

**Doktori (Ph.D.) értekezés**



**A SZŐLŐ MOLEKULÁRIS NEMESÍTÉSE HASZNOS  
GÉNKONSTRUKCIÓK FELHASZNÁLÁSÁVAL**

**Zok Anikó**

Kertészettudományi Doktori Iskola

Budapesti Corvinus Egyetem  
Genetika és Növénynevelés Tanszék

Budapest

2013

**A doktori iskola**

**megnevezése:** Kertészettudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Növénytermesztési és kertészeti tudományok

**vezetője:** Dr. Tóth Magdolna  
egyetemi tanár, DSc

BCE, Kertészettudományi Kar,  
Gyümölcsstermő Növények Tanszék

**Témavezetők:** Dr. Pedryc Andrzej  
egyetemi tanár, DSc

Dr. Oláh Róbert  
egyetemi docens, PhD

BCE, Kertészettudományi Kar  
Genetika és Növénynevelés Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....  
Dr. Tóth Magdolna

.....  
Dr. Pedryc Andrzej

.....  
Dr. Oláh Róbert

**A doktori iskola-vezető  
jóváhagyása**

**A témavezetők jóváhagyása**

**A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának  
2012.12.04.-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló  
Bizottságot jelölte ki:**

**BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:**

**Elnöke**

**Palkovics László, DSc**

**Tagjai**

**Kozma Pál, CSc**

**Kocsis László, DSc**

**Korbuly János, PhD**

**Deák Tamás, PhD**

**Opponensek**

**Mészáros Annamária, PhD**

**Bisztray György, PhD**

**Titkár**

**Deák Tamás, PhD**

# Tartalomjegyzék

1. FELHASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK.....	6
2. BEVEZETÉS .....	7
3. CÉLKITŰZÉS.....	9
4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	11
4.1. A regenerációs módszerek történeti áttekintése .....	11
4.1.1. Organogenezis.....	11
4.1.2. Szomatikus embriogenezis.....	12
4.2. A szőlőregenerációs kísérletek eredményei.....	13
4.3. A növénytranszformációs módszerek.....	17
4.4. Az <i>Agrobacterium</i> mint transzformációs vektor .....	20
4.5. A szőlő genetikai transzformációjának eredményei.....	24
4.6. A növényi stressztűrőképesség fokozásának lehetőségei .....	26
4.7. <i>Agrobacterium</i> rezisztens transzgenikus növények.....	30
4.8. Az <i>in vitro</i> körülmények és az akklimatizáció hatékonysága közötti összefüggések.....	35
5. ANYAG ÉS MÓDSZER .....	37
5.1. Felhasznált anyagok .....	37
5.1.1. Felhasznált növények .....	37
5.1.2. Felhasznált transzformációs vektorok .....	37
5.1.3. A transzformációs vektorok ismertetése.....	37
5.2. Alkalmazott módszerek .....	40
5.2.1. Embriogén kallusz indukció .....	40
5.2.2. Az embriogén kallusz felszaporítása .....	43
5.2.3. Szomatikus embrió indukció és növényregeneráció .....	44
5.2.3.1. A növényregenerációs kísérletek optimalizálása .....	44
5.2.4. Szőlő direkt organogenezis .....	44
5.2.5. Szőlőtranszformáció .....	45
5.2.5.1. Embrió fejlődés indukálása és agrobaktériumos kezelés .....	45
5.2.5.2. Az <i>Agrobacterium</i> előlése .....	46



5.2.5.3. Növényregeneráció szelekciós táptalajon.....	46
5.2.5.4. A szőlőtranszformáció az <i>MsFerr</i> , <i>iaaM</i> és <i>virE1</i> gének felhasználásával .....	46
5.2.5.5. A transzformációs kísérletek optimalizálása .....	47
5.2.6. Akklimatizációs kísérletek.....	48
5.2.7. A beépített DNS jelenlétének ellenőrzése PCR analízissel .....	50
5.2.8. A transzformánsok oxidatív stressztűrő képességének vizsgálata .....	52
5.2.9. <i>Agrobacterium</i> rezisztencia vizsgálatok .....	54
6. EREDMÉNYEK.....	56
6.1. Embriogén kallusz indukálása portokon.....	56
6.2. Embriogén kallusz felszaporítása .....	58
6.3. Növényregeneráció embriogén kalluszból.....	60
6.3.1. A növényregeneráció hatékonyságának optimalizálása .....	60
6.4. Direkt organogenezis .....	62
6.5. Szőlőtranszformáció .....	63
6.5.1. A transzformációs kísérletek optimalizálása .....	65
6.6. Az akklimatizációs kísérletek eredményei.....	67
6.7. PCR-analízis.....	72
6.8. A transzformánsok oxidatív stressztűrő képességének tesztelése .....	75
6.9. <i>Agrobacterium</i> rezisztencia vizsgálatok .....	78
6.10. Új tudományos eredmények.....	82
7. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA.....	83
8. ÖSSZEFOGLALÁS .....	88
9. SUMMARY .....	90
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	92
11. IRODALOMJEGYZÉK.....	93

## 1. FELHASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK

2,4-D	2,4-diklórfenoxi-ecetsav
BA	benzil-adenin
CaMV	karfiol mozaik vírus
CP	Cheé és Pool (1987) által leírt táptalaj
DTE	dithioerythritol
GA	gibberrelinsav
<i>gus</i>	$\beta$ -glükoronidáz gén
IAA	indol-3-ecetsav
<i>iaaH</i>	indol-3-acetamid hidroláz gén
<i>iaaM</i>	triptofán-monooxygenáz gén
<i>ipt</i>	AMP-izopentenil transzferáz gén
MS	Murashige és Skoog (1962) alap táptalaj
<i>MsFerr</i>	lucerna ( <i>Medicago sativa</i> ) ferritin gén
NN	Nitsch és Nitsch (1969) által leírt táptalaj
NOA	naftoxi-ecetsav
<i>nos</i>	nopalin-szintáz gén
<i>nptII</i>	neomycin-foszfo-transzferáz gén
PTGS	poszttranszkripcionális génelhallgattatás
TDZ	thidiazuron { 1-phenyl-3-(1,2,3-thidiazol-5-yl)-urea }

## 2. BEVEZETÉS

A szőlő világszerte jelentős gazdasági növény, mind maga a gyümölcs, mind pedig a borfogyasztás szempontjából. Becslések szerint Európában 4 millió hektáron folyik szőlőtermesztés, a megtermelt mennyiség pedig 2009-ben elérte a 27 millió tonnát (FAO statistics, <http://faostat.fao.org>). A szőlő a mezőgazdaság erősen környezetszennyező kultúrái közé tartozik a felhasznált növényvédőszer mennyisége miatt. A 19. század második felében az Amerikából Európába bekerült lisztharmat és peronoszpóra ma is a legnagyobb fenyegetést jelenti a világ szőlőtermesztésére, amely megköveteli a fungicidek folyamatos használatát. Az anyagi ráfordítás, a környezeti terhelés és ezzel együtt egészségünk védelme érdekében is a rezisztens fajták termesztése jelenthet egy kedvezőbb megoldást a szőlő növényvédelmében. A gombabetegségeken kívül jelentős károkat okozó *Agrobacterium vitis*, illetve a szőlő vírusos betegségei ellen pedig nincs is hatékony növényvédelmi kezelés. A szőlőültetvényekben levő tőkék a különböző gomba-, baktérium-, és vírusfertőzéseken kívül számos abiotikus környezeti stresszhatásnak vannak kitéve; ilyenek a magas fényintenzitás, ultraibolya B sugárzás, magas fémion koncentráció, magas vagy alacsony hőmérséklet, vízhiány, víztöbblet és sebzés. A különböző stresszhatások jelentősen befolyásolják a növények növekedését, produktivitását; és különböző morfológiai, fiziológiai, biokémiai és molekuláris változásokat eredményezhetnek.

A súlyosbodó környezeti problémák következtében egyre nagyobb teret nyertek a stresszélettani kutatások, melyek során fény derült arra is, hogy számos, meglehetősen különböző életfolyamatokat befolyásoló stressztényező hatása közös folyamatokra vezethető vissza. Ilyen általános stresszreakció az oxigénanyagcsere zavara következtében kialakuló különböző mértékben redukálódott aktív oxigénformák sejten belüli felhalmozódása, melyek károsító hatása olykor jelentősebb, mint az adott abiogén stressztényező egyéb hatásai.

A Budapesti Corvinus Egyetem Genetika és Növénynemesítés Tanszékén több mint harminc éve kezdődött meg a biotikus és abiotikus stresszel szemben ellenálló rezisztens szőlőfajták keresztezéses nemesítése. Az előállított fajták (pl. 'Kunleány', 'Kunbarát') a magyar szőlőtermesztésben jelentős szerepet játszottak, míg az új bor-, és csemegeszőlő fajtákat és fajtajelölteket jelenleg értékeli a piac (pl. 'Orpheus', 'Taurus'). Napjainkban egyre nagyobb figyelem irányul a molekuláris nemesítési módszerekre, a vélemények

pedig a növénynemesítés e lehetőségeiről megoszlanak. A társadalom megfelelő tájékoztatásával és a kutatómunka felelősségteljes végzésével az aggályok eloszlathatók. Erre azért is szükség van, mert a hagyományos keresztezéses nemesítési eljárásokhoz képest kevésbé időigényes technológiákkal állíthatók elő olyan új genotípusok, amelyek akár csak egyetlen tulajdonságban különböznek a kiindulási fajtától. A szőlő esetében különös figyelmet érdemel ez a nemesítési módszer, mivel a hagyományos nemesítési munka során egy új szőlőfajta piacra kerülése akár húsz évet is igénybe vehet. Figyelembe kell venni azt is, hogy egy új szőlőfajtának, akármilyen értékes tulajdonságokkal rendelkezzen is hagyományos társaihoz képest, kevés esélye lenne az elterjedésre a borfogyasztást meghatározó konzervativizmus, valamint a világfajták piacmeghatározó szerepe miatt. Ezért inkább az tűzhető ki célul, hogy az alapfajtától csak egyetlen tulajdonságban különböző fajtaváltozatokat hozzunk létre, amelyek jól alkalmazkodnak a különféle termesztési helyekhez, körülményekhez.

