



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

220 773 B1

(21) A bejelentés ügyszám: P 92 02400

(22) A bejelentés napja: 1991. 01. 14.

(30) Elsőbbségi adatok:

07/467,983 1990. 01. 22. US

07/508,045 1990. 04. 11. US

07/636,089 1990. 12. 28. US

(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 91/00183

(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 91/10725

(51) Int. Cl.⁷

C 12 N 15/82

C 12 N 15/87

A 01 H 5/00

(40) A közzététel napja: 1993. 06. 28.

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2002. 05. 28.

(72) Feltalálók:

Kirihara, Julie A., Bloomington, Minnesota (US)

Lundquist, Ronald C., Minnetonka,
Minnesota (US)

Walters, David A., Bloomington, Minnesota (US)

(73) Szabadalmaz:

DeKalb Genetics Corporation, DeKalb,
Illinois (US)

(74) Képviselő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,
Budapest

(54) **Eljárás termő transzgenikus kukoricanövények előállítására**

KIVONAT

A találmány tárgyát eljárások képezik *Zea mays* (kukorica)-fajhoz tartozó termékeny transzgenikus növények előállítására érintetlen, regenerálható *Zea mays*-sejtek mikrorészecske-bombázásával, majd ezt követően szelekciós technika alkalmazásával. A találmány szerint előállított növények képesek rekombináns DNS stabil expresszálására, továbbá képesek a rekombináns DNS-t utódaikba is átörököíteni. A találmány egyik megvalósítási

módja szerint a rekombináns DNS, amit bejuttatnak a kukoricanövénybe, a kukorica magjának egy tartalék-tápanyag-fehérjéjét, előnyösen a zein fehérjét kódolja. Ezzel az eljárással a kukorica termésének aminosav-összetétele javítható.

A találmány szerinti eljárások alkalmasak termékeny, transzgenikus kukoricanövények előállítására.

HU 220 773 B1

A találmány tárgyát eljárások képezik *Zea mays* (a továbbiakban kukorica) fajhoz tartozó termékeny transzgenikus növények előállítására érintetlen, regenerálható *Zea mays*-sejtek mikrorészecske-bombázásával, majd ezt követően szelekciós technika alkalmazásával.

A találmány szerinti eljárások alkalmasak előnyös tulajdonságú, termékeny, transzgenikus kukoricánövények előállítására, amelyek széles körben előnyösen alkalmazhatók a mezőgazdaságban.

A növények génebeszeti úton történő befolyásolása, ami a genetikai anyag (általában DNS vagy RNS) izolálását és manipulálását, valamint azt követően a manipulált genetikai anyagnak egy növénybe vagy növényi sejtbe való bejuttatását jelenti, nagyon ígéretes eljárás a modern mezőgazdaság és növénytermesztés számára. A termény megnövekedett élelmiszer-ipari értéke, magasabb terméshozamok, tápértékek, csökkentett termelési költségek, kártevő rezisztencia, stressztűrés, gyógyászati hatóanyagok, kémiai anyagok és biológiai anyagok előállítása, valamint egyéb előnyös tulajdonságok mind elérhetők a génebeszeti technikák alkalmazásával. Ha egy gént egyszer azonosítottak, klónoztak és mesterségesen megváltoztattak, akkor még mindig szükség van arra, hogy a számunkra fontos növénybe bejuttassuk, oly módon hogy a keletkező növény legyen mind termékeny, mind pedig alkalmas arra, hogy a bejuttatott gént tovább adja az utódainak.

Számos különböző módszert fejlesztettek ki, és jelenleg is hozzáférhetők, amelyek alkalmasak különböző növények és növényi sejtek DNS-sel való transzformálására. Ezek a növények általában kétszikűek, és bizonyos sikerekről is beszámoltak néhány egyszikű gabonanövény esetében. Azonban eddig néhány fajt semmilyen módszer alkalmazásával sem sikerült transzformálni, így, az ebben a leírásban ismertetett felfedezés előtt nem volt ismert olyan technológia, amellyel lehetséges volt a *Zea mays*-növények stabil transzformációja a bejuttatott rekombináns DNS-sel, amelyet legalább egy teljes szexuális cikluson keresztül sikerült tovább adni. Ezt a szakmai kudarcot jól dokumentálja a szakirodalom, és számos új összefoglalóban tárgyalják [I. Potrykus, Trends in Biotechnology, 7, 269 (1989); K. Weising et al., Ann. Rev. of Genetics, 22, 421 (1988); F. Cocking et al., Science, 236, 1259 (1987)].

A DNS bejuttatására alkalmazott számos kipróbált, vagy javasolt technika közé tartozik az elektroporáció, mikroinjektálás, mikrobombázás, liposzómafúzió, Agrobacteriummal közvetített transzfer, makroinjektáció, és tiszta DNS-sel való érintkeztetés oldatban.

Például J. DeWet és munkatársai [Experimental Manipulation of Ovule Tissue, G. Chapman et al. eds., Longman, Inc., New York (1985), 197–269. oldal] valamint Y. Ohta, [Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 83, 715 (1986)] leírják, hogy sikerült DNS-t bejuttatni kukoricába, oly módon hogy pollenszemeket keverték el DNS-oldattal, és a pollent a kukorica selymére vitték. Ezekben a közleményekben nincs olyan molekuláris adat, amely megerősítené azt, hogy idegen DNS jutott be a kukoricasejtekbe. Arntzen és munkatársai a 275 069 számú európai szabadalmi le-

írásban közlik azt, hogy a DNS-t kukorica pollenjével inkubálták, és ezután a kukorica csövét beporozták vele, majd magok keletkeztek. Az ezekből a magvakból származó növényekről leírták, hogy tartalmazzák a bejuttatott DNS-t, de nem gondolták, hogy a bejuttatott DNS egy teljes szexuális cikluson átjut.

A. Graves és munkatársai [Plant Mol. Biol., 3, 43 (1986)] a *Zea mays*-palánták Agrobacteriummal közvetített transzformálását írják le. A bizonyítékok olyan vizsgálatokon alapulnak, amelyek nem mindig megbízhatók. A mai napig nem írtak le újabb sikeres transzformációt sem pollennel sem Agrobacteriummal közvetített transzfertechnikák alkalmazásával.

A mikrobombázásról leírták, hogy transzformált kukoricasejteket eredményez. A technikát Sanford és munkatársai írják le [Part. Sci. and Techn., 5, 27 (1987); 331 855 számú európai szabadalmi leírás, ami a 07/161 807 szériaszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésen alapul, amelyet 1988. február 28-án jelentettek be. Klein és munkatársai [Plant Physiol., 91, 440 (1989)] leírják a transzformált kukoricasejtek előállítását, mikrobombázás alkalmazásával. A használt sejtek azonban nem voltak képesek növényekké regenerálódni. Tehát még nem közöltek kísérleti leírást, amelyben a DNS-t a bombázási technikával juttatják be bármilyen típusú regenerálható kukoricasejtbe. Semmilyen génnek nem írták le kukoricakallusz bombázásából származó stabil bejuttatását kukoricasejtbe, valamint nem sikerült elérni, hogy ezt követően termékeny növényeket regeneráljanak a kallusból, és a bejuttatott gént a transzformált növény egy szexuális cikluson átjuttatta volna. D. McCabe és munkatársai a 270 356 számú európai szabadalmi leírásban leírják a kukorica virágpor-DNS-sel való bombázását, a virágpornak a selyemre való juttatását, és olyan magvak képződését, amelyek tartalmazzák az idegen DNS-t. Arra azonban nincs bizonyíték, hogy a DNS átjutott egy teljes szexuális cikluson, és a csoport további eredményeket sem közölt.

A kukoricaprotoplasztok elektroporációjáról leírták, hogy transzformált sejteket eredményezett [M. E. Fromm et al., Nature, 319, 791 (1986)], jóllehet ezekből a sejtekből nem lett később regenerálódott növény. A kukoricaprotoplasztok elektroporációját Rhodes és munkatársai is leírták [Science et al., 240, 204 (1988)]. Bár a recipiens sejteket transzformálták, és ez utóbbi esetben a sejtek képesek voltak növényekké regenerálódni, a növények maguk sterilek maradtak. Ezenkívül, a Rhodes és munkatársai által a sejtvonalak előállítására használt módszerek nem voltak reprodukálhatók.

Egy további buktató a termékeny transzgenikus kukoricánövények előállításában a néhány transzformánsnak a kiválasztása, oly módon hogy a transzformánsoknak sem a regenerálókapacitása (a protoplasztok vagy sejtenyészetek esetében), sem a termékenysége ne romoljon el. A transzformációs technikákkal általában előállított kisszámú transzformáns következtében gyakran van szükség valamilyen szelekciós eljárásra. A szelekció azonban általában bizonyos toxikus anyagok, például herbicidek vagy antibiotikumok használá-

tát jelenti, ami romboló hatással lehet vagy a regenerálhatóságra, vagy a keletkező növény termékenységére.

Másrészről, az ismert volt, hogy a nemtranszformált kukoricaprotoplasztok, a tenyésztett sejtek és a kalusz legalább regenerálható, és a keletkező növények általában termékenyek. Például R. D. Shillito és munkatársai [Bio/Technology, 7, 581 (1989)], valamint L.M. Prioli és munkatársai [Bio/Technology, 7, 589 (1989)] leírják protoplasztok előállítását sejtenyészetekből, majd ezekből termékeny növények felnevelését. C. A. Rhodes és munkatársai [Bio/Technology, 6, 56 (1988)] olyan kísérleteket közölnek, amelyek során embrionális kukoricasejtek tenyészetéből izolált protoplasztokat sikerült regenerálniuk.

A szakembereknek azonban nem sikerült meghatározni, hogy mely kukoricaszövetek vagy -tenyészetek a megfelelő befogadói az idegen DNS-nek, azaz melyek tartalmaznak elegendő számú befogadóképes sejtet, amelyekbe a DNS stabilan integrálódik, ugyanakkor részét képezik a csírasejtvonalnak, azaz annak a sejtvonalnak, amely a következő növénygenerációt hozza létre.

A szakma tehát egy dilemmával állt szemben. Miközben bizonyos transzformációs technikákat javasoltak, vagy írtak le transzformáns kukoricasejtek előállítására, és bizonyos sejteket, illetve szöveteket javasoltak potenciális befogadóknak, mivel képesek voltak regenerálódni, a szakterületen dolgozók nem voltak képesek a technikáknak egy olyan kombinációját eltalálni, amellyel sikeresen lehetett volna olyan transzformált kukoricánövényt előállítani, amelyek a beléjük juttatott DNS-t képesek lettek volna egy teljes szexuális cikluson keresztül örökíteni.

A jelen találmány tárgya tehát termékeny, stabilan transzgenikus *Zea mays*-növények előállítása, valamint ezekből olyan magvak begyűjtése, amelyek a bejuttatott gént képesek az utódoknak tovább adni. A találmány tárgya továbbá ilyen stabilan transzgenikus növények és magvak előállítása mikrorészecske-bombázással, valamint szelekciós eljárás, amely a transzformált sejteknek legalább egy részének magas szintű életképességet biztosít. A találmány tárgya továbbá kukorica mellett más, magvas gabonanövényekből termékeny, stabilan transzgenikus növények előállítása.

Az alábbiakban felsorolt irodalmi hivatkozásokat referenciaként használjuk a továbbiakban.

Armstrong, CL, et al., *Planta* 164, 207–214 (1985);
Callis, J. et al., *Genes and Develop.* 1, 1183–1200 (1987);

M. Bevan et al., *Nucleic Acids Research*, 11, 36a (1983);

Chu, CC, et al., *Sci. Sin. (Peking)* 18, 659–668 (1975);

Cocking, F. et al., *Science*, 236, 1259–1262 (1987);
DeWet et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 82, 7870–7873 (1985);

Freeling, JC, et al., *Maydica* XXI, 97–112 (1976);

Graves, A. et al., *Plant Mol. Biol.*, 7, 43–50 (1986);

Green, C. et al., *Crop Sci.*, 15, 417–421 (1975);

Green, C. et al., *Maize for Biological Research*, *Plant Mol. Biol. Assoc.*, 367–372 (1982);

Gritz, L. et al., *Gene*, 25, 179–188 (1983);

Guilley, H. et al., *Cell*, 30, 763–773 (1982);

Hallauer, AR, et al., *Corn and Corn Improvement*, 3rd ed. *Agronomy Society of America*, 469–564 (1988);

Jefferson, R. et al., *EMBO J.*, 6, 3901–3907 (1987);

Kamo, K. et al., *Bot. Gaz.*, 146, 327–334 (1985);

Klein, T. et al., *Plant Physiol.*, 91, 440–444 (1989);

Klein, T. et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 85, 4305–9 (1988a);

Klein, T. et al., *Bio/Technology*, 6, 559–563 (1988b);

Lu, C. et al., *Theor. Appl. Genet.*, 62, 109–112 (1982);

McCabe, D. et al., *Bio/Technology*, 6, 923–926 (1988);

Murashige, T. et al., *Physiol. Plant*, 15, 473–497 (1962);

Neuffer, M., *Maize for Biological Research*, *Plant Mol. Biol. Assoc.*, 19–30 (1982);

Phillips, R. et al., *Corn and Corn Improvement*, 3rd ed., *Agronomy Society of America*, 345–387 (1988);

Potrykus, I., *Trends in Biotechnology*, 7, 269–273 (1989);

Rhodes, CA. et al., *Science*, 240, 204–7 (1988);

Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989);

Sanford J. et al., *Part. Sci. and Techn.*, 5, 27–37 (1987);

Weising, K. et al., *Ann. Rev. of Genetics*, 22, 421–478 (1988);

Yanisch-Perron, L. et al., *Gene*, 33, 109–119 (1985).

A jelen találmány tárgyát rekombináns DNS-t, előnyösen kromoszómálisan integrálódott rekombináns DNS-t tartalmazó termékeny transzgenikus *Zea mays*-növények képezik, amelyekben a bevitt rekombináns DNS tovább öröklődik.

A találmány tárgyát képezik továbbá mindazon termékek, amelyek transzgenikus *Zea mays*-növényekből, növényi sejtekből, növényi részekből, illetve magvakból származnak.

A találmány tárgyát képezik továbbá olyan transzgenikus *Zea mays*-magvak, amelyek stabilan integrálódott rekombináns DNS-t tartalmaznak, és ezeknek azok az utódai, amelyek örökölték a rekombináns DNS-t. A találmány tárgya továbbá a transzgenikus növények nemesítése, valamint a rekombináns DNS ezt követő beépítése bármely *Zea mays*-növénybe vagy -vonalba.

A találmány tárgya továbbá eljárás rekombináns DNS-t tartalmazó termékeny transzgenikus *Zea mays*-növények előállítására. Az eljárás mikrorészecske-bombázáson, szelekción, a növények regenerálásán, valamint konvencionális visszakeresztelési technikákon alapul.

A találmány tárgya továbbá eljárás *Zea mays*-tól eltérő, termékeny transzgenikus pázsitfűszerű transzformált növények előállítására, amelyeket a tradicionális módszerekkel, mint például elektroporációval, *Agrobacterium*-mal, injektálással és a korábbi ballisztikus technikával nem lehetett megbízhatóan transzformálni.

A találmány tárgyat képezik továbbá transzformált embriogénikus szövetből, az ezekből nyert transzgenikus magvakból, valamint az R1 és egyéb generációkból nyert regenerált termékeny növények.

A jelen találmány egy előnyös megvalósítási módját képezi egy termékeny, transzgenikus kukoricánövény, amelyet stabilan transzformáltak egy rekombináns, kimérágénnel, és ez a gén mag-tartalékfehérjeként stabilan expresszál egy fehérjét, például a 10 kD méretű zein fehérjét, oly módon hogy legalább egy aminosavszintje magasabb, mint ami a szülői, nem-transzformált sejtvonalon található. Az említett gén többszörös kópiájának expressziója, illetve a túlexpressziója lényegesen megváltoztatja bizonyos aminosavak szintjét a magban, például a lizinét, metionint, treonint és a hasonlókat. A továbbiakban a „lényegesen megnövekedett” szakkifejezés azt jelenti, hogy egy adott aminosav szintje legalább 10–20%-kal magasabb mint abban a kiindulási növényben vagy növényi részben, amelyet nem transzformáltunk az említett mag-tartalékfehérje génjével. Az előnyös megvalósítási módok szerint a találmány szerinti eljárással termékeny, transzgenikus növényeket állítunk elő morzsálékos embriogén kalluszcsoomóinak rekombináns DNS-sel borított mikrorészecske-bombázásával, majd a transzformált kalluszvonalak szabályozott tápközegben való növesztésével.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a mellékelt ábrákat.

Az 1A. ábrán Az I. példában használt pHYGI1 plazmid vektor térképét láthatjuk. Az 1B. ábrán láthatjuk a linearizált pHYGI1 plazmid megfelelő részét, amely a HPT kódoló szekvenciát és a kapcsolódó szabályozóelemeket tartalmazza. A bázispárok számozása a jelzett restrikciós enzimek felismerési helyének 5' nukleotidjánál indul, a CaMV 35S promotor 5' végénél levő EcoRI hellyel kezdődve.

A 2A. ábrán az I. példában használt pBII221 plazmid vektor térképét láthatjuk. A 2B. ábrán láthatjuk a linearizált pBII221 plazmidot, a HindIII hasítási helytől az EcoRI hasítási helyig.

A 3. ábrán a PH1 kalluszvonalból és egy transzformálatlan kontroll-kalluszvonalból izolált DNS Southern-blotja, valamint a vizsgálatban használt pHYGI1 próbák sematikus ábrázolása látható.

A 4. ábrán a PH1 kalluszvonalból és egy transzformálatlan kontroll-kalluszvonalból regenerált R0 növények leveleiből izolált levél-DNS Southern-blotja, valamint a vizsgálatban használt pHYGI1 próbák sematikus ábrázolása látható.

Az 5. ábrán a PH1 R0 növények és a transzformálatlan R0 növény R1 utódainak leveleiből izolált Southern-blot, valamint a vizsgálatban használt pHYGI1 próbák sematikus ábrázolása látható.

A 6. ábrán a PH2 kalluszvonalból és egy transzformálatlan kontroll-kalluszvonalból izolált DNS Southern-blotja, valamint a vizsgálatban használt pHYGI1 próbák sematikus ábrázolása látható.

A 7A. ábrán a II. példában használt pZ27Z10 plazmid vektor térképe látható. A 7B. ábrán a linearizált pZ27Z10 plazmid látható, amely a z10 kódoló szekvenciát, valamint a kapcsolódó szabályozóelemeket tartalmazza.

A 8. ábrán a PCR indító molekuláknak a kiméra z27-z10 génben való lokalizációja látható, sematikus ábrázolva.

A jelen találmány tárgya a *Zea mays*-fajba tartozó termékeny transzgenikus növények és magvak előállítása, illetve tárgyat képezik az ilyen transzgenikus növényekből előállított növények, növényi szövetek és magvak, valamint az utódok, és az ezekből származó termékek, előnyösen azok a transzgenikus *Zea mays*-növények, amelyek javított élelmi- vagy tápértékkel rendelkeznek. Az alábbiakban előállított transzgenikus növények közé tartoznak ennek a fajnak az összes növényei, beleértve a takarmánykukoricát „field corn”, a pattogatni való kukoricát „pop corn”, a csemegekukoricát „sweet corn”, a kemény magú kukoricát „flint corn” és a lófogú kukoricát „dent corn”.

A „transzgenikus” szakkifejezés jelentése a továbbiakban bármely olyan sejt, sejtvonala, kallusz, szövet, növényi rész vagy növény, amelynek a genotípusát egy rekombináns DNS jelenlétén keresztül megváltoztatták, amely DNS-t a génsebészeten „heterológ DNS”-ként, „exogén DNS”-ként vagy „idegen DNS”-ként említik, és amely DNS-t a növény genetikai anyagába a génsebészeti módszereinek alkalmazásával juttatták be, illetve eredetileg egy ilyen módszer alkalmazásával juttatták be egy szülői növény genetikai anyagába, és azt követően a későbbi generációkba szexuális keresztezéssel vagy aszexuális szaporítással vitték át. A továbbiakban a „genotípus” szakkifejezés jelentése a sejtben található összes genetikai anyag, akár kromoszomális vagy extrakromoszomális eredetű. Ezek szerint a „transzgenikus” szakkifejezésnek az alábbiakban való használata nem fedi a *Zea mays* genotípusának szokványos nemesítési módszerekkel való megváltoztatását, illetve a természetben előforduló eseményeket, például a random keresztbetermékenyítést, vírusfertőzést vagy spontán mutációt.

Az „örökletes” szakkifejezés alatt azt értjük, hogy a DNS a növénynek legalább egy teljes szexuális ciklusán át átadódik, azaz az egyik növényről a másikra a gamétákon keresztül adódik át.

A jelen találmány szerinti transzgenikus növényeket előállíthatjuk

(i) egy regenerálható sejttenyészet, előnyösen egy laza embriogén kallusz létrehozásával;

(ii) az említett sejttenyészetet mikrorészecske-bombázási technika alkalmazásával transzformáljuk;

(iii) a transzformált sejteket azonosítjuk vagy szelektáljuk, és

(iv) a transzformált sejtekből termékeny transzgenikus növényeket regenerálunk.

Néhány, a jelen találmány szerinti növény előállítható a transzgenikus magvakból, amelyeket a termékeny transzgenikus növényekből állítottunk elő szokványos keresztezési technikák alkalmazásával transzgenikus elit vonalak és variánsok előállítása céljából, illetve kommersz hibrid magvakból, amelyek a rekombináns DNS-t tartalmazzák.

I. Növényi vonalak és szövettenyészetek

A termékeny transzgenikus kukoricánövények előállítására különösen alkalmas sejtek azok a kalluszsejtek, amelyek regenerálhatók mind a szelekciós körülmények között való növesztés előtt, mind az után, amint azt az alábbiakban részletesen ismertetjük. Ezek a sejtek általában a merisztémás szövetből származnak, amelyek véglegesen még nem differenciálódott sejteket tartalmaznak. A pázsitfű jellegű magvakban általában, különösen a kukoricában ezek azok a szövetek, amelyek a fiatal levelek bazális régióiban, az éretlen címerekben, az éretlen embriókban és a sziklevehüvely csomóiban találhatók. Előnyösen az éretlen embriókat alkalmazzák. Az ezekből a szövetekből és növénytípusokból való kalluszkészítés és fenntartás módszerei jól ismertek a szakterületen jártas szakember számára, és hozzáférhetők a szakirodalomban [lásd Phillips et al., (1988)], amely leírásra a továbbiakban referenciaként hivatkozunk.

A specifikus kalluszoknak képeseknek kell lenniük arra, hogy termékeny növényekké regenerálódjanak. Egy specifikus kallusznak a regenerációs kapacitása fontos az alábbiakban alkalmazott bombázási/szelekciós eljárás szempontjából, mivel a szelekció során és után a regenerációs kapacitás jelentősen lecsökkenhet. Ezért fontos olyan tenyészetekkel indulni, amelyek a lehető legnagyobb regenerációs kapacitással rendelkeznek. A legalább 3 hónapos és maximum 36 hónapos kalluszt találtuk elég magas regenerációs szinttel rendelkezőnek, és ezért ezt részesítjük előnyben. Egy adott tenyészet regenerációs kapacitása könnyen meghatározható, ha mintákat viszünk át belőle a regeneráló táptalajra, és figyeljük a hajtások, gyökerek és palánták kialakulását. A Petri-csészénként, vagy egy gramm friss szövetből keletkező palánták száma használható a regenerációs kapacitás durva becslésére. Általában az a tenyészet az előnyös, amely legalább egy növényt eredményez egy gramm kalluszsövetből.

