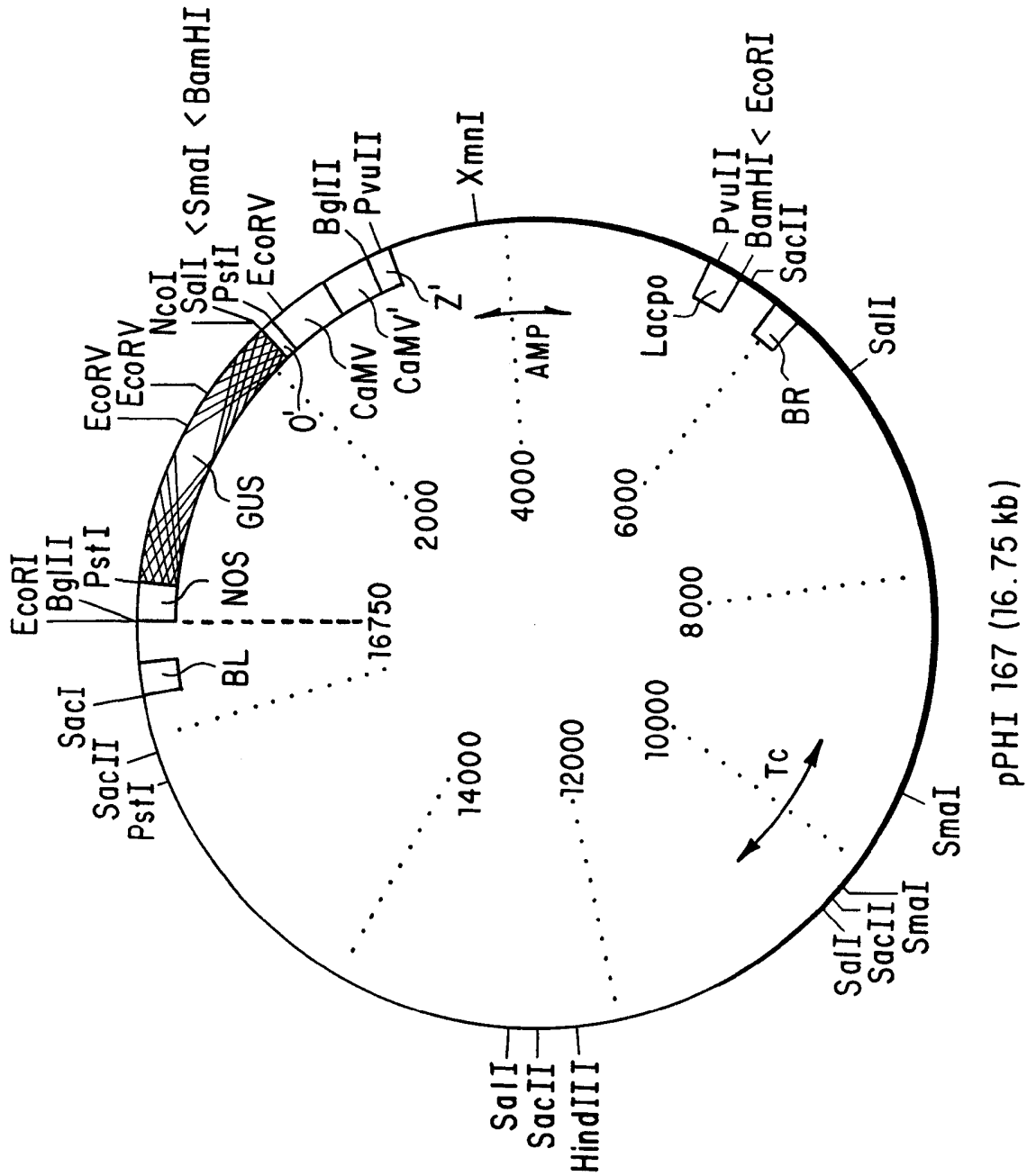


FIG. 2

pPHI 167 (16.75 kb)

*Saulo*  
 Somlai Mária  
 szabadalmi ügyvivő  
 az E.B.C. & K. Budapesti Nemzetközi  
 Szabadalmi Iroda tagja  
 H-1061 Budapest, Daiszínház u. 10.  
 Telefon: 153 2733, Fax: 153-3664