Az 1863-ban Amerikából behurcolt filoxérának köszönhetően vált szükségessé és terjedt el az oltás gyakorlata a szőlőtermesztésben. Az oltványelőállítás során felhasznált alanyok fokozottan ki vannak téve a különböző abiotikus stresszhatásoknak az árutermelő ültetvényekben, ezért az alanyfajták genetikai módosítása egy megfelelő alternatíva lehet az oxidatív stressz rezisztencianemesítésben. Az alanyhatásnak köszönhetően pedig a nemes fajták stressztűrőképessége is fokozható.

A hasznos génekkel végzett transzformációs kísérletek a GM növények előállításán túl sokat segíthetnek a szőlő genom megismerésében, ezáltal közvetett módon támogatják a nemesítést is. Napjainkban a genetikai transzformáció a növényi funkcionális genomikai kutatás egyik kulcsmódszerévé vált, ami izolált gének beépítését és így transzgénikus növények előállítását jelenti. A Budapesti Corvinus Egyetem Genetika és Növénynemesítés Tanszékén bizonyos szőlőfajták esetében rendelkezésre állnak a feltételek transzgénikus növények előállításához, lehetővé téve a genetikai kutatások legújabb eredményeinek hasznosítását a gyakorlatban szoros együttműködésben más hazai kutatóintézetekkel.

### 3. CÉLKITŰZÉS

A Budapesti Corvinus Egyetem Genetika és Növénynevelés Tanszékén az elmúlt években számos fajtára dolgoztak ki növényregenerációs eljárást és a Tanszéken optimalizált transzformációs rendszert felhasználva modell génekkel transzformált növényeket állítottak elő. E munka folytatásaként, az eddigi eredményeket hasznosítva, hosszabb távon a gyakorlat számára is hasznosítható génekkel módosított növényeket kívántunk előállítani. A dolgozat alapjául szolgáló kísérletek során a fő célunk az volt, hogy *Agrobacterium* vektor felhasználásával hozzunk létre *Agrobacterium* rezisztens, illetve növelt oxidatív stressz ellenállóságot mutató szőlő növényeket. A kitűzött cél eléréséhez szükséges munkát több szakaszra osztottuk fel.

Első lépésben a genetikai transzformációhoz elengedhetetlen szőlő regenerációs rendszerek továbbfejlesztését kívántuk megvalósítani. Munkánkat mind az organogenezis mind a szomatikus embriogenezis területén terveztük elvégezni, szomatikus embriogenezis esetében a fajták és genotípusok széles körén, különös tekintettel a Tanszékünkön előállított fajtákra. Kutatásaimhoz nagy segítséget nyújtott, hogy a Budapesti Corvinus Egyetem Genetika és Növénynevelés Tanszékének munkatársai rendelkezésemre bocsátották a 'Richter 110' szőlő alanyfajta embriogén sejttenyészeteit, így tapasztalatokat szerezhettem a szőlő embriogén sejttenyészetek felszaporításáról és a szomatikus embriogenezisen keresztül történő növényregenerációról.

Második lépésben célunk volt a szőlő genetikai transzformáció körülményeinek optimalizálása azáltal, hogy a transzformációs kísérletekhez felhasznált embriogén anyagot homogenizáljuk és a folyamatos szelekciós nyomás mellett fenntartott feltételezhetően transzformáns szomatikus embriók regenerációs hatékonyságát növeljük, valamint a regenerációs idő hosszát lerövidítsük.

Harmadik lépésben a hatékony regenerációs és transzformációs technikákat a szőlőtermesztési gyakorlat számára is hasznos információkkal szolgáló génkonstrukciók felhasználásával a következő területeken kívántuk hasznosítani: a szőlő oxidatív stressztűrő képességének növelése lucerna ferritint termelő növények előállításával, illetve *Agrobacterium* rezisztens növények előállítása az *A. tumefaciens virE1* génjének expresszáltatásával, valamint a géncsendesítés mechanizmusával.

A tanszékünkön alkalmazott akklimatizációs eljárás a transzformált szőlő növények esetében nem működött megfelelő hatékonysággal, ezért a Budapesti Corvinus Egyetem

Szőlészeti és Borászati Kutató Intézetével (Kecskemét) együttműködve különböző kísérleteket végeztünk el annak érdekében, hogy a transzformált és mikroszaporított szőlő növények edzését és üvegházba történő kiültetését hatékonyabbá tegyük.

Utolsó lépésben pedig a 'Pegazus', 'Csépi muskotály', 'Borostyán', 'Odysseus', 'Orpheus', 'Taurus', 'Korai bíbor' és 'Pannon frankos' tanszéki nemesítésű fajták különböző *Agrobacterium* törzsekkel szembeni ellenállóságát kívántuk tesztelni a Budapesti Corvinus Egyetem Szőlészeti és Borászati Kutató Intézetével (Kecskemét) együttműködve.

## 4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 4.1. A regenerációs módszerek történeti áttekintése

Az izolált növényi részek *in vitro* tenyésztése a sejt kultúrákkal kezdődött. A növényi sejtek, szövetek mesterséges, laboratóriumi körülmények között való tenyésztését először a német Haberland (1902, in Dudits and Heszký 1990) kezdte meg. A szerv- és az embriótenyésztésben először Hannig (1904, in Dudits and Heszký 1990) ért el sikereket. A második nagy áttörést Kotte (1922, in Dudits and Heszký 1990) hozta, akinek sikerült gyökércsúcsokat tenyésztenie táptalajon. A táptalaj hatására az inokulumok nem csak növekedtek, hanem oldalgyökereket is fejlesztettek (Maróti 1972, in Dudits and Heszký 1990). Az embriótenyésztésben a francia Mallyard (1921, in Dudits and Heszký 1990) és a német Laibach (1925, in Dudits and Heszký 1990) ért el eredményeket. Rájöttek, hogy a különböző kultúrák létesítésének az a feltétele, hogy a sejtek és a szövetek osztódásra képesek, tehát merisztématikusak legyenek. A gyökér és hajtáskezdemények tenyésztése mellett egyidejűleg a levelek, virágok és a virágzati részek tenyésztésével is próbálkoztak (Bonner et al. 1939, in Dudits and Heszký 1990). A virág és virágrészek, illetve a termés aszeptikus tenyésztésének módszereit Gregory (1940, in Dudits and Heszký 1990), Taylor (1950, in Dudits and Heszký 1990) és Vasil (1957, in Dudits and Heszký 1990) dolgozták ki. Ezekre a kutatásokra alapozták a pollenből kiinduló járulékos embriók tenyésztését napjainkban, ámár ezeket a kísérleteket 1952-ben egy nemzetközi botanikai kongresszuson egyes kutatók „a képzelet vad szárnyalásának” tartották (Dudits and Heszký 1990).

A növénybiotechnológia legnagyobb lehetőségét napjainkban - ellentétben a humán kutatásokkal - a növényi szervezet regenerálása jelenti, mesterséges körülmények között tenyésztett szomatikus sejtekből. A regeneráció során az a cél, hogy a differenciálatlan sejtekből növényt kapjunk. A regenerációnak két fő módját sikerült indukálni és fenntartani, az organogenezist és a szomatikus embriogenezist.

#### 4.1.1. Organogenezis

A szervdifferenciáció indításához a növény minden olyan része felhasználható inokulumként, amely merisztéma, kambális vagy parenchima szövetet tartalmaz. A kultúra indításához a leggyakrabban felhasznált növényrészek a következők: levél-, szár-, és gyökérrészek, valamint virág, embrió és sziklevelel (Flich et al. 1983). A táptalajra

helyezett steril növényi rész sejtjein először gyakran dedifferenciálódott sejtek tömege, a kallusz alakul ki (Bingh et al. 1989). A kalluszkultúrák sejtösszetételük szempontjából heterogének, de általában homogén sejtpopulációnak tekinthetők (Maróti 1972, in Dudits and Heszy 1990). A sejtek sokféleségének különböző okai lehetnek. Ilyenek, pl.: a kallusz eredete, a tenyésztés fizikai körülményei (fény, hő, levegő), a vizsgált szövetrészt és a táptalaj összetétele. A kalluszsövetből kiindulva az alaptápközeghez (ásványi elemek, cukor, vitaminok, inozit) hozzáadott megfelelő hormonok hatására szervképződés indukálódik (Linsmaier and Skoog 1965). A kalluszban lévő sejtekből egy olyan osztódási folyamat indulhat, amelynek során apikális merisztéma centrum alakul ki. Ebből gyökér- és hajtáskezdemény, majd növényi szervek keletkeznek. A megfelelő tápanyagellátottság biztosítja a citoplazma felépítéséhez szükséges anyagokat. A növekvő kalluszkultúrák sejtjeinek nagy része vakuolás, kisebb része pedig vakuola nélküli kambialis sejt. Ha ezekben a kultúrákban hosszabb inkubációs időtartamot vagy az osztódást gátló auxinkoncentrációt alkalmazunk, akkor a sejtek tágnak és szállítószöveti elemek differenciálódnak. A gibberellinsav is fokozza a nyalábképződést kis auxinkoncentráció jelenlétében. A hajtástenyészetek leggyakoribb táptalaja az MS (Murashige and Skoog 1962) tápközeg tiamin és mezo-inozit kiegészítéssel. A fejlődő hajtások továbbszaporítása a nodális részekkel, illetve merisztémákkal folyhat (Dudits and Heszy 1990).