Miközben kallusztenyészet indítható számos különböző növényi szövetből, az alábbiakban használatos tenyészetek előnyösen éretlen kukoricaembriókból származnak, amelyeket egy kalásznak a magjáról távolítottunk el, amikor az embriók körülbelül 1–3 mm hosszúak. Ez a hosszúság általában a beporzás után 9–14 nappal jelentkezik. Aszeptikus körülmények között az embriókat szokványos szilárd táptalajra tesszük, az embrió tengelyével lefelé, (pajzsocska fölfelé). A kalluszsövet néhány nap vagy néhány hét alatt fejlődik ki a pajzsocskából. Miután a kallusz eléggé megnőtt, a sejteknek a pajzsocskából való szaporodása a morzsolódó, laza konzisztenciáig valamint a jól definiált embriók megjelenéséig értékelhető. A „jól definiált konzisztencia” azt jelenti, hogy a szövet könnyen szétoszlatható anélkül, hogy

ezzel megsértenénk a sejteket. Az ezzel a morfológiával rendelkező szövetet azután friss táptalajra visszük át, és rutinszerűen új tenyészeteket indítunk róla minden második héten. Szitálást alkalmazhatunk arra, hogy csökkentjük az összecsapzódást, és/vagy megnöveljük a sejtek összefelületét az átoltási periódusban.

A kalluszt indító táptalaj előnyösen szilárd táptalaj. Az előnyös megvalósítási mód szerint az indító/fenntartó táptalaj tipikusan a Chu és munkatársai szerinti N6 sókon alapul (1975), amint azt Armstrong és munkatársai közlik (1985), illetve a Murashige és munkatársai szerinti MS sókon. Az alaptáptalajt szacharózzal és 2,4-diklórfenoxi-ecetsavval (2,4-D) egészítjük ki. A kiegészítőkről, úgymint az L-prolinról és a kazeinhidrolizátumról, azt találtuk, hogy megjavítják a kallusztenyészetek iniciációs frekvenciáját, morfológiáját és növekedését. A tenyészeteket általában sötétben tartjuk, bár kis mennyiségű fény is alkalmazható. A fenntartáshoz és szaporításhoz szükséges 2,4-D szintetikus hormon mennyisége általában körülbelül 0,3 és 3,0 mg/l között van.

Jóllehet az alábbiakban laza embriogén kallusszal sikeres transzformációt és regenerációt értünk el, ez nem jelenti, hogy más transzformálható regenerálható sejtek, szövetek vagy szervek nem használhatók a jelen találmány szerinti termékeny transzgenikus növények előállítására. Az egyedüli aktuális megkötés a transzformált sejteket illetően az, hogy a transzformálás után képeseknek kell lenniük egy növényé váló regenerálódásra, amely tartalmazza a rekombináns DNS-t, az aktuálisan használt adott szelekció vagy szűrővizsgálat után.

Használhatók például folyadék szuszpenziós tenyészetben növekvő sejtek. Ezeknek a tenyészeteknek a létrehozásához a II-es típusú kalluszt 4–6 hónap elteltével folyadék táptalajra visszük át. A regenerálható szuszpenziós folyadéktenyészetek előállításához szükséges módszereket és referenciákat a következő közleményekben találjuk meg [C. E. Green et al., Maize for Biological Research, Plant Molecular Biol. Assoc., 367–372 (1982); R. Phillips et al., Corn and Corn Improvement, Agronomy Soc. Amer., (3rd ed) 345–387 (1988); I. Vasil, Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, I, Laboratory Procedures and Their Applications, Academic Press, 152–158 (1984)]. Tipikus esetben a szuszpenziós tenyészetekhez használt folyadék táptalajok összetétele ugyanaz, mint a szilárd kalluszindukciós táptalajoké. ABA-t (abszcizinsavat) adhatunk 10^{-7} mol/liter mennyiségben a folyadék táptalajhoz, hogy megnöveljük a regenerációs kapacitást és javítsuk a tenyészet életképességét. Az előnyös, ha a kalluszt nem szűrjük meg mielőtt a folyadék táptalajba juttatjuk.

A folyadék táptalajokban levő tenyészeteket tovább oltjuk, amint az az aktív növekedés és a regeneratív tulajdonságaik fenntartásához szükséges. Az előnyös megvalósítási módok szerint a tenyészeteket hetente egyszer átoltjuk, friss táptalajjal 1 : 8–9 arányban hígítva.

II. A transzformáláshoz használt DNS

A továbbiakban a „rekombináns DNS” szakkifejezés arra a DNS-re vonatkozik, amelyet bármely forrás-

ból származik vagy izoláltunk, amely ezt követően kémiai módszerekkel megváltoztatható, és amelyet később *Zea mays*-növényekbe juttatunk. Egy példa a rekombináns DNS-re, amely „származik” egy forrásból egy olyan DNS-szekvencia, amely egy adott szervezeten belül hasznos fragmentként van azonosítva, és amelyet azután kémiai úton szintetizálunk lényegében tiszta formában. Egy példa a rekombináns DNS-re, amelyet „izoláltunk” egy forrásból egy olyan hasznos DNS-szekvencia, amelyet az említett forrásból kémiai módszerekkel, például restrikciós enzimekkel kivágunk, úgyhogy tovább manipulálható, például amplifikálható a találmány szerinti felhasználás céljából, a génszabvány módszereinek alkalmazásával.

Tehát a „rekombináns DNS” lehet teljesen szintetikus DNS, félszintetikus DNS, biológiai forrásból izolált DNS, valamint bevitt RNS-ből származó DNS. A rekombináns DNS általában nem tartozik eredetileg a *Zea mays* genotípusban, ami a DNS befogadója, de a találmány oltalmi körébe tartozik, hogy egy gént egy adott *Zea mays* genotípusból izoláljunk, majd ezt követően ennek a génnek több másolatát juttassuk be ugyanabba a genotípusba, azaz megnöveljük egy adott géntermék termelődését, például egy tartalékfehérjét.

A rekombináns DNS nem korlátozódik növényi gének DNS-ére hanem lehetnek nem növényi gének, például a baktériumokból, élesztőkből, állatokból vagy vírusokból származó, módosított gének, gendarabok, kimerágégek, beleértve azokat a géneket, amelyek ugyanabba, illetve eltérő *Zea mays* genotípusba tartoznak.

Az alábbiakban transzformációra használt rekombináns DNS lehet cirkuláris vagy lineáris, kétszálú vagy egyszálú. A DNS általában kiméra-DNS formájában fordul elő, ilyen például a plazmid-DNS, amely tartalmazhat kódoló régiókat, amelyeket a kapott kukoricánövényben levő rekombináns DNS expresszióját elősegítő szabályozószekvenciák határolnak. Például a rekombináns DNS maga is tartalmazhat egy promotert, amely aktív a *Zea mays*-ben, vagy használhat egy olyan promotert, amely már jelen van a *Zea mays* genotípusában, azaz a transzformáció célpontjában.

A szakterületen jártas szakember számára jól ismert bizonyos növényeket transzformálni képes rekombináns DNS-ek összetétele és előállítási módja, és ugyanilyen összetételek valamint készítési módok használhatók az alábbiakban használható DNS-ek előállítására. A DNS specifikus összetétele nem központi jelentőségű a jelen találmány szempontjából, és a találmány nem függ a használt specifikus rekombináns DNS összetételétől. K. Weising és munkatársai [Ann. Rev. Genetics, 22, 421 (1988)] leírják alkalmas DNS-komponenseket, szelekciós genetikai bélyegeket, riportergéneket és hasonlókat, valamint megfelelő referenciákkal szolgálnak az összetételükükre. J. Sambrook és munkatársai [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)] alkalmas módszereket közölnek a készítéshez. A rekombináns DNS általában kicsi, azaz körülbelül 30 kb-nál kisebb, hogy minimalizáljuk a fizikai, kémiai vagy enzimatisz roncsolódás

lehetőségét, amelyről ismert, hogy nő, amint a DNS mérete nő.

Az alábbiakban használható rekombináns DNS-ek közé tartozik minden olyan DNS, amely a keletkező transzgenikus kukoricánövénynek valamilyen előnyös tulajdonságot ad át, illetve elősegíti annak megnyilvánulását. A DNS kódolhat fehérjét vagy antiszensz RNS-transzkriptumokat, abból a célból, hogy elősegítse a javított élelmiérték, magasabb termés, kártevő rezisztencia, betegségekkel szembeni rezisztencia, herbicid rezisztencia és hasonlóké létrejöttét. A DNS kódolhat például egy DHP szintetáz, azaz a *dapA* gént, aminek a következménye lehet a megnövekedett lizintermelés, *Bacillus thuringiensis* (Bt) delta-endotoxint vagy proteázinhibitort a rovarok elleni rezisztencia biztosítására, bakteriális EPSP szintetáz a glifozát herbicid elleni rezisztencia biztosítására, valamint kitináz vagy glükán-endo-1,3- β -glükózidáz a fungicid tulajdonságok biztosítására.

Az élelmi- vagy tápérték biztosítása szempontjából fontosak azok a gének, amelyek magas szinten tartalmaznak esszenciális aminosavakat. Például csirkék tápérték szempontjából megfelelő, optimális növekedést biztosító táplálásához a kukorica-szójaliszt csirketápot általában kiegészítik szintetikus metioninnal vagy metioninanalóggal. Olyan kukoricavonalak kifejlesztése, amelyek több metionint tartalmaznak, csökkenthetik a metionin kiegészítő iránti igényt. Az ilyen magas metionintartalmú kukorica-sejtvonalak kifejlesztését oly módon végezhetjük, hogy a kukoricagenomba erősen expresszáldó gént vagy géneket juttatunk be, amelyek magas metionintartalmú fehérjét kódolnak.

A magas metionintartalmú fehérjét kódoló gének közé tartoznak például:

1. a kukorica 15 kD-os zein fehérjét kódoló gén (11% metionin), [Pedersen et al., Journal of Biological Chemistry, U261U, 6279 (1986)];

2. a Brazil dió tartalékfehérjét kódoló gén (18% metionin), [Altenbach et al., Plant Mol. Biol., 8, 239 (1987)]; és

3. a kukorica 10 kD-os zein fehérjét kódoló gén (22,5% metionin) [Kiriha et al., Gene, 71, 359 (1988)].

Az előnyben részesített gén a 10 kD-os zein fehérjét kódoló gén, mivel ez egy endogén kukoricagén, amelynek a fehérjeterméke normális körülmények között akkumulálódik a magban, és kétszer annyi metionint tartalmaz mint a 15 kD-os zein fehérje. Ahhoz, hogy erősen expresszáldjon a magban, a gén kódolószekvenciáját adott esetben egy erősen expresszáldó, mag-specifikus génszabályozó szekvenciájával fuzionáltatjuk. Egy másik módszer szerint, ha az érintetlen endogén 10 kD-os zein gént több példányban juttatjuk be a kukorica genomjába, akkor ezzel is megnövelhetjük a kukoricamagok metionintartalmát.

A lizin, ami egy esszenciális része az emberek és egygyomrú állatok étrendjének, a fő terményekben, főleg a gabonákban előforduló három leginkább korlátozott mennyiségű aminosavhoz tartozik. Ennek következtében a gabonaalapú étrendeket ki kell egészíteni

szintetikus lizinnel, illetve lizintartalmú olajosmag-fehérjéjellel. Továbbá, mivel az olajos magvak lisztjei magukban is általában nem tartalmaznak elegendő lizint, ezért ha a tápkeveréket lizin miatt egészítjük ki velük, ez gyakran ahhoz vezet, hogy olyan tápot kapunk, amelynek túl magas az egyéb kevésbé fontos tápanyagtartalma. Tehát, akár a gabonamagvak, akár az olajos növények magjának, akár mindkettőnek a lizintartalmát növelve lényeges tápérték-növekedést kaphatunk, valamint jelentős költségmegtakarítást érhetünk el a végfelhasználónál, azaz a sertés- és csirketenyésztőnél.

Az egyik megközelítés a gabonák lizintartalmának növelésére, ha dereguláljuk a bioszintézisutat, és lehetővé tesszük, hogy szabad lizin halmozódjon fel. Az *Escherichia coli* dapA génje dihidropikolinsav-szintetáz (DHPS) kódol, ami kulcs-szabályozóenzim, amelynek aktivitását a növényekben erősen gátolja a lizin. A baktériumeredetű enzim körülbelül 200-szor kevésbé érzékeny a lizines gátlásra. A dapA gén bejuttatása és expressziója a növényi sejtekben lehetővé teszi a szabad lizin szintézisét azután is, hogy a természetes növényi DHPS már teljesen gátlódik.

Különös jelentőséggel bír a kukorica terméshozamának fenntartásában, és lényegesen hozzájárul a kukorica termesztési költségeinek csökkentéséhez, ha a kukoricát megvédjük a kártevő rovarok támadásától. Az Amerikai Egyesült Államokban a kukorica fő kártevői a különböző Lepidoptera fajok, például a Coleoptera fajok, úgymint a *Diabrotica* alfaj. A kukorica megvédése a rovarok elleni támadástól költséges a termesztő számára, és mérgező kémiai inszekticidek alkalmazását követeli meg meghatározott időközökben. Mivel a növénynevelés és szelekció tradicionális módszerei nem tették lehetővé az olyan új kukoricavonalak kifejlesztését, amelyek lényegében rezisztensek a fő rovar-kártevőkkel szemben, ezért a jelen találmány szerinti rovarrezisztencia-gének vagy -szekvenciák bejuttatása és továbbörökítése a kukoricában csökkentené a termesztő költségeit, csökkentené a mérgező kémiai inszekticidek felhasználását, és sokkal hatékonyabban nyomná el a rovar-kártevők működését.

A jelen találmány lényeges elemei a rovarrezisztencia-gének bejuttatása a kukoricasejtekbe, a gén mitotikus replikációja úgy, hogy a gén beépül a teljes kukoricanövénybe, és végül öröklődik a növény utódaiba, a mitotikus és meiotikus osztódás folyamatában.

A *Bacillus thuringiensis* (vagy „Bt”) baktériumok közé közel 50 alfaj tartozik, amelyek olyan endotoxin polipeptideket termelnek, amelyek abban az esetben, ha számos különböző rovarfaj megemészti, akkor toxikus a rovarra nézve. Az endotoxin fehérjék (Bt-fehérjék) biológiáját és molekuláris biológiáját nemrégiben foglalták össze Whitely és munkatársai [Annual Review of Microbiology, 40, 549 (1986)], valamint H. Hofte és munkatársai [Microbiological Reviews, 53, 242 (1989)]. A különböző Bt-fehérjéket kódoló géneket klónozták és szekvenciájukat meghatározták. A kutatás igazolta, hogy a Bt-fehérje egyik szegmentuma lényeges a különböző Lepidoptera fajokkal szembeni to-

xicitás szempontjából, és ez a szegment a Bt-polipeptidmolekulának az első 50%-ban található. Ennek következtében egy csonkított Bt-gén által kódolt csonkított Bt-polipeptid számos esetben megtartja a toxicitását számos Lepidoptera rovar-kártevővel szemben. A HD73 és HD1 Bt-polipeptidekről kimutatták, hogy toxikusak az Amerikai Egyesült Államokban honos kukoricanövények fontos Lepidoptera rovar-kártevőinek lárváival szemben, azaz az európai magfűró, a bagoly-pille és a gyapotbagoly-pille lárváival szemben. A HD1 és HD73 Bt-polipeptideket kódoló géneket klónozták és szekvenciájukat meghatározták [M. Geiser et al., Gene, 48, 109 (1986); M. J. Adang et al., Gene, 36, 289 (1985)], és a törzsgyűjteményekben található HD1 és HD73 törzsekből klónozhatók (például a Bacillus Genetic Stock Center, Columbus, Ohio, vagy USDA Bt Stock Collection, Peoria, Illinois), standard eljárások alkalmazásával.

Az új, eddig még nem jellemzett Bt-toxinokat kódoló DNS klónozható a gazda *Bacillus* mikroorganizmusból, a korábban a Bt-gén klónozására alkalmazott eljárások alkalmazásával. Ezek közé tartozik egy *Bacillus* mikroorganizmusból izolált DNS-könyvtár készítése egy megfelelő plazmid- vagy fágvektorban, amely a megfelelő gazdaszervezetben szaporodik, majd a Bt-fehérje elleni antitestek alkalmazása, illetve a homológ Bt-génszekvenciából izolált DNS-szekvencia alkalmazása a klónozott Bt-szekvenciát tartalmazó transzformánsok azonosítására. A Bt kódoló szekvencia közelítő helyét először a klónozott DNS deléciós elemzésével lehet meghatározni. A Bt kódoló szekvencia pontos helyét számos különböző standard módszerrel határozhatjuk meg, beleértve a klónozott DNS-szegment szekvenciájának meghatározását, az esetleg a Bt-t kódoló nagy nyitott leolvasási keret jelenlétének meghatározását ebben a szekvenciában, és a DNS-nek a Bt-t kódoló természetének az igazolása a szekvencia alapján meghatározott aminosavszekvencia és a Bt-fehérje részleges aminosavszekvenciájának összehasonlításával.

A jelen találmány szerinti eljárásban jól használható kiméra Bt-gén tartalmaz egy 5' DNS-szekvenciát, ami egy kukoricanövényben lehetővé teszi az utána található Bt-szekvencia transzkripciójának iniciálását és translációját („promoter”). A kiméra Bt-gén tartalmaz még egy 3' DNS-szekvenciát, amely egy kukoricában expresszállódó gén 3' nemkódoló régiójából származó szekvenciát tartalmazza. A legfontosabb, hogy a kiméra Bt-gén egy olyan DNS-szekvenciát tartalmaz, amely a *Bacillus thuringiensis* által termelt toxikus Bt-polipeptidet, vagy annak toxikus részét, vagy azzal jelentős aminosavszerkezeti hasonlósággal rendelkező polipeptidet kódol. A Bt-t kódoló szekvencia lehet:

(i) a kukorica rovar-kártevői ellen aktív Bt-endotoxinokkal lényeges homológiával rendelkező, inszekticid aktivitással rendelkező fehérjéket kódoló DNS-szekvenciák, például a HD73 vagy HD1 Bt szekvenciák;

(ii) a Bt endotoxin polipeptid inszekticid aktivitással rendelkező polipeptid szegmentjeit, például a karboxi- vagy N-terminális végén csonkított HD73 vagy HD1 polipeptidet kódoló szekvencia;

(iii) egy csonkított Bt-szekvencia, leolvasási keretben fuzionáltatva olyan szekvenciákkal, amelyek további előnyöket jelentenek a növény számára, például:

- (a) szelektálható gének, például antibiotikumok vagy herbicidek elleni rezisztenciát biztosító gének;
- (b) riportergének, amelyeknek a terméke könnyen kimutatható vagy mérhető, például a luciferáz vagy B-glükuronidáz;
- (c) olyan DNS-szekvenciák, amelyek a Bt-fehérje lebomlásával szembeni stabilizációt biztosító, vagy Bt-fehérje rovarellenes hatását fokozó fehérjét kódolnak, például proteázinhibitorokat; és
- (d) olyan szekvenciák, amelyek segítik, hogy a Bt-fehérje a kukoricasejtek megfelelő részébe jusson, ilyen például a szignál szekvencia.

A Bt-fehérje kukoricában való optimális szintézisének eléréséhez az is alkalmas módszer lehet, hogy a Bt-gén szekvenciáját úgy változtatjuk meg, hogy jobban hasonlítson azokra a génekre, amelyek hatékonyan expresszálódnak kukoricában. Mivel számos Bt-génben, beleértve a HD73 és HD1 géneket is, a kodonhasznosítás sokkal inkább a *Bacillus* fajok kodonhasznosítására hasonlít mint a kukoricában expresszálódó génekére, a Bt-gének kukoricában való expressziója javítható, ha ezeket a ritkán használt *Bacillus* kodonokat olyanokkal helyettesítjük, amelyeket a kukorica sokkal gyakrabban használ [Murray et al., *Nucleic Acids Research*, 17, 477 (1989)]. A kodonok ilyen helyettesítése megköveteli, hogy a nukleotidbázisokat úgy cseréljük ki, hogy közben a keletkező Bt-poli-peptid aminosavszekvenciája ne változzon. A Bt-poli-peptid szekvenciája azonos lehet a bakteriális génével, vagy annak szegmentjeivel. A teljes Bt kódoló szekvencia, vagy annak szekciói, amelyek nagyobb részben tartalmazzák a kukorica által előnyben részesített kodonokat mint az eredeti baktériumgén, standard kémiai módszerekkel szintetizálható, majd standard módszerekkel bejuttatható a Bt-génekbe, illetve Bt-génekké állíthatók össze, ilyen például a helyspecifikus mutagenézis, a DNS-polimerizáció és ligálás valamint a hasonló eljárások.

A rekombináns DNS-szekvenciák mellett, amelyek transzkripció egységként vagy azok részeként szolgál-

nak, a hasznos rekombináns DNS lehet nem transzlálódó is, szabályozó vagy strukturális feladatokat látva el. A DNS emellett bejuttatható még azzal a céllal is, hogy genetikai eszközként működjön, hozzon létre mutánsokat és/vagy segítse a kukorica DNS-szegmentjeinek azonosítását, genetikai megjelölését vagy izolálását. A további példák Weising idézett publikációjában találhatók [Ann. Rev. Genetics, 22, 421 (1988)].

A növényi sejtekbe bejuttatandó rekombináns DNS általában tartalmaz még egy szelektálható genetikai bélyeget vagy riportergént, vagy mindkettőt, hogy lehetővé tegye a transzformált sejtek azonosítását és szelekcióját. Egy másik kiviteli mód szerint a szelektálható genetikai bélyeg lehet egy másik DNS-darabon, és kotranszformációs eljárásban alkalmazzuk. Mind a szelektálható genetikai bélyegeket, mind a riportergéneket megfelelő szabályozószekvenciák határolhatják, amelyek lehetővé teszik, hogy a szekvencia expresszálódjon kukoricában. A használható szelekciós markerek jól ismertek a szakterületen, ilyenek például az antibiotikum- és herbicid rezisztenciagének.

A szelekciós markerek specifikus példái Weising és munkatársai idézett művében találhatók [Ann. Rev. Genetics, 22, 421 (1988)]. Egy előnyös szelekciós genetikai bélyeg a higromicin-foszfotranszferáz enzim (HPT) kódoló szekvencia, amely származhat *Escherichia coli*-ből, és amely a higromicin B antibiotikummal szemben biztosít rezisztenciát. Más szelekciós genetikai bélyeg lehet például a Tn5 transzpozon aminoglikozid-foszfotranszferáz génje (AphII), ami a kanamicinnel, neomicinnel és G418 antibiotikumokkal szembeni rezisztenciát kódol, valamint azok a gének, amelyek a glifozát, 2,2-diklór-propionsav, metotrexát, imidazolinon herbicidek, szulfonil-karbamid herbicidek, bromoxinil, foszfínotricin és más herbicid vegyületekkel szembeni rezisztenciát vagy tűrőképességet kódolnak. Azok a szelekciós genetikai bélyegek, amelyek ezek ellen a fitotoxikus vegyületek ellen rezisztenciát vagy tűrőképességet biztosítanak a keletkező transzformált növényben, szintén kereskedelmi értékkel rendelkeznek. A fitotoxikus vegyületekkel szemben rezisztenciát biztosító enzimeket kódoló szelektálható genetikai bélyegek génjeit az alábbi, 1. táblázatban soroljuk fel.

