



## SZŐLŐ REGENERÁLÓ RENDSZER ÉS ENNEK ALKALMAZÁSA

### Kivonat

A találmány növény vagy érett szomatikus embrió létrehozására alkalmas módszereket mutat be, melyekben embriogén sejtől vagy sejt kultúrából indulunk ki. A módszer a következő lépésekből áll: a) embriogén sejtet tartalmazó folyadék sejttenyésztés létrehozása; b) utóbbi tenyésztésből embriogén sejt visszanyerése; c) az embriogén sejt átvitele egy második tenyésztésre és d) az embriogén sejtől szőlő érett szomatikus embrió növesztése.

## SZŐLŐ REGENERÁLÓ RENDSZER ÉS ENNEK ALKALMAZÁSA

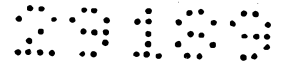
Jelen találmány szőlőcsemeték és csíraplazma regenerálására alkalmas módszerekre vonatkozik.

A szőlő egy ősi lombhullató, mérsékeltégyövi gyümölcs. A szőlőtermesztés mennyisége ( $65 \times 10^6$  tonna) felülmúlja bármely egyéb mérsékeltégyövi gyümölcsét és sorrendileg harmadik a citrusfélék és a banán mögött. Ezen felül értékét tekintve messze megelőzi az összes többi gyümölcsöt, mivel felhasználható friss gyümölcsként, gyümölcslének, zselének, mazsolának és bor készítésére is. Fentiek miatt a szőlőnemesítést célzó sikeres módszerek jelentős hatással lehetnek a kereskedelmi szőlőtermelésre.

A szőlőnemesítés jelenlegi módszerei idő és munkaigényesek. Például: a szőlő genetikai tulajdonságainak javítását súlyosan korlátozza hagyományos szaporítás esetén több tényező is, úgymint a hosszú előnevelési kor és a változó osztódási szintek. A termesztett szőlők nagymértékben heterozigóták és általában nem igazán szaporíthatók magról. Ezen kívül a szőlőszaporítási programok költséges és hosszútávú projektek. Noha a növényi biotechnológia a genetikai szőlőnemesítés egy vonzó lehetősége (Kuksova és mts., Plant Cell Tiss. Org. Cult. 49:17-27, 1997), az *in vitro* genetikai beavatkozások kérdését csak egyidejűleg hatékony regeneráló rendszer jelenléte esetén lehet felvetni. Ennek megfelelően a fenti problémák bármelyikét megoldó módszerek jelentős fejlődést jelenthetnek a szakma számára.

A találmány lényegét az alábbiakban foglaljuk össze:

Felfedeztünk olyan módszereket, melyek alkalmasak évelő szőlő embriogén sejt kultúrák, ill. utóbbiakból – folyadék szuszpenziós tenyésztéssel, viszonylagosan rövid idő alatt – nagyszámú szőlő szomatikus embrió növesztésére. A jelen módszerek számos előnyös tulaj-



donságokkal bírnak. Ezen megközelítések pl. megkönnyítik a szomatikus embriók kivételesen magas gyakoriságú kialakulását és a növény regenerálódását. A szőlőregenerálódás ilyen gyakoriságát még egyetlen fajta esetében sem írták le, és a módszert hasznossá teheti szőlőcsemeték klonális dugványkészleteinek nagy mennyiségben való kialakítására. Ezen felül a módszer olyan embriókat eredményez, melyek mentesek olyan gyakori kóros eltérésektől, mint pl. a szomatikus embriók fúziója és felrostozódása. A találmány szerinti módszer fokozott embriogén tenyészet megeredési gyakoriságot eredményez – kiemelt minőségű sejt kultúrák létrehozása mellett – melyeket sikeresen végig lehet vinni a regeneráció különböző fázisain, egészen a kialakult növény szintjéig. Fenti előnyök miatt a találmány szerinti módszer kiemelten hasznos lehet a biotechnológia alkalmazására ezen termény genetikai nemesítése során.

A találmány első tárgya érett szomatikus embrió létrehozására alkalmas módszer. A módszer a következő lépésekből áll:

- a) embriogén sejtet tartalmazó folyadék sejttenyészet létrehozása;
- b) utóbbi tenyészetből embriogén sejt visszanyerése;
- c) az embriogén sejt átvitele egy második tenyésztésre és
- d) az embriogén sejtől szőlő érett szomatikus embrió növesztése.

Előnyösen az embriogén sejteket portokból, ováriumból, ovulumból, virágszövetből, vegetatív szövetből, kacsából, levelekből, gyökerekből, nucelluszából, szárból, magvakból, protoplasztból, periciklusból, apikális merisztémából, embriogén szövetből, szomatikus vagy zigotikus embriókból nyerjük. A találmány egy előnyös megvalósítási alakjában az a) lépésben szereplő folyadékfázisú sejt kultúramedium egy növényi növekedési szabályzót – pl. egy auxint, NOA-t (naftoxi-ecetsav), indol-3-ecetsavat (IAA), dikambat, pikloramot, naftalén-ecetsavat (NAA), 2,4-diklórfenoxi-ecetsavat (2,4-D), egy



citokinint , benziladenint (BA), tidiazuront, zeatint, abszciszinsavat (ABA) vagy gibberelliksavat (GA) – tartalmaz.

A találmány egy másik előnyös megvalósításában az indító tenyésztőközeg legalább egy 0,01 mg/l koncentrációjú citokinint, egy 0,1 mg/l koncentrációjú szénhidrátot és egy 0,1 mg/l koncentrációjú nitrogéntartalmú vegyületet tartalmaz. A nitrogéntartalmú vegyület lehet pl. kálium-nitrát, kalcium-nitrát, ammónium-nitrát és ammónium-szulfát.

Szükség szerint az embriogén sejt vagy a szomatikus embrió DNS-el transzformálható (pl. egy betegségrezisztenciáért felelős gént kódoló DNS-el). Az embriogén sejt az első tenyészetből visszanyerhető szűréssel, ülepitéssel vagy kiválogatással. Ezen kívül az első tenyészetet szitán is átengedhetjük a differenciált szőlő szomatikus embriók kialakulásának szinkronizálása céljából.

Előnyösen az a) lépésben szereplő embriogén sejtet a következő forrásokból nyerhetjük: embriogén sejt, a találmány első tárgya a) és b) lépéseinek eredményeként; szőlő szomatikus embrió, a találmány első tárgya a)-d) lépései szerint; szőlő érett szomatikus embrió, a találmány első tárgya szerinti módszernek megfelelően; csíranövény a találmány ötödik tárgya szerint; portok, ovárium, ovulum, virágszövet, vegetatív szövet, kacs, levelek, gyökerek, nucellusz, szár, magvak, protoplaszt, periciklus, apikális merisztéma, embriogén szövet, szomatikus vagy zigotikus embriók, melyeket olyan növényből nyerünk, amelyek a találmány első tárgya szerinti módszernek megfelelően érett szomatikus embrióból származnak.

A találmány egy előnyös megvalósítási alakja szerint a módszer tartalmazza a szőlő szomatikus embrió áthelyezését csíráztató médiumba, csíranövény növesztése céljából.



A találmány egy másik előnyös megvalósítási módja során az embriogén sejtet – szükség szerint – növényi növekedési szabályzót tartalmazó médiumban tenyésztik.

A második sejt kultúra lehet folyadék- vagy szilárdfázisú. A folyadék tenyésztőközeg lehetőség szerint B5 fő és MS kiegészítőket tartalmaz.

A találmány második tárgya szülő szomatikus embrió létrehozására alkalmas módszer. A módszer a következő általános lépéseket tartalmazza:

- a) embriogén sejtet tartalmazó folyadéktenyészet létrehozása;
- b) utóbbi tenyészetből embriogén sejt kiválasztása;
- c) az embriogén sejt átvitele egy második tenyésztésre és
- d) az embriogén sejtől szülő szomatikus embrió növesztése.

A találmány harmadik tárgya szülő szomatikus embrió létrehozására alkalmas módszer. A módszer a következő általános lépésekből áll:

- a) embriogén sejtet tartalmazó folyadéktenyészet létrehozása, melyben a médium B5 fő és MS kiegészítőket tartalmaz;
- b) az embriogén sejt visszanyerése a tenyészetből ;
- c) az embriogén sejt átvitele egy második tenyésztésre és
- d) az embriogén sejtől szülő szomatikus embrió növesztése.

A találmány további – negyedik – tárgya szerint érett szomatikus embriót a találmány első tárgyának megfelelő módszerrel állítanak elő.

A találmány további – ötödik – tárgya szerint csíranövényt szülő érett szomatikus embrióból hoznak létre a találmány negyedik tárgyának megfelelően.

A találmány további – ötödik – tárgya szülő érett szomatikus embrió hosszútávú tárolására alkalmas módszer, amely egy általános szá-



rítási lépést tartalmaz, majd az embriókat 8 °C-nál alacsonyabb hőmérsékleten őrzik.

Előnyösen az éret szomatikus embriót a találmány első tárgyának megfelelő módszerrel állítják elő.

A találmány további – hetedik – tárgya szőlő szomatikus embrió közvetlen csíráztatására alkalmas módszer. A módszer egy általános lépésében a szőlő szomatikus embriót egy palántázó médiumba helyezik, ami homok és palántázó keverékből áll.

A találmány további – nyolcadik – tárgya szőlő szomatikus embrió előállítására alkalmas módszer, amelyben évelő szőlő embriogén kultúrából származó folyadék tenyésztőközeget használnak. A módszer a következő lépésekből áll:

a) évelő szőlő embriogén sejt kultúrát az első folyadék tenyésztőközegben – amely növényi növekedési szabályzót tartalmaz – tartjuk szuszpenziós sejttenyésztés növesztése céljából ;

b) a szuszpenziós sejt kultúrából embriogén sejtet vagy sejttömeget nyerünk és

c) ezen utóbbiakat a második folyadék tenyésztőközegbe helyezük szőlő szomatikus embrió előállítására.

A találmány egyik előnyös megvalósítási módja szerint a szőlő szomatikus embriót áthelyezzük csíráztató médiumba csíranövény növesztése céljából.

A találmány nyolcadik tárgyának egy másik előnyös alakja szerint a növényi növekedési szabályzó egy auxin, NOA, BA, zeatin, dikamba, pikloram, NAA, IAA, 2,4-D, egy citokinin, tidiazuron, ABA vagy GA. A találmány egy még további előnyös megvalósítási módja során az a) lépés folyadék sejt kultúráját továbboltjuk és a szuszpenziós sejttenyésztésből származó szőlősejtet vagy sejtcsoportokat elválasztjuk szűrés, ülepités vagy kiválogatás segítségével. A találmány



egy másik előnyös megvalósítási módja szerint a második folyadék tenyésztőközeg egy növényi növekedési szabályzót – pl. egy citokinint – is tartalmaz. A c) lépés folyadék sejt kultúráját szitán áteresztjük, hogy szinkronizáljuk a differenciált szőlő szomatikus embriók kialakulását. Szükség esetén az a) lépésben szereplő szőlő szomatikus embriót vagy embriogén sejtet DNS-el transzformálhatjuk. A b) lépésből származó embriogén sejtet vagy sejtömeget, ill. a visszanyert szomatikus embriót szintén transzformálhatjuk DNS-el.

A találmány további – kilencedik – tárgya szőlő szomatikus embrió előállítására alkalmas módszer, melyben élő szőlő embriogén kultúra szilárdfázisú tenyésztőközegét használjuk. A módszer a következő lépésekből áll:

a) embriogén sejtet az első folyadék tenyésztőközegben – amely növényi növekedési szabályzót tartalmaz – tartjuk szuszpenziós sejttenyésztés növesztése céljából ;

b) a szuszpenziós sejt kultúrából embriogén sejtet vagy sejtömeget nyerünk és

c) ezen utóbbiakat szilárd tenyésztőközegbe helyezük szőlő szomatikus embrió előállítására.

A találmány kilencedik tárgyának egy előnyös megvalósítási alakjában a szilárd tenyésztőközeg egy növényi növekedési szabályzót – pl. egy citokinint, ABA-t vagy GA-t – is tartalmaz. Egy további előnyös megvalósítási módban a visszanyert embriogén sejtet vagy sejtömeget szitán áteresztjük, hogy szinkronizáljuk a differenciált szőlő érett szomatikus embriók kialakulását.

A találmány további – tizedik – tárgya szerint olyan módszert mutatunk be, amely alkalmas folyadékkultúrában növényi kórokozóra rezisztens szőlő szomatikus embrió kiválasztására. A módszer a következő lépésekből áll:



a) szőlő szomatikus embriót az első folyadék tenyésztőközegben – amely növényi növekedési szabályzót és növényi kórokozó tenyészetből származó filtrátumot tartalmaz – tartjuk szuszpenziós sejtenyészet növesztése céljából ;

b) a szuszpenziós sejt kultúrából embriogén sejtet vagy sejtömeget nyerünk és

c) ezen utóbbiakat a második folyadék tenyésztőközegbe helyezzük szőlő szomatikus embrió előállítására.