#### 4.1.2. Szomatikus embriogenezis

Az embrió a fejlődése folyamán különböző morfológiai stádiumokkal jellemezhető: gömb, szív, torpedó és érett embrió (Ammirato 1983). Ezt az alakváltozást szövetdifferenciálódás kíséri. Az embriogenezist két fő szakaszra oszthatjuk, az első a heterotróf, a második az autotróf fázis. Az autotróf szakaszon belül megkülönböztetünk autonóm, élettani érettségi és ökológiai érettségi stádiumot. Az autonóm szakaszt az embrió növekedése jellemzi, az élettani érettség stádiumában az embrió eléri a teljes differenciáltságot. Az ökológiai érettség az embrió csíráképességét jelenti. Embriókultúrát nemcsak az embriók magból történő kipreparálásával és azok továbbnevelésével nyerhetünk. Megfigyelték, hogy a szomatikus sejtek 2,4-D-t (2,4-diklórfenoxi-ecetsav) tartalmazó táptalajon sejtaggregátumokat képeznek. Ha ezeket 2,4-D-t nem tartalmazó táptalajra helyezzük, az osztódások száma lecsökken és a sejtekből gömb alakú proembrioidok indulnak fejlődésnek. Az embriogén sejtekből álló kallusz egy grízszerű szerkezetet mutat, sárgásfehér színű (Forgács et al. 2011). Folyadékkultúrában a kallusz



állapota mikroszkópos vizsgálattal jól elkülöníthető. Az embriogén kallusz sejtjei gömbszerűek, kis vakuólumokkal rendelkeznek és sok keményítő található bennük. A szomatikus embriogenezis a gömb stádiumig megegyezik a zigótás embriogenezissel, a gömb stádium elérése után a szomatikus embriókon kialakulnak a felületi epidermiszsejtek és a protoplasztiszok fejlődésével lassan megindul a fotoszintézis, így fény jelenlétében az embrioidok megzöldülnek (Ammirato 1983).

#### 4.2. A szőlőregenerációs kísérletek eredményei

A sikeres genetikai transzformációs kísérletek alapja a hatékony növény-sejt-növény regenerációs rendszer. Az első sikeres járulékos organogenezisről szőlő esetében Rajasekaran és Mullins (1981), szomatikus embriogenezisről Mullins és Srinivasan (1976) közöltek először eredményeket. Napjaink irodalmát áttekintve elmondhatjuk, hogy a különböző transzformációs eljárásoknál gyakran alkalmaznak szomatikus embriókat. A szomatikus embriók indukciójára, valamint a transzgénikus növények regenerációjára többféle eljárás létezik. Különbség mutatkozhat a fajták között a felhasznált növényi részben, a táptalaj összetételében és a kísérleti körülményekben. A fajták közötti különbségeket Maillot és munkatársai (2006) embriogén kallusz indukciós kísérletei is alátámasztják. Kísérleteikben 6 *Vitis vinifera* és a [(*V. berlandieri* x *V. colombar*) x (*V. vinifera* x *V. berlandieri*)] eredetű 'Fercal' alanyfajta egy-rügyes hajtás darabjain kaptak embriogén kalluszt. A 'Fercal' alanyfajta esetében az embriogén kallusz indukció levél szegmenseken is sikeres volt.

Nakano és munkatársai (1997) 23 genotípussal dolgoztak. A *V. vinifera*, *V. x labruscana* és *V. rupestris* fajokat felhasználva levélből, portokból és magházból indítottak kultúrákat. Harst (1995) levéllemezből és nyélből indult ki, a *V. thunbergii* és az inter-specifikus 'Chancellor' hibrid felhasználásával. Később (Harst et al. 1998) *V. vinifera* fajtajelöltekből valamint a 'Rajnai rizling', a 'Dornfelder' és a 'Rizlingszilváni' fajtákból indított portokkultúrákat, amelyekből szomatikus embriókat kapott. Scorza és munkatársai (1995) zigotikus embrióból indultak ki, a kísérletben három különböző genotípusú magvatlan *V. vinifera* fajtajelölt (2-19-6; 72-659-2; 69-636-5) szerepelt. Levéllemez felhasználásával (Scorza et al. 1996) a 'Thompson' *V. vinifera* fajta esetében kaptak szomatikus embriókat. Vilaplana és Mullins (1989) 'Sultana', 'Granache' és 'Gloryvine' hipokotilból és járulékos gyökérből állítottak elő szomatikus embriókat. Portok kultúrából indult ki és embriogén kalluszt kapott Cersosimo és munkatársai (1990) *V. rupestris* és *V.*

*berlandieri* fajokból; Mozsár és Süle (1994) *V. vinifera* fajtákból ('Chasselas', 'Szürkebarát', 'Ezerjő', 'Piros Szlanka', 'Ezeréves Magyarország Emlékére'), valamint a *V. amurensis* és a *Vitis sp.* 'Georgikon 28' esetében; továbbá Perl és munkatársai (1996) a 'Superior' *V. vinifera* fajtánál. Szintén portok kultúrából kiindulva, de szomatikus embriókat is kapott a *V. rupestris* faj esetében Martinelli és Mandolino (1994). Számos fajta esetében (többek között 'Chardonnay', 'Favorit', 'Kunleány' stb.) számoltak be Oláh és munkatársai (2003b) embriogén sejtenyészetek előállításáról portokon.

Portokon embriogén kallusz fejlődés indukálására leggyakrabban a 2,4-D és BA (benzil-adenin) kombinációját használják (Martinelli and Gribaudo 2001a). Pino-Sintra (2007), ill. López-Pérez és munkatársai (2005) embriogén kallusz indukációs kísérleteikben szintén a 2,4-D és BA használatát találták a leghatékonyabbnak a fajták széles körében. Emellett Mullins és Srinivasan (1976), Stamp és Meredith (1988) kísérleteiben a NOA (naftoxi-ecetsav) és BA hormonkombináció is hatékornak bizonyult. Murthy és munkatársai (1998) fedezték fel, hogy létezik egy szintetikus vegyület, a thidiazuron [TDZ, 1-phenyl-3-(1,2,3-thidiazol-5-yl)-urea], amellyel a szomatikus embrio- és morfogenezis hormonális igénye helyettesíthető. Ezt a vegyületet néhány *Vitis* genotípus esetében sikeresen használták arra is, hogy a BA-t helyettesítsék vele; bár az eredmény erősen függött attól, hogy milyen típusú szövettenyészetet és genotípust használtak a kísérletek során. 'Seyval blanc' levélkorongok és protoplasztok esetében szomatikus embriogenezis indukálására 0,88-0,90 mg/l TDZ-t használtak (Harst 1995, Reustle et al. 1995). Hasonló koncentrációkat (0,88-1,1 mg/l) alkalmaztak folyékony kultúrában másodlagos embriók fejlődésének indukálására (Bornhoff and Harst 2000), illetve, hogy embriogén vonalakat indítsanak portokokról (Iocco et al. 2001). Nakano és munkatársai (1997) 2,2 mg/l TDZ-t használtak, hogy másodlagos embriogenezist indukáljanak különböző genotípusú levél explantátumokon. Különböző szőlő genotípusok mikrospóra tenyészeteinél 0,2-2,0 mg/l TDZ-t használtak embriogenezis indukálására (Sefc et al. 1997), 'Rajnai rizling' portokok esetében pedig két hetes BA kezelés után 2,2 mg/l TDZ-t alkalmaztak (Harst-Langenbucher and Alleweltdt 1993). *Vitis x Labruscana* esetében az embriogén vonalak hosszú távú fenntartásához 0,044 mg/l TDZ is elegendőnek bizonyult (Motoike et al. 2001). Több alanyfajta esetében is ('Börner', 'Richter 110', 'SO4', 'St. George', 'Teleki 5C') sikeresnek bizonyult a 0,05 mg/l TDZ alkalmazása az elmúlt években (Oláh et al. 2003a). A különböző növényi növekedésszabályozók használata mellett a táptalajok elemi összetételét érintő minőségi és mennyiségi változások szintén hatással vannak az embriogén kallusz indukációra (Perrin et al. 2001).

Torregrosa (1998) *V. rupestris* x *V. berlandieri* eredetű 'Richter 110' alanyfajtáról indított portokkultúrát, amelyet két különböző auxin-koncentrációjú táptalajra helyezett. Az első táptalaj 5  $\mu$ M 2,4-D-t és 5  $\mu$ M NOA-t, a második táptalaj 2,5  $\mu$ M 2,4-D-t és 2,5  $\mu$ M NOA növekedésszabályzó anyagot tartalmazott. Hat hét elteltével a kettes típusú táptalajon indult meg az elsődleges és másodlagos embriogenezis. A torpedó (2-4 mm hosszú) alakban lévő embriók fél MS alaptáptalajra kerültek át. Az embriókat transzformációhoz használta fel.

Vidal és munkatársai (2009) nyolc különböző *V. vinifera* fajta embriogén kapacitását vizsgálták portok és ovárium tenyészetekben. Kísérleteikben a különböző fejlettségi stádiumban indított kultúrákat 2,4-D és BA hormonkombinációval kiegészített MS, illetve 2,4-D és NOA tartalmú NN táptalajra helyezték. Kikkert és munkatársai (2005) embriogén kallusz indukciós kísérleteikben 12 fajta (*Vitis sp.*) ovárium és portok tenyészeit tesztelték három különböző táptalajon. Gambino és munkatársai (2007) öt *V. vinifera* és a *V. berlandieri* x *V. rupestris* cv. 'Richter 110' alanyfajta embriogén kallusz indukciójához éretlen virágbimbókat, ováriumokat és portokokat helyeztek 2,4-D-vel és BA-nel kiegészített NN táptalajra. Kísérleteikben a virágbimbók alkalmazása a legtöbb fajta esetében hatékonyan működött, a 'Richter 110', 'Chardonnay' és 'Grignolino' fajták esetében pedig a portokkultúrákban kapott eredményeket is meghaladta.

Cutanda és munkatársai (2008) a 'Macabeo' és 'Tempranillo' *V. vinifera* fajták embriogén kapacitását vizsgálták két különböző fejlettségi állapotban lévő portokokon. A portokokat portoknyéllel együtt helyezték a táptalajra. A kiindulási anyag fejlettsége mellett tesztelték a 48 órás 4°C-on történő hidegkezelés hatását, valamint két különböző táptalaj hatását az embriogén kallusz indukcióra. Kísérleteikben megfigyelték, hogy legnagyobb gyakorisággal a portoknyélen kaptak embriogén kalluszt.