1. táblázat
Szelektálható genetikai bélyegek

Rezisztenciagén vagy enzim	Rezisztenciát biztosít	Referencia
Neomicin-foszfotranszferáz (neo)	G-418, neomicin kanamicin	P. J. Southern et al., <i>J. Mol. Appl. Gen.</i> , 1, 327 (1982)
Higromicin-foszfotranszferáz (hpt vagy hyg)	Higromicin B	Y. Shimizu et al., <i>Mol. Cell. Biol.</i> , 6, 1074, (1986)
Dihidrofolát-reduktáz (dhfr)	Metotrexát	W. W. Kwok et al., <i>PNAS USA</i> , 4552 (1986)
Foszfinotricin-acetil-transzferáz (bar)	Foszfinotricin	M. DeBlock et al., <i>EMBO J.</i> , 6, 2513 (1987)
2,2-Diklórpropionsav-dehalogénáz	2,2-diklórpropionsav (Dalapon)	V. Buchanan-Wollaston et al., <i>J. Cell. Biochem., Supp. 13D</i> , 330 (1989)

1. táblázat (folytatás)

Rezisztenciagén vagy enzim	Rezisztenciát biztosít	Referencia
Acetohidroxisav-szintetáz	Szulfonilkarbamid, imidazolinon és triazopirimidin herbicidek	P. C. Andersen et al., (US Patent No. 4761373); G. W. Haughn et al., Mol. Gen. Genet 211, 266 (1988)
5-Enolpiruvil-sikimát-foszfát-szintetáz (aroA)	Glifozát	L. Comai et al., Nature. 317, 741 (1985)
Haloaril-nitriláz	Bromoxinil	D. M. Stalker et al., publikált PCT bej. WO 87/04181
Acetil-koenzim A karboxiláz	Szetoxidim haloxifop	W. B. Parker et al., Plant Physiol., 92, 1220 (1990)
Dihidro-pteroát-szintetáz (sul I)	Szulfonamid herbicidek	F. Guerineau et al., Plant Molec. Biol., 15, 127 (1990)
32 kD fotorendszer II polipeptid (psbA)	Triazin herbicidek	J. Hirschberg et al., Science. 222, 1346 (1983)
Antranilát-szintetáz	5-metil-triptofán	K. Hibberd et al. (US Patent No. 4581847)
Dihidropikolinsav	Aminoetil-cisztein	K. Glassman et al., W089/11789 számon publikált PCT bej.

A riportergéneket arra használják, hogy a potenciálisan transzformált sejteket azonosítsák, és hogy a szabályozószekvenciák működőképességét kiértékeljék. A könnyen vizsgálható marker fehérjéket kódoló riportergének jól ismertek a szakirodalomban. A riportergén általában egy olyan gén, amely nincs jelen, vagy nem expresszálódik a befogadó szervezetben vagy szövetben, és olyan fehérjét kódol, amelynek expressziója valamilyen jól detektálható tulajdonságban jelentkezik, azaz fenotipikus változásban vagy enzimatiszus aktivitásban. Az ilyen géneket Weising és munkatársai sorolják fel idézett publikációjukban [Ann. Rev. Genetics, 22, 421 (1988)]. Az előnyös gének közé tartozik például az *Escherichia coli* Tn9 transzpozonjából származó klór-*amfenikol* acetil-transzferáz (cat)-gén, a béta-glükuronidáz gén (gus) az *Escherichia coli* uidA lokuszából, és a szentjánosbogárból (*Photinus pyralis*) származó *luciferázzsén*. A riportergén expresszióját a DNS-nek a befogadó sejtekbe való bejuttatása után bizonyos idő elteltével vizsgáljuk. Az ilyen vizsgálatokra előnyös példa lehet az *Escherichia coli* béta-glükuronidáz (GUS) génje (R. Jefferson et al., EMBO J., 16, 3901 (1987)). Az ezzel a génnel transzformált és ezt a gént expresszáló sejtek kékre festődnek, ha megfelelő szubsztráttal, az 5-bróm-4-klór-3-indolil-béta-D-glükuroniddal (X-GLUC) hozzuk érintkezésbe a táptalajban.

Az alábbiakban használható szabályozószekvenciák közé tartozik bármely konstitutív, indukálható, szövet- vagy szervspecifikus, illetve fejlődésiállapot-specifikus promotor, ami egy adott sejtben expresszálható. Az alkalmas promotereket Weising és munkatársai sorolják fel idézett publikációjukban [Ann. Rev. Genetics, 22, 421 (1988)]. Az alábbiakban a felhasználható promotereknek egy részleges, reprezentatív listáját közöljük: az *Agrobacterium tumefaciens* T-DNS-ből szá-

mazó szabályozószekvenciák, beleértve a mannopin-szintetáz, nopalin-szintetáz és oktopin-szintetáz géneket; a kukorica alkohol-dehidrogenáz promotere; a fényvel indukálható promoterek, például számos különböző fajból származó ribulóz-biszfoszfát-karboxiláz/oxigenáz kis alegységének génje; a fő klorofill a/b kötő fehérje promoterei; a karfiol-mozaikvírus (CaMV) 35S és 19S promoterei; a kukorica fejlődés során szabályozott promoterei, például a viaszos, zein vagy bronz promoterek, ezenkívül szintetikus vagy más természetes promoterek, amelyek lehetnek indukálhatók vagy konstitutívek, beleértve azokat a promotereket, amelyek a növényben szervspecifikus vagy fejlődésiállapot-specifikus expressziót mutatnak.

Más elemek, például intronok, fokozók, poliadenilezési szekvenciák és hasonlóak is képezhetik a rekombináns DNS-részét. Ezek az elemek vagy fontosak vagy nem a DNS működése szempontjából, de a DNS jobb expresszióját szolgálhatják, azáltal, hogy befolyásolják a mRNS transzkripcióját, stabilitását, vagy hasonló funkciót látnak el. Az ilyen elemeket szükség esetén belefoglalhatjuk a DNS-be, ha a transzformáló-DNS optimális működését akarjuk elérni. Például a kukorica AdhIS első intronját elhelyezhetjük a promotor és a kódolószekvencia közé, egy adott rekombináns DNS-konstrukcióban. Erről az intronról tudott, hogy ha benne van egy DNS-konstrukcióban, akkor megnöveli a fehérje termelődését a kukoricasejtekben [J. Callis et al., Genes and Develop., 1, 1183 (1987)]. Egy szelekciós marker elem mértékű expresszióját azonban elérhetjük akkor is, hogy ha a konstrukció nem tartalmaz intront [T. Klein et al., Plant Physiol., 91, 440 (1989)]. Egy másik, alkalmas intron lehet a kukorica shrunken-1 első intronja. Ezek az egyéb elemek kompatibilisek kell hogy legyenek a DNS-konstrukciók egyéb részeivel.

III. DNS-bejuttatási módszerek

A rekombináns DNS bejuttatható a regenerálható kukoricatenyészetekbe, előnyösen a kallusztenyészetbe, részecskebombázási módszer alkalmazásával. Az alkalmas részecskebombázási módszert Sanford és munkatársai írták le (1987), amely leírásra az alábbiakban referenciaként hivatkozunk. Jóllehet a kukorica nem regenerálódó szuszpenziós tenyészetének bombázására használt berendezés alkalmazását közölték Klein és munkatársai (1988a, 1988b és 1989), még nem közöltek kísérleti leírást a kallusztenyészetek vagy regenerálható kukoricasejtek bombázására. Egy mikrobombázási eljárásban, amelyet biolisztikus (biolistic) eljárásnak is neveznek, a rekombináns DNS-nek a kalluszba való juttatását biológiailag semleges anyagból készült nagyon kis részecskékkel érjük el. Ha a semleges részecskéket DNS-sel borítjuk, és megfelelő sebességre felgyorsítjuk, akkor a részecskék közül egyik vagy másik képes belépni egyik vagy másik sejtbe, ahol a DNS leválik a részecskéről és expresszálódik. Egyik-másik befogadó sejt stabilan megtartja a bejuttatott DNS-t és expresszálja.

A részecskék, amelyeket mikrorészecskéknek hívnak, általában nagyon sűrű anyagból, például volfrámból vagy aranyból készülnek. Ezeket borítjuk a kiválasztott DNS-sel. A mikrolövedékeket ezután egy makrolövedék felszínére visszük, amelyet a mikrorészecskékkel együtt felgyorsítunk. Miután a makrolövedék és a mikrolövedékek elérték a megfelelő sebességet, egy blokkoloberendezésbe ütköznek, amely megakadályozza, hogy a makrolövedék tovább folytassa az útját, viszont a DNS-sel borított mikrorészecskéket nem gátolja ebben, és ezek beleütköznek a befogadó kalluszsejtekbe. A megfelelő berendezések különböző meghajtóerőt használnak, például löport vagy lökeshullámokat egy elektromos ívkisülésből [P. Christou et al., *Plant Physiol.*, 87, 671 (1988)]. Jelenleg azokat a berendezéseket részesítik előnyben, amelyekben a hajtóerőt löpor szolgáltatja, illet írnek le és magyaráznak el részletesen Sanford és munkatársai (1987), amely publikációra a továbbiakban referenciaként hivatkozunk.

A löporos berendezés használatának leírását Klein és munkatársai közlik (1988a,b), és ez két fő lépésből áll. Először, a volfrámrészecskéket elkeverik DNS-sel, kalcium-kloriddal és spermidinnel, megfelelő sorrendben, egy vizes oldatban. A különböző komponensek koncentrációja a leírás szerint változhat. Az előnyös eljárás pontosan azon alapul, amit Klein és munkatársai írtak le (1988b), kivéve azt, hogy az ott leírt DNS-koncentrációt meg kell duplázni. A második lépés az, hogy a DNS-sel borított mikrolövedékeket, a makrolövedéket és a befogadó sejteket megfelelő elrendezésbe hozzuk a berendezésben, és a meghajtóerőt ráadjuk a makrolövedékre. Az ebben a lépésben változtatható paraméter például a befogadó sejtek távolsága a csőtől, valamint a vákuumszint a mintakamrában. A befogadó szövetet 2–15, előnyösen 5 cm-rel a leállítólemez alá helyezük.

Az alábbiakban transzgenikus növények előállítására használható kallusztenyészetek általában a transzfer

periódusok között félidőben vannak, azaz bármely olyan „lag” fázis után, amely kapcsolódhat az új táptalajra való átvitelhez, valamint még azelőtt, hogy elérnének bármely „stacioner” fázist, ami akkor áll be, ha hosszabb időt töltenek el a tenyészetek anélkül, hogy átoltanák őket friss táptalajra. A szövetet körülbelül 30 és 80, előnyösen körülbelül 40–60 mg-os darabok formájában vannak. A csomókat egy Petri-csészére vagy egyéb felületre helyezhetjük, és lényegében mindegy, hogy hogyan rendezzük el őket, de tudni kell hogy

(i) a lemez központjában levő felület kapja a legnagyobb koncentrációban a fém DNS-részecskéket, és az ott található szövet valószínűleg károsodik a bombázás során, és

(ii) a szövetet elérő részecskék száma csökken a lövés középpontjától távolabb eső szöveteknél, tehát a lemez közepétől távol eső szövetet kisebb valószínűséggel éri el a lövedékek. Egy hálósövetet (amely előnyösen fémből készült) helyezhetünk a lemezre, hogy megakadályozzuk a szövet kiloccsanását vagy kilöködését. Egy másik módszer a szövet bombázásnak való alávetéséhez, ha a szövetet vékony rétegben eloszlatjuk egy szűrőlapon. A szövetet egyszer vagy többször bombázzhatjuk a DNS-sel borított fémrészecskékkel.

VI. Szelekciós eljárás

Miután a kalluszokat bombáztuk a rekombináns DNS-sel, és a DNS behatolt néhány sejtbe, akkor szükség lehet arra, hogy azonosítsuk és kiválasszuk azokat a sejteket, amelyek tartalmazzák a rekombináns DNS-t, ugyanakkor még képesek regenerálódni. Két általános megközelítés létezik, amelyek ennek a feladatnak az elvégzésére alkalmasak. Először, a transzformált kalluszokat, vagy a belőlük regenerált sejteket különböző standard módszerekkel átvizsgáljuk, hogy megtalálható-e bennük rekombináns DNS, amely módszer lehet a riportergének expressziójának vizsgálata, vagy a rekombináns DNS fenotipikus hatásának megfigyelése, ha van ilyen. Egy másik, és előnyös módszer szerint, ha egy szelektálható markergént a rekombináns DNS-sel együtt, vagy annak részeként bejuttatunk a sejtekbe, akkor azokat a kalluszsejteket, amelyek transzformálódtak, a szelekciós ágens használatával azonosítani lehet, a szelektálható markergén expressziója alapján.

A megfelelő transzformánsok szelekciója egy kritikus része a sikeres transzformációs eljárásnak, mivel a szelekciós körülményeket úgy kell megválasztani, hogy azok lehetővé tegyék a transzformált sejtek növekedését és felhalmozódását, és eközben egyidejűleg gátolja a nem transzformálódott sejtek növekedését. A helyzetet bonyolítja az a tény is, hogy az egyes sejtek életképessége egy adott populációban gyakran nagyon erősen függ a szomszédos sejtek életképességétől. Emellett a szelekciós körülményeknek nem szabad olyan szigorúaknak lenniük, hogy ezzel a kalluszsejtek növényregeneráló képességét és a keletkező növények termékenységet kizárjuk. Tehát a szelekciós ágensnek a sejtek életképességére és morfológiájára gyakorolt hatását ki kell értékelni. Ezt megtehetjük úgy, hogy először kísérleti úton előállítunk egy növekedés gátlási gör-

bét az adott szelekciós anyagra és a transzformálandó szövetre. Ez megadja azokat a koncentrációkat, amelyek gátolják a növekedést.

Ha egy szelektálható markergént használunk, akkor a kalluszcsonókat hagyni kell, hogy magukhoz térjenek a bombázás hatásaitól nem szelektív táptalajon, illetve előnyösebb, ha közvetlenül a szelekciós anyagot tartalmazó táptalajra visszük át.

A szelekciós eljárás lehet az, hogy egy toxikus anyag hatásának tesszük ki a sejteket, és a szelekciós anyag koncentrációját fokozatosan változtathatjuk, és a szelekciót több lépésben végezzük. Az adott koncentrációkat és ciklushosszakokat valószínűleg változtatni kell az egyes anyagoknál. A jelenleg előnyben részesített szelekciós eljárás szerint egy olyan szelekciós lépéssel kezdünk, amelyben viszonylag alacsony koncentrációban használjuk a toxikus anyagot, majd a későbbi lépésekben ezt a koncentrációt fokozatosan emeljük. Ez lehetővé teszi, hogy a szelekciós anyag lassan, hosszabb idő alatt fejtsse ki a hatását. Előnyösen az anyag kezdeti koncentrációja akkora, hogy a növekedésgátló hatásának 5–40%-a nyilvánul meg, a növekedési görbéből megállapítható módon. A hatás lehet az, hogy lehetővé teszi a transzformált sejteknek, hogy növekedjenek és osztódjanak, míg a transzformálatlan sejteket ebben gátolja, de nem olyan mértékben, hogy ezzel a transzformálatlan sejtek növekedését gátolja. Ha egyszer a néhány transzformált sejt már osztódott néhányszor, akkor a szövetet olyan táptalajra vihetjük, amely a toxikus anyagot magasabb koncentrációban tartalmazhatja, hogy lényegében az összes nem transzformált sejtet elpusztítsuk. A magasabb koncentrációk felé való eltolás csökkenti azt, hogy a nem transzformált sejtek adaptálódjanak az anyaghoz. A magasabb szint előnyösen a növekedés gátlásának körülbelül 30–100%-nál van. Az első szelekciós ciklus hossza lehet 1–4 hét, előnyösen körülbelül 2 hét. A későbbi szelekciós ciklusok hossza lehet 1–12 hét, előnyösen körülbelül 2–10 hét. A feltételezett kukoricatranszformánsokat általában úgy lehet azonosítani, mint egy szaporodó szektort a nem szaporodó sejtek hátterében. A kalluszt lehet nem szelektív táptalajon is tenyészteni különböző ideig, a teljes szelekciós periódus során.

Ha egyszer egy kalluszszelektort azonosítottunk mint egy feltételezett transzformáns, akkor a transzformáció megtörténtét fenotípusos és/vagy genotípusos elemzés alapján lehet megerősíteni. Ha egy szelekciós ágenszt használunk, akkor a fenotípusos elemzésre egy példa lehet, ha a feltételezett transzformáns nyerssúlyát mérjük, és a különböző kontrollokhoz hasonlítjuk a szelektív ágens különböző koncentrációja mellett. Más elemzéseket is alkalmazhatunk, amelyek a rekombináns DNS működésén alapulnak. Például, ha egy enzimet vagy fehérjét kódol a DNS, akkor az adott enzimre vagy fehérjére specifikus enzimátikus vagy immunológiai vizsgálatokat használhatjuk. Más géntermékeket alkalmas biológiai vizsgálatokkal vagy kémiai vizsgálatokkal lehet kimutatni. Más ilyen technikák is jól ismertek a szakterületen jártas szakember számára, ezeket itt nem ismételjük meg. A gén jelenlétét szokványos eljárások-

kal is megerősíthetjük, például Southern-blottal, polimeráz láncreakcióval (PCR) vagy hasonlókkal.

V. A növények regenerálása és a magvak előállítása

Azokat a sejtvonalatokat, amelyekről igazoltuk, hogy transzformálva vannak, növényekké kell regenerálnunk, és a kapott növények termékenységet meg kell határoznunk. Azokat a transzformált vonalatokat, amelyek a genotípusos és/vagy fenotípusos elemzés alapján pozitívnak bizonyultak, olyan táptalajra visszük, amely elősegíti a szövet differenciálódását és a növény regenerálódását. A regenerálást a szakterületen jártas szakember számára jól ismert, standard módszerekkel végezhethetjük. Az általában alkalmazott eljárások során csökkentjük az auxin mennyiségét, ami megszakítja a kallusz szaporodását, és elősegíti a szomatikus embrió kifejlődését vagy más szövet differenciálódását. Egy ilyen regenerálódási példát Green és munkatársai közölnek (1982). A növényeket érettségig neveljük egy megfelelő szobában vagy üvegházban, és a megfelelő szexuális keresztezéseket elvégezzük Neuffer szerint (1982).

A regenerálást, jóllehet a jelen találmány szempontjából nagyon fontos, bármely szokványos módon elvégezhetjük. Ha egy szelektálható genetikai bélyeget transzformáltunk a sejtekbe, akkor a szelekciós ágenszt bele lehet tenni a regeneráló táptalajba, hogy ezzel is megerősítsük azt, hogy a regenerálódó hajtások transzformálva vannak. Mivel a regenerálási technikák jól ismertek, és nem kritikusak a jelen találmány szempontjából, bármely olyan technika alkalmazható, amellyel a regenerálás létrejön, és termékeny növények keletkeznek.

VI. Az R1 utódok vizsgálata

A transzformált kalluszból regenerálódó növényeket nevezzük az R0 generációnak vagy R0 növényeknek. Az R0 generáció különböző szexuális keresztezéseivel előállított magvakat tekintjük az R1 utódoknak vagy R1 generációnak. Ha az R1 magvakat kicsíráztatjuk, akkor a keletkező növényeket R1 generációnak tekintjük.

Abból a célból, hogy igazoljuk a rekombináns DNS sikeres átvitelét és örökölhetőségét egy teljes szexuális ciklusban, az R1 generációt kell elemezni, hogy megerősítsük a transzformáló DNS jelenlétét. Az elemzést bármely módon elvégezhetjük, például úgy, ahogy azt az előzőekben leírtuk a bombázott kallusz elemzésére, amikor azt akartuk igazolni, hogy a transzformáció lejátszódott, számba véve azt a tényt, hogy növényt és növényi részeket használunk a kallusz helyett.

A rekombináns DNS különböző öröklődési mintázatot mutat a különböző transzformált vonalak esetében. Például a rekombináns DNS az utódokban a mendeli öröklésment szerint öröklődhet. Ez az öröklési mód magába foglalja a DNS átadását mind a hímivarú, mind a nőivarú ivarsejtekbe, és a kukorica DNS-be való stabil integrálódással vagy beépüléssel jár együtt. Az öröklésnek egy másik típusa az anyai öröklésment, mikor is a rekombináns DNS elsődlegesen, vagy kizárólagosan a nőivarú ivarsejteken keresztül adódik át. Egy

adott transzformáns esetében az öröklésmenetet a különböző szexuális keresztezésekkel származó utódok elemzésével lehet meghatározni.

VII. A rekombináns DNS átvitele más kukoricavariánsokba

A termékeny, transzgenikus növényeket ezután szokványos kukoricanemesítési programban alkalmazhatjuk, hogy a bevitt rekombináns DNS-t bejuttassuk a kiválasztott vonalakba vagy variánsokba. A kukorica konvergens javításának módszereit Hallauer és munkatársai írták le (1988), amely publikációra a továbbiakban referenciaként hivatkozunk. A szokványos nemesítési programok által alkalmazott megközelítések között van egy konverziós lépés is (visszakeresztezés). Röviden, a konverziót úgy hajtjuk végre, hogy a kiindulási termékeny növényt elit, beltenyésztett vonalakkal keresztezzük. Az ebből a keresztezésből származó utódok úgy szegregálódnak, hogy a növények közül néhány hordozza a rekombináns DNS-t, míg néhány nem. Azokat a növényeket, amelyek hordozzák a DNS-t, ismét keresztezzük elit beltenyésztett vonalakkal, így kapunk olyan utódokat, amelyek még egyszer szegregáltak. Ezt a visszakeresztezési lépést addig ismételjük, amíg az eredeti elit beltenyésztett növény egy olyan vonallá konvertálódik, amely tartalmazza a rekombináns DNS-t, ennek ellenére rendelkezik a szülőiben eredetileg előforduló összes fontos jellemzővel. Ehhez általában 6–8 generációt van szükség. Általában külön visszakeresztezési programot használnak minden egyes olyan elit vonalhoz, amelyet génszélesztési úton módosított elit vonal akarnak konvertálni.

Az alábbiakban előállított transzformált kukorica kereskedelmi értéke akkor a legnagyobb, ha a rekombináns DNS-t számos különböző hibrid kombinációba be lehet építeni. Egy gazdálkodó tipikusan számos különböző hibridet termeszt, a különbségek alapja az érettség, az állóképesség és egyéb mezőgazdasági tulajdonságok. A gazdálkodónak a hibridet emellett a földrajzi elhelyezkedés alapján is meg kell választania, mivel az egyik régióhoz adaptált hibridek általában nem adaptálódnak egy másik régióhoz, az érettségben, betegségekre való fogékonyságban és a rovarellenállásban való különbségek miatt. Ennek következtében a rekombináns DNS-t számos szülői vonalba kell integrálni, hogy számos, a kiválasztott heterológ DNS-t tartalmazó hibrid kombinációt kapjunk.

A kukorica nemesítése, valamint a gének egyik vonalból a másikra való átvitelének technikája és gyakorlata a szakterületen jártas szakember számára jól ismert. Tehát a rekombináns DNS bejuttatását bármely más vonalba vagy variánsba ezekkel a nemesítési eljárással lehet elérni.

VIII. A transzgenikus növények alkalmazása

Az alábbiakban előállított transzgenikus növényekről azt várjuk, hogy számos különböző kereskedelmi és kutatási szempontból hasznosak lehetnek. A transzgenikus növényeket elő lehet állítani azért, hogy a szokványos mezőgazdaságban használjuk, mert a termelő szá-

mára előnyös tulajdonságokat hordoz (például agronómiai tulajdonságokat, úgymint kártevő rezisztencia, herbicid rezisztencia, vagy megnőtt termés hozam), előnyös a növényről betakarított mag felhasználójának (például megnövekedett tápértékkel rendelkezik az emberi ételben vagy az állati tápban), vagy előnyös az élelmiszer-feldolgozónak (például javított feldolgozási paraméterekkel rendelkezik). Az ilyen alkalmazásokban a növényeket általában azért termelik, hogy a magvaikat az emberi vagy állati táplálékban hasznosítsák. A növénynek azonban más részei, beleértve a szárát, héját, vegetatív részét és hasonlókat is használhatók, ide tartozik az hogy állati silóként vagy díszítési célokra használják. A kukoricának és más terményeknek a kémiai összetevőit (például olajok, keményítők) extrahálják élelmiszer-ipari vagy egyéb ipari célokra, és olyan transzgenikus növényeket lehet előállítani, amelyekben az ilyen komponensek megváltoztatott vagy módosított koncentrációban fordulnak elő.