A találmány további – tizenegyedik – tárgya növényi kórokozóra rezisztens szőlőcsemete létrehozására alkalmas módszer. A módszer a következő általános lépésekből áll:

a) szőlő szomatikus embriót az első folyadék tenyésztőközegben – amely növényi növekedési szabályzót és növényi kórokozó tenyészetből származó filtrátumot tartalmaz – tartjuk szuszpenziós sejtenyészet növesztése céljából;

b) a szuszpenziós sejt kultúrából embriogén sejtet vagy sejtömeget nyerünk;

c) a szőlősejtet vagy sejtcsoportot egy második folyadék tenyésztőközegben tartjuk szőlő szomatikus embrió előállítására;

d) a növényi kórokozóra rezisztens szőlő szomatikus embrió visszanyerése és

e) utóbbiból növény termesztése. A találmány tizedik vagy tizenegyedik tárgyának egy előnyös megvalósítási módja szerint a szőlő szomatikus embriót áthelyezzük csíráztató médiumba csíranövény növesztése céljából. A találmány egy további másik előnyös megvalósítási alakjában a kórokozó szűrletet egy vírustól, féregből, rovarból, gombából (pl. *Elsinoe ampelina*) vagy baktériumból nyerjük. A találmány egy másik előnyös megvalósítási formája szerint az a) lépés növényi növekedési regulátora egy auxin, míg egy következő esetben a



második folyadék tenyésztőközeg is tartalmaz egy növényi növekedési szabályzót.

A találmány további jellegzetességeit és előnyeit a következő részletes leírás és a szabadalmi igénypontok alapján ismerjük meg.

Az ábrákat az alábbiakban ismertetjük:

1A ábra egy növényi tenyésztőlemez fotója, amely egy folyadék tenyésztőközegeből nyert 'Chardonay' típusú embriogén (sejt)tömeget ábrázol, kb. 10 héttel a sejt kultúra indítása után.

1B ábra egy növényi tenyésztőlemez fotója, amely sziklevíl állapotú szomatikus embriót ábrázol, kb. 12 héttel az embriófejlődés kezdetét követően.

1C ábra egy növényi tenyésztőlemez fotója, amely egy érett szomatikus embriót ábrázol folyadékkultúrában a csírázás kezdetén. Számos embrióban a gyökerek növekedése figyelhető meg. A felvétel kb. 20 héttel az embriófejlődés kezdetét követően készült.

1D ábra egy növényi tenyésztőlemez fotója, amely szilárdfázisú médiumban mutatja a szomatikus embriódifferenciáció kezdeti fázisait 5 hetet követően. A szomatikus embriók folyadék médiumban tenyésztett embriogén sejt tömegekből származnak (1A ábra szerintiből).

1E ábra egy növényi tenyésztőlemez fotója, amely szilárd tenyésztőközegeben mutatja a szomatikus embrió fejlődésének korai fázisait. A nagyon korai szomatikus embriók átlátszóak s néhány nap múlva kezdenek opállossá válni.

1 F ábra egy növényi tenyésztőlemez fotója, amely csírázó érett szomatikus embriókat ábrázol 3 %-os szukrózt tartalmazó MS törzs-közegeben.

A találmány részletes leírását a továbbiakban ismertetjük:

Évelő szőlő embriogén sejt kultúra növesztésére alkalmas módszer fejlesztettünk ki, amely hasznos lehet szőlő regenerációra. Sejt-

kultúránkból származó egyedülálló csíraplazma képes olyan szőlőnővény létrehozására, amelyből fokozott mértékben lehet ismét embriogén tenyészetet kialakítani. Továbbá kidolgoztunk egy eljárást, amely képes szomatikus szőlő embriókat – évelő szőlő embriogén tenyészetből, relatíve rövid idő alatt - nagy mennyiségben növeszteni folyadék sejtszuspenziós tenyésztés segítségével.

Az alábbiakban ismertetjük az alkalmazott fogalmak jelentéseit.

„Évelő szőlő embriogén tenyészet”: olyan embriogén tenyészet, melyben embriogén sejteket vagy sejtömegeket ismételten kiválógattunk, továbbtenyésztettünk és *in vitro* tenyészetben tartottunk. Ezeket a tenyészeteket legalább fél évig, előnyösen három évig, és legoptimálisabban négy vagy több évig is fenntarthatjuk.

„Embriogén sejt”, „embriogén sejtömeg”, „embriogén tenyészet”: sejt vagy sejtek, melyek olyan belső képességgel bírnak, hogy szomatikus embriókká, ill. végső sorban növényé fejlődjenek. Jellemzően ezeknek a sejteknek nagy magjuk és sűrű citoplazmájuk van. Ezen kívül, ezek a sejtek totipotensek abban az értelemben, hogy rendelkeznek mindazon genetikai és szerkezeti adottságokkal, hogy végeredményében érett növényé fejlődjenek.

„Fokozott embriogenezis”: fokozott teljesítőképesség embriogén sejt vagy sejtömeg létrehozására évelő szőlő embriogén tenyészetben a kontroll, nem évelő szőlő embriogén tenyészetben elérhető szinthez képest. Általában ez a fokozott embriogenezis szint a kontroll tenyészethez viszonyítva legalább 20%-al, előnyösen 50%-al, még előnyösebben 100%-al és legoptimálisabban 250%-al magasabb. Az embriogenezis szintjét szokványos módszerekkel mérjük.

„Explantátum”: egy növényből származó szerv, szövet vagy sejt, melyet *in vitro* tenyésztünk növényi sejt- vagy szövettenyészet indítása céljából. Például szőlő szövet explantátumot gyakorlatilag a szőlő



bármelyik részéből nyerhetünk korlátozás nélkül, így portokból, ováriumból, ovulumból, virágszövetből, vegetatív szövetből, kacsából, levelekből, gyökerekből, nucellusból, szárból, magvakból, protoplasztból, periciklusból, apikális merisztémából, embriogén szövetből, szomatikus vagy zigotikus embriókból.

„Növényi növekedés szabályzó”: olyan anyag, amely a növényi sejt növekedését és osztódását befolyásolja. Az előnyös növényi növekedési szabályozók közé tartoznak a természetes vagy szintetikus auxinok vagy citokininek. Az auxinok közül említendők – korlátozás nélkül – a NOA, 2,4,-D, NAA, IAA, dikamba, és pikloram. A citokininek közül említendők – korlátozás nélkül – a BA és a zeatin.

„Szomatikus embriogenezis”: az embriófejlődés kezdetének és kifejlődésének folyamata *in vitro* szexuális szaporodásra képtelen növényi sejtekből és szövetekből.

„Szomatikus embrió”: *in vitro* szomatikus- vagy embriogén sejtekből mitotikus sejtosztódással keletkező embrió.

„Érett szomatikus embrió”: teljesen kifejlődött, bipoláris szerkezetű embrió gyökérrel és sarj végződésekkel. Előnyben részesítettek azok az érett szomatikus embriók, melyeknek kialakult szikleveleik vannak.

„Csíranövény”: szomatikus embrióból nyert kis csírázó növény.

„Regeneráció”: szerv, embrió, vagy teljes növény létrehozása növényi szövetkultúrában.

„Kórokozó”: egy olyan szervezet, mellyel megfertőzve az élő növényi szövetet, abban betegség jön létre. Ilyen kórokozók közé tartoznak – korlátozás nélkül – baktériumok, mikoplazmák, gombák, rovarok, férgek, vírusok és viroidok. Az ilyen kórokozók által okozott növényi betegségek leírását megtalálhatjuk a „Plant Pathology”(Agrios), 3rd ed., Academic Press, Inc, New York, 1988 11-16. fejezeteiben. A bak-

teriális kórokozók közé tartoznak – korlátozás nélkül – például az *Agrobacterium vitis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xylella fastidiosa* és a *Xanthomonas ampelina*. A kórokozó gombák közé tartoznak – korlátozás nélkül – például az *Uncinula necator*, *Plasmopara viticola*, *Botrytis cinerea*, *Guignardia bidwelkii*, *Phomopsis viticola*, *Elsinoe ampelina*, *Eutypa lata*, *Armillaria mellea* és *Verticillium dahliae*. A kórokozó férgek közé tartoznak – korlátozás nélkül – a gyökérgumó férgek (például a *Meloidogyne* sp.), cisztás férgek (például *Heterodera* sp.), gyökérpusztító férgek (például *Rotylenchulus* sp.) és földfelszíni férgek (például *Anguina fuesta*). A kórokozó rovarkártevők (pl. bogarak) közé tartoznak – korlátozás nélkül – a *Phylloxera*, *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Homoptera*, *Dermaptera* és *Diptera*. A kórokozó vírusok közé tartoznak – korlátozás nélkül – a szőlő legyezőlevelűség és a levélfodrosodás vírusok.

„Fokozott rezisztencia”: egy rezisztens szőlőben - vagy hajtásában (oltóágában), tőkéjében, sejtjében vagy annak magvában - észlelhető, egy kontroll növényhez viszonyított fokozott mértékű rezisztencia vagy tolerancia betegséget okozó kórokozóval vagy rovarkártevővel szemben. A kontroll növény egy olyan szőlő, amelyet nem az *in vitro*, egy tetszőleges növényi kórokozó vagy annak toxin tartalmú szűrletével szembeni rezisztencia alapján választottunk ki. Egy előnyös megvalósításban a találmány szerinti rezisztens növényben a rezisztencia mértéke legalább 5-10%-al (még előnyösebb esetben 30-40%-al) meghaladja a kontroll növényét. Egy másik előnyös megvalósítási formában a betegséget okozó kórokozóval szembeni ellenállás 50-60%-al, sőt még 75-90% is nagyobb lehet a kontroll növényénél; de a legelőnyösebb esetben a kontroll növény ellenállását 100%-nál is nagyobb mértékben meghaladja. Az ellenállás vagy tolerancia szintjét szabványos mórdszerekkel mérjük. Például egy kórokozóval szembeni

állás mértékét meghatározhatjuk a rezisztens és kontroll szőlők fizikai jellegzetességeinek és tulajdonságainak összehasonlításával. Ilyenek lehetnek például a növény magassága és súlya; összehasonlíthatjuk a betegségek tüneteit, például késői károsodás kifejlődését, csökkent károsodás méretét, levél hervadást, összezsugorodást és kunkorodást, gyümölcsfürtök fonnyadását, vízázttal foltokat, levél perzselődést és széli égést, ill. a sejtek elszíneződését.

„Transzformált”: olyan sejt, melybe mesterségesen egy nukleinsav molekulát vittünk be (például egy DNS szekvenciát), és utóbbi az abból a sejtől kialakuló szervezet genomjának részévé válik (vagy integrált vagy extrakromoszómális módon, például egy szubgenomikus promotert tartalmazó virális expressziós rendszer esetén). Jelen alkalmazásban a transzformált szervezet vagy sejt általában szőlő vagy szőlő alkotóelem, míg a nukleinsav molekulát (például egy transzgént) mesterségesen juttatjuk be a növényi sejt magjába vagy plastid kompartmentjébe.

„Transzgén”: bármely nukleinsavmolekula darab (például DNS), melyet mesterségesen juttatunk be a sejtbe, és utóbbi az abból a sejtől kialakuló szervezet részévé – a genomba integrálva vagy extrakromoszómálisan maradvánnyá - válik. Egy ilyen transzgén tartalmazhat a transzgenikus szervezet számára részlegesen vagy teljesen heterológ (azaz idegen) gént, vagy a szervezet egy saját génjével lehet homológ.

Az itt leírt regenerációs módszert sikeresen alkalmaztuk számos szőlő alany- és nemes fajtái eredményes regenerációjára szomatikus embriogenezis segítségével. Ilyenek voltak: Autumn Seedless, Blanc du Bois, Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Chardonnay (pl. CH 01 és CH 02), Dolcetto, Merlot, Pinot Noir (pl. PN és PN Dijon), Semillon, White Riesking, Lambrusco, Stover, Thompson Seedless, Niagara



Seedless, Seval Blanc, Zinfindel, *Vitis rupestris* St. George, *Vitis rotundifolia* Carlos, *Vitis rotundifolia* Dixie, *Vitis rotundifolia* Fry, és *Vitis rotundifolia* Welder.

Az itt leírt növényi szövettenyésztési módszert alkalmazva szintén kidolgoztunk egy *in vitro* szelekciós módszert, amely lehetővé teszi szakemberek számára növény-rezisztens szőlők kifejlesztését. Egy ilyen alkalmazási mód mutációk kiválasztása szőlő sejttenyésztésből, melyben egy bizonyos körülményre rezisztens vagy érzékeny sejteket azok fokozott vagy szelektív növekedése alapján választjuk ki. A sejteket a továbbiakban mutagénnel is kezelhetjük, amely az adott sejt DNS-ében változásokat okoz. A megváltozott DNS-t szokványos módszerekkel azonosíthatjuk. Egy második, ehhez kapcsolódó alkalmazás kórokozórezisztens sejt kiválasztása. A sejteket a kórokozó jelenlétében tenyésztjük és a rezisztenciát mutató sejteket kórokozórezisztens növény regenerálására használhatjuk. A harmadik alkalmazásban genetikai információt juttatunk be a szőlősejtbe. A genetikai információ tartalmazhat egy szelekciós markert kódoló nukleinsav-szekvenciát. A sejteket a szelekciós támadás jelenlétében tenyésztve, csak azok osztódnak ill. élnek tovább, melyek a megfelelő genetikai információval rendelkeznek. Az itt leírt módszerek a szakembereket képessé teszik új és hasznos tulajdonságokkal rendelkező szőlővariánsok kifejlesztésére, kiválogatására és elterjesztésére.