Perrin és munkatársai (2004) embriogén kalluszindukciós kísérleteikben 13 nemes-, és 6 alanyfajta portoknyéllel együtt kipreparált portokait helyezték 2,4-D és BA hormonokkal kiegészített 5 különböző táptalajra. Megfigyeléseik szerint a portok kultúráknál nagyon gyakori a portoknyélen történő embriogén kalluszfejlődés, melyet véleményük szerint a portokok csészéről történő leválasztási módja is befolyásol. Ezért a 'Rajnai rizling' portoktenyészetekben kétféle eljárást hasonlítottak össze: a portokokat spontán leválasztották a csészéről, vagy a csatlakozási helytől körülbelül 0,5 mm-nyi távolságra vágással távolították el azokat. Kísérleteikben a vágásos technológia szignifikánsan befolyásolta a portoknyélen fejlődött kallusz gyakoriságát, 18,04%-ról 43,16%-ra emelte azt.

López-Pérez és munkatársai (2005) a ‘Sugarone’, ‘Crimson Seedless’, ‘Italia’ és a ‘Don Marco’ csemegeszőlőfajták portok-, és ováriumtenyészetein kaptak embriogén kalluszt a 2,4-D és BA hormonokkal kiegészített MS táptalajon. A szomatikus embriófejlődés indukálásához az embriogén kultúrák fél MS táptalajra kerültek át. Kísérleteikben tesztelték az aktív szén (0,25%) hatását a szomatikus embriófejlődésre. A ‘Crimson Seedless’, ‘Italia’ és ‘Don Marco’ fajták esetében az aktív szén használata elengedhetetlennek bizonyult a szomatikus embriófejlődés indukálásához, a ‘Sugarone’ fajta esetében pedig a hatékonyságot sikerült növelni (5,8%-ról 99,5%-ra). Hébert-Soulé és munkatársai (1995) az aktív szén torpedó stádiumban lévő szomatikus embriókra gyakorolt jótékony hatását annak abszorpciós képességével magyarázza azáltal, hogy megköti a táptalajban jelenlévő potenciális csírázásgátló anyagokat.

Jayasankar és munkatársai (2003) a folyékony táptalaj alkalmazásának szomatikus embriogenezisre gyakorolt hatását vizsgálták. A 2,4-D és BA tartalmú szilárd MS táptalajra helyezett ‘Chardonnay’ és ‘Thomson Seedless’ portokokon, ill. levélkorongokon kapott embriogén kallusztenyészetekből 2,4-D-t tartalmazó szuszpenziós kultúrákat indítottak, majd a szilárd és folyékony tenyészetek további fejlődését a Li és munkatársai (2001) által leírt szilárd X6 táptalajon hasonlították össze. Kísérleteikben megfigyelték, hogy a folyékony táptalajból származó érett szomatikus embriók a szilárd táptalajról származó embriókhoz viszonyítva kisebb sziklevelekkel és nagyobb méretű szuszpenzorral rendelkeztek. A hipokotil és a sziklevek hosszának arányait vizsgálva megállapították, hogy a szilárd táptalajról származó szomatikus embriókon a sziklevek hosszabbak voltak a hipokotilnál, a folyékony táptalajból származó embriókon pedig ez az arány pont fordítva alakult. A zigotikus embriókon a hipokotil és a sziklevek hossza körülbelül azonos (Jayasankar et al. 2003). Korábbi megfigyeléseik szerint (Jayasankar et al. 1999) a zigotikus embriók fejlődésével ellentétben a folyékony táptalajból származó kultúráknál nem alakult ki magnyugalom. Gray and Purohit (1991a, b) szilárd táptalajról származó tenyészeiteken a szomatikus embriófejlődés indukálása során szintén megfigyelték a magnyugalmat, melyet aztán különböző kezelések hatására sikerült feloldaniuk. A magnyugalom a szomatikus embriók fejlődése során felhalmozódó abszcizinsavnak köszönhető (Rajaeskanan et al. 1982), és többek között exogén giberrelinsav alkalmazásával feloldható. Mivel a szuszpenzorban is történik giberrelin szintézis, ezért Jayasankar és munkatársai (2003) arra a következtetésre jutottak, hogy a szuszpenziós kultúrákból származó szomatikus embriók nagyobb méretű szuszpenzorának köszönhető a magnyugalom elmaradása ill. az embriók korábbi csírázása.

Valerii és munkatársai (2003) az indolecetsav (IAA, 0,1 mg/l) és a BA (0,5 mg/l) hatását vizsgálták a 'Bianca', 'Podarok Magaracha' és 'Intervitis Magaracha' levélnyel darabokon fejlődött embriogén kallusz szuszpenziós tenyészeiben. Megfigyeléseik szerint a gömb stádiumú embriók fejlődésére az IAA-val kiegészített NN táptalaj volt kedvező hatással, a BA tartalmú táptalaj használata a szív stádium elérését segítette. A torpedó stádium eléréséhez pedig szintén az IAA-val kiegészített NN táptalaj használata bizonyult kedvezőnek. A szomatikus embriók további fejlődéséhez 0,5 mg/l gibberellinsavval (GA) kiegészített folyékony táptalajt használtak, majd a sziklevéllal rendelkező kis növényeket 0,5 mg/l BA-nel kiegészített szilárd táptalajon nevelték tovább.

Amar és munkatársai (2007) cukkini és petrselyem, majd a 'Tempranillo' szőlőfajta szuszpenziós sejt kultúrákról származó, az ún. kondicionált táptalaj hatását vizsgálták különböző szőlőfajták portok eredetű embriogén kallusztenyészeire. Kísérleteikben a NN táptalaj különböző változatait használták. Az indításkor 50 ml kondicionált és 50 ml friss táptalajt tartalmazó kallusztenyészetekben a megfelelő embriogén struktúrák gyors felszaporodását tapasztalták a kondicionált táptalaj eredetétől függetlenül. Az autoklavozás után felhasznált kondicionált táptalaj esetében azonban a 100% friss táptalajban indított szuszpenziós tenyészetekhez hasonló eredményeket kaptak. Amar és munkatársai (2007) azt is bizonyították, hogy az induló tenyészetekre gyakorolt pozitív hatásért a kondicionált táptalajokban megtalálható arabinogalaktán extra-celluláris fehérje a felelős. Az embriogén kallusz felszaporítása után a tenyészeteket naponta friss hormonmentes folyékony táptalajba helyezték át. 5-6 hét elteltével a szinkronizált fejlődésű, torpedó stádiumban lévő szomatikus embriók aktív szénrel kiegészített táptalajra kerültek át, melyek aztán fényen gyökérrel és hajtással rendelkező növényekké regenerálódtak.

#### **4.3. A növénytranszformációs módszerek**

A genetikai transzformáció során a gazdanövény genomjába egy tetszőleges származású gént építhetünk be. Ezzel elérhetjük, hogy az idegen gént tartalmazó, úgynevezett transzgénikus növény valamilyen tulajdonságában felülmúlja az eredeti gazdanövényt. Az idegen gének bejuttatása történhet közvetlen módon, vagy vektorok közvetítésével (indirekt). Az alábbiakban a gyakorlati szempontból legfontosabb módszereket sorolom fel.

## **Közvetlen DNS-beviteli módszerek:**

### **Transzformáció polietilén-glikol (PEG) felhasználásával**

Ezzel a módszerrel protoplasztokat transzformálhatunk. A gyengén negatív polaritású PEG-molekulák hidrogénhíd-kötéssel kapcsolódnak a víz, a fehérjék és a szénhidrátok megfelelő molekula részleteihez, valamint a  $\text{Ca}^{++}$ -hoz is, melyet a PEG-gel együtt a protoplasztokhoz adagolunk. Ennek következtében a plazmalemmák molekulái között átrendeződés megy végbe, ami megbontja a sejthártya integritását, és így lehetővé válik a sejt számára az idegen eredetű DNS felvétele (Davey et al. 1980, Krens et al. 1982).

### **Transzformáció elektroporációval**

Protoplasztok transzformálását teszi lehetővé az elektroporáció. A módszer lényege, hogy rövid ideig tartó erős elektromos impulzusok hatására a protoplaszt membránján átmenetileg lyukak képződnek, amelyeken keresztül az idegen DNS bejuthat a sejtbe. Emlősejteken dolgozva igazolták először a DNS-felvétel megnövekedését elektromos impulzus hatására (Neumann et al. 1982). Később hasonló közlemények jelentek meg a növényi sejtekkel kapcsolatban is (Fromm et al. 1986, Riggs and Bates 1986).

### **Mikroinjektálás**

A mechanikai úton történő DNS-bevitel egyik lehetséges módja a DNS-oldat beinjektálása a protoplasztokba, illetve közvetlenül a sejtmagba (Crossway et al. 1986). Az injektálás invert-mikroszkópra szerelt mikroinjektáló berendezéssel történik. A több ezer donor DNS kópiából mikroinjektáláskor 1-2 az integrálódott kópiák száma. Az állati sejtekbe (hímivarsejtek, petesejtek, zigóták, embrionális sejtek) történő géntranszfert ugyanezzel a módszerrel végzik.

### **Génbelövés**

A „génbelövés” kifejezés a módszer lényegére utal, miszerint a DNS élő sejtekbe, szövetekbe történő juttatása egy génbelövő készülékkel („génpuskával”) történik. Az eljárás lényege, hogy a DNS molekulákat hordozó mikrolövedékeket (1-2  $\mu\text{m}$  átmérőjű wolfram vagy arany részecskéket) He- illetve  $\text{N}_2$ -gázzal nagy sebességre gyorsítják fel, így a részecskék áthatolnak a sejtfalon és a sejtmembránon, magukkal szállítva a sejtek belsejébe az idegen DNS-molekulákat. A sejtek egy része túléli az így okozott sérülést,

osztódik és ezekből a sejtekből megfelelő szelekciós körülmények között növények regenerálhatók (Dudits and Heszký 1990).