A transzgenikus növények felhasználhatók fehérjék és egyéb molekulák kereskedelmi mennyiségben való előállítására, mikor is a kiválasztott molekulát a növény részeiből, magvaiból vagy egyéb részeiből extrahálják. A növényekből származó sejteket vagy szöveteket tenyésztani, növesztani is lehet in vitro körülmények között, vagy fermentálni az ilyen molekulák előállítására céljából.

A transzgenikus növények használhatók kereskedelmi nemesítési programokban, illetve keresztezhetőek vagy nemesíthetők rokon terményfajok növényeivel. A rekombináns DNS által kódolt javított eredményeket át lehet vinni más fajokba, például protoplasztfúzióval.

A transzgenikus növényeknek számos felhasználási lehetősége van a kutatásban vagy nemesítésben, beleértve az új mutáns növények készítését inszerciós mutagenézissel, abból a célból, hogy azonosítsuk azokat az előnyös tulajdonságokkal rendelkező mutánsokat, amelyeket a későbbiekben szokványos mutációval és szelekcióval elő lehet állítani. Egy példa az említett folyamatra egy átugró, transzpozázibilis elemet kódoló rekombináns DNS-szekvencia bejuttatása, amelyet genetikai variánsok készítésére lehet használni. A találmány szerinti módszereket használhatjuk olyan növények előállítására, amelyeknek egyedi „szignatúraszekvenciáik” vagy más markerszekvenciáik vannak, és amelyeket a megfelelő vonalak vagy variánsok azonosítására lehet használni.

Az alábbi, nem korlátozó jellegű példák a jelen találmányt illusztrálják. Azért mutatjuk be őket, hogy jobban elmagyarázzuk azokat az általános eljárásokat, amelyeket azoknak a jelen találmány szerinti termékeny *Zea mays*-növényeknek az előállítására használtunk, amelyek stabilan expresszálnak a rekombináns DNS-t, és amelyek az említett DNS-t továbbadják az utódaiknak. A koncentrációadatok, százalékok súly alapján vannak megadva, hacsak külön nem jelezzük az ellenkezőjét. Az nyilvánvaló, hogy egy specifikus transzformációs esemény előfordulásának valószínűsége a transzformációs eljárásnak alávetett anyag mennyiségének a függvénye. Tehát azokban az esetekben, ami-

kor az ismertetett eljárásokban nem keletkezik transzformált termék, az eljárás megismétlése szükséges.

I. példa

Termékeny transzgenikus Zea mays-növények előállítás az AB11 kalluszvonalból

I. Olyan kukoricasejt-tenyészetek indítása és fenntartása, amelyek megőrizték a növénné váló regenerálódás képességét.

Morzsalékos, embriogén kukorica-kallusztenyésztetet indítunk hibrid, éretlen embriókból, amelyeket az A188 növény beltenyésztett vonalának (University of Minnesota, Crop Improvement Association) a B73 növény beltenyésztett vonala (Iowa State University) virágorával való beporzásával állítunk elő. A kalászokat akkor gyűjtjük be, amikor az embriók hossza eléri az 1,5–2,0 mm-t. Mindegyik kalászt a felületén sterilizáltuk 50%-os kereskedelmi fehérítőben (2,63 súly/térfogat% nátrium-hipoklorit) 20 percig szobahőmérsékleten. A kalászokat ezután steril, desztillált, ionmentesített vízzel mossuk. Az éretlen embriókat aseptikus körülmények között izoláljuk, és indító/fenntartó táptalajra tesszük, oly módon hogy a gyökér/hajtás tengelyt hozzuk érintkezésbe a táptalajjal. Az indító/fenntartó táptalaj (a továbbiakban „F táptalaj” néven említjük) tartalmaz N6 alaptáptalajt (Chu 1975), amelyben van még 2 súly/térfogat% szacharóz, 1,5 mg/liter 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav (2,4-D), 6 mmol/liter prolin, és 0,25% Gelrite (Kelco, Inc., San Diego). A pH értékét a sterilizálás előtt 6,8-ra állítjuk. Ha csak külön nem jelezzük, akkor az összes szövettenyésztet manipulációt steril körülmények között végezzük.

Az éretlen embriókat 26 °C-on sötétben inkubáljuk. Az éretlen embriók pajzsocskájából származó sejtek szaporodását a morzsalékos konzisztencia és a jól definiált szomatikus embriók megléte alapján értékeljük. Az ilyen morfológiával rendelkező szövetet azután az éretlen embriók kezdeti szélesztése utáni 10–14. napon visszük át friss táptalajra. A szövetet azután minden 14–21. napon rutinszerűen átolttjuk. A körülbelül 1 g méretet elérő szövetdarabokról 60–80 mg-os mennyiségeket távolítunk el, és friss táptalajra visszük át. Az átolttás során vizuálisan alaposan ellenőrizzük, hogy biztosan csak a helyes morfológiával rendelkező szövetet tartjuk fenn. A szomatikus embriók jelenléte biztosítja, hogy a tenyészetből megfelelő körülmények között növény keletkezhet. Az ebben a példában használt, AB11-nek nevezett sejtenyészet egy ilyen tenyészet, és 1 évvel a bombázási kísérlet előtt indítottuk.

II. Plazmidok

A pHYGI1 plazmidot a pBS+ vektorban állítottuk elő (Stratagene, Inc., San Diego, CA), ami egy 3,2 kb méretű cirkuláris plazmid, standard rekombináns DNS-technikák alkalmazásával. A kukorica AdhIS első intronját tartalmazó 553 bázispár méretű Bcl-BamHI fragmentet (Callis et al., 1987) a CaMV 35S promotere és a pCHN1-1 plazmid (előállítás az V. példában leírtak alapján) higromicint kódoló szekvenciája közé illesztjük be. A pHYGI1 plazmid térképét az 1. ábrán kö-

zöljük. A pHYGI1 plazmidot az American Type Culture Collectionnál helyeztük letétbe (Rockville, MD, USA, 1990. március 16-án) a Budapesti Egyetem alapján, 40774 letéti szám alatt.

A pBII221 plazmid tartalmazza az Escherichia coli β -glükuronidázt kódoló szekvenciát, amelyet az 5' végén a CaMV 35S promotor, a 3' végen pedig a nos poliadenilezési szignál határolja. A plazmidot úgy állítjuk elő, hogy a kukorica AdhIS első intronját a 35S promotor és a pBII221 kódoló szekvenciája közé illesztjük be (Jefferson et al., 1987). A pBII221 térképét 2. ábrán mutatjuk be.

A plazmidokat az AB11 embriogén kallusztenyésztetbe juttatjuk be, mikrorészecske-bombázási technika alkalmazásával.

III. DNS-bejuttatási módszer

Az embriogén AB11 kukorica-kalluszvonalat 7–12 nappal a mikrorészecske-bombázás előtt átolttjuk. Az AB11 kalluszt az alábbiak szerint készítjük elő a bombázáshoz. Öt kalluszcsoportot, mindegyik körülbelül 50 mg nedvessúlyú, egy steril, 60×15 mm-es steril Petri-csészében kereszt alakban elrendezzük. A lemezeket a bombázási eljárás során egy zárt tartóban tároljuk, amely nedves papírtörülközőket tartalmaz. Tizenkét lemezt készítünk.

A plazmidokat M–10 volfrámrészecskékre visszük fel (Biolistics), pontosan Klein és munkatársai leírása alapján azzal a különbséggel, hogy

- (i) a javasolt DNS-mennyiség dupláját használjuk;
- (ii) a DNS-t 0 °C-on csapjuk ki a részecskékre; és
- (iii) a DNS-sel borított volfrámrészecskéket jégen tároljuk a bombázás során.

Mindegyik cső 25 μ l 50 mg/ml M–10 volfrámot tartalmaz vízben, valamint 25 μ l 2,5 mol/l CaCl_2 -ot és 10 μ l 100 mmol/l spermidint. Összesen 5 μ l 1 mg/ml koncentrációjú plazmid-DNS-sel. Egy cső csak a pBII221 plazmidot tartalmazza, és egy cső a TE puffert tartalmazza (lásd a 2. táblázatot a későbbiekben).

Mindegyik csövet jégen inkubáljuk 10 percig, a részecskéket centrifugálással üleptjük Eppendorf centrifugában szobahőmérsékleten 4 másodpercig, és a felülszót elöntjük. A csöveket jégen tároljuk a bombázás folyamata alatt. Mindegyik készítményt maximum 5 bombázásra használjuk.

A makrolövedékeket és a leállítólemezeket a Biolistics Inc.-től vásároljuk (Ithaca, NY). Ezeket a gyártó előírásai szerint sterilizzük. A mikrolövedék-bombázó berendezést a Biolistics, Inc. cégtől vásároljuk.

A mintalemezeket 5 cm-rel a mikrolövedék-berendezés leállító lemeztálcája alatt helyezük el, úgy, hogy a leállítólemez a csőhöz legközelebbi résben helyezkedjen el. A fentiekben leírt módon kalluszsöveteket a mintalemez közepére helyezük el, és a Petri-csésze fedelét eltávolítjuk. Egy 7×7 cm-es négyszögletes, merev dróthálót helyezünk a nyitott csészére, hogy a szövetet visszatartsuk a bombázás során. A volfrám/DNS preparátumokat ultrahanggal besugározzuk a Biolistics Inc. leírása szerint, és a szuszpenziókból 2,5 μ l-eket pipettázunk a makrolövedékek felszínére az egyes bombá-

zásokhoz. A berendezést a gyártó előírásai szerint működtetjük. A végrehajtott bombázásokat a 2. táblázatban foglaljuk össze.

2. táblázat

2 × pBII221 preparátum	A tranziens expresszió frekvenciájának meghatározására
7 × pHYGI1/pBII221 (1:1)	Potenciális pozitív kezelés a transzformáláshoz
3 × T. E. ^a	Negatív kontrollkezelés

^a 10 mmol/l TRIS-HCl pH=8,0, 1 mmol/l EDTA

A két, pBII221 plazmiddal bombázott kalluszelemez egy az egyben F táptalajra visszük át (higromicin nélkül), majd a kalluszt sötétben tartjuk 26 °C-on. 2 nap elteltével ezt a kalluszt egy az egyben átvisszük 35 × 10 mm-es Petri-csészékre (Falcon 1008), amelyek 2 ml GUS vizsgáló puffert tartalmaznak (1 mg/ml 5-bróm-4-klór-3-indolil-β-D-glükuronid) (Research Organics), 100 mmol/l nátrium-foszfát 7,0, 5–5 mmol/l kálium-ferricianid, illetve kálium-ferrocianid, 10 mmol/l EDTA és 0,06% Triton X-100. A lemezeket 37° C-on inkubáljuk 3 napig, majd a kék sejtek számát meghatározzuk. Ennek értéke az adott esetben 313 a 355-ből ezek a tranziens GUS-expresszálo sejtek, amelyek láthatók a két lemezen, jelezve, hogy a DNS bejuttatása lejátszódott a másik bombázási eljárás során is. A GUS vizsgálatban használt szöveteket tartalmazó lemezeket a számlálás után eldobjuk, mivel a GUS vizsgálat roncsoló hatása.

IV. Szelekciós eljárás

A táptalajba lemezöntés előtt higromicin-B-t teszünk, oly módon hogy a megfelelő térfogatú, szűrővel sterilizált 100 mg/ml koncentrációjú higromicin-B vizet oldatát adjuk táptalajhoz, amikor hőmérséklete 45 °C-ra csökkent.

Közvetlenül azután, hogy az összes mintát bombáztuk, az összes pHYGI1/pBII221 plazmiddal kezelt lemezről származó kalluszt, valamint két TE lemezt egy az egyben átvisszük 15 mg/ml higromicin-B-t tartalmazó F táptalajra (tíz kalluszdarab lemezenként). Ezeket nevezzük az első körből származó szelekciós lemezeknek. A TE-vel kezelt lemezekről származó kalluszt higromicint nem tartalmazó F táptalajra visszük át. Ezt a szövetet minden 2-3 hétben nem szelektív táptalajra visszük át, és ezt nevezzük nem szelektált kontrollkallusznak.

14 napos szelekció után a szövet lényegében azonosnak tűnik mind a szelektív, mind a nem szelektív táptalajon. A pHYGI1/pBII221 kezelésből származó mind a hét lemezről és egy TE-vel kezelt lemezről származó összes kalluszt az első szelekciós kör lemezeiről átvisszük a második szelekciós kör lemezeire, amelyek 60 mg/l higromicint tartalmaznak. A 2. szelekciós kör mindegyik lemeze tíz db 30 mg-os kalluszt tartalmaz lemezenként, ennek következménye a lemezek számának növekedése.

A 2. szelekciós lemezekon töltött 21 nap elteltével az összes anyagot átvisszük a 3. szelekciós kör lemezeire, amelyek 60 mg/l higromicint tartalmaznak. A bombázás után 79 nappal a 3. szelekciós kör lemezeit átvizsgáljuk, hogy van-e bennük életképes kalluszszelet. Az egyik szektor szaporodott a nekrotikus szöveti háttérén a pHYGI1/pBII221 plazmidokkal kezelt lemezekon. A szektor a PH3 jelölést kapta, és F táptalajra vittük át, amely nem tartalmazott higromicint.

19 nap elteltével a higromicin nélküli F táptalajon, a PH3-at F táptalajra visszük át, amely 60 mg/ml higromicint tartalmaz. A PH3-ról kiderült, hogy képes növekedni többszörös átoltás után is, 60 mg/l higromicin jelenlétében is.

V. A transzformált kallusz igazolása

Annak igazolására, hogy a PH3 kalluszban megtalálható a higromicinrezisztencia-gén, genomális DNS-t izolálunk a PH3 kalluszból és a szelektálatlan kontrollkalluszból az V. példa szerint, és Southern-blottal analizáljuk. Az izolált DNS-t (10 µg) BamHI (New England Biolabs) restrikciós enzimmel emésztjük, majd 0,8 tömeg/térfogat%-os agarózgélben elektroforetizáljuk 15 V feszültség mellett 16 óra hosszat TAE pufferben (40 mmol/l TRIS-acetát, pH=7,6, 1 mmol/l EDTA). A DNS-t Nytran membránra visszük át (Schleier and Schüll). A transzfert, a hibridizálást és a mosási körülményeket az előállító által javasolt módon állítjuk be.

Egy ³²P-vel jelzett próbát állítunk elő random jelzőkittel (Oligo Labelling Kit, Pharmacia), az előállító előírásai szerint, α-³²P-dCTP (ICN Radiochemicals) felhasználásával. A használt templát DNS a pHYGI1 1055 bp méretű BamHI fragmentje volt, amely a teljes HPT kódoló szekvenciát tartalmazza.

A membránokat Kodak X-OMAT AR filmre exponáljuk X-OMATIC kazettában, erősítőszűrő alkalmazásával. A PH3 kallusznál egy csík figyelhető meg a várt 1,05 kb-nál, jelezve, hogy a HPT kódoló szekvencia jelen van. A kontrollkallusznál nem lehet csíkot megfigyelni.

Annak igazolására, hogy a higromicingén beépült a nagy molekulású DNS-be, a PH3 kalluszból és a kontrollkalluszból származó emésztetlen DNS-t elektroforézisnek vetjük alá, blotoljuk, és a fentiek szerint hibridizáljuk. Az emésztetlen PH3 DNS csak ott mutatott hibridizálást a próbához, ahol a mobilitás megegyezett a hasítatlan DNS-sel. Nem volt megfigyelhető hibridizálás a kontrollkallusz esetében. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a HPT kódoló szekvencia nincs jelen a PH3 kalluszban érintetlen pHYGI1 vagy kis nem kromoszomális plazmid formájában. Ezek az eredmények megegyeznek azzal, hogy a higromicingén nem épül be a nagy molekulású DNS-be.

VI. Növényregenerálás és magvak előállítása

A PH3 kallusz egyes részeit közvetlenül a 60 mg/l higromicint tartalmazó lemezekről visszük át az RM5 táptalajra, amely az MS alapsókat tartalmazza (Murashige et al., 1962) kiegészítve 0,5 mg/l tiamin-HCl-dal, 0,75 mg/l 2,4-D-vel, 50 g/l szacharózzal,

150 mg/l aszparaginnal, és 2,5 g/l Gelrite-tal (Kelco Inc., San Diego).

Miután 14 nap eltelt az RM5 táptalajon, a PH3 legnagyobb részét és a szelektálatlan kalluszt R5 táptalajra visszük át (összetétele ugyanaz, mint az RM5 táptalajé, csak a 2,4-D-t hagyjuk ki belőle). A lemezeket sötétben 26 °C-on inkubáljuk 7 napig, majd fényre tesszük, a megvilágítás 14 óra hosszat tart, a sötétség 10 óra hosszat, és itt tartjuk 14 napig, 26 °C-on. Ennél a pontnál az esetleg keletkező hajtásokat 100 ml R5 táptalajt tartalmazó edényekbe tesszük át. A növényeket az edényekből vermikulitra ültetjük át 7-8 nappal azelőtt, hogy talajba ültetnénk őket és érett állapotig nevelnénk őket. A PH3-ból összesen 45 növény keletkezett, a kontrollkalluszból összesen 10 növény.

Az érett PH3 növények ellenőrzött beporzását standard módszerek alkalmazásával végezzük, MBS501 (Mike Brayton Seeds), FR4326 (Illinois Foundation Research) beltenyésztett *Zea mays*-vonalak és a szabadalmaztatott LM1112 beltenyésztett vonal alkalmazásával. A magvakat 45 nappal a beporzás után gyűjtjük be, és további 1-2 hétig hagyjuk száradni.

VII. Az R1 utódok elemzése

Az R1 növényeket PCR-elemzéssel vizsgáljuk meg, hogy megtalálhatók-e bennük a HPT- és GUS-gének szekvenciái. A HPT-gén expresszióját a HPT-aktivitás enzimatikus mérésével határozzuk meg. Az adatokat a 3. táblázatban foglaljuk össze. Ezek az adatok igazolják a rekombináns DNS átadását és expresszióját mind a hímivarú, mind a nőivarú növényekben, és ez megegyezik a mendeli öröklődés szabályaival. Annak igazolása Southern-blottal, hogy a HPT-t kódoló szekvencia integrálódott a kiindulási kallusz nagy molekulású DNS-ébe, és kombinálása az öröklődési adatokkal azt sugallja, hogy az említett DNS-ek kromoszómába integrálódtak. A GUS-gén-szekvenciák jelenléte az R1 utódokban azt igazolja, hogy egy nem szelektált gén együtt transzformálódott és együtt öröklődik.

3. táblázat

A PH3 R1 utódainak analízise

Transzformánsok

Szülők: MBS501 × PH3.4

PH3.4 növény	Enzimes HPT-vizsgálat	PCR-vizsgálat	
		HPT	GUS
4.1	–	–	–
4.2	+	+	+
4.3	+	+	+
4.4	–	–	–
4.5	+	+	+
4.6	+	+	+
4.7	+	+	+
4.8	–	–	–
4.9	–	–	–

Szülők: LM1112 × PH3.18

Növény	Enzimes HPT-vizsgálat	PCR vizsgálat	
		HPT	GUS
18.1	–	–	–
18.2	+	+	+
18.3	–	–	–
18.4	–	–	–
18.5	+	+	+
18.6	+	+	+
18.7	+	+	+
18.8	+	+	+
18.9	+	+	+
18.10	+	+	+

Szülők: PH3.2 × FR4326

Növény	Enzimes HPT-vizsgálat	PCR vizsgálat	
		HPT	GUS
2.1	–	–	–
2.2	–	–	–
2.3	+	+	+
2.4	–	–	–
2.5	+	+	+
2.6	–	–	–
2.7	+	+	+
2.8	+	+	ND
2.9	+	+	ND

Kontrollok

Szülők: TE3.1 × Oh43

3.1	–	–	ND
3.2	–	–	ND
3.3	–	–	ND
3.4	–	–	ND
3.5	–	–	ND
3.6	–	–	ND
3.7	–	–	–
3.8	–	–	–

Kontrollok (folyt.)

Szülők: TE3.1 × Oh43

Növény	Enzimes HPT-vizsgálat	PCR vizsgálat	
		HPT	GUS
3.9	–	–	–
3.10	–	–	–
3.11	–	ND	ND

Táblázat (folytatás)

Növény	Enzimes HPT-vizsgálat	PCR vizsgálat	
		HPT	GUS
3.12	–	ND	ND
3.13	–	ND	ND
3.14	–	ND	ND
3.15	–	ND	ND
3.16	–	ND	ND
3.17	–	ND	ND
3.18	–	ND	ND
3.19	–	ND	ND
3.20	–	ND	ND
3.21	–	ND	ND
3.22	–	ND	ND
3.23	–	ND	ND
3.24	–	ND	ND

A HPT-enzim-vizsgálat az alábbi módszereken alapul: S. K. Datta et al., *Bio/Technology*, 8, 736 (1990); M. Staebell et al., *Analytical Biochemistry*, 185, 318 (1990); és E. Cabanes-Bastos, *Gene*, 77, 169 (1989).

0,2 g-os gyökérmintákat vágunk ki 7–10 napos hajtásokból, és cseppfolyós nitrogénben gyorsan lefagyasztjuk. A mintákat alumínium-oxiddal és 400 µl EB pufferrel eldörzsölve tárjuk fel (50 mmol/l TRIS-HCl pH=7,0, 10 térf/térf% glicerin, 0,1 mmol/l PMSF) 30–60 másodpercig, eldobható mozsártörőt és csövet használva (Kontes), majd egy Eppendorf mikrocentrifugában 10 percig centrifugáljuk. A felülúszót egy Centricon 30 szűrőegységbe tesszük át, majd szögrotorban Beckman GPR centrifugával 30 percig 4 °C-on 5000/perc fordulatszámmal centrifugálva sómentesítjük. Minden egyes szűrőegység mosásához 1 ml EB-t használunk, majd újabb 60 percig centrifugáljuk 5000/perc fordulatszámmal. A visszamaradt folyadékot kinyerjük és –70 °C-on tároljuk. A transzgenikus és nem szelektált kontrollkalluszsövet 0,2 g-os mintáit a fentiek szerint feltárjuk, majd a felülúszókat használjuk pozitív és negatív kontrollként.

A fehérjék mennyiségi meghatározását Bradford módszerével végezzük [*Analytical Biochemistry*, 72, 248 (1976)] egy BioRad kit alkalmazásával. A gyökérkivonatokban található fehérjekoncentráció 0,2–2 µg/ml között változott.

A gyökérkivonatokat (4 µg összfehérje) egy reakcióelegyhez adjuk hozzá, amely 20 mmol/l Tris-maleát puffert, 13 mmol/l MgCl₂-t, 120 mmol/l NH₄Cl-t, 0,5 mmol/l DTT-t, 50 µmol/l ATP-t, 0,61 µg/µl higromicin-B-t, 25 µg/µl szarvasmarha-szérumalbumint és 12 µCi gamma-³²P-ATP-t tartalmaz. A reakcióelegy térfogata 33 µl. A reakcióelegyet 30 percig 37 °C-on inkubáljuk.

A reakcióelegyből egy µl-t polietilénimin-cellulóz vékonyréteg-kromatográfiás lemezre viszünk (Sigma

Chem. Co.). A lemezeket 50 mmol/l koncentrációjú hangyasavban fejlesztjük ki, levegőn szárítjuk, majd Kodak XAR–5 filmre exponáljuk. A reakció terméke, a higromicin-B-foszfát ilyen körülmények között az oldószerfront közelében vándorol.

A PCR-vizsgálatok kivitelezéséhez 0,1 g-os mintákat veszünk a növényi szövetekből és cseppfolyós nitrogénben lefagyasztjuk. A mintákat 120-as szemcséjű szilícium-karbiddal dörzsöljük el 200 µl 0,1 mol/l TRIS-HCl pH=8,5, 0,1 mol/l NaCl, 20 mmol/l EDTA, 1% szarkozil összetételű oldatban 4 °C-on. A fenol:kloroform 1:1 arányú elegyével végzett extrakció és etanol-izopropanolos kicsapások után a mintákat TE-ben szuszpendáljuk és polimeráz-láncreakcióval vizsgáljuk [K. B. Mullis, 4 683 202 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás).