A találmány szerinti módszer általában számos szőlőfajtára alkalmazható (például *Vitis spp.*, *Vitis spp.* hibridek, és az *Euvinis* és *Muscadinia* alfajok valamennyi tagja), ideértve a nemes fajtákat vagy a szőlőalanyokat. A nemes fajtákhoz tartoznak – korlátozás nélkül – például, amelyeket asztali vagy mazsola szőlőnek tekintünk : Alden, Almeira, Anab-E-Shahi, Autumn Black, Beauty Seedless, Black Corinth, Black Damascus, Black Malvoisie, Black Prince Blackrose, Bronx



Seedless, Burgrave, Calmeira, Campbell, Early, Canner, Cardinal, Catawba, Chrithmas, Concord, Dattier, Deligth, Diamond, Dizmar, Duchess, Early Muscat, Emerald, Seedless, Emperor, Exotic, Ferdinand de Lesseps, Fiesta, Flame Seedles, Flame, Tokay, Gasconade, Gold, Himrod, Hunisa, Hissienne, Isabella, Italia, July Muscat, Khandahar, Katta, Kourgane, Kishimishi, Loose Perlette, Malaga, Monukka, Muscat of Alexandria, Muscat Flame, Muscat Hamburg, New York Muscat, Niabell, Niagara, Olivette blanche, Ontario, Pierce, Queen, Red Malaga, Ribier, Rish Baba, Romulus, Ruby Seedless, Schuyler, Seneca, Suavis (IP 365), Thompson seedless, és Thomuscat. Ide tartoznak a bortermelésben használt fajták: Aleatico, Alicante Bouschet Aligote Alvarelhao, Aramon, Baco blanc, (22A), Burger, Cabernet franc, Cabernet Sauvignon, Calzin, Carignane, Charbono, Chardonnay (pl.CH 01, CH 02 és CH Dijon), Chassele dore, Chemin blanc, Clairette blancheh, Early Burgundy, Emerald Riesling, Feher Szagos, Fernao Pires, Flora, French Colombard, Fresia, Furmint Gamay, Gewurtztraminer, Grand Noir, Gray Riesling, Green Hungarian, Green Velteliner, Grenache, Grillo, Helena, Inzolia, Lagrein, Lambrusco de Salamino, Malbec, Malvasia bianca, Mataro, Melon, Merlot, Meunier, Mission, Montua de Pilas, Muscadelle du Bordelais, Muscat blanc, Muscat Ottonel, Muscat Saint-Vallier, Nebbolio, Nebbolio fino, Nebbolio Lampia, Orange Muscat, Palomino, Pedro Ximenes, Petit Bouschet, Petite Sirah, Peverella, Pinot Noir, Pinot Saint-george, Primitivo di Gioa, Red Velteliner, Refosco, Rkatsiteli, Royalty, Rubired, Ruby Cabernet, Saint Emillion, Saint Macaire, Salvador, Sangiovese, Sauvignon blanc, Sauvignon gris, Sauvignon vert, Scarlet, Seibel 5279, Seibel 9110, Seibel 13053, Semillon, Servant, Shiraz, Souzao, Sultana Crimson, Sylvaner, Tannat, Teroldico, Tinta Madeira, Tinto cao, Touriga, Traminer,



trebbiano Toscano, Trousseau, Valdepanas, Viognier, Walschriesling, White Riesling és Zierfandel. A szőlőalany fajták közé tartoznak: Couderc 1202, Couderc 1613, Couderc 1616, Couderc 3309 (*Vitis riparia X rupestris*), Dog Ridge, Foex 33 EM, Freedom, Ganzin 1 (AxR+1), Harmony, Kober 5BB, LN33, Millardet&de Grasset, 41B (*Vitis vinifera X berlandieri*), Millardet&de Grasset 420A, Millardet&de Grasset 101-14 (*Vitis riparia X rupestris*), Oppenheim 4 (SO4), Paulsen 1045, Paulsen 1103, Richter 99, Richter 110, Riparia Gloire, Ruggeri 225, Saint-George, Slat Creek, Teleki 5A, *Vitis rupestris* Constantia, *Vitis californica* és *Vitis girdinia*, *Vitis rotundifolia*, *Vitis rotundifolia* Carlos, Teleki 5C (*Vitis berlandieri X riparia*), 5BB Teleki (selection Kober, *Vitis berlandieri X riparia*), SO4 (*Vitis berlandieri X rupestris*) és 039-16 (*Vitis vinifera X Muscadinia*).

A továbbiakban a fenti módszerek tételes leírása következik. Ezek a példák a találmány szemléltetésére szolgálnak és nem korlátozó jellegűek.

#### Évelő szőlő embriogén tenyésztőrendszere

A következő módszer hatékonynak bizonyult évelő szőlő embriogén tenyészetek létrehozására és szőlő regenerálására szomatikus embriogenezis segítségével.

#### Szöveti explantátum és a tenyészet indítása

A tenyészet indítási lépésében az átültetendő szövetet az ültetvényről, üvegházból vagy *in vitro* szőlőhajtás mikropropagációs tenyészetből gyűjtöttük és *in vitro* tenyészetbe helyeztük. Az explantátum anyagát típusos esetben levélből, portokból vagy kacsából vettük, de a szőlő egyéb vegetatív és osztódó szöveteiből is nyerhetjük. Az összegyűjtött explantátum szövet felszínét – szükség szerint – csíramentesítettük szokványos módszerekkel és megfelelő szilárd indítóközegbe helyeztük egy petricsészében.



Bármely jól ismert tenyésztőközeg használható, például Murashige és Skoog (MS) és Nitsch típusú. Egy ilyen közeg rendszerint szervetlen sókat, vitaminokat, mikrotápanyagokat, egy nitrogénforrást, egy szénforrást – mint szukróz, maltóz, glukóz, glicerin, inozitol és hasonlók – tartalmaz. Például szukrózt hozzáadhatunk kb. 1-200 g/l, előnyösen pedig 30-90 g/l közötti koncentrációban. Különben, egy ilyen növényi szövettenyésztőközeg összetételét módosíthatjuk az aktuálisan használt növényi sejt növekedésének optimalizálására céljából. Például az indító tenyésztőközeget elkészíthetjük az 1. táblázatban szereplő bármely törzsközegből.



## 1. táblázat

A példákban használt közegek összetétele

Összetevő (mg/l, ha másképp nem adjuk meg)	MS	Módosított MS	Nitsch
KNO <sub>3</sub>	1900,0	3033,3	950,0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,0	-	720,0
NH <sub>4</sub> Cl	-	363,7	-
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370,0	370,0	185,0
CaCl <sub>2</sub>	440,0	440,0	166,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,0	170,0	68,0
Na <sub>2</sub> EDTA	37,23	37,23	37,3
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,95	27,95	27,95
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	16,9	16,9	18,9
KI	0,83	0,83	-
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2	10,0
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,6	8,6	10,0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,25
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025
Glicin	2,0	2,0	-
Nikotinsav	0,5	0,5	1,0
Piridoxin HCl	0,5	0,5	1,0
Tiamin HCl	0,1	0,1	1,0
Inozitol	0,1 g/L	1,0 g/L	0,1 g/L
Szukróz	30,0 g/L; 60,0 g/L	30,0 g/L; 60,0 g/L;	20,0 g/L



		90,0 g/L	
Aktív szén	-	0,5 g/L; 1,0 g/L; 2,0 g/L	-
Agar	7,0 g/L	7,0 g/L	8,0 g/L
pH	5,5	5,5	5,5

Szükség szerint az indítóközeg tartalmazhat egy auxint vagy auxinok keverékét kb. 0,01-100 mg/l közötti koncentrációban - a szóbanforgó szőlőtől függően -, amely hatékony az embriogén sejtek vagy sejtömegek létrehozása indukálásában az explantátumon. Például az explantátumot tarthatjuk agarral szilárdított Nitsche típusú közegben, melyet kiegészítünk pl. 0,01-10 mg/l, és még előnyösebben 0,5-3 mg/l koncentrációjú 2,4-D-vel. A 2,4-D csak példaként használt auxin, amely hasznos a találmány szerinti módszerben. Egyéb auxinok lehetnek még például NAA, NOA, IAA, dikamba és piklorám. Kiegészítőleg – szükség szerint – betehetünk más növényi növekedési szabályozókat is a közegbe standard koncentrációban. Például citokinineket - természetben előforduló vagy szintetikus citokinineket, mint a BA vagy zeatin – használhatunk kb. 0,01-10 mg/l közötti, és még előnyösebben 0,3 mg/l koncentrációban az aktuális fajtától függően. Néhány esetben más osztályba tartozó növekedési szabályozókat – mint az ABA vagy GA – is beletehetünk megfelelő standard koncentrációban. Például ABA-t használhatunk kb. 0,5-20 mg/l közötti, még előnyösebben 5 mg/l koncentrációban; GA-t hozzáadhatunk kb. 0,1-30 mg/l közötti, még előnyösebben 5 mg/l koncentrációban. Az embriogenezis elindításához a folyamatnak ebben a fázisában nem szükségesek a növényi növekedési szabályozók. Kiegészítőleg az



indítóközeg tartalmazhat aktív szenet (0,1-0,2 g/l) vagy a szakemberek által ismert egyéb hasonló abszorbenst.

Az explantátum tenyésztését ebben a fázisban előnyösen sötétben, 22-30 °C-on végezhetjük, bár nagyon gyenge megvilágításban vagy teljes fényben is lehetséges. Kb.1-4 hetes tenyésztést követően az explantátumtenyészetet teljes fénybe helyezzük át, 16 órás fényperiódussal. A tenyészeteket hetente átvizsgáljuk az újonnan keletkező embriogén sejtek vagy sejtömegek jelenlétére. Az utóbbiak a morfológia alapján azonosíthatók. Általában az embriogén sejtömegek fehérek vagy halványsárgák és gyakran átlátszóak. Felismerhetjük őket már a nagyon korai, kis mennyiségű fázisban (10-20 sejtaggregátum) a színük, ill. laza, granuláris megjelenésük alapján. Az embriogén tenyészeteket azonosíthatjuk kompakt jellegük szerint is, melyet gazdag citoplazmájú sejtek alkotnak (fénymikroszkóp alatt nézve). Az embriogén tenyészetek változó gyakorisággal alakulnak ki számos tényezőtől függően, melyek lehetnek – korlátozás nélkül - a genotípus, az explantátum jellege és típusa, a közeg összetétele és a szüret évszaka. A tenyészet fenntartásához körültekintő vizuális kiválogatás szükséges, hogy a megfelelő embriószerű képleteket vigyük tovább. Amint azonosítottuk, az embriogén sejteket vagy sejtömegeket áthelyezzük az itt leírandó fenntartó tenyésztőközegbe.

#### A tenyészet fenntartása

Az embriogén sejteket vagy sejtömegeket óvatosan kivesszük és áthelyezzük egy fenntartó tenyésztőközegbe. Ismét bármely jól ismert közeget használhatunk, pl. MS-t és Nitsch-et. Noha általában nem kötelező, növényi növekedési szabályzókat is hozzáadhatunk a fentieknek megfelelően.



Általában embriogén szövetet fenntarthatunk, ha rendszeres időközönként továbboltjuk – pl. minden 1-4 vagy 4-8 hetente – új fenntartóközegbe. Más módszer szerint az embriogén szövetet folyadék tenyésztőközegbe helyezhetjük – pl. MS, B-5 vagy Nitsch -és ott növeszthetjük, mint folyadék embriogénszuspenziót. Az embriogén sejtömegeket megfelelő módon növeszthetjük az embriogén sejt biomassza növelése érdekében úgy, hogy a terjeszkedő tenyészeteket az átvitel során szétosztjuk. A tenyészeteket serkenthetjük a fokozódó embriogenezis kifejlődésének, vagy kisebb mértékű embriogenezis és több rendezetlen embriogén sejtnövekedés irányába a tenyészet ismételt kezelésével. Utóbbi az embriogén sejtek és sejtömegek körültekintő kiválasztását jelenti az átvitel során. Az embriogén sejtek vagy sejtömegek ismételt átvitele nemcsak az embriogén szövet növekedését gazdagítja, hanem megkönnyíti a szomatikus embriogenezis folyamatát is. A tenyészetek évelők abban az értelemben, hogy két évnél is hosszabb ideig fennmaradnak.

A találmány szerinti megközelítés alapvető összetevője az embriogén sejteknek az explantátumból való körültekintő kiválasztása, melyet ismételt szelekció és a kiválasztott embriogén szövet továbbtenyésztése követ. Az így kialakult szövet nemcsak a teljes szőlőnövény szomatikus embriókból való regenerációjára volt használható, hanem az embriogenezis vonatkozásában kifejezetten fokozott teljesítőképességgel bírt, beleértve szomatikus embriók létrehozását is. Fenti módszert alkalmazva az embriogén sejtek növekedése felerősödik, a szomatikus embrioképződés és az ezt követő növényregeneráció pedig felgyorsul.