### **Transzformáció szilikonkarbid-tűk felhasználásával**

A módszer lényege, hogy a tenyésztett növényi sejteket folyékony táptalajban, szilikon-karbid mikrotűk és plazmid-DNS jelenlétében rázatják. Az eljárás során a mikroméretű szilikonkarbid tűk belefúródnak a sejtekbe, és magukkal viszik az oldatban lévő DNS molekulákat (Jenes 1999).

### **Vektor alapú (indirekt) DNS-beviteli módszerek:**

#### **Vírusvektorok**

Elsősorban a kétszálú (Caulimosaic vírusok) és egyszálú (Geminivírusok) DNS-vírusok kerültek alkalmazásra. A karfiol mozaik vírus (CaMV) klónozása során megfigyelték, hogy a klónozott vírus megtartotta fertőzőképességét. Azt is megfigyelték, hogy bizonyos DNS-szakaszok eltávolítása nem hat ki a vírus fertőzőképességére, és így az eltávolított DNS szakaszok helyére idegen rezisztenciagént építettek be (Brisson et al. 1984). Annak ellenére, hogy a transzformáció sikeres volt, több tényező is gátolja a módszer elterjedését. A vírusedzőmolekula csak kisméretű DNS-szakasz befogadására képes, a vírusedzőnek megnyilvánulása miatt pedig a transzformáns növényeken betegségtünetek jelennek meg. Lényeges hátrány továbbá, hogy általában szűk a fertőzhető növények köre. A virális szekvenciák *Agrobacterium* T-DNS vektorba (lásd 3.4. fejezet) történő klónozása vezetett az ún. agroinfekciós rendszer kidolgozásához (Grimsley et al. 1987).

A vírusindukált géncsendesítést (VIGS) a növényi sejtben replikálódó vírusok indukálják saját RNS genomjukkal szemben. Ha a vírus genomja idegen szekvencia elemet is tartalmaz (amely homológ egy növényi endogén génnel), akkor az endogén gén mRNS-e is szekvenciaspecifikusan lebomlik és így az endogén gén hiányára jellemző fenotípus alakul ki a növényen. A VIGS ezen tulajdonsága lehetővé teszi, hogy a növények e védekező mechanizmusát felhasználva ismeretlen funkciójú szekvenciákhoz funkciót rendeljünk, vagy adott funkciójú gének funkcióvesztésének hatását vizsgáljuk (Burgán 2006).

### ***Agrobacterium* vektorok**

Az *Agrobacterium* fajok szintén rendelkeznek azzal a képességgel, hogy a növényi genomba géneket juttassanak. Az *Agrobacterium* fajok és a velük való transzformáció lehetőségeit részletesen a következő fejezet tartalmazza.

#### **4.4. Az *Agrobacterium* mint transzformációs vektor**

Az *Agrobacterium* fajok egyedülállóan rendelkeznek azzal a képességgel, hogy a növényi genomba géneket integráljanak. A *Rhizobiaceae* családba tartozó, Gram-negatív, patogén talajbaktériumok az *Agrobacterium* nemzetség képviselői, az *A. tumefaciens*, az *A. vitis*, az *A. rhizogenes* és az *A. rubi* fajok. A kétszikű növényeket sebzési helyeken fertőzik, majd a fertőzött növényeken tumorfejlődést, illetve hajszálgöykeresedést okoznak. Az *A. rhizogenes* főleg almatermésű gyümölcsfajokat, míg az *A. rubi* a *Rubus* fajokat betegíti. Az *A. tumefaciens* számos növényfajon indukál tumorképződést, az *A. vitis* pedig a szőlőn idéz elő törzs-, kar-, vagy vesszőgolyvát (Folk and Glits 1993).

A szőlő agrobaktériumos vesszőgolyvája a földünkön mindenhol előforduló betegség, amely az intenzív művelésű ültetvényekben súlyos termés kiesést is okozhat. A fertőzött növények gyengén fejlődnek, levélzetük sárgászöld vagy vöröses, a levelek olykor kanalasodók. A talaj feletti részeken karfiolszerű, egyenetlen felületű tumorok képződnek (Folk and Glits 1993).

A tumorszövetek *in vitro* hormonmentes táptalajon növekedésre képesek és specifikus aminosav származékokat ún. opinokat (pl. oktopint, nopalint, agropint) termelnek, szemben az egészséges növényi szövetekkel. A tumorképződésért és az opinszintéziséért az *Agrobacterium* sejtekben található Ti-plazmid felelős (Zaenen et al. 1974). DNS hibridizációval igazolták, hogy a baktériumfertőzés során a Ti-plazmid egy része, az ún. transzfer vagy T-DNS átkerül a növényi sejtekbe, és stabilan integrálódik a sejtmag DNS állományába. Ezek a kísérleti eredmények nagyon fontosak voltak, mert fényt derítettek egy természetes génátviteli mechanizmusra, amelynek során bakteriális gének épülnek be a fertőzött növények sejtmagi örökítőanyagába.

A T-DNS hozzávetőlegesen 21-23 kilobázis hosszúságú, amelyen a tumoros növekedésért és az opinszintéziséért felelős gének lokalizálhatók, és amelyet két rövid, 25 bázispár hosszúságú ismétlődő határszekvencia (bal oldali határoló régió: LB, jobb oldali határoló régió: RB) vesz körül. A tumoros növekedésért felelős gének növényi növekedési hormonok bioszintéziséért felelős fehérjéket kódolnak, melyek túlermelése felborítja a



normál növényi sejtosztódást és differenciációt. Az egyik növekedési hormon az auxin (indol-3-ecetsav, IAA), melynek bioszintéziséért két gén, az *iaaM* és az *iaaH* által kódolt enzim, a triptofán-monooxygenáz és az indol-3-acetamid hidroláz a felelős. A másik hormon a citokinin (zeatin), amelynek képződésében az *ipt* gén által kódolt AMP-izopentenil transzferáz enzim vesz részt. Az enzim által létrehozott vegyületet (izopentenil-AMP) a növény által kódolt enzimek gyorsan tovább alakítják zeatinná.

A Ti-plazmidon végzett deléciós analízis igazolta, hogy a két T-DNS határolószakasz (LB, RB) között található gének nem befolyásolják a T-DNS átvitelt és integrációt (Miranda et al. 1992). Az átvitel folyamatában a Ti-plazmidon lévő virulencia (*virA* - *virG*) régióknak, valamint a kromoszómális virulencia (*chvA*, *chvB*) régióknak van meghatározó szerepe. A *chv* gének folyamatosan, úgynevezett konstitutív módon nyilvánulnak meg és termékeik a baktérium sejtfalhoz tapadását okozzák, a *vir* gének expressziója viszont szigorúan szabályozott, és aktiválódásuk indítja el az átviteli mechanizmust. A sérült növényi szövetekből kiszabaduló fenol vegyületek, mint például az acetosziringon, indukálják ezen gének átírását.

A *vir* gének 8 operonba rendeződve, a mintegy 40 kbp kiterjedésű vir-régiót alkotják a plazmidon. A *virA* régió által kódolt protein egy ún. szenzor fehérje, mely a növényi sebzés során keletkező fenolszármazékokat közvetlenül érzékeli (Lee et al. 1996), majd aktiválja a *virG* gént. A monoszacharidok a kromoszómálisan meghatározott ChvE proteinhez kapcsolódnak először, mely kölcsönhatásba lép a *virA* proteinnel. A *virG* ezt követően elindítja a teljes virulencia rendszer működését (kétkomponensű szabályozó rendszer). A *virD1* protein a T-DNS jobboldali határszakaszán bemetszi a Ti-plazmidot és ezt követően a keletkező egyszálú T-szál 5'-végéhez kovalens kötéssel kapcsolódik a *virD2* protein. A bevágásnál keletkezett 3'-végtől a DNS-szintézis során a szál újra felépül, miközben a *virD2*-vel kapcsolódó 5'-vég letolódik a komplementer szálról (a régió másik határszekvenciájáig). Az így leváló egyszálú DNS-t a *virE2* proteinek stabilizálják. A *virD2* protein részt vesz a T-DNS növényi kromoszómális DNS-be történő integrálódásnak meghatározásában is. A bakteriális, illetve a növényi sejtmembránon való átjutást a membránba épült *virB* fehérjék biztosítják. A folyamat nagyfokú hasonlóságot mutat a bakteriális konjugációval, pl. a T-DNS jobboldali határszakasz és a konjugatív plazmidoknál az *oriT* meghatározó szerepe, az egyszálú T-szál 5'-végű polarizáltsága, valamint a sejtmembránokon keresztül történő protein exporttal (Christie 1997, Hooykaas and Beijersbergen 1994, Kado 1994, Lessl and Lanka 1994, Sheng and Citovsky 1996,

Tinland et al. 1995, Waters and Guiney 1993, Weising and Kahl 1996, Zupan and Zambryski 1995).

Mivel a T-DNS jobb-, és baloldali határszakaszai közötti szekvenciák a T-DNS integráció szempontjából nem meghatározóak, ezért az *Agrobacterium* Ti-plazmid T-DNS része alkalmas arra, hogy vektorként felhasználva idegen géneket építsünk bele és juttassunk be általa magasabbrendű növényekbe (Gheysen et al. 1987). A növényi genomba épült mesterséges T-DNS a továbbiakban növényi szekvenciaként funkcionál. Ezek az alapvető felismerések vezettek el a különböző növényi transzformációs vektorrendszerek kidolgozásához.

Bár a *vir* gének aktiválódása nagyrészt ismert az agrobaktériumos fertőzés során, semmit nem tudunk arról, hogyan inaktiválódik a *vir* regulon a növényi sejtek transzformációja után, ugyanis a T-DNS növényi genomba való integrálódását követően a *vir* gének expressziójára a továbbiakban nincs szükség. Mivel T-DNS szakasz kivágódásához és transzformációjához szükséges gének aktiválásában a növényi szignálmolekulák játszanak szerepet, nem lenne meglepő, ha baktérium fel tudná ismerni a transzformált sejteket egy jelzőmolekula segítségével (Liu and Nester 2006). Mivel a *vir* regulon csak akkor aktiválódik, amikor a baktérium a növény a közvetlen közelében van, valószínűleg létezik egy mechanizmus, amely a T-DNS integrálódását követően ugyanezt a regulont inaktiválja.