A PCR-t 100 µl térfogatú oldatban hajtjuk végre, amelynek összetétele: 50 mmol/l KCl, 10 mmol/l TRIS-HCl pH=8,4, 3 mmol/l MgCl₂, 100 µg/ml zselatin, 0,25 µmol az egyes indítómolekulákból, 0,2 mM az egyes dezoxi-nukleotid-trifoszfátokból (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2,5 egység Taq DNS polimeráz (Cetus), valamint 10 µé a DNS-preparátumból. A reakcióelegyet ásványi olajjal felülrétegezzük, 3 percre 94 °C-ra melegítjük, majd 35 cikluson keresztül amplifikáljuk (55 °C 1 percig, 72 °C 1 percig, 94 °C 1 percig). A reakcióelegyet ezután 50 °C-on inkubáljuk 2 percig, majd 72 °C-on 5 percig. A PCR termékből 10 µl-t agarózgélén elektroforetizáljuk, majd etidium-bromiddal tesszük láthatóvá.

A HPT-gén jelenlétének igazolására egy, a 35S promoterrel komplementer PCR indító molekulát, és egy, a HPT kódoló szekvenciával komplementer indítómolekulát használunk. Tehát a megfelelő méretű PCR-termék előállításához a HPT templát DNS-nek egybefüggő 35S promoter régiót, Adh1 intront és 5' fehérje kódoló szekvenciát kell tartalmaznia.

A GUS-gén jelenlétének elemzéséhez a GUS fehérje kódoló régióban található szekvenciákkal komplementer PCR indító molekulákat használtunk. Egy 797 bp méretű PCR-termék várható, ha a templát DNS a két indító között érintetlen kódoló régiót tartalmaz.

II. példa

45 *Termékeny transzgenikus növények az AB63S kalluszvonalból, amely egy mag-tartalékfehérjét kódoló rekombináns DNS-t tartalmaz*

A 10 kd méretű zein tartalékfehérjét a kukoricamag-endospermiuma állítja elő, és egy reprezentatív tagja azoknak a fehérjéknek, amelyeket „mag-tartalékfehérjéknek” neveznek. A fehérje különlegesen nagy mennyiségben tartalmaz metionint (22,5%), és a Zps10/(22) gén kódolja [M. S. Benner et al., *Theor. Appl. Genet.*, 78, 761 (1989)], amely gént a továbbiakban z10 génként említünk. Tehát a z10 gén megnövekedett expresszióját lehet arra használni, hogy a kukorica metionintartalmát megnöveljük. A kiméra z10 gént tartalmazó termékeny kukoricánövényt az I. példában leírtak alapján állíthatjuk elő, minimális módosításokkal. A II. példa azt is igazolja, hogy a re-

kombináns DNS-t az I. példában használttól eltérő kalluszzonalba is sikerült bejuttatni.

I. Szövettenyésztés-vonalak

Az ebben a példában alkalmazott AB63S jelű embriogén kukoricakalluszt olyan éretlen embriókból állítottuk elő, amelyek az elit beltenyésztett A188, illetve B73 vonalak keresztezéséből származnak, az I. példában leírt iniciációs és fenntartási eljárások alkalmazásával. A kalluszzonalat a bombázási kísérlet előtt körülbelül 7 hónappal indítottuk. Tizenegy héttel a bombázás előtt a szövetet megszürtük, oly módon hogy egy 1,9 mm-es szitán nyomtuk át, majd N6 fenntartó táptalajra szélesztettük. A morzsalékos, embriogén kalluszt a növekedés 1–2. hete után választottuk ki a keletkező szövetből, friss táptalajra tettük át, majd 1,5–3 hétig hagytuk növekedni, mielőtt újból megszürtük. A morzsalékos kallusznak ezt a szűrési és kinyerési ciklusát összesen háromszor hajtuk végre a bombázási kísérlet előtt.

II. Plazmidok

Az I. példában leírt pHYG11 és pBII221 plazmidokat használjuk ebben a példában. Emellett a DNS/volfrám készítmény készítéséhez a pZ27Z10 plazmidot is felhasználtuk. A pZ27Z10 plazmidot a pUC118 plazmidból kiindulva állítottuk elő [Vieira et al., *Methods in Enzymology*, 153, 2 (1987)], standard rekombináns DNS technika alkalmazásával; ez egy 3,2 kb méretű cirkuláris plazmid. A pZ27Z10 tartalmazza a kukorica 27 kd-os zein génjének [D. E. Geraghty, PhD. Thesis, University of Minnesota (1987)] 5' transzkripció szabályozó régióját, amit a továbbiakban z27-ként említünk, közvetlenül a kukorica 10 kd-os zein génjének [Kiriha et al., *Gene*, 7, 359 (1988), amelyet a továbbiakban z10-ként említünk] kódoló szekvenciája és 3' nemkódoló szekvenciája elé beépítve. A z27 szabályozószekvencia és a z10 kódoló- valamint 3' szekvenciák kombinációját a továbbiakban kiméra z27-z10 génként említjük. A CaMV genomnak a 35S promotor szomszédságából származó poli A szignált a z10 génszekvencia után helyezük el a pZ27Z10 plazmidban. A plazmid térképét a 7. ábrán láthatjuk.

A pZ27Z10 plazmidot az American Type Culture Collectionnál (Rockville, MD) hegyeztük letétbe a Budapesti Egyezmény szerint, ATCC 40938 letéti szám alatt.

III. DNS-bejuttatási módszerek

Az AB63S kukorica embrionális kalluszzonalból származó szövetet a mikrorészecske-bombázás előtt áttöltjük. A szövetet úgy készítjük elő a bombázáshoz, hogy egy 1,9 mm-es szitán szűrjük át. A megszürt szövetet szélesztjük 5,5 cm átmérőjű Whatman No. 1 szűrőlapra vékony pázsit formájában, körülbelül 500 mg szövetet használva szűrőlaponként. Összesen 6 szűrőkorongot készítettünk. A mikrorészecske-bombázás előtt a szöveteket tartalmazó szűrőkorongokat üres Petri-csészére tesszük át. A szövetet enyhén dehidratáljuk, oly módon hogy egy laminárboxban fedetlenül áll-

ni hagyjuk 20 percig. Hogy a szövet további dehidratálódását megakadályozzuk, a lemezeket a bombázáshoz való felhasználás előtt magas nedvességtartalmú tárolóban tartjuk.

A bombázáshoz használt DNS 1:1:1 súlyarányú keveréke a pHYG11, pZ27Z10 és pBII221 plazmidoknak. A DNS-nek a volfrámrészecskékre való kicsapását az I. példában leírtak alapján végeztük.

A bombázást az I. példában leírtak alapján végeztük, azzal a különbséggel, hogy a Biolistic™ PDS 1000 (DuPont) berendezést használtuk, és a szövetek fölé nem tettünk szitát. A kalluszsövetet tartalmazó hat szűrőkorongot az alábbiak szerint kezeltük: két szűrőlapot kétszer bombáztunk, mindkétyszer a DNS/volfrám preparátummal (potenciális 2X pozitív kezelés); három szűrőlapot egyszer bombáztunk a DNS/volfrám preparátummal (potenciális 1X pozitív kezelés); egy szűrőlapot egyszer bombáztunk a volfrám/víz szuszpenzióval, ugyanolyan mennyiségű volfrámot használva mint a DNS/volfrám bombázási kísérletekben (negatív kontroll).

IV. A transzformált kallusz szelekciója

A bombázás után a 2X DNS kezelésből származó kalluszsöveteket tartalmazó szűrőkorongokat az 1. kör szelekciós lemezeire tesszük át: F táptalaj, 15 mg/ml higromicinnel. Az 1X DNS kezelés két szűrőkorongja közül az egyiket, valamint a negatív kontrollkezelés szűrőkorongját is áttettük az 1. kör szelekciós lemezeire tesszük át. Az 1X DNS kezelésből származó harmadik szűrőkorongot higromicint nem tartalmazó F táptalajra tesszük át, a nem szelektált kontrollkalluszként való felhasználáshoz. Mivel ez a nem szelektált kontrollkallusz potenciálisan pozitív volt, ezért a szelekciónak csak az első két körét hajtottuk végre, összehasonlítás céljából; ezt követően a nem bombázott AB63S kalluszt F táptalajon tartottuk fenn higromicin nélkül, és ezt használtuk nem szelektált kontrollkalluszként.

Öt nap elteltével a kalluszt kis csomókban (körülbelül 25 mg) a szűrőkorongokról friss, 1. szelekciós körhöz tartozó táptalajra vesszük át. A szélesztés sűrűsége 10 csomó per lemez. Erre az időre a kallusz súlya körülbelül kétszeresére nőtt. A nem szelektált kontrollkalluszt ugyanígy vesszük át higromicint nem tartalmazó F táptalajra. A bombázás utáni tizenkilencedik napon az összes szövetet az 1. szelekciós kör táptalajáról a 2. szelekciós kör táptalajára vesszük át (F táptalaj, 60 mg/ml higromicinnel). A szélesztés sűrűsége ennél az áttöltésnél tizen-négy csomó per lemez. A kallusz térfogata körülbelül a háromszorosára nőtt az előző áttöltés óta eltelt 14 nap alatt. 23 nap elteltével az összes kalluszt áttöltjük a 2. szelekciós kör táptalajáról a 3. szelekciós kör táptalajára, amely 60 mg/ml higromicint tartalmaz.

A bombázás után 59 nappal öt élő szektor figyelhető meg, amelyek szaporodtak a környező nekrotikus kalluszok között. Erről az öt szektorról azt gondoltuk, hogy a 2. szelekciós kör egyetlen kalluszcsoomójából származtak, mivel egymással szomszédosak voltak az előző áttöltésből származó egymást követő lemezek. Ezek a szektorok egy 2X DNS kezelésből származtak, és a Met1 kalluszzonal jelölést kapták.

A Met1 kalluszvonalat 60 mg/ml higromicint tartalmazó F táptalajra, valamint higromicint nem tartalmazó F táptalajra vittük át. Az inkubálás 22. napja után nem volt észlelhető különbség a szövet növekedésében vagy megjelenésében a két különböző típusú táptalajon. A Met1 kalluszvonal gyorsan nőtt, és úgy tűnt, hogy nem gátolja táptalajban jelenlevő higromicin. A Met1 kallusz erősen morzsálékosnak és embrionálisnak tűnt mindkét táptalajon, és szemmel nem volt megkülönböztethető a higromicint nem tartalmazó F táptalajon növekedő AB63S kontrollkallusztól.

V. A transzformált kallusz ellenőrzése

A Met1 kallusszal és a kontroll AB63S kallusszal gátlási vizsgálatokat végeztünk. A gátlási vizsgálat megkezdése előtt a Met1 kalluszt 21 napig higromicint nem tartalmazó F táptalajon növesztettük. A Met1 és a kontroll AB63S kalluszokat F táptalajokra vittük át, amelyek 0, 15, 60, 100 és 200 mg/l higromicint tartalmaztak. Az egyes kalluszvonalakból három lemezt készítettünk minden egyes higromicinkoncentrációhoz; mindegyik lemez 5-6 kalluszdarabot tartalmazott, egyenként 50 mg per darab a súlyuk (a lemezenkénti kallusz mennyisége körülbelül 300 mg volt).

28 napi inkubálás után az egyes lemezekben levő kalluszkok súlyát megmértük. A százalékos növekedési gátlás mértékét úgy határoztuk meg, hogy az egyes higromicinkoncentrációknál kapott kallusz átlagos súlyát osztottuk a 0 mg/l higromicinkoncentrációnál kapott kallusz átlagos súlyával. Az eredmények azt mutatták, hogy a Met1 kallusz növekedését egyáltalán nem gátolta a 15, 60 és 100 mg/ml higromicinkoncentráció. A Met1 kallusz növekedését a 200 mg/l higromicint tartalmazó táptalaj 20%-ban gátolta. Ezzel szemben, az AB63S kallusz növekedését minden higromicinkoncentráció gátolta; 200 mg/ml higromicinkoncentrációnál az AB63S kallusz növekedése 90%-ban gátolt volt. Ezek az eredmények megerősítik, hogy a Met1 kalluszvonal rezisztens a növesztő táptalajban levő higromicinre.

Annak igazolására, hogy a higromicinrezisztencia gén benne van a kallusz-DNS-ben, és hogy a kalluszban megtalálható-e a kiméra z27-z10 gén is, Southern-blotanalízist végeztünk. A HPT kódoló szekvencia kimutatására a Met1 és a kontrollkalluszból izolált DNS-t BamHI, HindIII és BstEII restrikciós enzimekkel emésztettük. Az emésztett DNS-mintákat agarózgél-elektroforézisnek vetjük alá 0,8%-os agarózgélben, majd Nytran membránra blotoljuk az I. példában leírtak alapján. Az etídium-bromiddal festett gélnak a blotolás előtti vizuális vizsgálata azt mutatta, hogy a BamHI emésztés teljesen lejátszódott, míg sem a HindIII, sem a BstEII enzim nem emésztette jelentős mértékben a DNS-mintákat. A blotot biotinnal jelzett, 1,05 kb méretű, a HPT-t kódoló szekvenciából származó BamHI fragmenttel vizsgáltuk meg. A hibridizáláshoz, mosáshoz és a kimutatáshoz használt körülmények azok, amelyeket a kísérletben használt BRL Photogene™ kithez megadtak.

A hibridizálás után jelzett csíkokat figyelhetünk meg a BamHI restrikciós enzimmel emésztett Met1 DNS-ben, a várt 1,05 kb méretnél, valamint a kö-

rülbelül 2,7, 4,5 és 6,5 kb méreteknél is. Ez az eredmény azt mutatta, hogy a HPT-t kódoló szekvencia jelen van Met1 kalluszvonalból származó DNS-ben. A 2,7, 4,5 és 6,5 kb-nál megfigyelt további csíkok azt mutatták, hogy vagy a restrikciós enzimes emésztés nem volt teljes, vagy a HPT-szekvenciának többszörös, átrendeződött kópiája van jelen. A HindIII és BstEII emésztések esetében hibridizációs jelek voltak megfigyelhetők mindkét sávban az emésztetlen DNS-nek megfelelő pozícióban. Ezek az eredmények azt mutatták, hogy a HPT-t kódoló szekvencia integrálódott a Met1 genom nagy molekulású DNS-ébe. A kontrollkalluszból származó DNS-nél egyik sávban sem volt megfigyelhető hibridizációs jel.

A kiméra z27-z10 gén kimutatásához Southern-blot-elemzést végeztünk, a Met1 és a kontrollkalluszból izolált DNS-mintákat alkalmazva. A DNS-mintákat BamHI és EcoRI restrikciós enzimmel emésztettük. A BamHI emésztéssel egy 2,76 kb méretű fragment szabadul fel, amely a z10-et kódoló szekvenciát tartalmazza, valamint az ebben a transzformálásban használt pZ27Z10 konstrukcióból származó 3' nemkódoló szekvenciát. A 7,26 kb méretű pZ27Z10 plazmidon egyetlen EcoRI restrikciós hasítási hely található. A készített blotot egy olyan biotinnal jelzett próbához hibridizáltuk, amely a teljes z10-et kódoló szekvenciát tartalmazta, a Photogene kithez (BRL) megadott körülményeket alkalmazva.

A BamHI emésztéseknél az endogén z10 szekvenciák 9 kb-nál adtak hibridizációs jeleket, és körülbelül 15 kb-nál a Met1 és kontrollkallusz-DNS-t is tartalmazó sávokban. A Met1 mintában egy további körülbelül 3,5 kb méretű csík figyelhető meg, de ez nincs meg a kontroll-DNS-mintákban. A Met1 DNS-ben nem volt megfigyelhető a várt erős hibridizációs jel 2,76 kb-nál. Az, hogy a BamHI restrikciós enzimmel emésztett Met1 DNS-ből hiányzott a jelzett 2,76 kb méretű csík, az arra utal, hogy a DNS emésztése vagy nem volt teljes, vagy a bejuttatott DNS átrendeződött.

Az EcoRI-emésztések esetében az endogén z10 szekvenciák körülbelül 12 kb-nál és 16 kb-nál adtak hibridizációs jelet mind a Met1 mind a kontrollkallusz-DNS esetében. Egy további csík figyelhető meg körülbelül 14 kb-nál a Met1 mintában, de nem volt megfigyelhető a kontrollkallusz-DNS-mintákban. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy azok az új z10 DNS-szekvenciák találhatóak meg a Met1 kallusz-DNS-ben, amelyek nincsenek meg a kontrollkallusz-DNS-mintákban.

Ezeket az eredményeket egy második Southern-blot-elemzéssel erősítettük meg, mikor is a Met1 és a kontroll-DNS-t BamHI, NcoI és NsiI restrikciós enzimekkel emésztettük. Felhasználtuk még a Met1 és a kontrollkalluszból származó emésztetlen DNS-mintákat. A szűrőlapot ³²P-vel jelzett z10-et kódoló szekvenciával vizsgáltuk át. Mindegyik emésztésben új z10 hibridizációs jelek figyelhetők meg a Met1 kallusz DNS esetében, amelyek viszont hiányoznak a negatív kontrollkallusz-DNS-mintájában. Ezek az eredmények megerősítik, hogy az új z10-t kódoló szekvenciák megtalál-

hatók a Met1 kalluszból. Az emésztetlen DNS-t tartalmazó sávokban hibridizációs jelek figyelhetők meg az emésztetlen DNS-nél, mind a Met1, mind a kontrollkalluszból. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a bejuttatott z10 szekvenciák integrálódtak a Met1 kallusz kromoszomális DNS-ébe.

VI. A növények regenerálása és transzgenikus magvak előállítása

A Met1 vonalból és az AB63S kontrollvonalból származó kalluszt RM5 táptalajra visszük, az I. példában leírtak alapján. Miután 14 napig inkubáltuk 26 °C-on, sötétben, a kalluszt az I. példában leírtak szerint R5 táptalajra visszük. A kalluszt 7 napig inkubáljuk sötétben 26 °C-on, majd fényre visszük az I. példában leírtak szerinti körülmények között. 14 napig tartjuk világosban, majd a hajtásokat Meganta dobozokba tesszük át (Sigma Chemical Co.), amelyekben 100 ml R5 táptalaj van. Miután 7–14 napot töltöttek ezen a táptalajon, a hajtásokat 7 napra vermikulitra tesszük, majd földbe, és teljes kifejlétségig felneveljük. Összesen 49 növényt (jelzésük Met1-1-től Met1-49-ig terjed) regenerálunk a Met1 kalluszból, és összesen 25 növényt regenerálunk a kontroll AB63S kalluszból.

A PCR-elemzést levélszövetből származó DNS-mintákon végezzük el, annak igazolására, hogy a Met1 kalluszból regenerált növények megtartották a bejuttatott DNS-t. Ebből a célból hat oligonukleotidból álló csoportot használunk. Ezeknek az oligonukleotidoknak a szekvenciája, orientációjuk és relatív helyzetük a 8. ábrán látható kiméra z27-z10 génkonstrukción belül van összefoglalva a 4. táblázatban.

4. táblázat

I. Az oligonukleotidok neve/pozíciója a Z27-Z10 génben

1.	Z27-5'	nukleotid
2.	Z27-MID	nukleotid
3.	Z27-3'	nukleotid
4.	Z10-5'	nukleotid
5.	Z10-MID	nukleotid
6.	Z10-3'	nukleotid

II. Amplifikált fragmentméretek az oligonukleotidpárokból

A) Endogén vagy kimérageénpárok

(1) + (3)	972 bp
(2) + (3)	476 bp
(4) + (6)	389 bp
(4) + (5)	262 bp

B) Kimérageén-specifikus párok

(1) + (6)	1439 bp
(1) + (5)	1313 bp
(2) + (6)	943 bp
(2) + (5)	816 bp

Az oligonukleotidokat, illetve indítómolekulákat úgy terveztük, hogy az oligonukleotidpárok, amelyek egy z27 oligonukleotidból (Z27-5' vagy Z27-MID) és egy z10 oligonukleotidból állnak (z10-MID vagy z10-3'), használata csak a kiméra z27-z10 génből származó fragment amplifikációját eredményezi, de nem eredményez amplifikációt az endogén kukorica z27 vagy z10 génekből. Az, hogy a PCR-reakciókban a várt méretű amplifikált fragmentek jelentek meg ezeknek a z10-z27 specifikus oligonukleotidpároknak az alkalmazásával, diagnosztikai jelentőségű a kiméra z10-z27 géneknek az adott kallusz vagy növényi DNS-mintában való előfordulása szempontjából.

A z27 oligonukleotidpárok (Z27-5' vagy Z27-MID a Z27-3'-vel) vagy a z10 oligonukleotid párok (a z10-5' a z10-MID-del vagy z10-3'-vel) olyan fragmentek amplifikálódását eredményezte, amelyek a z27 szabályozószekvenciákat vagy z10 kódolószekvenciákat eredményezik a PCR-reakciókban, ha kontroll AB63S kallusz-DNS-t vagy Met1 kallusz-DNS-t vagy pZ27Z10 plazmid-DNS-t használunk templátként. Ezek a reakciók szolgálnak pozitív kontrollként az egy adott kallusz vagy növényi DNS-mintából származó endogén kukorica-génszekvencia amplifikálásakor.

A levél-DNS-t két Met1 R0 növényből állítjuk elő (jelzésük Met1-1 és Met1-2), valamint egy AB63S növényből, az alábbiak szerint. A PCR-reakciókat ezekkel a DNS-mintákkal hajtjuk végre, a HPT-t kódoló szekvenciára, a kiméra z27-z10 génre, a z27 szabályozószekvenciára és a z10 kódolószekvenciára specifikus specifikus oligonukleotidpárokkal. A PCR-reakciótermékek gélelemzése azt mutatta, hogy a várt méretű amplifikációs termékeket kapjuk mindegyik reakcióban, ha a Met1-1 DNS-t és a Met1-2 DNS-t használjuk. A kontroll AB63S DNS negatív eredményt ad a HPT-t kódoló szekvencia és a z27-z10 kimérageén szempontjából, de pozitív eredményt ad az endogén z27 szabályozószekvencia és a z10-et kódoló szekvencia szempontjából. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a vizsgált Met1 R0 növények megtartották a bejuttatott HPT-DNS-t és a kiméra Z27-Z10 DNS-t.

További bizonyítékként, hogy a diagnosztikus jelentőségű z27-z10 PCR-reakciótermékek mind a z27 szabályozószekvenciákat, mind a z10 kódolószekvenciákat tartalmazzák, Southern-blot-analízist végeztünk a PCR-reakciótermékeken. Southern-blot-filtereket készítettünk két, azonos mintákat tartalmazó agarózgélről. A minták a fentiekben ismertetett z27 szabályozószekvenciák, a z10 kódolószekvenciák és a kiméra Z27-z10 szekvenciák amplifikálásából származó PCR-reakciótermékeket tartalmazzák. Az egyik Southern-blotot egy z27 szabályozószekvenciához hibridizáljuk. Az eredmények azt mutatják, hogy a z10 kódolószekvenciából készült próba hibridizálódik a z10-et kódolószekvenciáról készült PCR-reakciók amplifikált fragmentjeihez és a kiméra Z27-Z10 gén PCR-reakcióihoz, de nem hibridizálódik a z27 szabályozószekvencia PCR-reakcióiból származó amplifikált fragmentekhez. Analóg módon, a z27 próba hibridizálódik a z27 szabályozószekvencia PCR-reakcióiból és a Z27-z10 kiméra-

gén PCR-reakcióiból származó amplifikált fragmentekhez, de nem hibridizálódik a z10-et kódoló szekvencia PCR-reakcióiból származó amplifikált fragmentekhez. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a PCR-reakciókban amplifikált fragmentek tartalmazzák a várt génszekvenciákat, és a kiméra Z27-z10 kimérágen diagnosztikus PCR-rel amplifikált termékei mind a z27 szabályozószekvenciákat, mind a z10-et kódoló szekvenciát tartalmazzák.