A szomatikus embriókból felnövesztett növények explantátuma fokozott embriogén képességgel bírt összehasonlítva olyan anyaggal, amely egy klonális explantátumból származik, amit nem tenyésztettek



embriogén sejtek létrehozására. Az embriogén képességnövekedést két vagy három egymást követő ciklus – tenyészet indítás, fenntartás és növényregeneráció – után figyelték meg (pl.: klonális növény --> explantátum --> embriogén tenyészet indítás --> szomatikus embrió --> szomatikus embrióból kialakult növény --> explantátum). Nem szükséges szomatikus embriókból származó növény használata az explantátum forrásaként; szomatikus embrió vagy új közegbe átvitt embriogén tenyészet szintén fokozott embriogén képességgel rendelkező új szomatikus embriókat fog létrehozni. Az ilyen átültetett anyagot könnyen fenntarthatjuk *in vitro* hónaljajtás tenyészetként, amely a vegetatív explantátum forrásaként szolgál; azonban egyéb növénytar-tási módszerek is elfogadhatóak.

#### Csíráztatás és csíranövény növesztése

A fentiekben leírt tenyészetekből nyert szomatikus embriókból csíráztatás során csíranövény fejlődik ki standard módszereket használva. Például szomatikus embriókat steril petricsészében a csíráztaó közeg – pl. MS közeg – felszínére helyezzük. Utóbbi tenyészeteket egy növesztőkamrában inkubáljuk megvilágított körülmények – 16 órás fényperiódus – között. A csíráztatás során a gyökér megjelenik és az epikotil növekedni kezd. Amikor a csíráztaóközegben növesztett szőlőpalánta megfelelő méretű lesz (1cm, legalább két levéllel), eltávolítjuk a tenyésztőedényből és elültetjük sterilizált palántázókeverékbe. A palántákat tipikusan földnélküli keveréket tartalmazó neveltetőtartályba tesszük (pl. Vermiculite, Perlite, ProMix TM, V.J. Growers, Apopka, FL). Szükség szerint a palántákat növesztőkamrába vagy üvegházi nedveskamrába helyezhetjük és magas nedvességtartalmú körülmények között – 90%-os páratartalom – inkubáljuk a növe-



kedés és akklimatizáció érdekében. Ezt követően a már akklimatizált palántákat kiültetjük a szabadba egy szőlészetbe vagy üvegházba.

A találmány egyik példájában a *Vitis vinifera* cv. „Thompson Seedless” évelő embriogén tenyészet létrehozását mutatjuk be. Az anyanövényből származó tenyészeteket egy felületfertőtlenített levélből nyertük, melyet leoltottunk egy tenyésztő indítóközegre, melyet Nitsch (1968) írt le, majd Gray D.J. módosított („Somatic embryogenesis in Grape.” In: *Somatic embryogenesis in woody perennials*, Vol.2, Gupta P.K., Jain S.M., és Newton R.J. (Eds.), Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, pp. 191-217, 1995) Ez a közeg kb. 1,1 mg/l koncentrációjú 2,4-D-t és 0,05 mg/l BA-t tartalmazott. A szövetátültetést követően a tenyésztőedényeket teljes sötétségben inkubáltuk hat hétig, mely idő alatt az explantátum döntő része egy differenciálatlan, sok vakuólával rendelkező sejtömeget hozott létre. Az embriogén tenyészeteket – melyek felismerhetőek kompakt jellegük és gazdag citoplazmájú sejtjeik alapján – ismételtén továbboltottuk. Az így kialakult tenyészeteket a fentiekben leírt szelekciós módszerekkel nyertük, majd továbbtenyésztettük (kb. 6 hétig) amíg elegendő mennyiségű embriogén tenyészet nem keletkezett. Egy eredetileg az anyanövényből származó szomatikus embriót (azaz 1. generációs embrió) csíráztattunk és a hajtásvéget használtuk az *in vitro* mikropropagációs tenyészet kialakítására. Az ebből a tenyészetből származó növény levelét használtuk egy új embriogén tenyészet létrehozására (2. generáció). A tenyészetből nyert szomatikus embriót hasonló módon felhasználtuk a harmadik generáció kialakítására. A *Vitis vinifera* cv. „Thompson Seedless” – amely *in vitro* mikropropagációs tenyészetből nyert levélből keletkezett - embriogén válaszát a 2. táblázat mutatja (lásd lent). Az eredmények összehasonlítják azokat a leveleket, amelyek az anyanövényből nyert tenyészetek növényeiből



származtak olyan növény leveleivel, melyek harmadik generációs csíráztatott szomatikus embriók tenyészetéből alakultak ki.

2. táblázat

Tenyészet forrása	Tenyészett levelek száma	Embriogén tenyészetek száma	Válasz %
Anyanövény	195	0*	0
3. generációs szomatikus embrió	200	14	7"

\* Más kísérletek egy embriogén tenyészetet eredményeztek.

# A levelenkénti százalékos választ 30%-nak észleltük.

Ezen kívül más szőlőből is létrehoztunk évelő embriogén tenyészeteket az itt leírt módszerek segítségével. Ezekhez tartoznak a *Vitis longii*, *Vitis rotundifolia* (cv. Carlo és Dixie), *Vitis rupestris*, *Vitis vinifera*, (cv. Autumn Seedless, Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Chardonnay, Dolcetto, Gamay Beaujolais, Lambrusco, Pinot Noir, Semillon, Tokay, White Riesling, Zinfindel és hasonlóak), ill. számos *Vitis* hibridek (cv. Blanc du Bois, Niagara Seedless, Seyval Blanc, Stover, Southern Home és hasonlóak).

Fokozott embriogén képességű szőlősejtek létrehozása folyadék-  
szuszpenziós vagy szilárd tenyészetben

Kifejlesztettünk egy módszert szőlő szomatikus embriók nagy mennyiségben való előállítására folyadékszuszpenziós sejttenyészet vagy szilárd tenyésztőrendszer alkalmazásával. Ezek a módszerek különösen hasznosak fokozott embriogén képességű sejtek előállítására, melyek képesek kifejlett növényé regenerálódni.

Az alábbiakban egy hatékony szőlő szomatikus embriogenezis létrehozására alkalmas egyszerű protokollt mutatunk be, folyadékszuszpenziós sejttenyészet vagy szilárd tenyésztőrendszer alkalmazásával.

Általában a módszer egy többfázisú tenyésztőfolyamat, amely típusosan a következő lépésekből áll: 1) tenyészet indítás; 2) embriogén sejtek vagy sejtömegek azonosítása és elkülönítése; 3) évelő embriogén tenyészet létrehozása; 4) fokozott embriogén képességű sejtcsoportok koncentrációja. A módszer a következő lépésekből áll.

Az explantátum szövetet megfelelő indító tenyésztőközegbe helyezzük, ahogy azt az alábbiakban leírjuk. Hat hetes tenyésztést követően az embriogén sejtek vagy sejtömegek azonosíthatóak. Az azonosítást követően az embriogén tenyészeteket – amelyek átmérője kisebb lehet 1 mm-nél – elkülönítjük és továbbtenyésztjük friss indítóközegben a növekedés serkentéséért. Az embriogén tenyészetek továbboltása típusosan szomatikus embriók kialakulásához vezet. Az embriogén tenyészeteket, ill. a belőlük nyert korai fázisú szomatikus embriókat továbbtenyésztjük egy megfelelő folyadék növényi növekedési közegben. Utóbbi lehet például egy növényi szövettenyésztő tápoldat, amely B-5 közegből áll (Gamborg és mts., Exp. Cell. Res. 50:151-158, 1968; Sigma Chemicals, St. Louis, MO), és amit DeWald és mts.

(J.Amer.Soc.Hort.Sci., 114:712-716, 1989), ill. Litz és mts. („Somatic embryogenesis in mango”, 1995, *supra*) módosítottak. Ez a módosított közeg B-5 fősókat, MS kiegészítő sókat és vitaminokat, glutamint (kb. 400 mg/l) és szukrózt vagy kereskedelmi asztali cukrot (kb. 60 mg/l) tartalmaz. Autoklávozás előtt a közeg vegyhatását kb. pH=5,8-ra beállítjuk. Noha ebben a közegben az előnyös növekedési szabályozó a 2,4-D (kb. 0,5-2,0 mg/l), másokat is -mint pl. dikamba, piklorám, NOA, vagy 2,4,5-triklór-fenoxi-ecetsav – használhatunk megfelelő koncentrációban. Az embriogén sejttenyészeteket, a szomatikus embriókat vagy mindkettőt tartalmazó edényeket ezt követően kb. 26 °C-on inkubáljuk, forgó rázógépen (125 fordulat/perc), sötétben vagy diffúz fényben. A tenyészeteket továbboltjuk az itt leírtaknak megfelelően, tipikusan minden 10-14. napon, de a továbboltási szabályok változhatnak az embriogén sejtcsoportok növekedésétől és szaporodásától függően.

Kb. 6-8 hét múlva egy sejtszuspenziós tenyészet jön létre, amely egyrészt gazdagon vakuolizált, nyújtott formájú sejtekből (nem-embriogén sejtek), és kisebb részben kis, gazdag citoplazmájú, azonos átmérőjű sejtekből (embriogén sejtek) áll. Miután kifejlődött elegendő mennyiségű tenyészet, abból a differenciált embriókat eltávolítjuk - szitán való szűréssel – és eldobjuk. Az átszűrt embriogén sejtszuspenziót változatlanul módosított B-5 folyadék közegben tartjuk - periódikus továbboltás mellett – amely fokozza a sejtcsoportok mennyiségét.

Kb. 12-16 hét múlva nagy mennyiségű és magas koncentrációjú szőlő embriogén sejteket láthatunk. Az embriogén sejt vagy sejtömegek koncentrációhoz szükséges idő számos tényezőtől – fajtától, genotípustól és a tenyésztési feltételektől – függően változhat. Ebben a fázisban az embriogén sejtek különösen hasznosak lehetnek gya-



korlatilag bármilyen genetikus transzformációs módszerben. Ezeket az embriogén sejteket bármely standard módszerrel differenciálódásra - szomatikus embrióvá – serkenthetjük, pl. a sejteket kb.4-6 hétig növekedési szabályzóktól mentes, módosított B-5 folyadék tenyésztőközegben tenyészhetjük. Egy másik lehetőség szerint a korai fázisú szomatikus embriókat leolthatjuk – szomatikus embriók további differenciálódása céljából, teljes sötétségben – egy megfelelő gélfórmáló anyaggal (mint pl. gellán gumi, agaróz, agar vagy egyéb hasonló anyag) megszilárdított közegbe. Szükség szerint a torpedó/ szikleveles-fázisú embriókat egyenként továbbolthatjuk standard érési közegbe, pl. amely MS tápanyagból áll. Az érett szomatikus embriókat csíráztatásra egy növesztőkamrába, majd növényregenerálódásra egy megfelelő tartályba tesszük. A szomatikus embriók kialakulásának gyakorisága típusosan magas ezzel az eljárással.

A továbbiakban az embriogén sejtek vagy sejtömegek - folyadékszuszpenzióban és szilárd tenyészetben történő - létrehozásának eredményeit ismertetjük a „Thompson Seedless” és két különböző Chardonnay klón, a CH 01 és CH 02 esetében.

A *Vitis vinifera* cv. „Thompson Seedless” és a Chardonnay CH 01 és CH 02 aszinkron szomatikus embriókat - évelő embriogén szövetből – továbbtenyésztettük folyadékközegben egy hegszövet (callus) szuszpenziós tenyészet létrehozására. Kb. tizennégy nap és két-három továbboltást követően (a továbboltást kb. minden tizennegyedik nap végeztük) egy amorf, sárga-krémfehér színű heg alakult ki. A hegszövet kialakulásakor a sejttenyésztő edényben a folyadék tenyésztőközegben sűrű szuszpenzió volt látható. Mikroszkópilus vizsgálattal a hegsejtek megnyúltak és gazdagon vakuolizáltak voltak, az embriogén képeség legkisebb jele nélkül. Az amorf hegszövet tovább



szaporodott, még akkor is, amikor a tenyészet indítására használt szomatikus embriókat eltávolítottuk a közegből.

Kb. hat hét múlva a módosított B-5 közegben, gazdag citoplazmájú kis sejtcsoportok – mint fehér csomók – kialakulását figyelhettük meg ( 1A ábra). Ezek az embriogén sejtömegek exponenciálisan szaporodtak, és kb. tíz-tizenkét hét múlva elérték a sejttenyésztőedény kapacitásának határát.

Az embriogén sejtömegek egy egységben – azaz egy edényben – való tartása gyakran végzetes, ahogy azt a tenyészetek minőségének romlása jelezte és esetenként meg is barnultak. A továbboltások során ezeket az embriogén tenyészeteket kisebb egységekre osztjuk, elősegítve az osztódást és az osztott tenyészetek biológiai tömegének növekedését. A két vizsgált fajta közül mindkét „Chardonnay” klón egyaránt gyorsan növekedett és felülmúlta a „Thompson Seedless”-t. Míg a „Chardonnay” embriogén sejtömegei krémfehér-sárgás, addig a „Thompson Seedless” mattfehér vagy barnás színűek voltak. Ezen kívül a „Thompson Seedless” érzékenyebb volt a tenyészet sűrűségére, és a sejtek sötétebbé váltak, ha azt nem korrigálták. Az előnyös tenyésztési sűrűség kb. 400 mg embriogén sejt/40ml módosított B-5 folyadéközeg volt egy 125 ml-es edényben.