Liu és Nester (2006) kutatómunkájuk során rávilágítottak arra, hogy az indol-ecetsav - amelyet a T-DNS-en kódolt két enzim a tryptofán átalakításával termel – gátolja az *A. tumefaciens* C58 *vir* gén expresszióját azáltal, hogy versengés folyik a növény által termelt acetosziringon és az indol-ecetsav között a *virA* génnel történő kölcsönhatásért. Azt tapasztalták, hogy az indol-ecetsav gátolja a *virA* régió acetosziringon érzékelését, ugyanakkor az acetosziringon koncentrációjának növelésével csökkent az indol-ecetsav gátló hatása. Magasabb koncentrációban az indol-ecetsav az *Agrobacterium* és más növénypatogén baktériumok növekedését is gátolta, az indol-ecetsav megvonása után azonban a telepek folytatták növekedésüket.

Növények hiányában a növényi sejt transzformációjához szükséges gének nem expresszálódnak. Azonban a növényi rizoszférában lévő baktériumok felismernek néhány olyan növényi szignál molekulát, amelyek egy két-komponensű szabályozó rendszeren – *virA/G* – keresztül aktiválják a 30 *vir* génből álló regulont. Mivel a Ti-plazmidon lévő *vir* gének a növényi transzformációhoz szükségesek, ezért a baktérium számára felesleges, hogy folyamatosan szintetizálja azt a 30 fehérjét, amelyeknek a fertőzés bekövetkezte

után a továbbiakban nincs hasznos funkciójuk. A felismerést segítő növényi szignálmolekulák hiányában a *virA* defoszforizálhatja *virG*-t, ezáltal megakadályozva a *vir* gének indukcióját (Brencic et al. 2005). Liu és Nester (2006) megfigyelései szerint az *Agrobacterium* lecsökkentette a *vir* gének expresszióját érzékelve a transzformált sejtek által túlermelgetett indol-ecetsavat, ezért arra a következtetésre jutottak, hogy az indol-ecetsav a növényi transzformációs folyamatban egy jelző molekulaként vesz részt. Következésképpen az indol-ecetsav egy olyan molekula, amely szerepet játszhat a növények növénypatogén baktériumokkal szembeni védekezésében.

A DNS átvitele akkor is sikeres, ha a virulencia gének és a T-DNS két különböző plazmidon helyezkedik el az *Agrobacterium* sejten belül (Hoekema et al. 1983). Tehát a virulencia gének „transz” helyzetben is képesek a T-DNS mobilizációjához szükséges funkciók ellátására. A két funkció szétválasztása nyomán kifejlesztett növényi vektorrendszerek a kettős, ún. bináris vektorrendszerek. A T-DNS átvitelét segítő plazmid („*vir* helper plazmid”) általában olyan Ti-plazmid származék, amelyből a határszekvenciákkal együtt eltávolítják a teljes T-régiót. Számos helper plazmidot fejlesztettek ki napjainkra (Hoekema et al. 1983, Hood et al. 1993, Koncz és Schell 1986). Lefegyverzett vagy "disarmed" vektoroknak is nevezik azokat a nem patogén Ti-plazmidokat, amelyekből részben vagy egészben hiányzik a T-DNS régió. A másik, a „klónozó” plazmid („bináris vektor”), egy széles gazdaspecifitású vektor, mind *E.coli*, mind *A. tumefaciens* háttérben képes replikálódni, konjugációval könnyen átvihető az egyik baktériumból a másikba. Az ilyen klónozó vektorok tartalmazzák a T-DNS határszekvenciáit, ezen belül a növényi szelekciós markergéneket, mint pl. kanamicin-, higromicin-, vagy herbicid rezisztencia (Gasser and Fraley 1989, Weising et al. 1988), a klónozásra alkalmas helyet, ezen kívül a plazmid replikációjáért és stabilitásáért felelős géneket, valamint a bakteriális szelekciós markert (pl. kanamicin, gentamicin rezisztencia). Ezek az integratív vektorrendszerek már transzformáns növények létrehozását is lehetővé tették, mivel a transzformált növényi sejtekből, a megfelelő hormonok alkalmazásával, regeneráltatható a teljes, transzgént hordozó növény.

Az első bevezető kísérletek óta (DeBlock et al. 1984) számos, a gyakorlat szempontjából is fontos tulajdonságot sikerült növényekbe bevinni (pl. herbicid rezisztencia, Gasser and Fraley 1989). Amennyiben a géneket transzformáció során, pl. a kloroplasztiszba építjük be, sokkal intenzívebb génmegnyilvánulást kapunk, mint a kromoszómába beépített T-DNS esetében. Mivel az öröklésmenet ebben az esetben

citoplazmához kötött, nem áll fenn a veszély, hogy az újonnan bevitt gén pollennel kikerülhet a természetbe (McBride et al. 1995).

#### 4.5. A szőlő genetikai transzformációjának eredményei

A szőlő transzformációs kísérletek során szintén sikeresen alkalmazzák növényi génvektorként az *Agrobacterium* törzseket. Mára számos szőlőfajtán végeztek el sikeres transzformációt *Agrobacterium* alapú génvektorok segítségével. A szőlő transzformációnál gondot jelent, hogy csak néhány genotípusra van kidolgozva olyan eljárás, amellyel rutinszerűen lehet növényt regenerálni.

Néhány alanyfajta megfelelő rezisztenciát mutat a különböző gombás betegségekkel szemben, de a legtöbbjük érzékeny az abiotikus stresszre valamint a gomba- és vírus-fertőzésekre. Legyőzendő ezeket a nehézségeket, a molekuláris nemesítési eljárásokkal próbálják javítani a szőlőfajták stressz és betegség ellenállóságát (Perl and Eshdat 1998, Vivier and Pretorius 2000, Colova-Tsolova et al. 2001, Kikkert et al. 2001, Martinelli and Mandolino 2001b). Bár az utóbbi időben előállítottak transzgénikus alanyfajtákat is (Mullins et al. 1990, Le Gall et al. 1994, Krastanova et al. 1995, Mozsár et al. 1998, Xue et al. 1999), a regenerációs eljárás csak néhány fontosabb genotípusnál ismert. A *gus* ( $\beta$ -glükoronidáz) génnel végeztek kísérleteket alanyokon Berres és munkatársai (1992) a *V. riparia* x *V. berlandieri* '41B', a *V. berlandieri* x *V. riparia* 'SO4', és '5BB' transzformációjával és GUS pozitív kalluszt kaptak. Mauro és munkatársai (1995) is a *V. riparia* x *V. berlandieri* '41B' és a *V. berlandieri* x *V. riparia* 'SO4' alanyokat használták *nptII/GUS/GFLV-CP* génekkel történő transzformációs kísérleteik során. Később (1998) a *V. riparia* x *V. berlandieri* '41B' alany esetében *GFLV* gén bevitelével kaptak transzformáns növényeket. A *V. berlandieri* x *V. rupestris* cv. 'Richter 110' alanyfajtán LeGall és munkatársai (1994) végeztek transzformációs kísérleteket, amelynek során embriogén kalluszból kiindulva a *hyg/nptII/GUS/GCMV-CP* gének bevitelével hygromicin és kanamicin rezisztens, GUS pozitív és GCMV-CP előállító növényeket kaptak. Göllés és munkatársai (1998) a 'Richter 110' alanyfajtaról származó embriogén kalluszt *GFLV*, *ArMV*, *GVA* és *GVB* köpenyfehérje génekkel transzformálták és transzformáns növényeket kaptak. Coutos-Thévenot és munkatársai (2001) a *V. riparia* x *V. berlandieri* '41B' alanyfajta embriogén szuszpenzióját használták fel transzformációs kísérleteikhez. A felhasznált génkonstrukcióval - amely egy a lucernából származó patogén indukált promóter mögött tartalmazta a *VST1* (sztilbén-szintáz) gént - *Botrytis cinerea* és

*Eutypa lata* fertőzésekkel szemben fokozott ellenállóságot mutató növényeket állítottak elő. Magyarországon Mozsár és munkatársai (1998) a 'Georgikon 28' alanyfajta esetében értek el eredményeket, Oláh és munkatársai (2003a) a 'Richter 110' és 'St. George' fajtákat sikeresen transzformálták *nptII/GUS* génekkel.

*V. vinifera* fajták esetében többek között Guellec és munkatársai (1990) 'Greanche' gyökerek transzformációjára a C58C1 (pGV3850::1103neo, pRi15834) vektort használták, amelynek eredményeként *nptII* és opin pozitív kallusz kaptak. Harst és munkatársai (1998) a 'Dornfelder', a 'Rizlingszilváni' és a 'Rajnai rizling' portokból és levélből előállított szomatikus embriókat transzformálta *nptII* génnel, amelynek eredményeképpen a 'Dornfelder' és 'Rajnai rizling' fajtákból kapott transzformánsokat. Kikkert és munkatársai (1998) 'Merlot' és 'Chardonnay' embriogén sejtszuspenziót használtak fel a kitináz enzimet kódoló génnel történő transzformációra és kitináz pozitív növényeket kaptak. Bornhoff és munkatársai (2005) 'Seyval blanc' levélkorongok transzformációjával állítottak elő kitináz és RIP (riboszóma inaktiváló protein) expresszáló növényeket. A transzgénikus vonalak *Uncinula necator* és *Plasmopara viticola* fertőzése során azonban nem tapasztaltak statisztikailag igazolható toleranciát. Az *nptII/GUS* gén bevitelével értek el eredményeket Mullins és munkatársai (1990) a 'St. George' *V. rupestris* hipokotil, a 'Cabernet sauvignon' és 'Chardonnay' *V. vinifera* fajták levéllyél transzformációjával. A kísérlet során a 'Cabernet sauvignon' és 'Chardonnay' fajtáknál GUS pozitív rügyeket, a 'St. George-nál' pedig *nptII* és *GUS* pozitív növényeket kaptak. Legrand és munkatársai (2003) transzformációs kísérleteikben a *Vigna radiata* eredetű eutypin detoxifikáló enzimet (Vr-ERE) kódoló gént használták fel. A regenerált szőlő növények toleránsak voltak az *Eutypa lata* fertőzéssel szemben. Oláh és munkatársai (2003b) portok eredetű embriogén kalluszt transzformálva sikeresen állítottak elő *nptII/GUS* génekkel transzformált vonalakat. Li és munkatársai (2001) az *in vitro* 'Thompson Seedless' növények levélkorongjain kapott embriogén kallusztényészetek transzformációja során különböző promóterek hatását vizsgálták a green fluorescent protein (GFP) és az *nptII* szelekciós markergén expressziójára. Vidal és munkatársai (2006) az antimikrobiális magainin génnel (*mag2*) és szintetikus változatával (*MSI99*) transzformáltak 'Chardonnay' szuszpenziós embriogén kultúrákat. A regenerált transzgénikus vonalakat lisztharmattal és az *A. tumefaciens* C58, *A. vitis* Tm4, CG450 törzsekkel fertőzték. A nem-transzformált kontroll növényekhez viszonyítva csökkent tumorfejlődést tapasztaltak minkét gén esetében. A lisztharmatfertőzés során azonban csak két *mag2* vonal mutatott enyhe toleranciát. Agüaro és munkatársai (2006) a körte poligalakturonáz enzim génjének (*pGIP*)