Az érett Met1 R0 növény szabályozott beporzását beltenyésztett A188, B73, A654 és H99 kukoricavonallakkal végeztük. Emellett számos ön-, illetve rokonbeporzást végeztünk. Összesen 130 beporzást végeztünk, a Met1 R0 növényeket mind pollendonorokként, mind pollenrecipiensekként alkalmazva. Az érett magvakat a beporzás után 45 nappal gyűjtöttük be, majd további 1-2 hétig hagytuk száradni.

Az R1 utódok elemzése

A HPT-szekvencia és a kiméra z27-z10 génnek jelenlétének igazolását az R1 növényi szövetekből származó DNS PCR-elemzésével végeztük el, három R1 utódcsoporthoz.

Az első elemzett R1 utódcsoporthoz a Met1-7 R0 növény négy éretlen címermagja volt. Ezeket a címermagvakat úgy kaptuk, hogy a Met1-7 címeréből fejlődő kukoricahajon végeztünk nyitott beporzást. A beporzás után körülbelül 18 nappal a címermagvakat eltávolítottuk a növényről és a felületükön sterilizáltuk. Az egyes magvakból kivágtuk az endospermiumot, szárastól fagyasztottuk, majd -70°C -ra tettük, amíg DNS-t izoláltunk belőle.

Az egyes magvakból származó embrió R5 táptalajra tettük, és hagytuk kicsírázni. 10 nap elteltével a hajtásokat áttettük vermikulitra, ott 7 napig tartottuk, majd földbe tettük, és hagytuk hogy teljes érettségig felnőjenek. Az egyes endospermiumokból izolált DNS-sel PCR-elemzést végeztünk, a HPT-t kódoló szekvenciára, a kiméra Z27-z10 génre és a kukorica Adh1 génre specifikus oligonukleotidokat használva. A négy endosperma-DNS közül három az összes említett génszekvenciákra pozitívnak bizonyult. A negyedik endosperma-DNS-minta negatív volt a HPT-t kódoló szekvenciára és a Z27-z10 kimérágen-szekvenciára, de pozitív volt az endogén Adh1 szekvenciára. Az eredmények azt mutatták, hogy mind a HPT-szekvencia, mind a kiméra Z27-z10 gén átadódott a Met1-7 R1 utódának.

Hasonló elemzést végeztünk az A654×Met1-1 keresztezésből származó 24 maggal. A beporzás után 24 nappal a magvakat eltávolítottuk a kalászból, és a felületükön sterilizáltuk őket. Az endospermiumokat és az embriókat ez előzőekben leírt módon izoláltuk és kezeltük. Az endosperma-DNS-minták PCR-elemzése azt mutatta, hogy a 24 utódból 9 megörökölte mind a HPT-szekvenciákat, mind a kiméra Z27-z10 gént. A többi 15 utód egyik bejuttatott génszekvenciát sem örökölte. Az R1 utódok harmadik elemzett csoportja a Met1-6 R0 növény önbeporzásával kapott 28 R1 növényből állt. A DNS-mintákat 28 kéthetes hajtás levélszövetéből izoláltuk.

A levél-DNS-minták PCR-elemzése azt mutatta, hogy 24 R1 utód mind a HPT-szekvenciákat, mind a kiméra Z27-z10 géneket hordozza. A többi 4 R1 utód egyik bejuttatott génszekvenciát sem hordozta. Az elemzések eredményeit az 5. táblázatban foglaltuk össze, és ez azt mutatja, hogy a Met1 növények R1 utódjainak jelentős része örökölte a bejuttatott DNS-t.

5. táblázat

A bejuttatott HPT-szekvencia és a kiméra Z10 gén öröklődése a Met1 növények keresztezéseiből származó utódokban

Genotípus	Külső keresztezés (A654×Met1-1)	Önbeporzás (Met1-6)
	Utódok száma	
HPT+/z27z10+	9/24	24/28
HPT+/Z27Z10-	0/24	0/28
HPT-/z27z10+	0/24	0/28
HPT-/Z27Z10-	15/24	4/28

A z27z10+/HPT+ növények és a Z27Z10-/HPT- növények aránya a külső keresztezésből származó populációban megegyezik egyetlen lokusz 1:1 arányú szegregációjával. Emellett, a z27z10+/HPT+ növények és a Z27Z10-/HPT- növények aránya az önbeporzásból származó populációban megegyezik egyetlen lokusz 3:1 arányú szegregációjával. Ezek az adatok a bejuttatott HPT és Z27-z10 szekvenciák kapcsoltságát mutatják.

III. példa

Egy inszekticid fehérjét kódoló rekombináns DNS-t tartalmazó AB12 kalluszvonalból származó termékeny transzgenikus növények

A Bacillus thuringiensis által kódolt fehérjéről kimutatták, hogy számos peszticid alkalmazásban jól használható. A specifikus heterológ Bt-géneket tartalmazó transzgenikus kukoricánövények előállítását megnövelheti a növények rezisztenciáját a specifikus kártevőkkel szemben. A rekombináns Bt-gént tartalmazó termékeny transzgenikus növényeket az I. példában leírtak alapján állítjuk elő, számos kis módosítás alkalmazásával, amint azt az alábbiakban jelezzük.

Ugyanabban az időben, amikor az I. példa kalluszvonalát indítottuk, egy másik kalluszvonalat is indítottunk. Az AB12-t ugyanolyan szülői genotípusú növények külön keresztezésével állítottuk elő (A188×B73). Ez példa igazolja termékeny transzgenikus növények regenerálását egy harmadik kalluszvonalból, az AB11 és az AB63S mellett, valamint azt is igazolja, hogy a termékeny transzgenikus növények előállítása nem az adott kalluszvonalak egyedi tulajdonsága volt.

Az I. példában ismertetett pHYGII plazmidot, valamint a pMS533 plazmidot, amely a Bacillus thuringiensis endotoxin (BT)-gént tartalmazza a neomicin-foszfortranszferáz (NPTII)-génhez fuzionáltatva, használ-

juk a továbbiakban. A fúziós géntől 5' irányban levő pozícióban található a CaMV-gén és a nopalín szintetáz promóter DNS-einek szakaszai. A fúziós géntől 3' irányban található a paradicsom I-es proteázinhibitorának génje valamint a nopalín szintetáz gén poli A régiója.

A kalluszt az I. példában leírtak alapján bombáztuk, azzal a különbséggel, hogy a volfrám/DNS preparátumban használt DNS a pHYGI1 és pMS533 plazmidokat tartalmazta. Egy cső csak öt µl TE puffert (10 mmol/l TRIS-HCl pH=8,0, 1 mmol/l EDTA) tartalmazott.

Az alábbi bombázási kísérleteket végeztük: 11×pHYGI1/pMS533 (potenciális pozitív kezelés) és 3×TE preparátum (kontrollkezelés).

A bombázás után a pYGI1/pMS533 kezelésekből származó kalluszt az 1-es szelekciós körbe tartozó lemezekre tesszük (F táptalaj, 15 mg/l higromicintartalommal), lemezenként tíz darabot. Ugyanazt tesszük a két TE készítménnyel bombázott lemezzel (szelektált kontrollkallusz). Az egyik, TE preparátummal bombázott kalluszlemez higromicint nem tartalmazó F táptalajra tesszük; ezt a kalluszt az egész kísérlet során fenntartjuk, mint a kontrollszövetek forrását (nem szelektált kontrollkallusz).

18 nap elteltével a kalluszt az 1-es kör szelekciós lemezéről a 2-es szelekciós kör lemezeire (60 mg/l higromicint tartalmaz) tesszük át, lemezenként 10 mg-os darabokban. 21 napig tartjuk a 2. szelekciós kör lemezein, ezalatt a kallusz teljesen gátlódott. Az összes kalluszt a 2-es kör szelekciós lemezeiről a 3-as kör szelekciós lemezeire vittük át, amelyek 60 mg/l higromicint tartalmaztak.

A harmadik szelekciós kör lemezein tartottuk 42 napig, ezalatt hat szektor volt megfigyelhető, amelyek a környező nekrotikus szövet mellett szaporodtak, mindegyik a pYGI1/pMS533-mal kezelt anyagból származott. A kalluszvonalakat F táptalajra tettük át.

24 nap elteltével egy kalluszvonal, jele CB2, mutatott lényeges növekedést. Az egyes kalluszvonalakból darabokat vittünk át i) 15 mg/l higromicint tartalmazó F táptalajra, vagy ii) 60 mg/l higromicint tartalmazó táptalajra. A kontrollkalluszt 15 mg/l higromicint tartalmazó F táptalajra szélesztettük.

A hat kalluszvonal közül csak egy, a CB2 volt képes fenntartani a növekedést többszöri átoltás során is 60 mg/L higromicin jelenlétében. Ennek a kallusznak a darabjaiból DNS-t izoláltunk, és a Bt-gén jelenlétét Southern-blot-analízissel igazoltuk.

A DNS-t BamHI és XhoI restrikciós enzimek kombinációjával emésztettük. A BamHI a Bt kódoló szekvencia 5' végén hasít, az XhoI a kódoló szekvencia 3' végén hasít. Egy ³²P-vel jelzett próbát készítettünk az 1,8 kb méretű BamHI/XhoI pMS533 restrikciós fragmentből. A várt 1,8 kb méretű csíkot figyeltük meg hibridizálás és autoradiográfia után. Csík nem volt megfigyelhető a transzformálatlan kallusz DNS-ében.

A CB2-ből növényeket regeneráltunk, majd szabályozott beporzást végeztünk az R1 generáció előállítására, az előzőekben leírt módon. Az R1 növényeket megvizsgáltuk, hogy megtalálható-e bennük a HPT- és a Bt-gének szekvenciája PCR-elemzéssel, valamint enzimatis mérésel megvizsgáltuk a HPT-gén expresszióját is, az I. példában leírtak alapján.

Az I. példában leírtak alapján PCR-elemzést végeztünk az R1 utódok gyökérszövetéből izolált DNS-endonukleáz. Annak ellenőrzésére, hogy minden egyes DNS-minta alkalmas-e a PCR-vizsgálathoz, PCR-elemzést végeztünk a kukorica természetes 10 kD-os zein génjére specifikus indítómolekulákkal. A Bt-gén PCR-elemzéséhez használt indítómolekulák a 35S promóterrel, illetve a Bt-t kódoló szekvenciával voltak komplementerek. A HPT PCR-elemzéséhez használt indítómolekulák ugyanazok, mint amelyeket az I. példában írtunk le. Ennek az elemzésnek az eredményei a 6. táblázatban láthatók. Az eredmények a bejuttatott HPT- és Bt-gének átadását mutatják mind a hímivarú, mind a nőivarú szülőkön keresztül, és a megfigyelt frekvenciák megegyeznek a mendeli frekvenciákkal. Az eredmények illeszkednek ahhoz a feltevéshez, hogy a HPT- és Bt-gének beépültek a kromoszomális DNS-be. Az is kiderült, hogy a HPT- és Bt-gének kapcsolatos öröklődést mutatnak, jelezve, hogy a két gén szorosan egymás mellett, ugyanarra a kromoszómára épült be.

6. táblázat
A CB2 R1 utódainak elemzése

A. Transzgenikus CB2.8XFR4326 Elemzés					Kontroll AB12.7XFR4326 Elemzés				
Növény	10kD PCR	HPT PCR	Bt PCR	HPT ENZ	Növény	10kD PCR	HPT PCR	BT PCR	HPT ENZ
1	+	+	+	+	1	+	–	–	–
2	+	+	+	+	2	+	–	–	–
3	+	–	–	–					
4	+	+	+	+					
5	+	+	+	+					

6. táblázat (folytatás)

A. Transzgenikus CB2.8XFR4326 Elemzés					Kontroll AB12.7XFR4326 Elemzés				
Növény	10kD PCR	HPT PCR	Bt PCR	HPT ENZ	Növény	10kD PCR	HPT PCR	BT PCR	HPT ENZ
6	+	–	–	–					
7	+	+	+	+					
8	+	–	–	–					
9	+	+	+	+					
10	+	–	–	–					

B. Transzgenikus CB2.11×LB101 Elemzés					Kontroll AB12.4×LB101 Elemzés				
Növény	10kD PCR	HPT PCR	Bt PCR	HPT ENZ	Növény	10kD PCR	HPT PCR	BT PCR	HPT ENZ
1	+	–	–	–	1	+	–	–	–
2	+	+	+	+	2	+	–	–	–
3	+	–	–	–					
4	+	+	+	+					
5	+	–	–	–					
6	+	+	+	+					
7	+	–	–	–					
8	+	–	–	–					
9	+	–	–	–					
10	+	–	–	+					

C. Transzgenikus CB2.7xLM1112 Elemzés				Kontroll AB12.5xLM1112 Elemzés			
Növény	10kD PCR	HPT PCR	Bt PCR	Növény	10kD PCR	HPT PCR	BT PCR
1	+	–	–	1	+	–	–
2	+	+	+	2	+	–	–
3	+	–	–				
4	+	–	–				
5	+	+	+				
6	+	+	+				
7	+	+	+				
8	+	+	+				
9	+	–	–				
10	+	–	–				

6. táblázat (folytatás)

D. Transzgenikus FR4326×CB2.9 Elemzés				Kontroll FR4326×AB12.1 Elemzés			
Növény	10kD PCR	HPT PCR	Bt PCR	Növény	10kD PCR	HPT PCR	BT PCR
1		–	–	1	+	–	–
2	+	+	+	2	+	–	–
3	+	+	+				
4	+	+	+				
5	+	+	+				
6	+	–	–				
7	+	+	+				
8	+	+	+				
9	+	–	–				
10	+	–	–				

E. Transzgenikus A188×CB2.1 Elemzés				Kontroll A188×AB12.2 Elemzés			
Növény	10kD PCR	HPT PCR	Bt PCR	Növény	10kD PCR	HPT PCR	BT PCR
1	+	+	+	1	+	–	–
2	+	+	+	2	+	–	–
3	+	+	+				
4	+	–	–				
5	+	+	+				
6	+	–	–				
7	+	+	+				
8	+	+	+				
9	+	–	–				
10	+	–	–				

F. Transzgenikus LM1112×CB2.2 Elemzés				Kontroll LM1112×AB12.6 Elemzés			
Növény	10kD PCR	HPT PCR	Bt PCR	Növény	10kD PCR	HPT PCR	BT PCR
1	+	–	–	1	+	–	–
2	+	–	–	2	+	–	–
3	+	–	–				
4	+	–	–				
5	+	–	–				

6. táblázat (folytatás)

F. Transzgenikus LM1112×CB2.2 Elemzés				Kontroll LM1112×AB12.6 Elemzés			
Növény	10kD PCR	HPT PCR	Bt PCR	Növény	10kD PCR	HPT PCR	BT PCR
6	+	–	–				
7	+	–	–				
8	+	+	+				

IV. példa

Termékeny transzgenikus növények az AB12 kalluszvonalból, amelyek két teljes szexuális cikluson keresztül átadták a rekombináns DNS-t

I. Növényi vonalak és szövettanészetek

Az AB12 kalluszvonalat használtuk, amelyet a III. példában írtunk le.

II. Plazmidok

Az I. példában ismertetett pBII221 és pHYGI1 plazmidokat használtuk.

III. DNS-beviteli módszerek

A kalluszt az I. példa szerint bombáztuk, azzal a különbséggel, hogy a volfrám/DNS preparátumokban használt DNS más volt. Az összes cső 25 µl 50 mg/ml koncentrációjú M–10-es volfrám vizes szuszpenzióját, 25 µl 2,5 mol/l CaCl₂-ot és 10 µl 100 mmol/l spermidint tartalmazott összesen 5 µl 1 mg/ml összplazmidtartalommal. Egy cső csak a pBII221 plazmidot tartalmazta; két cső csak a pYGI1 plazmidot tartalmazta; és egy cső nem tartalmazott plazmidot, csak 5 µl TE puffert.

Az alábbi bombázásokat végeztük: 2×pBII221 preparátum (a tranziens expresszióhoz); 7×pYGI1 preparátum (potenciális pozitív kezelés); és 3×TE preparátum (negatív kontrollkezelés).

Miután az összes bombázást elvégeztük, a pBII221 kezelésből származó kalluszt egy az egyben átvittük F táptalajra, 5 darab 50 mg-os darab formájában. Két nap elteltével a kallusz az I. példában leírtak alapján GUS vizsgáló pufferbe tettük. A tranziens expressziót mutató sejtek számát meghatároztuk (686, illetve 845 GUS pozitív sejt, jelezve, hogy a részecskebejuttatási eljárás lejártszódott a többi bombázott lemezen).

IV. A transzformált kallusz szelekciója

A bombázás után a pYGI1 kezelésből származó kalluszt az 1. szelekciós körbe tartozó lemezekre visszük (ez F táptalaj, 15 mg/ml higromicintartalommal), lemezenként 25 darabot. Ugyanezt elvégezzük a TE preparátummal bombázott másik két lemeze is (szelektált kontrollkallusz). Egy olyan lemezt, amelyen a TE preparátummal bombázott kallusz található, higromicint nem tartalmazó F táptalajra tesszük; ezt a kal-

luszt az egész kísérlet során megtartjuk, mint a kontrollszövet forrását (nem szelektált kallusz).

13 nap elteltével az 1. szelekciós kör lemezein található kallusz nem különböztethető meg a nem szelektált kontrollkallusztól. Az 1. szelekciós kör lemezeiről származó összes kalluszt a 2. szelekciós kör lemezeire tesszük át, amelyek 60 mg/l higromicint tartalmaznak. A lemezek száma körülbelül ötszörösére nőtt.

A 2. szelekciós kör lemezein a kallusz súlya lényegesen megnőtt 23 nap elteltével, de ekkor már közel nekrotikusnak tűnt. A 2. szelekciós körből származó összes kalluszt átvisszük a 3. szelekciós kör lemezeire, amelyek már 60 mg/l higromicint tartalmaznak.

A bombázás után 58 nappal három élő szektor volt megfigyelhető, amely a környező elpusztult szövetek mellett szaporodott. Mind a három vonal a pYGI1 kezelésből származott, jelzésük 24C, 56A, illetve 55A.

Miután 15 napig fenntartó táptalajon tartottuk, a vonalak növekedése volt megfigyelhető. A 24C vonal jól nőtt, míg az 55A és 56A vonalak lassabban nőttek. Mind a három vonalat 60 mg/l F táptalajra vittük át, amely 60 mg/l higromicint tartalmaz. A fenntartó táptalajon levő nem szelektált kalluszból is vittünk át 60 mg/l higromicint tartalmazó F táptalajra.

Miután 19 napot töltött 60 mg/l higromicinen, a 24C vonal növekedése egyáltalán nem gátlódott, míg a kontroll a 24C vonal súlygyarapodásának csak 80%-át mutatta. Az 56C vonal teljesen nekrotikus volt, az 55A vonal pedig nagyon közel állt ahhoz, hogy nekrotikus legyen. A 24C és 55A sejtvonalakat ismét 60 mg/l higromicint tartalmazó F táptalajra vittük át, csakúgy, mint a kontrollszövetet.

23 nap elteltével a 60 mg/ml higromicinen növekedő 24C vonal egyáltalán nem tűnt gátoltnak. Az 55A sejtvonal teljesen elpusztult, csakúgy, mint a második negatív kontrollkallusz, miután másodszor tettük 60 mg/l higromicint tartalmazó F táptalajra.

V. A transzformált kallusz vizsgálata

Southern-blotot készítünk a 24C vonal BamHI restrikciós enzimmel emésztett DNS-éből, majd az I. példában leírtak alapján a HPT-próbával vizsgáltuk át. Amint az a 6. ábráról látható, a 24C-ben a várt 1,05 kb méretnél egy csíkot figyeltünk meg, és ez azt mutatja, hogy a 24C vonal tartalmazza a HPT-t kódoló szekven-

ciát. A kontrollszövetben nem volt megfigyelhető ilyen csík. A 24C kallusvonal a PH2 jelzést kapta ezek után.

Annak igazolására, hogy a higromicingén beépült a nagy molekulású DNS-be, a PH2 kalluszból és a kontrollkalluszból izolált DNS-t a következőképpen kezeltük:

- (i) nincs restrikciós enzim kezelés;
- (ii) BamHI emésztés, az előzőekben leírt módon;
- (iii) PstI emésztés, amivel a HPT-t kódoló szekven-

ciába egyszer belehasítunk a pHYG11 plazmidon.

A mintákat blotoljuk, majd a HPT-t kódoló szekven-
ciával vizsgáljuk meg, az előzőekben leírt módon.
Az emésztetlen PH2 DNS csak a hasítatlan DNS-nél mutatott hibridizálást a próba-DNS-hez, jelezve, hogy a higromicingén beépült a nagy molekulású DNS-be. A BamHI restrikciós enzimmel emésztett PH2 DNS-nél a várt 1,05 kb méretű csíkot kaptuk, amint azt már korábban jeleztük. A PstI restrikciós enzimmel emésztett PH2 DNS esetében egy 5,9 kb méretű csík várható, ha a higromicingén az érintetlen pHYG11 plazmidon található. Kettő vagy több, változó méretű csíkot (méretük függ attól, hogy a pozíciótól, amit a határoló PstI hasítási helyek foglalnak el a gazdaszervezet DNS-ében) várhatunk, ha a gén integrálódott a genomiális DNS-be. Két csíkot figyeltünk meg, amelyeknek hozzávetőleges molekulásúlya 6,0, illetve 3,0 körülbelül. Ezek az adatok meg-
egyeznek azzal, hogy a higromicingén integrálódott a nagy molekulású DNS-be. A kontrollkalluszból származó DNS-nél nem figyelhető meg hibridizáció, egyik fent említett kezelés után sem.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a HPT-t kódoló szekven-
cia nincs jelen a PH2 kalluszban érintetlen pHYG11 vagy egy kis nem kromoszomális plazmid formájában. Az eredmények arra utalnak, hogy a higromicingén beépült a nagy molekulású DNS-be. További Southern-blot-elemzésekkel ki lehet mutatni, hogy a HPT-t kódoló szekven-
cia egybefügg a 35S promoter szekven-
ciával.

VI. Növény regenerálása és magvak előállítása

A PH2 vonalat, a nem szelektált kontrollkallusszal együtt RM5 táptalajra tettük, hogy növényekké regeneráljuk, az I. példában leírtak alapján. 16 nap elteltével a kalluszt R5 táptalajra vittük át, az I. példában leírtak alapján. Miután 25 napig tartottuk R5 táptalajon, a hajtásokat R5 táptalajra vittük át, és 20 napig növesztet-
tük. Ennél a pontnál a hajtásokat vermikulitra vittük át egy hétre, majd földbe ültettük át, ahol szexuális érettségig neveltük őket. A szabályozott beporzást a B73 bel-
tenyésztett vonallal hajtottuk végre.

VII. Az R1 utódok elemzése

A) A PH2 virágpor mint donor

A B73 × PH2.6 keresztezésből származó tíz R1 utód-
növénynek vizsgáltuk a HPT expresszióját mind gyökér-
hosszabbítással, mind az elhervadt levelek expresszió-
jának vizsgálatával. Egy pozitív növényt sikerült azono-
sítani. A HPT-gén jelenlétét a pozitív növényben

Southern-blot segítségével sikerült igazolni, a HPT-pró-
ba alkalmazásával, az I. példában leírtak alapján.