#### Szomatikus embrió létrehozása folyadéktenyészetben

Az embriogén sejtömegeket átszűrtük egy 960 mikronos nylon szitán majd összegyűjtöttük őket egy steril pohárban. Az embriogén sejtömegek szűrése - az embriogenezis folyadéktenyészetben való indítása érdekében – két célt szolgált. Egyrészt az embriodifferenciáció elfogadható mértékű szinkronizálását okozta, másrészt a differenciálódás során kialakuló szomatikus embrió károsodások száma (mint pl. felrostdozódás vagy fúzió) mérséklődött. 4-6 hét múlva a



folyadéközegben kis, fehér szomatikus embriók jelentek meg, melyek a globuláris vagy korai szív-fázisban voltak. A tenyészetek átszűrése ebben a fázisban már nem fokozta az embrió differenciálódást.

Kb. 8 hét múlva a szomatikus embriók tisztán láthatóak voltak, és néhányuk elérte az embriófejlődés sziklevei stádiumát. A differenciált embriók átszűrése és külön edényben való tenyésztése azonban gyorsabb differenciációt, ill. az embriófejlődés szinkronizálását eredményezte.

Mindkét „Chardonnay” klón – CH 01 és CH 02 – könnyen szomatikus embrióvá differenciálódott. A megfelelő átszűrés és a tenyésztősűrűség beállítása – kb. 1000 mg szomatikus embrió/40ml közeg – biztosította a fokozott szinkronizációt és elkülönülést, ill. az embriók differenciálódását (1B ábra). Folyadék embriogenezis közegben továbbtenyésztve kb. tizenkét-tizennégy hét múlva az elkülönült szomatikus embriók színe zöldre változott, a hajszálgyökerek megnyúltak jelezvén a korai csírázás kezdetét (1C ábra).

Kezdetben a „Thompson Seedless” tenyészetek folyadékközegben nem jutottak túl a szív-fázison. Ezen kívül az embriók nagyobb csoportokat alkottak, gyakran fúzionált szomatikus embriók jöttek létre. A károsodott embriók eltávolítása és a tenyésztősűrűség felére csökkentése a folyadéktenyészetekben normális szomatikus embriogenezist eredményezett. A szomatikus embriók teljes kifejlődése kb. tizennégy-tizennyolc hét múlva jött létre.

### Szomatikus embriók létrehozása szilárd közegben

Folyadéktenyészetből nyert embriogén sejtek vagy sejtömegek szomatikus embrióvá történő differenciálódása legkorábban a tenyészet indítását követő harmadik héten figyelhető meg. Négyhetes tenyésztés után a mikroszkópos vizsgálat globuláris és szívalakú szo-



matikus embriók kialakulását mutatta a hegyszövetben (a callusokban) (1D ábra). A szomatikus embriók átlátszóak voltak és a hiperhidrózisos állapothoz hasonlítottak (1E ábra); azonban az embriók továbbdifferenciálódtak és három-négy hét múlva érett szomatikus embrióvá fejlődtek. Ezek a szomatikus embriók egy csírafüggesztőt fejlesztettek ki (1E ábra). Ezen kívül az embriogén sejtek egy aszinkron szomatikus embriótömeeggé alakultak.

Fenti kísérletek egyik érdekes megfigyelése az volt, hogy a szomatikus embriók többsége különálló egységként alakult ki – és nem kis csomók formájában -, bár néhányukat csomókba rendeződve is megfigyelhettük. Utóbbi esetben az egyes csomókban hat-tíz szomatikus embrió volt és könnyen el lehetett őket választani a hegyszövettől. A sziklevíl fázist elért embriókat hetente elkülönítettük és továbboltottuk az éréshez. Valamennyi embriogén sejtömeg csomó szomatikus embriókat termelt még legalább tizenkét hétig. Az embriogén sejtömegek szilárd közegben – melyek Gel-Gro-t (ICN Biochemicals) tartalmaznak - gyakran megbarnultak, de az elszíneződések nem voltak károsak a tenyészet életképességére. Négy-öt hét múlva szomatikus embriócsoportok jelentek meg a barna színű embriogén sejtek vagy sejtömegek felszínén.

#### Szomatikus embrió érése, csírázása és növényregeneráció

Három érési közeget – mangó érési közeget (Litz és mts., „Somatic embryogenesis in mango,” 1995, *supra*); agarral szilárdított (7 g/l) mangó érési közeget; és MS törzsközeget 3%-os szukrózzal - tanulmányoztunk, hogy milyen mértékben képesek elősegíteni a szomatikus embriók csírázását és a növényregenerációt. Eredményeink azt jelezték, hogy az MS törzsközeg 3%-os szukrózzal volt a leghatékonyabb az embrióérés, csírázás és növényregeneráció serkentésére.



Ez érvényes volt mind szilárd közegből nyert, mind folyadék tenyésztőközegből származó, korai csírázási stádiumban levő embriók esetén (1D ábra). Noha kellő csírázás volt az agaros mangó érési közegben, a regenerált növények minősége nem érte el az MS sók + 3%-os szukrózos közegét. A két rendszerből (azaz a folyadék és szilárd közegből) származó embriókat megvizsgálva minták közti variációt lehet észlelni a csírázás és a regeneráció szempontjából. Bár az embriók korai csírázása folyadékközegben létrejött, itt a folyamat leállt. Szilárd közegbe áthelyezve az embriók csírázása folytatódott és sűrű gyökérrendszerrel bíró szőlőnövényt eredményezett. A hajszálgyökerek megjelenése után az embriókat változatlanul folyadék közegben tartva hiperhidrózis jelentkezett és esetenként a növényregeneráció mérséklődött. Ennek megfelelően előnyben részesítjük a szomatikus embriók eltávolítását a folyadék közegből – amint a korai csírázás megjelenik – és áthelyezzük őket a szilárd közegbe.

#### Szuszpenzióból származó szőlő szomatikus embriók hosszútávú tárolása és növény regenerálása

Kidolgoztunk egy eljárást a szomatikus embriók hosszútávú tárolására. „Chardonnay” szuszpenziós tenyészetből nyert érett szomatikus embriókat megszáritottunk lamináris-áramoltatású kamrába helyezett steril szűrőpapíron, majd 6 °C-on steril petricsészékben tároltuk. A csészékből periodikusan mintákat vettünk és azokat 3%-os szukrózt tartalmazó MS közegben csíráztattuk. A csírázást – a szomatikus embriókból gyökerek megjelenését – és a növényregenerációt nyomonkövettük. A 3. táblázat a CH 02-es klón adatait mutatja huszonkét hónapos, míg a 4. táblázat a CH 01-es klónét öt hónapos tárolást követően.



3. táblázat

Kísérleti szám	Embriók száma	Csírák száma (csírázási szá- zalék)	Növények száma	Százalékos hozam
1	87	81 (93,1)	69	79,3
2	42	40 (95,2)	35	83,3
3	41	41 (100,0)	30	73,2
Összesen	170	162 (95,3)	134	78,8

4. táblázat

Kísérleti szám	Embriók száma	Csírák száma (csírázási szá- zalék)	Növények száma	Százalékos hozam
1	15	15 (100,0)	13	86,7
2	15	15 (100,0)	13	86,7
3	15	13 (86,7)	9	60,0
4	15	12 (80,0)	7	46,7
5	15	13 (86,7)	9	60,0
6	15	11 (73,3)	9	60,0
7	15	15 (100,0)	14	93,3
8	15	13 (86,7)	9	60,0
Összesen	120	107 (89,2)	83	69,2

Szuszpenziós tenyészetből származó szőlő szomatikus embriók  
közvetlen csíráztatása



„Chardonnay” és „Thompson Seedles” szomatikus embriókat folyadéktenyésztésben termeltünk az itt leírtaknak megfelelően. A szuszpenzióból származó érett szomatikus embriókat gyorsan megszárítottuk lamináris-áramoltatású kamrában, szűrőpapíron majd közvetlenül csíráztattuk Magenta edényekben, melyek a következő palántázóközegek egyikét tartalmazták: 1) homok; 2) ProMix kereskedelmi palántázókeverék (CPM); 3) vagy homokkal fedett CPM. Valamennyi 20 ml desztilláltvizet tartalmazó edényt és a palántázóközeget autoklávban csíramentesítettük (30 percig) majd egy éjszakán át lehűtöttük a szomatikus embriók leoltása előtt. Valamennyi edénybe három szomatikus embriót helyeztünk. A leoltás aszeptikusan történt, a tartályokat lezártuk és 26 °C-on inkubáltuk, 16 órás fényperiódussal, 75  $\mu\text{mol/s/m}^2$  fényintenzitás mellett. Az eredmények szerint a homokkal fedett CPM volt a legideálisabb a növény fejlődéséhez. Noha a homok nagyobb számú csírázást eredményezett, a kifejlett növények klorotikusak voltak és a túlélési arány alacsonynak bizonyult. Tiszta CPM esetén a szomatikus embriók szennyeződése magasabb volt. Jelen vizsgálat lehetőséget ad - szuszpenziós tenyésztet alkalmazásával - szőlők nagyméretekben való szaporítására és lefekteti a szőlő szomatikus embriók bioreaktorban történő növesztésének alapelveit.

A fentiekben leírt eredményeket a következő eljárásokkal kaptuk.

#### Tenyésztet indítása

Az embriógén tenyészteteket „Chardonnay” (CH 01 és CH 02 klónok) fajta esetén portokból és ováriumokból, míg a „Thompson Seedless”-nél levélből indítottuk standard módszereket alkalmazva. Utóbbi tenyésztetekből származó szomatikus embriókat – melyeket módosított MS közegben indítottunk és tartottunk – használtuk fel a folyadék sejtsuszpenziós tenyésztet indításához. Típusosan ezek a te-



nyészetek nagymértékben aszinkronak az embriogén fejlődés és differenciáció szempontjából, és ezért valamennyi leoltás a fejlődés különböző stádiumaiban levő szomatikus embriókat tartalmazott.

#### Folyadéktenyészet kialakítása differenciált szomatikus embriókból

A tenyésztőközeg összetételénél a Litz és mts. által leírt közeget adaptáltuk a következő módon. Hegszövetképződés serkentésére (callus indukálására) 1 mg/ml 2,4-D-t adtunk a közeghez, melynek vegyhatását kb. pH=5,8-ra állítottuk be, majd 40 ml-es adagokra osztottuk szét 125 ml-es Erlenmeyer lombikokba. Az edényeket nagy teherbírású alumíniumfóliával szorosán lefedtük az autoklávozás előtt. Hűtést követően kb. 1 g szomatikus embriót helyeztünk steril spatulával, aszeptikusan a folyadék közegbe. Az edény nyakát lezártuk Parafilmmel, és a tenyészeteket félsötétben (diffúz fényben) inkubáltuk forgó rázógépen (120 fordulat/perc). A tenyészeteket legalább kéthetente egyszer továbboltottuk.

A szuszpenziós tenyészeteket tartalmazó edényeket levettük a forgó rázógépről és ülepedni hagytuk kb. tizenöt percig. A felülúszót óvatosan leöntöttük egy steril lombikba, az embriogén sejteken maradt minimális folyadék (kb. 5 ml). Kb. 35 ml friss folyadékközeget adtunk az embriogén sejtekhez és gyorsan összekevertük. A palack egész tartalmát átvittük egy steril 125 ml-es palackba. Ezen utóbbit – mely az embriogén sejteket tartalmazta – lezártuk Parafilmmel és visszahelyeztük a rázógépre. A szomatikus embriókból keletkezett amorf hegyszövetet a következő módon gyűjtöttük össze. Az embriogén szuszpenziót – amely a differenciált szomatikus embriókat és a hegyszövetet tartalmazta – hagytuk leülepedni egy palackban. A felülúszó felét leöntöttük, a maradékot gyorsan összekevertük és átszűrtük egy 150 ml-es üvegphárra helyezett elősterilizált nylonhálón (960 mikro-



nos). Míg a differenciált szomatikus embriók fennakadtak a hálón, a folyadékközeget a vele együtt átszűrt hegszövettel felfogtuk a pohárban. Az itt összegyűlt hegszövetet ezután átszűrtük egy steril tölcsérré helyezett duplarétegű steril gézen. A gézhez tapadt amorf hegszövetet egy steril spatulával eltávolítottuk és felfuszpendáltuk friss folyadék tenyésztőközegben; kb. 100 mg jutott valamennyi edénybe. Ezeket a folyadéktenyészeteket kéthetente egy alkalommal továbbtenyésztettük az itt leírtaknak megfelelően 2,4-D-t tartalmazó módosított B-5 közegben.