felhasználásával a *Xyella fastidiosa* által okozott Pierce baktériumos betegséggel szemben növelt ellenállóságot mutató ‘Chardonnay’ és ‘Thomson Seedless’ transzgénikus vonalakat állítottak elő.

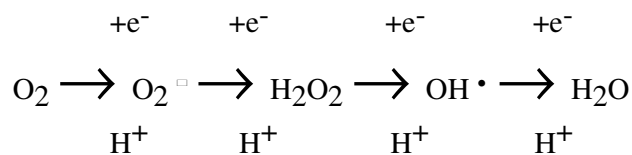
#### 4.6. A növényi stressztűrőképesség fokozásának lehetőségei

Az abiotikus és biotikus stressz, mint a legfőbb limitáló tényező játszik szerepet a növények életében. A különböző stresszhatások jelentősen befolyásolják a növények növekedését, produktivitását; és különböző morfológiai, fiziológiai, biokémiai és molekuláris változásokat eredményezhetnek. Amikor a növények stresszhatásnak vannak kitéve, számos gén expressziója megnövekszik, ami pedig különböző fehérjék és metabolitok felhalmozódását eredményezi. Ezen felhalmozódó anyagok valószínűsíthetően a növényi sejtek védelméért felelősek a különböző stressz körülmények között. Ahhoz, hogy a különböző stresszhatások következtében jelentkező károsodások ellen hatékonyabban tudjunk védekezni, először az ilyenkor végbemenő sejt szintű, biokémiai és molekuláris folyamatokat kellett megismerni. A stressz-indukált génexpresszió három fő csoportra osztható: (1) ismert enzimatiszus vagy strukturális funkcióval rendelkező fehérjéket kódoló gének, (2) számunkra még egyelőre ismeretlen funkcióval rendelkező fehérjéket kódoló gének és (3) regulátorokat kódoló gének (Bhatnagar-Mathur et al. 2008). A növényi stressztűrőképesség fokozása érdekében végzett (leginkább dohány) transzformációs kísérletekben az ún. egy funkciós géneket részesítik előnyben. Ide tartoznak például a következő ismert funkciójú stressz-indukált fehérjéket kódoló gének: a vízcsatorna-fehérjék génjei, az ozmolitok bioszintézisének (prolin, betain, trehalóz, poliamin) kulcsenzimeit kódoló gének, a detoxifikáló enzimek génjei és a transzport fehérjéket kódoló gének (Bhatnagar-Mathur et al. 2008). Tsvetkov és munkatársai (2000) például glicin-betain túlermelő növényeket állítottak elő a *V. vinifera* cv. ‘Rusalka’ fajta genetikai transzformációjával. Kísérleteikben három különböző génkonstrukciót használtak, melyek egy sarkvidéki hal fagyásvédő fehérje (anti-freeze) génjének szekvenciáit tartalmazták. Bár a metabolitok szintézisének módosításáért felelős gének felhasználása egyszerűbb - főleg ha a reakcióút ismert és kevés enzimreakciót igényel -, a stressztolerancia kialakításához számos gén egyidejű működésére van szükség. Ezért a stressz-indukált gének harmadik csoportjába tartozó regulátor elemeket kódoló gének használata előtérbe került. Egyetlen stressz-indukált transzkripciós faktort kódoló gén felhasználásával - a termelő fehérjék segítségével - a stresszválaszban résztvevő számos

gén expressziója egyidejűleg szabályozható (Kasuga et al. 1999). A növényi stresszválaszban szerepet játszó transzkripciós faktorok száma szinte végtelen, a legnagyobb részük az AP2/ERF, bZIP, NAC, MYB, MYC, Cys2His2 cink-ujj és a WRKY transzkripciós faktor családokhoz tartozik (Bartels and Sunkar 2005). Romero és munkatársai (1997) az optimális körülmények között nevelt, trehalózt túltermelő dohány növényeken fejlődési rendellenességeket figyeltek meg, ezért a kiválasztott transzgén stresszrezisztenciában betöltött szerepén kívül - indukálható promóterek használatával - a génkifejeződés térbeli és időbeli szabályozása is döntő fontosságú lehet.

Stesszhatás következtében (magas fényintenzitás, ultraibolya B sugárzás, magas fémion koncentráció, magas vagy alacsony hőmérséklet, vízhiány, víztöbblet, sebzés, vírus-, baktérium-, és gombafertőzés) a reaktív oxigén fajták gyors akkumulációja (1. ábra) jelentősen hozzájárul a növényi terméskiesésekhez (Prince et al. 1989, Foyer et al. 1994, Hammond-Kosack and Jones 1996, Lamb and Dixon 1997). Reaktív oxigén fajták normál fiziológiai működés esetén is képződhetnek a kloroplasztiszokban, mitokondriumokban és peroxiszómákban, semlegesítésük történhet enzimatis (szuperoxid-dizmutáz, kataláz, gvajakol-peroxidáz) és nem enzimatis (glutation, aszkorbinsav, karotinoidok, tokoferol) úton (Apel and Hirt 2004).

A képződött reaktív oxigén fajták különböző reakciókon keresztül egymásba átalakulhatnak, ennek egyik útja a Fenton-reakció, amikor a hidrogén-peroxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) szabad  $\text{Fe}^{2+}$  jelenlétében hidroxil gyökök forrása lehet:  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet + \text{Fe}^{3+}$ . A Fenton-reakcióban keletkezett hidroxil gyök - amely a legkárosabb termelő reaktív oxigénfajta - pedig kárt tud tenni a biológiailag fontos makromolekulák minden csoportjában, különösen a nukleinsavakban (Henle and Linn 1997).



**1. ábra:** Az aktív oxigénformák képződésének folyamata az oxigén négyelektronos redukciója során (Scandalios 1990).

Mivel az intracelluláris vas katalizálja az oxidatív reakciókat, a szabad vas koncentrációjának szabályozása egy lehetséges módja lehet az oxidatív károk

csökkentésének. Az élő szervezetekben széles körben elterjedt fehérje a ferritin (Theil 1987), egy burokba gyűjti a vasnak az élő sejtekben oldott állapotban jelenlévő formáját ( $\text{Fe}^{2+}$ ), oxidálja is azt ( $\text{Fe}^{3+}$ ), ezáltal a hidrogén-peroxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) nem jut elektronhoz. A ferritin fehérjekomplex a vasat oldható, különböző anyagsere folyamatokban hasznosítható formában hordozza. A növényi ferritin elsősorban a kloroplasztiszokban lokalizált. A vegetatív szervek ferritin tartalma sokkal kisebb, mint a magvaké. A csírázás folyamán egyre csökken a ferritin mennyisége, ami feltehetőleg a fehérje 28 kDa-os alegységének szabad gyökök által történő oxidatív hasításának köszönhető (Lobréaux and Briat 1991). A növényi ferritin gének egy része konstitutív módon fejeződik ki, másik részének szintézisét viszont transzkripcionálisan szabályozza a vas, vagy a stresszhormon abszcizinsav (Lobréaux et al. 1993). A ferritin részvételét az oxidatív stresszválaszban humán és állati sejt-kísérletekkel támasztották alá, amelyekben az oxidatív károk következtében a ferritin szintézis serkentése mutatkozott (Balla et al. 1992, Vile and Tyrrell 1993, Cario et al. 1995).

Deák és munkatársai (1999) lucerna cDNS könyvtárból stresszhatásra indukálódó ferritingént izoláltak, melyet *Agrobacterium* transzformációs vektorral juttattak be dohányba. CaMV 35S illetve Rubisco kis alegység promótereket és kanamicin rezisztencia-markert alkalmaztak. Mindkét promóter esetében azt várták, hogy erős kifejeződést mutat a transzformánsok vegetatív szöveteiben. A kanamicin rezisztens, feltételezett transzformáns dohány növények Northern blot analízise azt mutatta, hogy mindkét promóter esetén jelentős mennyiségű ferritin mRNS-t akkumuláltak a leveleikben. Ezeket a növényeket később a levelekből származó fehérjekivonat Western blot analízisével is jellemezték. A Rubisco kis alegység promóterhez kapcsolt gén 22,5 kD molekulatömegű, aminovégi toldalékot nem tartalmazó érett fehérjeterméke a kloroplasztiszokban volt kimutatható. A CaMV 35S promóter esetében a lucerna ferritin cDNS szakaszához egy FLAG-tag kapcsolódott. Ezen transzformánsok esetében a 30 kDa molekulatömegű feldolgozatlan előfehérje-termék a citoplazmában volt kimutatható.