A gyökérhosszabbítási biológiai vizsgálat végrehaj-
tásához a magvakat sterilizáltuk. Kereskedelmi fehérítő-
szer 1:1 arányú vizes hígításával, amely még 0,1%
Alconoxot is tartalmazott, 20 percig kezeltük a magva-
kat 125 ml-es Erlenmeyer-lombikban, majd háromszor
öblítettük steril desztillált vízzel. A magvakat éjszakán
át 50 mg/ml Captant tartalmazó steril vízzel duzzasztot-
tuk, 150/perc fordulatszámmal rázatva.

A duzzasztás után az oldatot leöntjük, majd a magva-
kat lamináris boxokba visszük át (Flow Laboratories),
amelyekben 3 lap desztillált vízzel átitatott csíráztatópapír
van. Egy negyedik, vízzel telített csíráztatópapírt terítünk
a magvakra. A magvakat négy napig hagyjuk csírázni.

Miután a magvak kicsíráztak, a mindegyik hajtás
csíragyökeréből körülbelül 1 cm-t levágunk, majd egy
olyan táptalajra tesszük, amelynek összetétele: MS-
só, 20 g/l szacharóz, 50 mg/l higromicin, 0,25%
Gelrite, és sötétben inkubáljuk 4 napig.

A gyökereket kiértékeljük, azon az alapon, hogy
van-e rajtuk bőséges gyökérször és gyökérelágazás.
A gyökereket transzgenikusnak minősítjük (higromicin-
rezisztens), ha rendelkeznek gyökérszörökkel és gyö-
kérelágazásokkal, illetve nem transzformálódnak (higro-
micin érzékeny), ha korlátozott számú elágazással ren-
delkeznek csak.

Miután a gyökerek csúcsát kivágtuk, az egyik PH2 ka-
lász és az egyik kontrollkalász hajtásait nedves vermi-
kulitra tesszük, és sötétben neveljük öt napig. Ennél a
pontnál, az elhervadt levél vizsgálatának végrehajtásához
1 mm-es darabokat hasítunk ki a sziklevelelvéllyéből,
10 másodpercig a felületén sterilizáljuk, majd a következ-
ő összetételű táptalajra helyezzük: MS alapsók, 20 g/l sza-
charóz, 2,5 g/l Gelrite, 0 (kontroll), illetve 100 mg/l higro-
micint tartalmaz, s 18 óra hosszat sötétben inkubáljuk
26 °C-on. Mindegyik lemez dupla szekciót tartalmazott
az egyes hajtásokból. A lemezeket azután világosan
inkubáljuk (a világítás periódusa: 14 óra világos, 10 óra
sötét) 48 óráig 26 °C-on, majd a levélszövetben található
zöld színt a következő skála alapján értékeljük ki 0: min-
den barna; 6: minden zöld. A hajtásokat nem transzfor-
málódnak (higromicinérzékeny) soroljuk be, ha a besorolá-
suk 0, és transzformálódnak soroljuk be (higromicinrezisz-
tens), ha az értékük három vagy magasabb.

B) A PH2 mint virágpor-befogadó

80, PH2 növényből (PH 2.23 × B73 keresztezés)
származó R1 utódnövényt vizsgáltunk meg a gyökér-
hosszabbítási vizsgálatban, és ezek közül 26 bizonyult
pozitívnak. A HPT-gén expresszióját továbbiakban az-
al is igazoltuk, hogy Flow boxokban mind a 26 hajtást
közvetlenül kitettük higromicint tartalmazó táptalajra.
A rezisztens növények közül kettőt PCR-rel vizsgál-
tunk meg, és a HPT-szekven-
cia jelenlétét igazoltuk.

VIII. Az R2 utódok elemzése

Az R1 transzgenikus növényeket, amelyeknél
PH2 volt a szülői virágpor, érettségig neveljük, majd
egy FR4326 növényt használtunk beporzásra.

Az ebből a keresztezésből származó R2 magvakat kicsíráztattuk, és PCR-rel vizsgáltuk, hogy megvan-e bennük a HPT-szekvencia. A HPT-gén expresszióját a HPT-enzimatis vizsgálat határozta meg, az I. példában leírtak alapján.

A vizsgált 19 utód közül három tartalmazta a HPT-génszekvenciákat, és ugyanakkor expresszáta a HPT-enzimet is. A többi sem a HPT-szekvenciát nem tartalmazta, sem enzimaktivitást nem mutatott. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a virággal át lehet vinni és expresszálatni lehet a genetikailag módosított DNS-t 2 egymást követő generációban is, azaz a gén stabil.

V. példa

A III. példában leírt morzsálékos, embriogén kukoricakallusztényeszetet használjuk.

A pCHN1-1 és pLUC-1 plazmidokat a pBS+ vektorban állítjuk elő (Stratagene, Inc., San Diego, CA), ami egy 3,2 kb méretű plazmid, standard rekombináns DNS-technika alkalmazásával. A pCHN1-1 tartalmazza az *Escherichia coli* higromicin B-foszfotranszferáz (HPT) kódoló szekvenciát (Gritz et al., 1983), amelyet a 3' végén az *Agrobacterium tumefaciens* nopalín szintetáz (nos) poliadenilezési szekvencia határol (Chilton and Barnes, 1983). Az expressziót a karfiol-mozaikvírus (CaMV) 35S promotere szabályozza (Guilley et al., 1982), amely a HPT-t kódoló szekvencia előtt helyezkedik el. Ebben a példában a pBII221 és pHYG11 plazmidokat is használjuk.

A pLUC-1 a szentjánosbogár-luciferáz kódoló szekvenciát tartalmaz (DeWet et al., 1987), amelyet az 5' végén a CaMV 35S promotor, a 3' végén a nos poliadenilezési szignál határol. Ezt a plazmidot kizárólag mint negatív kontroll-DNS-t használjuk. A plazmidokat mikrorészecske-bombázással juttatjuk be az AB12-be. Az I. példában leírtak alapján 21 lemezt készítünk. Az egyik cső csak a pBII221 plazmidot tartalmazza; két cső mind a pHYG11 mind a pBII221 plazmidot tartalmazza; két cső mind a pCHN1-1 mind a pBII221 plazmidot tartalmazza; egy cső csak a pLUC-1 plazmidot tartalmazza. Az elvégzett bombázási kísérleteket a 7. táblázatban foglaljuk össze.

7. táblázat

2 × pBII221 preparátum	A tranziens expresszió frekvenciájának meghatározására
10 × pHYG11/pBII221	Potenciális pozitív kezelés a transzformációhoz
10 × pCHN1-1/pBII221	Potenciális pozitív kezelés a transzformációhoz
4 × pLUC-1	Negatív kontrollkezelés

A két, pBII221 plazmiddal bombázott kallusz lemezen vizsgáltuk a tranziens GUS-expressziót. Meghatároztuk a kék sejtek számát, és megállapítottuk, hogy 291 és 477 tranziens GUS-t expresszáló sejt található a két lemezen, jelezve, hogy a DNS-bejuttatási folyamat lejátszódott a többi bombázott lemezen is.

Közvetlenül azután, hogy az összes mintát bombáztuk, az összes, pHYG11/pBII221, pCHN1-1/pBII221 kezelésnek alávetett lemezről származó kalluszt, valamint a pLUC-1-gyel kezelt lemezek közül háromról a kalluszt az 1. szelekciós kör lemezeire (F táptalaj, amelyben 15 mg/l higromicin B van) visszük át (öt kalluszdarab lemezenként). A pLUC-1-gyel kezelt, negyedik lemezről a kalluszt higromicint nem tartalmazó F táptalajra visszük át. Ezt a szövetet minden 2-3 hétben nem szelektív táptalajra visszük át, és ezt tekintjük nem szelektált kontrollkallusznak.

A szelekció után két héttel mind a kontroll, mind a nem szelektív táptalajon a szövetek lényegében azonosnak látszottak. A pHYG11/pBII221 és a pCHN1-1/pBII221 kezelések nyolc-nyolc lemezéről, valamint a szelektív táptalajon tartott kontrollkallusz két lemezéről az összes kalluszt az 1. szelekciós kör lemezeiről a 2. szelekciós kör lemezeire vittük át, amelyek 60 mg/l higromicint tartalmaztak. A 2. szelekciós kör lemezei lemezenként tíz db 30 mg-os kalluszt tartalmazta, ennek következtében a lemezek összmennyisége megnőtt.

A szelektív táptalajokon megmaradt szövetet – két-két lemez a pHYG11/pBII221 és a pCHN1-1/pBII221 kezelésnek alávetett szövetekből és egy a kontrollkalluszból – GUS vizsgáló pufferbe helyeztük 37 °C-on, abból a célból, hogy meghatározzuk, vajon a sejtek kék csomói megfigyelhetők-e a bombázás után két héttel. Miután 6 napot tartottuk a vizsgálópufferben, a szövetben kiértékeljük a GUS-expressziót. Az eredményeket a 8. táblázatban foglaljuk össze.

8. táblázat

Kezelés	Replikáció	Megfigyelések
pLUC-1		Nincsenek kék sejtek
pHYG11/pBII221	1-es lemez	11 egyedi sejt, egy négysejtes csomó
	2-es lemez	5 egyedi sejt
pCHN1-1/pBII221	1-es lemez	1 egyedi sejt, két kétsejtes csomó
	2-es lemez	5 egyedi sejt, 1 kétsejtes csomó, és 2, 8–10 sejtől álló csomó

A 2-es szelekciós lemezen töltött 21 nap elteltével az anyag összes életképes részét a 3. szelekciós kör lemezeire vittük át, amelyek 60 mg/l higromicint tartalmaznak. A 2. szelekciós kör azon lemezeit, amelyek látszólag elpusztult sejteket tartalmaztak, megőriztük. Mind a 2. mind a 3. szelekciós kör lemezeit periodikusan megfigyeltük, van-e rajtuk szaporodó szektor.

A 3. szelekciós kör lemezein töltött 35 nap elteltével mind a 2. szelekciós kör, mind a 3. szelekciós kör lemezeit átvizsgáltuk, van-e rajtuk életképes kalluszszektor. Két ilyen szektor volt megfigyelhető, amelyek a pHYG11/pBII221 kezelésnek alávetett lemezek

levő elpusztult sejteken mint háttéren növekedtek. Az első, 3AA jelzéssel ellátott szektor a lemezek 3. csoportjából származott, míg a második, PH1 jelű szektor a lemezek 2. csoportjából származott. Mindkét vonalat F táptalajra vittük át, amely nem tartalmazott higromicint.

19 nap elteltével a 3AA vonal nagyon gyengén nőtt a higromicint nem tartalmazó F táptalajon, míg a PH1 vonal gyorsan nőtt. Mindkettőt átoltottuk F táptalajra, és 9 napig ott tartottuk. A 3AA és PH1 vonalakat ezután 15 mg/l higromicint tartalmazó F táptalajra tettük át, és 14 napig tartottuk ott. Ennél a pontnál a 3AA vonalról megfigyelhető volt, hogy nagyon gyengén és lassan nőtt. A PH1 vonal azonban gyorsan nőtt a 15 mg/l higromicint tartalmazó F táptalajon; a vonalat ezután higromicint nem tartalmazó F táptalajra tettük át.

Az F táptalajon töltött 10 nap elteltével a PH1 vonal gátlási vizsgálatát indítottuk el. A PH1 kalluszt 1, 10, 30, 100 és 250 mg/l higromicin B-t tartalmazó F táptalajra tettük át. Mindegyik koncentrációból öt kallusz lemezt készítettünk, és mindegyik lemez körülbelül 50 mg-os kalluszdarabot tartalmazott. A nem szelektált kontrollszövetből egy-egy lemezt készítettünk mindegyik higromicin-koncentrációhoz.

Azt figyeltük meg, hogy a PH1 vonal képes volt növekedni 9 átoltás után is 0, 10, 30, 100 és 250 mg/l higromicinen.

További szektorokat izoláltunk különböző időpontokban a 2. és 3. szelekciós kör lemezeiről. Ezek közül egyik sem volt képes növekedni több átoltást (két-három átoltás) követően higromicin jelenlétében.

Annak igazolására, hogy a PH1 kallusz megszerezte a higromicinrezisztencia-gént, a PH1 kallusznak egy Southern-blotját készítettük el, oly módon hogy a PH1-ből és a nem szelektált kontrollkalluszokból DNS-t izoláltunk, a következő eljárással: 2 g kalluszt lefagyasztottunk folyékony nitrogénben majd finom porrá törtük, a port egy 30 ml-es Oak Ridge csőbe tettük át, amely 6 ml extrakciós puffert tartalmazott (7 mol/l karbamid, 250 mmol/l NaCl, 50 mmol/l TRIS-HCl pH=8,0, 20 mmol/l EDTA pH=9,0, 1% szarkozin). Ehhez adtuk fenol:kloroform 1:1 arányú elegyét, a csövet összeráztuk és 15 percig 37 °C-on inkubáltuk. A mintákat 8000/perc fordulatszámmal centrifugáltuk 10 percig 4 °C-on. A felülúszót miraclothon (speciális, gézszerű szűrőanyag, Calbiochem 475855) pipettáztuk át egyszer használatos 15 ml-es csőbe (American Scientific Products, C3920-15A), amely 1 ml 4,4 mol/l ammónium-acetátot tartalmaz (pH=5,2). 6 ml izopropanolt adtunk hozzá, a csövet összeráztuk, majd a mintákat 15 percig inkubáltuk -20 °C-on. A DNS-t Beckman TJ-6 centrifugában ülepítjük maximális fordulatszámmal, 4 °C-on. A felülúszót elöntjük, majd az üledéket 500 µl TE-10-ben oldjuk (10 mmol/l TRIS-HCl pH=8,0, 10 mmol/l EDTA pH=8,0), és 15 percig szobahőmérsékleten tartjuk. A mintákat azután 1,5 ml-es Eppendorf-csővekbe tesszük át, és 100 µl 4,4 mol/l ammónium-acetátot (pH=5,2) és 700 µl izopropanolt adtunk hozzá. Ezt 15 percig -20 °C-on inkubáltuk, majd a DNS-t 5 percig Eppendorf mikrocentrifugában

ülepítettük (12 000/perc). Az üledéket 70%-os etanollal mostuk, majd TE-1 pufferben (10 mmol/l TRIS-HCl pH=8,0, 1 mmol EDTA), szuszpendáltuk.

10 µg izolált emésztettük BamHI restrikciós enzimmal, majd az I. példában leírtak alapján a HPT-próbával vizsgáltuk át. Amint az a 3. ábráról látható, a PH1 kalluszban a várt 1,05 kb méretnél egy csíkot figyeltünk meg, és ez azt mutatja, hogy a 24C vonal tartalmazza a HPT-t kódoló szekvenciát. A kontrollkalluszban nem volt megfigyelhető ilyen csík.

Annak igazolására, hogy a higromicingén beépült a nagy molekulású DNS-be, a PH1 kalluszból és a kontrollkalluszból izolált DNS-t a következőképpen kezeltük:

15 (i) nincs restrikciós enzim kezelése;
(ii) BamHI emésztés, az előzőekben leírt módon;
(iii) PstI emésztés, amivel a HPT-t kódoló szekvenciába egyszer belehasítunk a pHYGII plazmidon.

20 A mintákat blotoljuk, majd a HPT-t kódoló szekvenciával vizsgáljuk meg, az előzőekben leírt módon.

Az emésztetlen PH1 DNS csak a hasítatlan DNS-nél mutatott hibridizálást a próba-DNS-hez, jelezve, hogy a higromicingén beépült a nagy molekulású DNS-be. A BamHI restrikciós enzimmal emésztett PH1 DNS-nél a várt 1,05 kb méretű csíkot kaptuk, amint azt már korábban jeleztük. A PstI restrikciós enzimmal emésztett PH1 DNS esetében egy 5,9 kb méretű csík várható, ha a higromicingén az érintetlen pHYGII plazmidon található. Kettő vagy több, változó méretű csíkot (méretük függ attól a pozíciótól, amit a határoló PstI hasítási helyek foglalnak el a gazdaszervezet DNS-ében) várhatunk, ha a gén integrálódott a genomális DNS-be. Három csíkot figyeltünk meg, amelyeknek hozzávetőleges molekulásúlya 12, 5,1, illetve 4,9 körülbelül. Ezek az adatok megegyeznek azzal, hogy a higromicingén integrálódott a nagy molekulású DNS-be. A 4,9 kb méretű csík intenzitása körülbelül duplája a másik két csík intenzitásának, jelezve, hogy vagy részleges emésztés történt, vagy a HPT-gén kétszer egymás után beépült a kromoszómába. A kontrollkalluszban a fenti kezelésekkal nem volt megfigyelhető hibridizálás.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a HPT kódoló szekvencia a PH1 kalluszban nem intakt pHYGI1 plazmid vagy kis, nem kromoszomális plazmid formájában van jelen. Ez megegyezik azzal a feltételezéssel, hogy a higromicingén beépült a nagy molekulású DNS-be. A Southern-blot-elemzések igazolták továbbá, hogy a HPT kódoló szekvencia egybefügg a 35S promoter szekvenciával.

50 Az inhibíciós vizsgálatban használt összes higromicin-koncentrációról a PH1 kalluszt RM5 táptalajra visszük át, és az I. példában leírtak alapján regeneráljuk. A PH1 kalluszból összesen 65 növényt kaptunk, míg a kontrollkalluszból összesen 30 növényt kaptunk.

55 Annak igazolására, hogy a bejuttatott DNS-t az R0 növények megtartották a szöveikben, Southern-blotot végeztünk az előzőekben leírt módon, a PH1 három véletlenszerűen kiválasztott R0 növényének BamHI restrikciós enzimmal emésztett levél DNS-én. A blotot a HPT-próbával vizsgáltuk át, az I. példában leírtak alap-

ján. Amint az a 4. ábrán látható, mind a három növény-nél egy 1,05 kb méretű csík figyelhető meg, jelezve, hogy a HPT-t kódoló szekvencia jelen van. Egy kontroll-növényből izolált DNS esetében nem volt csík megfigyelhető.

Az érett PH1 növények szabályozott beporzását standard módszerekkel végeztük, beltenyésztett A188, B73 és Oh43 *Zea mays*-vonalakkal. A magvakat a beporzás után 45 nappal gyűjtöttük be, majd további 1-2 hétig hagytuk száradni.

Az higromicinrezisztencia tulajdonság jelenlétét az R1 utódokban gyökérhosszabbodási vizsgálattal, elhervadt levél vizsgálatával, majd Southern-blottal értékeltük. Az analízishez a regenerált PH1 növényből és a kontrollnövényből is két-két kalászt választottunk ki. Mindegyik kalásznál az A188 beltenyésztett vonal volt a virágpór donor. Az eredmények az 5. ábrán, valamint az alábbi 9. táblázaton láthatók.

A PH1 anyai szülőből származó két R2 utódban a 10 HPT-gén jelenlétét megerősítettük.

9. táblázat
A PH1 R1 növények elemzése

PH1 növény	Gyökér-vizsgálat	Levél-vizsgálat	Blot	Cont. növény	Gyökér-vizsgálat	Levél vizsgálat	Blot
3.1	+	ND	+	4.1	–	ND	ND
3.2	–	ND	–	4.2	–	ND	ND
3.3	–	ND	–	4.3	–	ND	ND
3.4	–	ND	–	4.4	–	ND	ND
3.5	–	ND	–	4.5	–	ND	ND
3.6	+	ND	+	4.6	–	ND	ND
3.7	–	ND	–	4.7	–	ND	ND
				2.1	–	ND	–
10.1	+	+	+	1.1	–	–	–
10.2	+	+	+	1.2	–	–	ND
10.3	–	–	ND	1.3	–	–	ND
10.4	–	–	–	1.4	–	–	ND
10.5	–	–	–	1.5	–	–	ND

9. táblázat (folyt.)
A PH1 R1 növények elemzése

PH1 növény	Gyökér-vizsgálat	Levél-vizsgálat	Blot	Cont. növény	Gyökér-vizsgálat	Levél-vizsgálat	Blot
10.6	–	–	–	1.6	–	–	ND
10.7	–	–	–	1.7	–	–	ND
10.8	ND	+	+	1.8	–	–	ND

Magyarázat: + =transzgenikus; – =nemtranszgenikus; ND=nincs kísérlet

A PH1.3.1 növényt (lásd 9. táblázat) Oh43 virágpórporoztuk be. Az ebből a keresztezésből származó kilenc magvat kicsíráztattuk, négy utódnövénynek a leveleiből DNS-t izoláltunk, és Southern-blottal analizáltuk, a HPT-t kódoló gént használva próbaként. A vizsgált négy növény közül kettő nagy kópiaszámban tartalmazta a HPT-t kódoló szekvenciát. Jóllehet a HPT-gén két növényben jelen volt, mégsem lehetett a gén expresszióját kimutatni a hervadt levél biológiai vizsgálatával.

A PH1.10.8 növényt (9. táblázat) használtuk a B73 beporzására, valamint önbeporzást is végeztünk. A másik partnerrel végzett keresztezés utódaiból ötvenet vizsgáltunk le mind gyökér-, mind levélelemzéssel,

hogy expresszálja-e a HPT-t. Expresszió nem volt kimutatható. Hasonlóképpen, nyolc utódnak a DNS-et Southern-blottal megvizsgálva nem lehetett a HPT-gén jelenlétét kimutatni. Az önbeporzásból származó utódoknál kilenc utód levelében nem lehetett kimutatni a gén jelenlétét, illetve Southern-blottal sem, ezek közül négy növényben.

A rekombináns DNS-ről kimutattuk, hogy az utódok csak akkor öröklők, ha a transzgenikus növényt (mind az R0-át, mind az R1-et) használtuk nőivarú szülőként. Ez azt sugallja, hogy a PH1 rekombináns DNS anyai úton öröklődik át.

Az összes idézett publikációt és szabadalmi dokumentumot referenciaként idéztük. A találmányt külön-

bőző specifikus és előnyös megvalósítási módra való hivatkozással írtuk le. Az azonban nyilvánvaló, hogy számos módosítás tehető anélkül, hogy eltérnénk a találmány szellemétől és oltalmi körétől.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás termékeny, transzgenikus *Zea mays*-növény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

a *Zea mays*-növény genomjához érintetlen, regenerálható *Zea mays*-sejtek mikrorészecske-bombázásával DHDP-szintáz vagy mag-tartalékfehérjét kódoló, izolált, heterológ DNS-konstrukciót adunk hozzá, és

szelektáljuk azokat a transzgenikus növényeket és/vagy adott esetben bármely generációba tartozó utódnövényeket, amelyekben a DNS-konstrukció expresszáldása következtében a transzgenikus növény egy vagy több olyan fenotípusos jellemzőt mutat, amely lehetővé teszi azonosítását a megfelelő nemtranszformált, tehát a DNS-konstrukciót nem tartalmazó növényvel szemben, és a DNS-konstrukció a transzgenikus *Zea mays*-növény teljes normális szexuális ciklusán keresztül továbbadódik a következő generációnak.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy heterológ DNS-konstrukcióként promotert is tartalmazó DNS-konstrukciót alkalmazunk.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy heterológ DNS-konstrukcióként körülbelül 30 kilobázisnál rövidebb DNS-konstrukciót alkalmazunk.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a DNS-konstrukciót az alábbi *Zea mays*-növények bármelyikének genomjához adjuk hozzá: takarmánykukorica („field corn”), pattogatni való kukorica („popcorn”), csemegekukorica („sweet corn”), keménymagvú kukorica („flint corn”) vagy lófogú kukorica („dent corn”).

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy heterológ DNS-konstrukcióként növényből izolált vagy onnan származó DNS-t nem tartalmazó heterológ DNS-konstrukciót alkalmazunk.

6. Az 1–5. igénypont szerinti eljárások bármelyike, *azzal jellemezve*, hogy a heterológ DNS-konstrukciót expresszálo, a fenotípusos jellemzőket mutató bármely generációba tartozó utódnövényt állítunk elő.