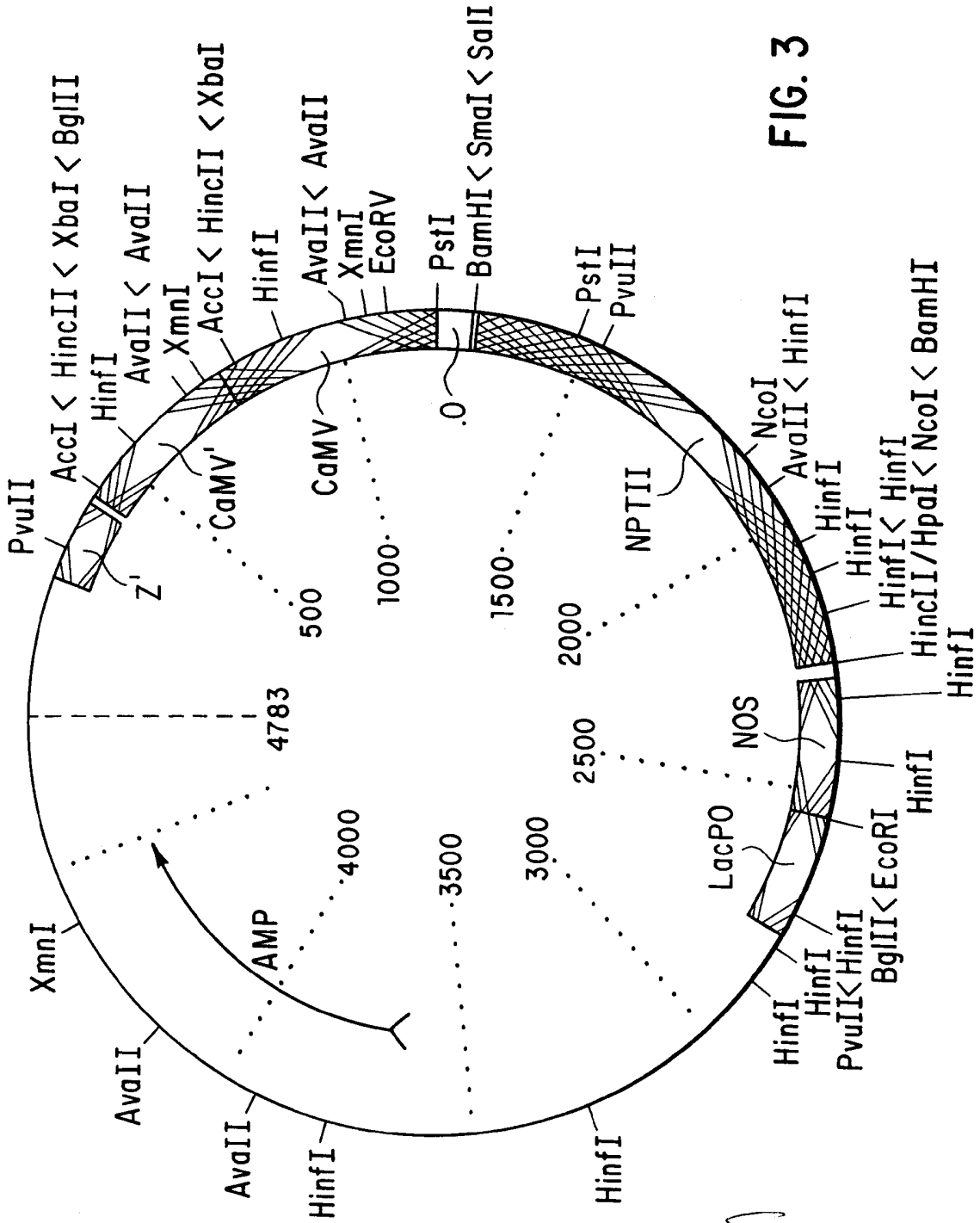


FIG. 3

pPHI419 (4.783 kb)

*Sellala*  
 Somlai Mária  
 szabadalmi ügyvivő  
 az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi  
 Szabadalmi Iroda tagja  
 H-1061 Budapest, Daiszilánáz u. 10.  
 Telefon: 158-2733, Fax: 158-5664