#### Szomatikus embriók létrehozása szuszpenziós tenyészetben

Folyadékszuszpenziós tenyészetben eredetű embriogén sejteket vagy sejtömegeket átszűrtük egy 960 mikronos szitán, és a finomabb frakciót aszeptikus körülmények között folyadék embriogenezis közegbe gyűjtöttük. A közeg összetétele megegyezett az indítóközegeével, kivéve, hogy a 2,4-D-t kihagytuk és kb. 0,05 mg/l BA-t adtunk hozzá. Miután a vegyhatását pH=5,8-ra beállítottuk, a közeget 40 ml-es adagokban 125 ml-es Erlenmeyer lombikokba osztottuk szét, majd alumíniumfóliával lefedtük és autoklávoztuk. Valamennyi edénybe kb. 100 mg hegszövetet (callust) tenyésztünk, amit félsötétben, 25 °C-on forgó rázógépen (120 fordulat/perc) tartottunk és kéthetente egyszer továbboltottuk. Szükség szerint a tenyészeteket szitán átszűrtük a differenciált szomatikus embriók szinkronizálása céljából. Szükség esetén kisebb pórusméretű szitát – pl. 520 mikronost – is használhatunk.

### Szomatikus embriók csíráztatása szuszpenziós tenyészetből és növény regenerálása

A megnyúlt hajszálgökerű, kizöldült szomatikus embriókat szitán való szűréssel nyertük a szuszpenziós tenyészetből. A szomatikus embriókat egyenként kivettük és tenyésztettük. Három különböző közeget - mangó érési közeget (Litz és mts., „Somatic embryogenesis in mango,” 1995, *supra*); Gel-Gro helyett agarral szilárdított (7 g/l) mangó érési közeget; és MS törzsközeget 3%-os szukrózzal - vizsgáltunk a csírázás és a növényregeneráció szempontjából. Ezek a közegek nem tartalmaztak növényi növekedési szabályzókat. Valamennyi standard petricsészében huszonöt embriót tenyésztettünk és minden közeg esetén nyolc párhuzamos csészét vizsgáltunk. Parafilmmel való lezárást követően a tenyészeteket egy növesztőkamrában inkubáltuk, 16 órás fényperiódussal. A négy valódi levéllel rendelkező csíranövényeket a továbbiakban áthelyeztük szabadföldre.

### Szomatikus embrió létrehozása szilárd közegben

A szuszpenziós tenyészetben kifejlődött embriogén sejteket és sejtömegeket a fentieknek megfelelő módon összegyűjtöttünk és áthelyeztük szilárd embriogenezis közegbe, melynek összetétele azonos volt a folyadék embriogenezis közegével, majd megszilárdítottuk 2 g/l Gel-Gro-val vagy 7 g/l agarral. Kb. 50 mg hegszövetet (callust) helyeztünk – mint egy csomót - a közeget tartalmazó petricsészébe; valamennyi csészében két ilyen adag volt. A leoltást követően a petricsészéket Parafilmmel lezártuk és teljes sötétségben inkubáltuk. A továbboltást a szomatikus embriódifferenciálódás megjelenése után végeztük. Az embriogén sejtekből vagy sejtömegekből kialakult szomatikus embriókat hetente megszámláltuk a hatodik héttől kezdődően.

A sziklevel stádiumú embriókat megszámoztuk és további érésre továbbtenyésztettük.

#### Szomatikus embriók csírázása és érése szilárd közegben

Kb. 5 mm hosszú érett szomatikus embriókat elkülönítettük az aszinkron sejttömegetől és érési közegben tenyésztettük. Huszonöt érett szomatikus embrió-t tenyésztettünk valamennyi standard petricsészében, 3%-os szukrózos MS közegben, sötétben tartva a csírázás kezdetéig. A hajszálgökerek megnyúlását követően az embriókat áthelyeztük fénybe, 16 órás fényperiódussal. A legalább négy igazi levéllel bíró csíranövényeket átültettük földbe.

#### Betegségrezisztens embriogén szőlősejtek és szőlőnövény kiválasztása

A találmány szerinti évelő szőlő embriogén tenyészetet felhasználhatjuk toxikus anyagokkal - mint pl. növényi kórokozók által termeltek - szemben rezisztens szőlősejtek kiválasztására vagy sorozatvizsgálására. Az ilyen kórokozók közé tartoznak - korlátozás nélkül - baktériumok, mikoplazmák, gombák, rovarok, férgek, vírusok és viroidok. Utóbbi kórokozók által okozott növényi betegségek leírását megtalálhatjuk a „Plant Pathology” (Agrios, 3. kiadás, Academic Press, Inc., New York, 1988) c. könyv 11-16 fejezeteiben. A kórokozó baktériumok közé tartoznak például - korlátozás nélkül - az *Agrobacterium vitis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xylella fastidiosa*, és a *Xanthomonas ampelina*. A kórokozó gombák közé tartoznak például - korlátozás nélkül - az *Uncinula necator*, *Plasmopara viticola*, *Botrytis cinera*, *Guignardia bidwellii*, *Phomopsis viticola*, *Elsinoe ampelina*, *Eutypa lata*, *Armillaria mellea*, és a *Verticillium dahliae*. A kórokozó férgek közé tartoznak - korlátozás nélkül - a gyökérgumó férgek (például a



*Meloidogyne sp.*), ciszta férgek (például a *Heterodera sp.*), gyökértámadó férgek (például a *Rotylenchulus reniformis*), és a földfeletti férgek (például az *Anguina funesta*). A kórokozó rovarkártevők (pl. bogarak) közé tartoznak - korlátozás nélkül - a *Phylloxera*, *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Homoptera*, *Dermptera*, és *Diptera*. A kórokozó vírusok közé tartoznak - korlátozás nélkül - a szőlő legyezőlevelűség és a levélfodrosodás vírusai.

Ha az embriogén tenyészeteket egy növényi kórokozóból nyert nem tisztított tenyészetszűrlet vagy tisztított toxin hatásának tesszük ki, rezisztens szőlősejteket tudunk kiválasztani és szaporítani. Azok a szőlősejtek, melyek túlélnek a szelekciós támadást, nemcsak az adott toxinra, hanem azt az termelő mikróbára is rezisztensé válhatnak. A szelekciós folyamat jellege miatt az indukált rezisztencia kiterjedhet egy sor egyéb betegséget okozó szervezetre az eredeti szelekcióban használt kórokozóan kívül. A szelekciót sejtszinten alakítjuk ki, ezért valószínű, hogy az ilyen a sejtekből kifejlődő szőlőnövény szintén rendelkezik a szelektált tulajdonsággal. Kiemelendő, hogy ez a rendszer a szakember számára lehetővé teszi a kívánt tulajdonság kiválasztását vagy tesztelését több ezer sejten, egyetlen tenyésztőedényben vagy petricsészében.

### Szőlőbetegségek

A szőlő számos kórokozóját ismerjük és ezek többféle betegséget okoznak. Ezek közé tartoznak a levelek és a gyümölcs gombabetegségei (mint a fekete rothadás és anthraknózis), az érrendszer és a gyökerek gombabetegségei (mint az esca, fekete kanyaró, fekete szárelhalás –Black Dead Arm –, és a szőlő eutipás tőkeelhalása), bakteriális betegségek (mint a szőlő *Agrobaktériumos* vesszőgolyválya és Pierce-betegség), vírusok és vírusszerű képletek által okozott betegségek



(mint a szőlő faszöveti barázdáltsága, a szőlő levélfodrosodás és szőlő legyezőlevelűség degeneráció) valamint a férges okozta betegségek és a mikoplazma.

A szőlőt megtámadó egyik betegség az anthraknózis vagy más néven "madárszem-pötty" betegség, melyet az *Elsinoe ampelina* nevű gomba okoz. Számára kedvező körülmények között a gomba a szőlő csaknem valamennyi földfeletti részét megtámadja - beleértve a gyümölcsöt is -, súlyos károkat okozva a termésben. Az anthraknózis kekek formájú, barna vagy fekete szélű és lekerekített vagy szögletes élű elváltozást okoz a szőlőnövényen. Az elváltozások közepe szürkésfehérré válik és időnként kiszárad, ill. kiesik, egy golyóüthet lyuk alakját utánozva. A betegség különösképpen a fiatal leveleket érinti és megakadályozza a normális fejlődést. Az új hajtások szintén megbetegednek és egyértelműen égett jelleget öltenek. A szőlőfürtök szintén érzékenyek a gombabetegségekre fejlődésük során; a bogyókon levő elváltozások beterjedhetnek a pulpába is, és gyakran megrepednek (Pearson és Goheen, Compendium of Grape Diseases, APS Press, St. Paul, MN, 1988).

#### Kórokozó szűrlés

Az *Elsinoe ampelina* tenyészet toxikus aktivitással rendelkező szűrlését a következő módon állítottuk elő. A teljes erősségű Czapek-Dox táptalajt (Fisher Scientific, Springfield, NJ) úgy készítettük, hogy a kellő mennyiségű táptalajkeveréket deionizált (DI) vízben feloldottuk. A közeget szétosztottuk 125 ml-es Erlenmeyer lombikokba, 50 ml-es adagokban. Az autoklávozás és hűtés után 100 µl *Elsinoe ampelina* spóraszuszpenziót adtunk valamennyi edényhez (1. nap); az edényeket egy hétig sötétben inkubáltuk forgó rázógépen (120 fordulat/perc). Egy hét után az egyes edények tartalmát átvittük 100 ml teljes erőssé-



gü Czapekk-Dox tápoldatba - 250 ml-es Erlenmeyer lombikokba -, majd további két hétig inkubáltuk. A periódus végén (azaz az 1. naptól számított három hét múlva) a gombatenyészet szűrletét összegyűjtöttük úgy, hogy valamennyi edény tartalmát átszűrtük több-rétegű steril gézen. A nyers tenyészet szűrletét a további használatig - 4 °C-on tároltuk, ahogy azt korábban leírtuk (Subramanian, J., " Selection and characterization of resistance in mango (*Mangifera indica* L.) embryonic cultures to the phytotoxin produced by *Colletotrichum gloeosporioides*, Penz.," Ph.D. Dissertation, University of Florida, Gainesville, 1995).

Mielőtt az *in vitro* szelekciós kísérletben a tenyésztőközeghez hozzáadtuk volna, a fagyasztott tenyészetszűrletet feloldottuk (melegítés nélkül) szobahőmérsékleten, vegyhatását pH= 5,8-ra beállítottuk, majd szűrőn keresztül (0,2 mikronos, Nalgene, Rochester, NY) csíra-mentesítettük. Utóbbi kórokozószűrlet megőrizte toxikus aktivitását.

#### Szelekció

Az *Elsinoe ampelina* tenyészet szűrletét a továbbiakban hozzáadtuk *V. vinifera* cv. "Chardonnay" embriogén sejtek és sejtömegek folyadékszuszpenziós tenyészetéhez módosított B-5 közegben, hogy kiválasszuk a toxikus gombaszűrlettel szemben rezisztens sejteket. A szőlő embriogén sejteket és sejtömegeket a fentiekben leírtak szerint növesztettük azzal a különbséggel, hogy ebben az *in vitro* szelekciós kísérletben a növesztőközeget kiegészítettük ismert térfogatú *Elsinoe ampelina* tenyészet szűrletével. A kórokozó szűrlet megfelelő hígítását a szűrlet toxicitásának sorozathígítással történő meghatározásával állítottuk be. Ezek a kísérletek azt mutatták, hogy a 40%-os (v/v) tenyészetszűrlet bizonyult használhatónak az *in vitro* szelekcióban.

"Chardonnay" embriogén sejtek és sejtömegek tenyészetét 40%-os (v/v) gombatenyészet szűrletet tartalmazó folyadékközegben tar-



tottunk 26 °C-on, diffúz fényben, forgó rázógépen (125 fordulat/perc). A továbboltást tíznaponta egy alkalommal végeztük; valamennyi továbboltásnál szűrőn csíramentesített tenyészet-szűrletet használtunk a közeg hígításához. A szelekciós folyamat - a tenyészet szűrletével - négy vagy öt továbboltási ciklus (egy ciklus = tíz nap) során folytatódott. Míg az embriogén sejtek többsége elpusztult, nagyon kevés - gyakran kevesebb, mint 1% - sejt túlélte a szelekciós támadást. A rezisztens sejtvonalak létrehozásakor a szelekciós támadást megszüntettük négy vagy öt ciklust követően és a túlélő sejteket módosított B-5 közegben - tenyészet-szűrlet nélkül - növesztettük. A rezisztens sejtvonalak szaporodtak és a szomatikus embriókat a már leírt módszereknek megfelelően hoztuk létre.

A szelekciós folyamat során kiválasztott embriogén sejtenyészeteiket számos *in vitro* bioesszében vizsgáltuk az *Elsinoe ampelina* ellenes rezisztencia irányában. Elsőként azt vizsgáltuk, hogy a rezisztens szőlő sejtvonalak rendelkeznek-e olyan aktivitással, amely gátolja a gombanövekedést. Ennek eldöntésére egy rezisztens sejtvonal tenyésztőközegét (azaz kondicionált közeget) vizsgáltuk gombaellenes gátló aktivitás jelenlétére. A kondicionált közeget különböző *Elsinoe* ellenes rezisztenciával bíró sejtvonalakból gyűjtöttük, és különböző koncentrációban használtuk gomba növesztőközeg készítéséhez. Egy aktívan növekedő gombakolóniát egy petricsésze közepére helyeztünk, amely gomba növesztőközeget tartalmazott - rezisztens szőlő sejtvonalakból származó kondicionált közeggel vagy azt kihagyva (kontroll) - és standard körülmények között inkubáltuk. A kísérleti eredmények azt mutatták, hogy a gomba növekedését gátolta a 25 vagy ennél nagyobb százalékban kondicionált közeget tartalmazó gomba növesztőközeg.