7. Az 1–6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a *Zea mays*-növény genomjához egy, promotert és *Zea mays* magjának tartalékfehérjét a promotor által irányítottan kódoló régiót tartalmazó, izolált heterológ DNS-konstrukciót adunk, és a DNS-konstrukció által kódolt magi tartalékfehérje expresszáltatásával egy magi tartalékfehérje aminosavmennyiségét a transzgenikus növények magvaiban jelentősen megnöveljük olyan *Zea mays*-növényi magvakban meglevő mennyiséghez képest, amelyek csupán a DNS-konstrukció hiányában különböznek a transzgenikus *Zea mays*-növények magvaitól.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a mag tartalékfehérjeként a 10 kD méretű zein fe-

hérjét alkalmazzuk, amelynek expresszáltatásával a növény teljes magbéli metioninszintjét számottevően megnöveljük a transzgenikus *Zea mays*-növénytől csupán a DNS-konstrukció hiányában különböző, megfelelő *Zea mays*-növény magbéli metioninszintjéhez képest.

9. A 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy előre kiválasztott DNS-konstrukcióként szelekciós markergént vagy riportergént tartalmazó és azt expresszálni képes DNS-konstrukciót alkalmazunk.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy DNS-konstrukcióként az alábbi vegyületek bármelyike ellen rezisztenciát vagy toleranciát biztosító szelekciós markergént tartalmazó DNS-konstrukciót alkalmazunk: kanamicin, G418, 2,2-diklóropionsav, neomicin, „sethoxydim”, „haloxyfop”, foszfotricin, glifozát, metotrexát, imidazolinon-herbicidek, szulfonilkarbamid-herbicidek, triazolopirimidin-herbicidek, s-triazin-herbicidek és bromoxinil.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szelekciós markergéntként hygromicin ellen rezisztenciát vagy toleranciát biztosító markergént alkalmazunk.

12. A 9. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy előre kiválasztott DNS-konstrukcióként riportergént tartalmazó és azt expresszálni képes DNS-konstrukciót alkalmazunk.

13. A 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy promoterként *Zea mays*-növényből izolált promotert alkalmazunk.

14. A 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy előre kiválasztott DNS-konstrukcióként kiméra DNS-konstrukciót alkalmazunk.

15. A 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy aminosavként metionin aminosavszintjét növeljük meg.

16. Eljárás transzgenikus *Zea mays* utódnövény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az 1. igénypont szerinti eljárással előállított növénynek egy másik *Zea mays*-növényvel való keresztezése útján egy, a DNS-konstrukciót expresszálo transzgenikus *Zea mays* utódnövényt állítunk elő.

17. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a termékeny, transzgenikus *Zea mays*-növényt transzformált embriogén szövetből regeneráljuk.

18. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy éretlen embriókból származó sejteket bombázunk.

19. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy morzsalékos embriogén kalluszból származó sejteket bombázunk.

20. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a bármely generációba tartozó utódot a termékeny, transzgenikus növénynek egy beltenyésztett vonallal végzett keresztezésével állítjuk elő.

21. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a bármely generációba tartozó utódnövényből magokat nyerünk és a magból a DNS-t tartalmazó újabb utódnövényeket állítunk elő.

22. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a bármely generációba tartozó utódot a bel-

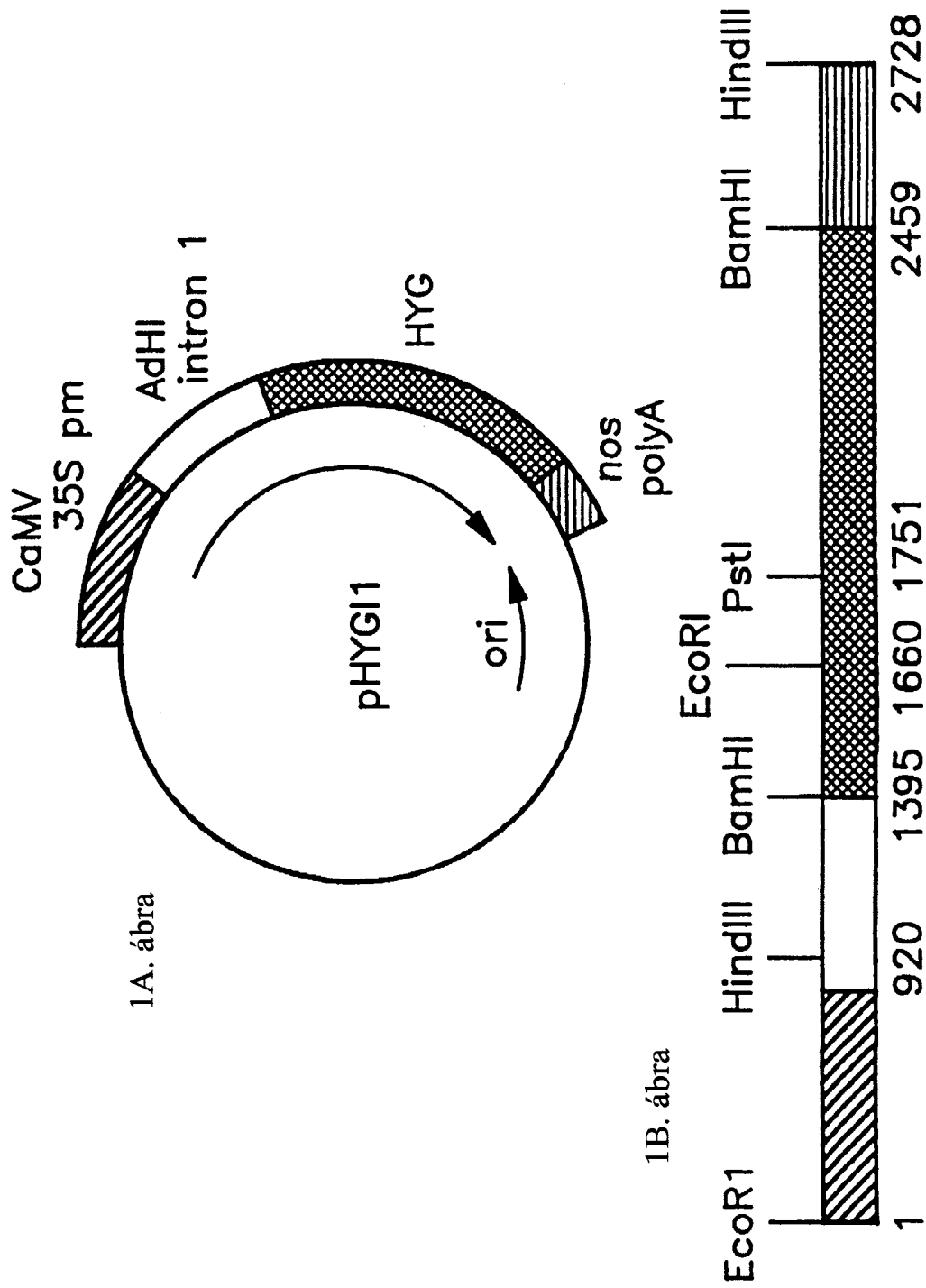
tenyésztett vonallal visszakeresztjük, amivel újabb, a DNS-t tartalmazó, bármely generációba tartozó utódot állítunk elő.

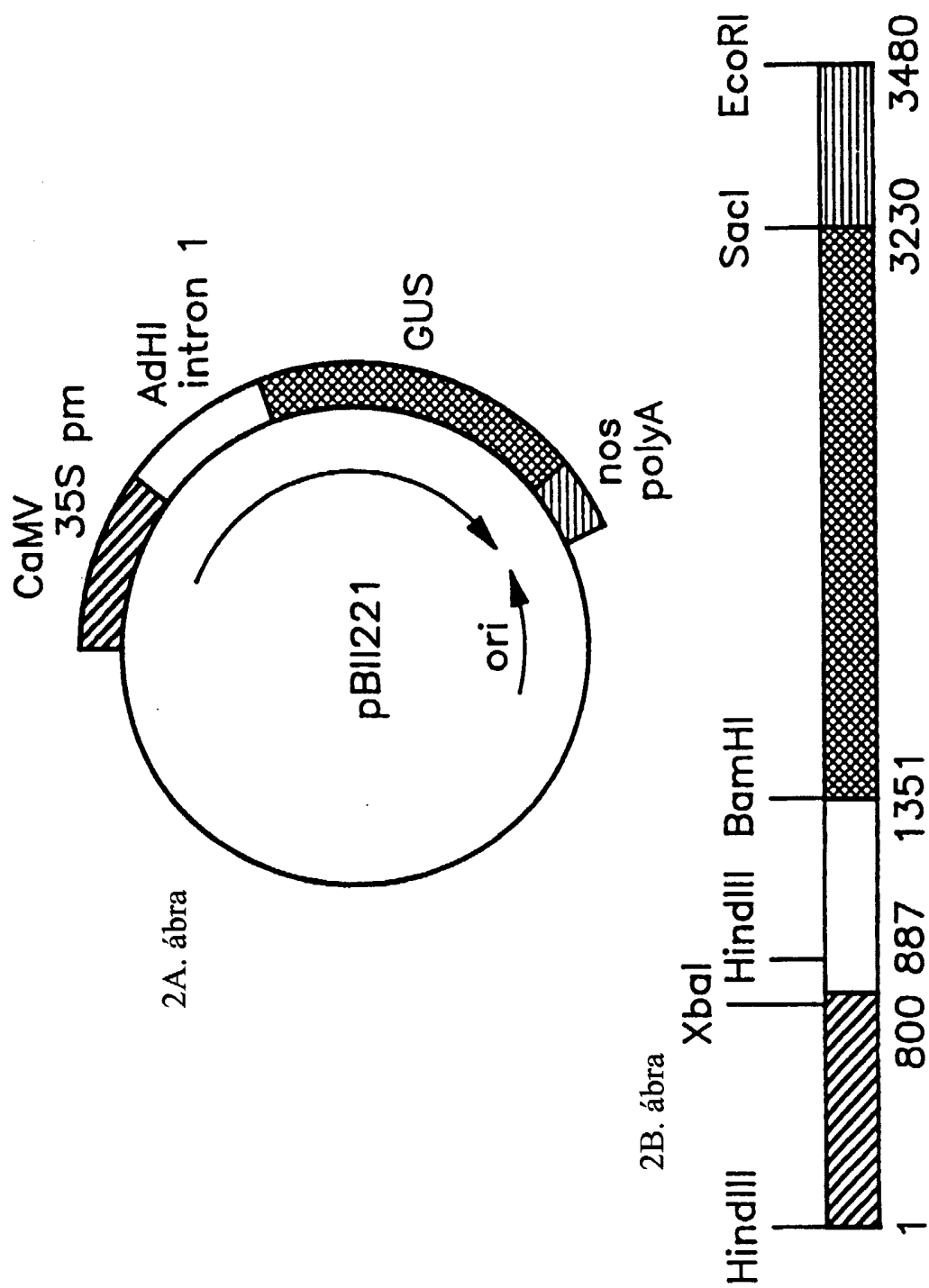
23. A 21. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az újabb utódnövényből mago/ka/t nyerünk és a mag/ok/ból a DNS-t tartalmazó növényt nevelünk.

5

24. A 22. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az újabb utódnövényt a beltenyésztett vonallal visszakeresztjük, amivel a DNS-t tartalmazó bármely generációba tartozó utódot állítunk elő.

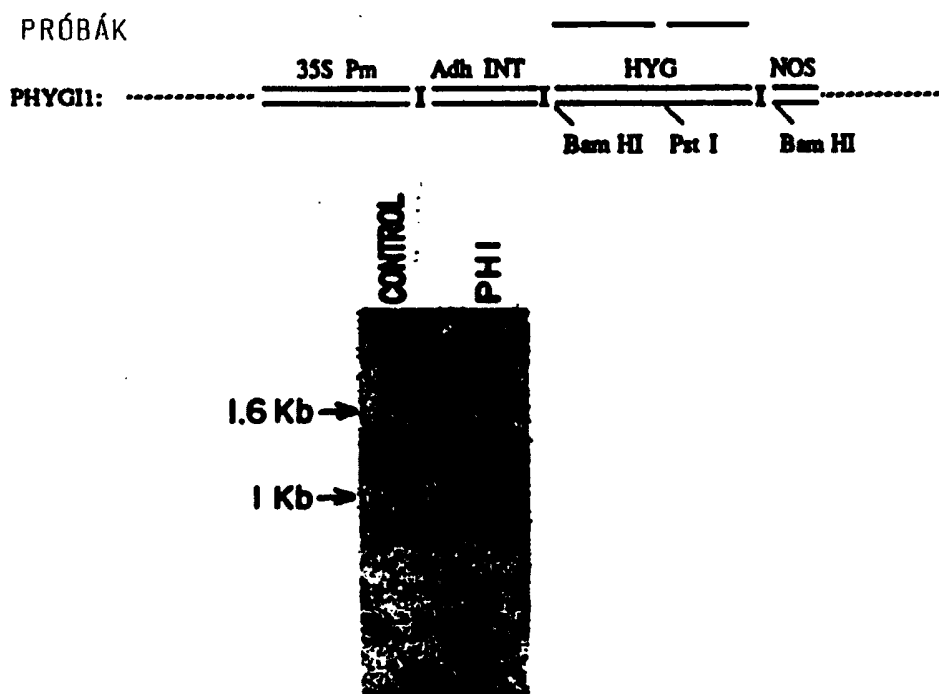
25. Az 1–24. igénypontok szerinti eljárások bármelyike, *azzal jellemezve*, hogy bármely generációba tartozó utódnövényt állítunk elő.





3. ábra

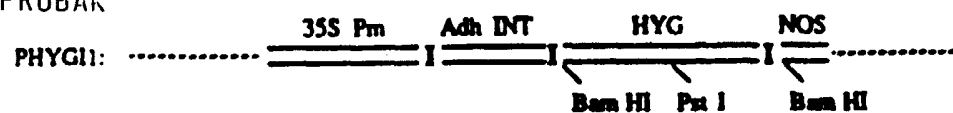
PHI KALLUSZ



4. ábra

PHI RO NÖVÉNYEK

PRÓBÁK



PHI.1
PHI.7
PHI.24
CONTROL

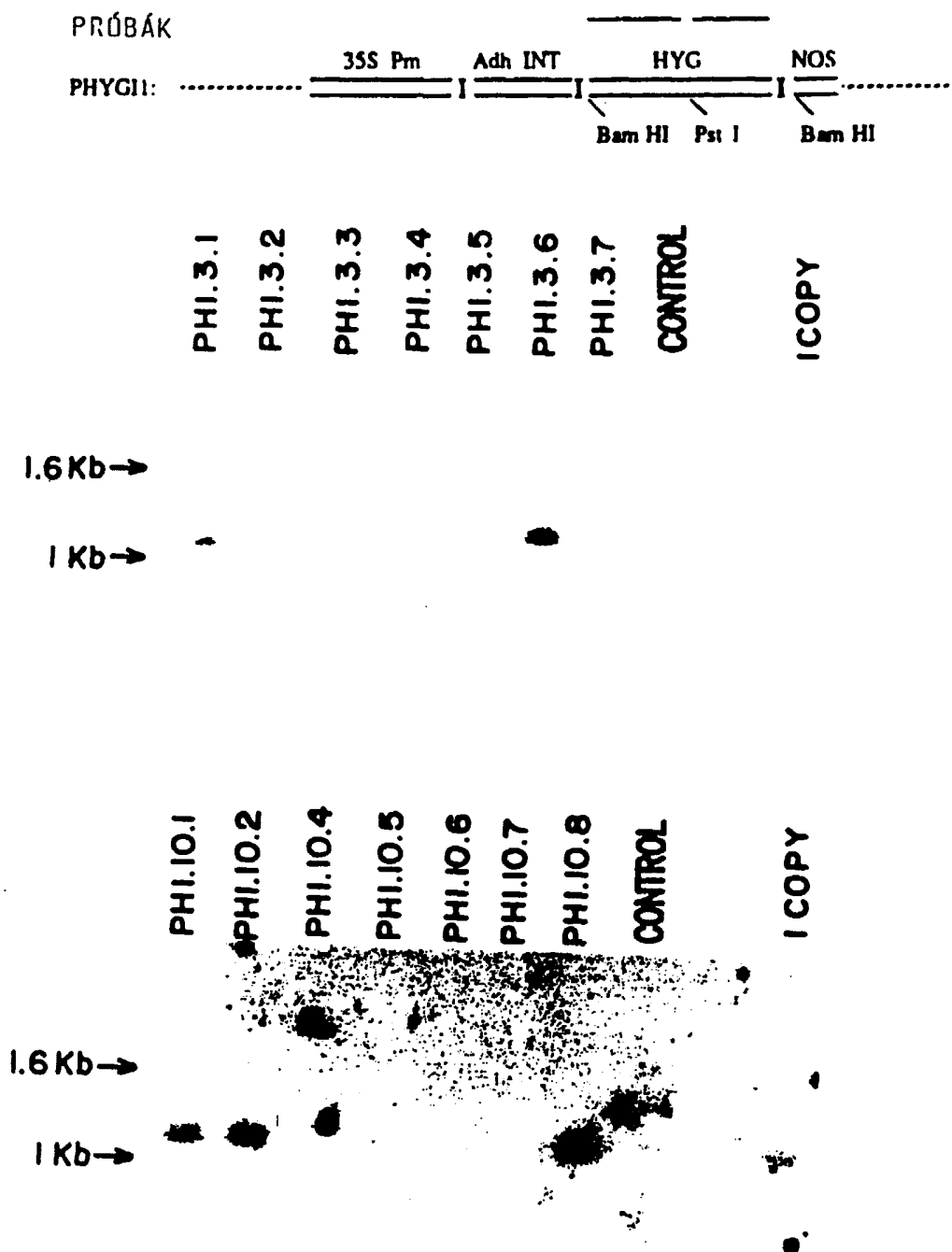
1.6Kb →

1Kb →



5. ábra

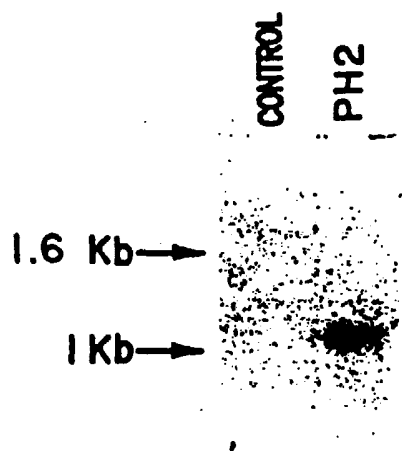
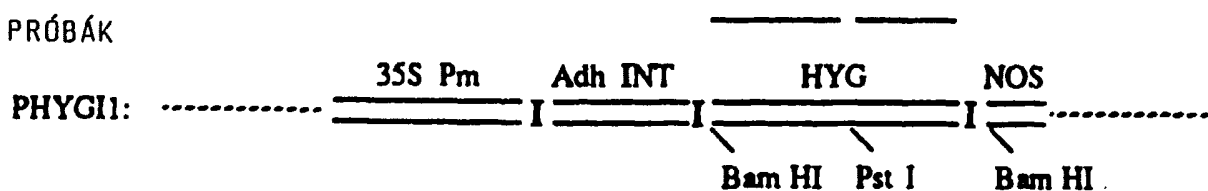
PHI R₁ GENERÁCIÓ



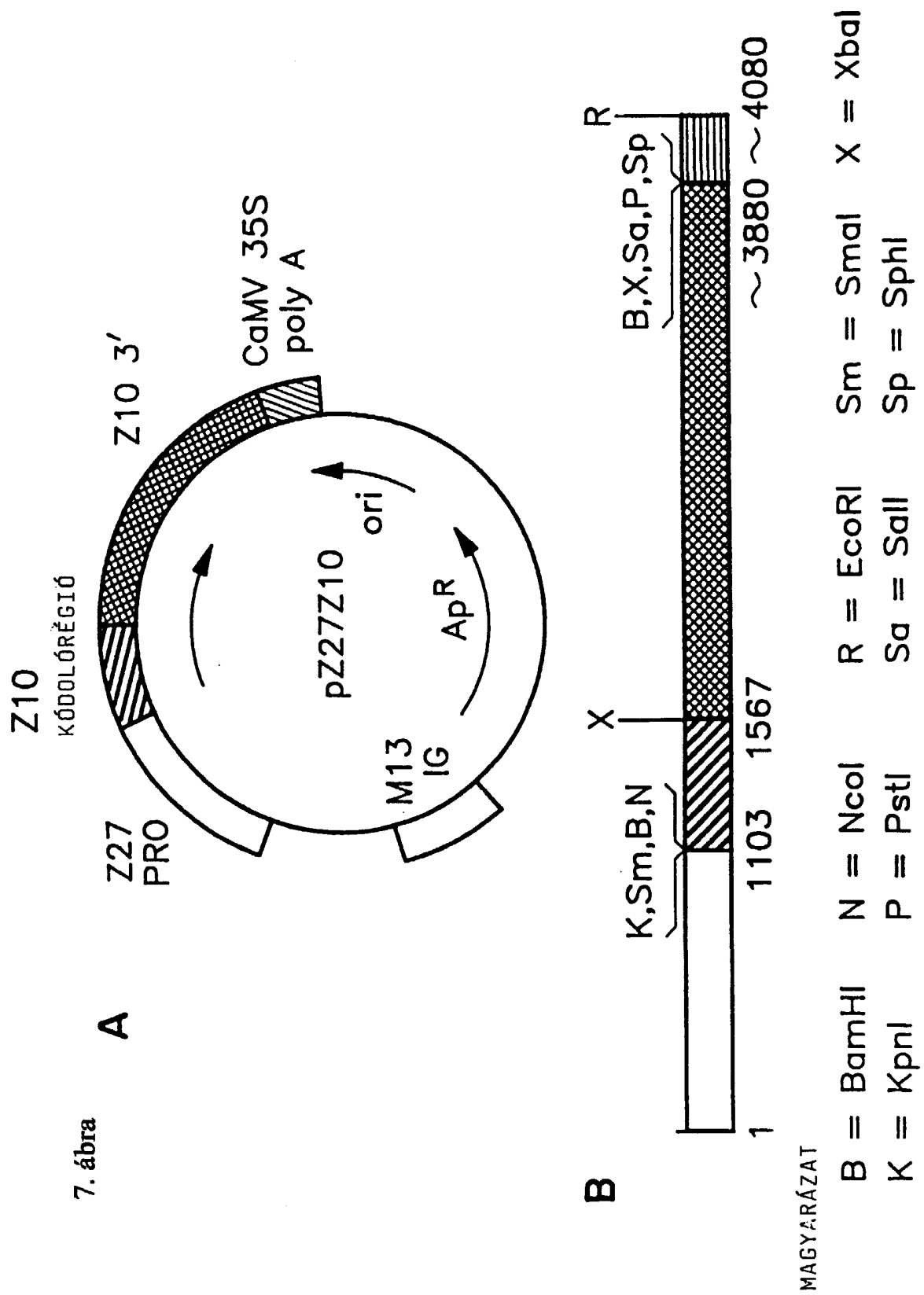
6. ábra

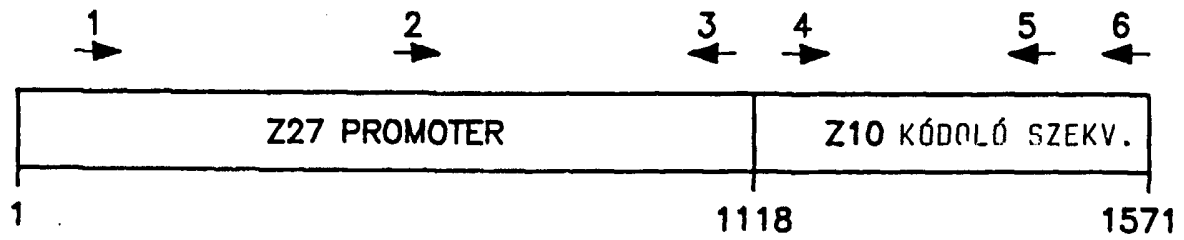
PH2 KALLUSZ

PRÓBÁK



7. ábra





8. ábra