Annak érdekében, hogy rezisztens szőlőtenyészetekben egy gombaellenes aktivitás jelenlétét kimutassuk, rezisztens és kontroll sejtvon-



nalakat szilárd növényi növesztőközegbe helyeztünk petricsészékben – a hat és tizenkét órának megfelelő helyre - majd négy hétig sötétben inkubáltuk. A periódus végén az aktívan növekedő *Elsinoe* gombakolónia egy darabját a petricsésze közepére helyeztük és standard körülmények között inkubáltuk. A gomba gyorsan fejlődött és megfertőzte a kontroll tenyészeteket. Ezzel ellentétben a gomba növekedése megállt azokban a csészékben, melyek az *Elsinoe*-tenyészet szűrletére rezisztens szőlő sejttenyészetet tartalmaztak. A rezisztens tenyészeteket tartalmazó petricsészékben a gombafonalak nem tudtak szabadon nőni a tenyésztőközegen keresztül, ahogy azt a kontroll tenyészetekben (azaz nem rezisztenssekben) lehetett látni. Egy vastag gombaszőnyeg - mint a kontroll tenyészeteket tartalmazó csészékben - soha nem alakult ki azokban a csészékben, melyek az *Elsinoe ampelina* rezisztens tenyészeteket tartalmazták. A rezisztens tenyészetek *Elsinoe ampelina* növekedését gátló képessége a szelekciót követő kilenc hónap múlva is megmaradt, bizonyítván, hogy a rezisztens tenyészetekben levő genetikai változások stabilak.

Ezen kívül, az *Elsinoe ampelina* ellenes rezisztenciával bíró szőlőtenyészeteket megvizsgáltuk egy második gomba kórokozó - a *Fusarium oxysporum* - elleni rezisztencia jelenlétére is. A rezisztens és kontroll sejtvonalatokat szilárd növényi növesztőközegbe helyeztük petricsészékben – a hat és tizenkét órának megfelelő helyre - és négy hétig sötétben inkubáltuk. A periódus végén az aktívan növekedő *Fusarium oxysporum* gombakolónia egy darabját a petricsésze közepére helyeztük és szobahőmérsékleten inkubáltuk, 16 órás fényperiódussal. A gomba gyorsan fejlődött és megfertőzte a kontroll tenyészeteket. Ezzel ellentétben a gomba növekedése megállt azokban a csészékben, melyek az *Elsinoe*-tenyészet szűrletére rezisztens szőlő sejttenyészetet tartalmaztak. A rezisztens tenyészeteket tartalmazó



petricsészékben a gombafonalak nem tudtak szabadon nőni a tenyésztőközegen keresztül, ahogy azt a kontroll tenyészetekben (azaz nem rezisztensekben) lehetett látni. Egy vastag *Fusarium* gombaszőnyeg - mint a kontroll tenyészeteket tartalmazó csészékben - soha nem alakult ki azokban a csészékben, melyek az *Elsinoe ampelina* rezisztens tenyészeteket tartalmazták. Ez a kísérlet azt bizonyította, hogy a rezisztens szőlőtenyészetek nemcsak az *Elsinoe ampelina*, hanem a *Fusarium oxysporum* ellenes rezisztenciával is rendelkeznek.

További vizsgálatokat végeztünk annak meghatározására, hogy a gombarezisztens szőlő tenyészetekből kialakulhatnak-e az *Elsinoe ampelina* ellen is rezisztens szomatikus embriók. Rezisztens és kontroll (azaz nem rezisztens) tenyészetekből nyert szomatikus embriókat vagy 40%-os gombatenyészet szűrletet vagy utóbbit nem tartalmazó kontroll közegben növesztettünk. A rezisztens tenyészetekből származó szomatikus embriók mind a gombatenyészet szűrletét tartalmazó, mind a kontroll közegben normálisan fejlődtek és csíráztak; a kontroll tenyészetekből származó szomatikus embriók nekrotizáltak és időnként elpusztultak a gombatenyészet szűrletét tartalmazó közegben, de nem haltak el a kontrollban. A kontroll embriók nekrozisa a gombatenyészet szűrletét tartalmazó közegben olyan gyors volt, hogy a kontroll szomatikus embriók már hetvenkét órával a tenyészet indítása után elsötétedtek. Ezen kísérleti eredmények azt mutatták, hogy a rezisztens tenyészetekből származó szomatikus embriók is ellenállóak voltak a gombaszűrlettel szemben. Ezen kívül ezek a rezisztens szomatikus embriók ellenálltak ugyanolyan koncentrációjú *Elsinoe ampelina* tenyészetszűrletnek, mint a saját rezisztens embriogén progenitor sejtjeik és sejttömegeik.

### Betegségrezisztens növények



Az embriogén tenyészeteket *in vitro* szelektáltunk az *Elsinoe ampelina* gombatenyészet szűrletének ellenében. A kiválasztott tenyészetekből növényt regeneráltunk, amelyek üvegházban akklimatizálódtak. A kiválasztott vonalakból származó, ill. a nem-szelektált kontroll növényeket lefújtuk spóra szuszpenzióval ( $1 \times 10^6$  spóra/ml). A növényeket egyenként zsákokba csomagoltuk a nedvesség megőrzésére - ez optimális körülmény az anthraknózis kórokozójának - három napig. A zsákok eltávolítása után a növényeket pontoztuk a betegség tüneteinek szempontjából. Valamennyi nem-szelektált kontroll a betegségre igen érzékenynek bizonyult, és az esetek többségében lombhullást észleltünk három napon belül a betegség következményeként. A két kiválasztott vonal 40 növénye közül csak egy mutatta az anthraknózis enyhe tüneteit. Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy az embriogén sejtek *in vitro* szelekció során nyert kórokozó ellenes rezisztenciája a kifejlett növényben is kimutatható.

A regenerált növényeket standard módszerekkel vizsgáltuk az anthraknózis ellenes rezisztencia szempontjából. Például *Elsinoe ampelina* spóráiból szuszpenziót készíthetünk, ha a friss gombatelepek spóráit steril deionizált vízben (DI) szuszpendáljuk és a spórasűrűséget 100000 spóra/ml-re állítjuk be hemocitóméterrel. Üvegházban nevelt növények vagy hajtások leveleit összegyűjtjük és óvatosan megmossuk DI vízben. A levél lemezére egy pontban 100  $\mu$ l spóraszuszpenziót helyezünk és - a gombaleoltás elősegítésére - egy éles karcolást ejtünk a pont közepén. Minden egyes levélen legalább két ilyen pontot készítenek. A leveleket nedves körülmények között - a tünetek kifejlődésének optimális - inkubáljuk legalább hetvenkét óráig, majd megfigyeljük a károsodások kifejlődését, ahogy azt korábban leírtuk (Subramanian, J., Ph.D. Dissertation, University of Florida, Gainesville, 1995). A kontroll vizsgálatokban DI vizet használtunk.



Ezenkívül anthraknózisra ismertén érzékeny vagy rezisztens fajtákból vett leveleket beoltottunk és az ezeken a leveleken észlelhető károsodások szolgáltak standardként a regenerált növények - amelyek in vitro szelektált embriogén sejtekből származnak - érzékenységének/rezisztenciájának megítélésére. Az adatok statisztikai elemzésével meghatároztuk az *Elsinoe ampelina* és az anthraknózis ellenes rezisztencia mértékét. A találmány szerint azok a szőlőnövények hasznosak, amelyek a kontroll növényekhez képest fokozott mértékű rezisztenciával bírnak az *Elsinoe ampelina*, az anthraknózis vagy mindkettőjük ellen.

### Szőlőtranszformáció

Az itt leírt módszer alkalmas transzformált növények létrehozására. A sejteket transzformálhatjuk a szomatikus embrióképződés bármelyik lépésében. A transzformációra alkalmas szövetek és sejtek közé tartozik az explantátum, embriogén sejtek, embriogén sejtömegek és szomatikus embriók (beleértve az érett szomatikus embriókat is).

A találmány szerinti módszer által létrehozott sejttenyészeteket transzformálhatjuk a kívánt transzgén tartalmazó DNS-el. Ezeket a sejteket transzformálhatjuk például egy kórokozó, egy betegség, egy rovarkártevő vagy ezek bármely kombinációja elleni rezisztenciáért felelős génekkel. Például számos olyan *Bacillus thuringiensis* gén ismert és hasznos a találmány szerinti módszerben, amelyek számos kórokozóra toxikus fehérjék kódolásáért felelősek. Több standard módszer létezik egy transzgén gazdanövénybe való bevitelére és ezáltal transzgenikus növény létrehozására.

A növényi expressziós vektor előállítása folyamatában számos standard módszer ismert a vektornak a gazdanövénybe való bejutta-



tására és ezáltal transzgenikus növény létrehozására. Ezek közé tartoznak :

1) *Agrobacterium*-közvetített transzformáció (*A.tumefaciens* vagy *A.rhizogenes*) (lásd pl. Lichtenstein and Fuller In: *Genetic Engineering*, Vol.6, PWJ Rigbí, ed, London, Academic Press, 1987; és Lichtenstein C.P., and Draper J., In: *DNA Cloning*, Vol II, D.M. Glover, ed, Oxford, IRI Press, 1985);

2) részecske beviteli rendszer (lásd pl. Gordon-Kamm et al., *Plant Cell* 2:603 (1990); és BioRad Technical Bulletin 1687, *supra* );

3) mikroinjekciós módszerek (lásd pl. Green et al., *supra*);

4) polietilénglikolos (PEG) eljárások (lásd pl. Draper et al., *Plant Cell Physiol.* 23:451, 1982; és Zhang and Wu, *Theor.Appl.Genet.* 76:835, 1988);

5) liposzóma-közvetített DNS felvétel (lásd pl. Freemna et al., *Plant Cell Physiol.* 25:1353, 1984);

6) elektroporációs protokollok (lásd pl. Gelvin et al., *supra*; Dekeyser et al., *supra*; Fromm et al., *Nature* 319:719, 1986; Sheen *Plant Cell* 2:1027, 1990; és Jang and Sheen *Plant Cell* 6:1665, 1994);

7) a vortexes módszer (lásd pl. Kindle *supra*).

A találmány szempontjából a transzformáció módszere nem lényeges, bármely hatékony transzformációt biztosító eljárás alkalmazható. Ahogy új módszerek jelennek meg a termés és más gazdasejtek transzformálására, ezeket közvetlenül lehet alkalmazni.

A következőkben egy példaként szolgáló különleges technikát mutatunk be vázlatosan, nevezetesen az *Agrobacterium*-közvetített transzformációt. Ezen technikánál a növényi sejtek genomjába bejuttatandó gének kezelésének általános folyamata két lépésből áll. Az első lépésben a klónozást és a DNS módosítási lépést *E.coliban* végezzük, és az aktuális génkonstrukciót tartalmazó plazmidot konjugá-



ció vagy elektroporáció segítségével juttatjuk be az *Agrobacteriumba*. A második lépésben az így kialakult *Agrobacterium* törzset használjuk a növényi sejtek transzformálására. Az általános növényi expressziós vektorban a plazmid egy olyan replikációs kezdőpontot tartalmaz, amely lehetővé teszi szaporodását az *Agrobacteriumban*, ill. egy másik nagy mennyiségben jelenlevő replikációs kezdőpontot, ami viszont az *E.coliban* működik. Ez lehetővé teszi, hogy *E.coliban* könnyen kialakíthassunk és tesztelhessünk transzgéneket, mielőtt azokat átvinnénk az *Agrobacteriumba* további, növényekbe való bejuttatás céljából. Rezisztenciagéneket is betehetünk a vektorba, egyet a baktériumban való szelekcióra - pl. sztreptomocint -, és egy másikat, amely a növényben fog működni, például a kanamicin vagy növényirtószer rezisztenciáért felelős gént. A vektoron vannak restrikciós endonukleáz helyek - egy vagy több transzgén hozzáadására - és irányjelző T-DNS határszekvenciák, melyeket az *Agrobacterium* transzfer funkciója felismer és a növénybe bejuttatandó régiót körülhatárolja.

Egy másik példában növényi sejteket transzformálhatunk oly módon, hogy egy wolfram mikrolövedékeket - melyek felszínére klónozott DNS-t abszorbeálunk - lövünk be a sejt belsejébe. A belövésre használt Biolistic készülékben (Bio-Rad) puskaportöltés (22-es kaliberű Power Piston Tool Charge) vagy léglökés hajtja a makrolövedéket a puskacsövön keresztül. Egy adag wolfram részecskeszuszpenziót - melyre DNS-t abszorbeáltunk - helyezünk a műanyag makrolövedék elülső részére, majd azt kilőjük egy akril blokkolólemezre. A lemezen levő nyílás túl kicsi ahhoz, hogy a makrolövedék átjusson rajta, ott megakad, míg a wolfram mikrolövedékek tovább folytatják útjukat a nyíláson keresztül a kívánt célíg. Jelen találmányban a cél lehet bármely növényi sejt, szövet, mag vagy embrió. A mikrolövedékekkel bejuttatott DNS integrálódik a sejtmagba vagy a kloroplasztba.



Általában a transzgének bejuttatása és expresszálása növényi sejtekbe ma már rutineleget a szakemberek számára és fő eszközeivé váltak génexpressziós vizsgálatokban, ill. mezőgazdasági és kereskedelmi jelentőségű növényfajták nemesítését teszik lehetővé.

#### Egyéb megvalósítások

A leírásban szereplő publikációk hivatkozásként vannak beépítve.

A találmányt egy aktuális megvalósítási alakban mutattuk be, azonban érthető módon ez módosítható. Jelen leírással le szándékoztunk fedni a találmány minden variációját, használati módját, adaptációját és általános alapelvét, továbbá védeni kívánjuk a megoldásnak a szakterületen járatos szakember által kivitelezhető módosításait is, mely oltalmi kört az alábbi igénypontok körvonalaznak.



## Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás érett szomatikus embrió létrehozására, azzal jellemezve, hogy:

- a) egy embriogén sejtet tartalmazó folyadéktenyészetet alakítunk ki;
- b) fenti tenyészetből visszanyerjük a fenti embriogén sejtet;
- c) fenti embriogén sejtet átvisszük egy második tenyészetbe és
- d) fenti embriogén sejtéből érett szülő szomatikus embriót növesztünk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az embriogén sejtet portokból, ováriumból, ovulumból, virágszövetből, vegetatív szövetből, kacsból, levelekből, gyökerekből, nucellusból, szárból, magvakból, protoplasztból, periciklusból, apikális merisztémából, embriogén szövetből, szomatikus vagy zigotikus embriókból nyerjük.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a második tenyészetben növényi növekedési szabályzót tartalmazó közeget alkalmazunk.

4. Az 3. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy növényi növekedési szabályzóként egy auxint, NOA-t, dikambát, pikloramot, NAA-t, IAA-t, 2,4-D-t, egy citokinint, benziladenint, zeatint, tidiazuront, abszciszinsavat vagy giberrelinsavat alkalmazunk.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az embriogén sejtet DNS-el transzformáljuk.



6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy további e) lépésként az érett szőlő szomatikus embriót áthelyezzük egy csíráztató közegbe szőlő csíranövény növesztésére.

7. Eljárás szomatikus szőlő embrió létrehozására azzal jellemezve, hogy:

a) egy embriogén sejtet tartalmazó folyadéktenyészetet alakítunk ki;

b) fenti embriogén sejtet kiválasztjuk fenti tenyészetből;

c) fenti embriogén sejtet átvisszük egy második tenyészetbe és

d) fenti embriogén sejtéből szőlő szomatikus embriót növesztünk.

8. Eljárás szomatikus szőlő embrió létrehozására, azzal jellemezve, hogy:

a) egy embriogén sejtet tartalmazó folyadéktenyészetet alakítunk ki, amelyben a közeg B-5 fősókat és MS kiegészítőkat tartalmaz;

b) fenti tenyészetből fenti embriogén sejtet visszanyerjük;

c) fenti embriogén sejtet átvisszük egy második tenyészetbe és

d) fenti embriogén sejtéből szőlő szomatikus embriót növesztünk.

9. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a visszanyert szőlő szomatikus embriót DNS-el transzformáljuk.

10. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan folyadéktenyészetet alkalmazunk, amely B-5 fősókat és MS kiegészítőkat tartalmaz.

11. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy második tenyészetként folyadéktenyészetet alkalmazunk.

12. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az embriogén sejteket a fenti tenyészetből szűréssel, ülepítéssel és kiválogatással nyerjük vissza.



13. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az első tenyészetet szitán átszűrjük a differenciált szőlő szomatikus embriók keletkezésének szinkronizálása céljából.

14. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy második tenyészetként egy szilárd közegűt alkalmazunk.

15. Érett szomatikus szőlő embrió, melyet az 1. igénypont szerinti eljárással állítunk elő.

16. A 15. igénypont szerinti érett szőlő szomatikus embrióból csíráztatott csíranövény.

17. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az a) lépés szerinti embriogén sejtet a következő csoportból választott forrásból nyerjük:

- az 1. igénypont a) és b) lépései szerint létrehozott embriogén sejt;

- az 1. igénypont a)-d) lépései szerint létrehozott szőlő szomatikus embrió;

- az 1. igénypont szerinti eljárással létrehozott érett szomatikus embrió;

- az 1. igénypont szerinti eljárással létrehozott csíranövény;

- az 1. igénypont szerinti eljárással létrehozott érett szomatikus embrióból növesztett növényből származó portok, ovárium, ovulum, virágszövet, vegetatív szövet, kacs, levelek, gyökerek, nucellusz, szár, magvak, protoplaszt, periciklus, apikális merisztéma, embriogén szövet, szomatikus vagy zigotikus embriók.

18. Eljárás érett szőlő szomatikus embrió hosszútávú tárolására, azzal jellemezve, hogy az embriót megszárítjuk, majd 8 °C-nál alacsonyabb hőmérsékleten tároljuk.



19. A 18. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az érett szőlő szomatikus embriót az 1. igénypont szerinti eljárással hozzuk létre.

20. Eljárás szőlő szomatikus embrió közvetlen helyrevezetésére, azzal jellemezve, hogy a szőlő szomatikus embriót homokot és palántázókeveréket tartalmazó közegbe helyezzük.

21. Eljárás növényi kórokozóra rezisztens szőlő szomatikus embrió kiválasztására, azzal jellemezve, hogy:

a) szőlő szomatikus embriót tenyésztünk az első folyadék tenyésztőközegben sejtszuspenziós tenyészet létrehozása céljából, melyben az első folyadék tenyésztőközegben egy növényi növekedési szabályzót és egy növényi kórokozó tenyészetűrlét alkalmazunk;

b) a szőlősejtet vagy szőlősejt csoportokat visszanyerjük a sejtszuspenziós tenyészetből;

c) a szőlősejtet vagy szőlősejt csoportokat egy második folyadék tenyészetben tenyésztjük szőlő szomatikus embrió létrehozására;

d) a növényi kórokozóra rezisztens szomatikus szőlő embriót visszanyerjük.

22. A 21. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szőlő szomatikus embriót áthelyezzük egy csíráztató közegbe szőlő csíranövény növesztésére.

23. A 21. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szűrletet vírustól, féregből, rovarból, gombából vagy baktériumból nyerjük.

24. A 23. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy gombaként az *Elsinoe ampelina*-t alkalmazunk.

25. A 21. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az a) lépésben növényi növekedési szabályzóként egy auxint alkalmazunk.



26. A 25. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a második folyadék tenyésztőközegben egy növényi növekedési szabályzót alkalmazunk.

27. Eljárás növényi kórokozóra rezisztens szőlőnövény létrehozására, azzal jellemezve, hogy:

a) egy szőlő szomatikus embriót az első folyadék tenyésztőközegben tenyésztünk sejtszuszpenziós tenyészet létrehozása céljából, melyben az első folyadék tenyésztőközegben egy növényi növekedési szabályzót és egy növényi kórokozó tenyészet szűrletét alkalmazzuk;

b) a szőlősejtet vagy szőlősejt csoportot visszanyerjük a sejtszuszpenziós tenyészetből;

c) a szőlősejtet vagy szőlősejt csoportot egy második folyadék tenyésztőközegben tenyésztjük szőlő szomatikus embrió létrehozása céljából;

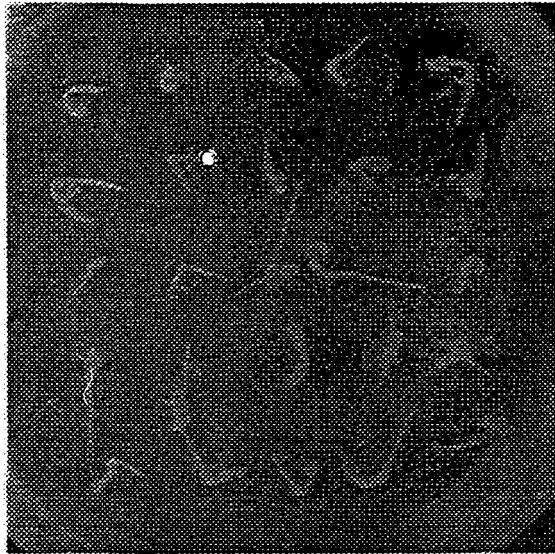
d) a növényi kórokozóra rezisztens szőlő szomatikus embriót visszanyerjük;

e) a szőlő szomatikus embrióból növényt növesztünk.

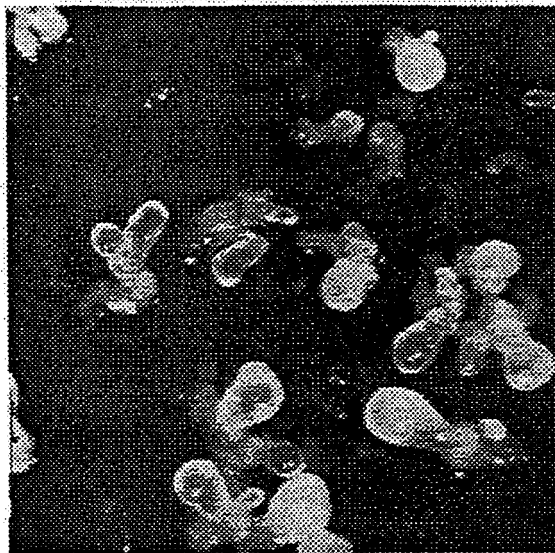
52 + 2 = 54 oldal

A meghatalmazott:

1002  
**DANUBIA**  
szőlő- és vörösvirág-üzem  
Tóth Hanna  
szőlő- és vörösvirág-üzem



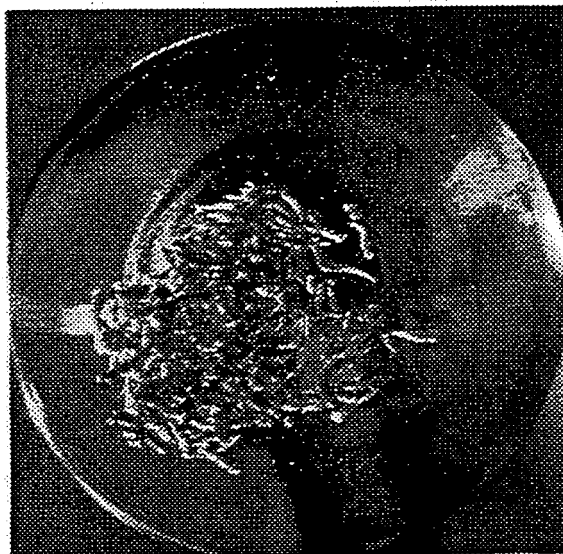
1A ábra



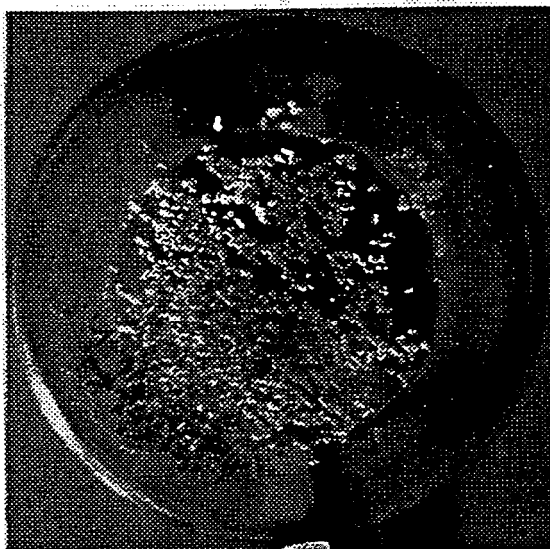
1B ábra



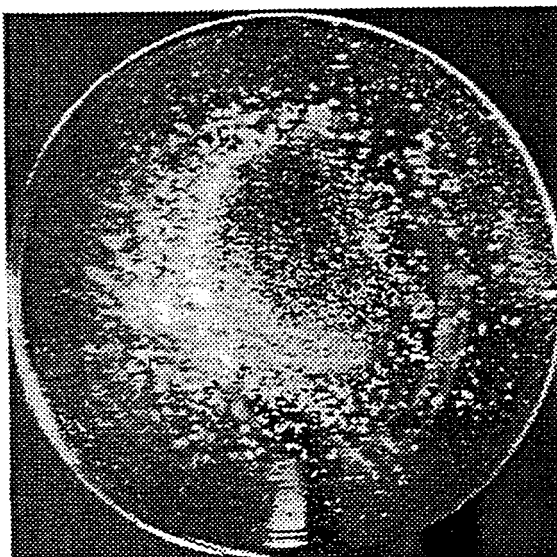
1C ábra



1D ábra



1E ábra



1F ábra