Előzetes kutatások szerint a vas toxicitás összefüggésben van az oxidatív stresszel (Kampfenkel et al. 1995). A paraquat herbicid a fotoszintetikus elektrontranszportláncból származó elektronok felhasználásával szuperoxidgyököket képez, ami a növények oxidatív károsodásához vezet (Babbs et al. 1989). Deák és munkatársai (1999) a kontroll és transzformáns dohány növényeket 4 napig 500  $\mu\text{M}$  koncentrációjú  $\text{Fe(III)-EDTA}$  és 2 napig 10  $\mu\text{M}$  koncentrációjú paraquat oldattal kezelték. A sejtkárosodás mértékét a fényindukált klorofill fluoreszcenciájának mérésével vizsgálták. A transzgénikus növények



$F_v/F_m$  aránya az 500  $\mu\text{M}$  Fe(III)-EDTA hatására négy nap alatt 0,8-ról 0,6-0,7 körüli értékre, míg a kontroll dohánynövényeké 0,3-0,4 közé csökkent. A paraquat oldattal történő kezelés során a kontroll dohánynövények fotoszintetikus aktivitása szinte teljesen megszűnt, míg a transzformáns vonalak mindegyike különböző mértékű toleranciát mutatott:  $F_v/F_m$ -arányuk és klorofilltartalmuk szignifikánsan magasabb értéket ért el. A ferritint túltermelő transzgénikus növények üvegházi körülmények között nem mutattak látható változást sem morfológiában, sem növekedési ütemben. Mivel a vas ion alapvető eleme a fotoszintetikus pigmenteknek, fontos hogy a ferritin túltermelés ne okozzon változást a fotoszintetikus aktivitásban és a kloroplasztisz összetételben a transzformáns növényeknél.

Reaktív oxigén fajták termelődnek kórokozók fertőzése során is, amikor egy bonyolult jelrendszeren keresztül (Low and Merida 1996) a kórokozó behatolás korlátozott (Peng and Kuc 1992, Ouf et al. 1993, Király et al. 1993) a növényi szövetek nekrotizálódása következtében (Elstner 1982, Sutherland 1991, Elstner and Osswald 1994, Baker and Orlandi 1995). Ebből következik, hogy a növények antioxidáns kapacitásának növekedésével fokozódnia kellene a kórokozók által okozott sejt és szövet nekrozissal szembeni toleranciájuknak is; ezért az üvegházban nevelt 7 hetes kontroll és transzformáns dohány növényeket Deák és munkatársai (1999) tobacco necrosis vírussal (TNV) fertőzték. A nekrotizált foltok száma jelentősen csökkent a lucerna ferritint túltermelő transzformánsokban mindkét promóter esetében – a citoplazmában termelődött fehérje elhelyezkedési helyétől függetlenül - a kontroll növényekhez képest. *Alternaria* és *Botrytis* fertőzés esetén a nekrotikus foltok átmérőjét vizsgálva a transzformált vonalaknál szintén jelentős toleranciát figyeltek meg a kontroll növényekhez viszonyítva.

Hegedűs és munkatársai (2008) a lucerna ferritint kloroplasztdiálisan túltermelő transzgénikus dohány növényeket (Deák et al. 1999) az alacsony hőmérséklet okozta stressz hatások elemzésére használták fel. A négyleveles transzgénikus és nem-transzformált kontroll dohánynövényeket 24 órás megvilágítást, 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPFD-t (fotoszintetikus fotonfluxus-sűrűség) és 0°C-os állandó hőmérsékletet biztosító Conviron PGV-36 nevelőkamrába helyezték. A vizsgált transzgénikus vonalak  $F_v/F_m$  értéke a két, illetve három napos hidegkezelés ideje alatt folyamatosan meghaladta a kontroll vonalak  $F_v/F_m$  értékét. A hidegkezelést követően 22°C-ra visszahelyezett transzgénikus növények esetében pedig ez az érték sokkal gyorsabban állt helyre, mint a kontroll növényeknél. Hideg és munkatársai (2000) vizsgálataik során azt tapasztalták, hogy az UV-B sugárzásnak és hosszú idejű (42 napos) szárazságkezelésnek kitett lucerna ferritint

túltermelő dohánynövények károsodásának mértéke megegyezett a kontroll növények esetében tapasztalhatóval. Ezzel szemben Murgia és munkatársai (2001) az általuk vizsgált, fotoinhibíciós kezelésnek alávetett, szójaferritint plasztidiálisan túltermelő transzgénikus dohánynövények esetében az  $F_v/F_m$  értékek nagyobb mértékű csökkenését mérték, mint a nem-transzformált növények esetében. A szójaferritint citoplazmatikusan túltermelő dohányok a nem-transzformált növényekkel megegyező mértékű károsodást mutattak.

Ha a különböző stresszhatások következtében képződött reaktív oxigén fajták reakcióba lépnek a lipidekkel, a képződött lipidperoxidok súlyos sejtszintű károsodást okozhatnak (Chia et al. 1984). A lipidperoxidok további degradációjával lipidaldehidek képződnek mind az állati, mind a növényi sejtekben. Ezen rendkívül mérgező hatású vegyületek közé tartozik a 4-hidroxinonenal (HNE), melynek aldehidcsoportját az aldózreduktázok képesek redukálni (Srivastava et al. 1995). Oberschall és munkatársai (2000) lucernából izolált, számos stresszhatásra indukálódó aldóz/aldehid-reduktáz génnel transzformáltak dohánynövényeket. Szárazságstressz hatására fotoszintetikus aktivitásukat csak az aldóz/aldehid-reduktáz enzimet túltermelő transzgénikus vonalak voltak képesek megőrizni, míg a nem transzgénikus növények újraöntözés hatására sem voltak képesek visszanyerni fotoszintetikus aktivitásukat. A transzformáns növények  $H_2O_2$ - és  $CdCl_2$ -kezeléssel szemben is ellenállóbbnak bizonyultak.

A növények oxidatív stresszel szembeni ellenállóságának növelése érdekében végzett transzformációs kísérletekben gyakran alkalmazzák a különböző szuperoxid-dizmutáz (SODs) enzimeket kódoló géneket, mint pl. a citoplazmában lévő Cu/Zn—SOD, a kloroplasztiszban lévő Fe-SOD vagy a mitokondriális Mn-SOD enzimek génjeit (Beyer et al. 1991). Tesniere és munkatársai (2006) szőlő transzformációs kísérleteikben az alkohol-dehidrogenáz enzim abiotikus stressz érzékenységben és másodlagos anyagcseretermékek szintézisében betöltött szerepét vizsgálták. Kísérleteikben a *VvADH2* gén cDNS-ét szensz és antiszensz orientációban juttaták be a szomatikus embriókba. Az aldehid-dehidrogenázt túltermelő növényeknél alacsonyabb cukortartalmat, magasabb fenol és illóolaj tartalmat detektáltak.

#### **4.7. *Agrobacterium* rezisztens transzgénikus növények**

Az agrobaktérium okozta golyvás megbetegedés világszerte komoly problémákat okoz számos növényfaj esetében (pl. málna, szőlő, fás növények). A betegség

kialakulásáért az *A. tumefaciens* vagy az *A. vitis* a felelős. A hidegebb klímájú termesztő területeken -mint például a magyarországi szőlőtermesztő vidékek- a szőlő agrobaktériumos megbetegedése különösen fontos. A probléma valamelyest csökkenthető *Agrobacterium*-mentes szaporítóanyag telepítésével, valamint rezisztens alanyfajták felhasználásával, azonban még nincs egy rutinszerűen alkalmazható és hatékony eljárás a szőlőtermesztők kezében, amivel a betegség megelőzhető lenne (Burr and Otten 1998).

Nam és munkatársai (1999) kisselektáltak olyan mutáns *Arabidopsis thaliana* növényeket, amelyek rezisztensnek bizonyultak a tumoros megbetegedésre, azáltal, hogy a mutáció olyan géneket érintett, amelyek nélkülözhetetlenek az *A. tumefaciens* fertőzéshez és az onkogének integrációjához. A több tízezer lehetséges mutáns tesztelése kivitelezhető az *Arabidopsis thaliana* esetében, azonban ilyen nagyszámú mutáns előállítása és tesztelése a fás növényeknél - ahol az agrobaktériumos vesszőgolyva egy általános probléma - nem megvalósítható (Viss et al. 2003). Ezért elmondható, hogy a genetikai transzformáció az *Agrobacterium* okozta golyvás megbetegedés elleni rezisztencia kialakításában döntő szerephez juthat.

Sundberg és Ream (1999) élesztő kettős-hibrid rendszerben bizonyították, hogy az *A. tumefaciens* VirE1 fehérjéje kölcsönhatásba lép az *Agrobacterium* virulenciájában alapvető szerepet játszó VirE2 fehérjével. A VirE1 és VirE2 fehérje komplex kialakulásáról Deng és munkatársai (1999) azt feltételezik, hogy ez a kölcsönhatás a sejt aggregáció kialakulását és a VirE2 molekulák T-DNS-hez való kötődését hivatott megszüntetni a baktériumsejten belül. Ha a VirE1 fehérje már az *Agrobacterium* fertőzés előtt jelen van a növényben, akkor a transzportálódó VirE2 fehérjék megkötése miatt a növényi sejtekbe érkező T-DNS hozzáférhető lesz a növényi nukleázok számára (Szegedi et al. 2001). A két fehérje közötti kapcsolat megfelelő hatékonysága esetén pedig a tumorok kialakulása elmarad és az *Agrobacterium* elleni rezisztencia kialakulhat. Szegedi és munkatársai (2001) kísérleteik során az oktopinos *A. tumefaciens* törzs Ti-plazmidjáról (pTiA6) származó *virE1* génnel transzformált dohány növényeket állítottak elő és a felnevelt növények golyvás megbetegedéssel szembeni ellenállóságát az *A. vitis* AB3 és *A. tumefaciens* A348 törzsekkel tesztelték. A független transzformáns növények vizsgálata során azt tapasztalták, hogy azokban a sejtekben, ahol a *virE1* gén kifejeződött csökkent a tumorok előfordulása az oktopinos *A. vitis* AB3 fertőzés során. Humann és munkatársai (2006) VirE1 fehérjét expresszáló transzgenikus *Arabidopsis* növényeket állítottak elő. A transzgenikus *Arabidopsis* és az üres vektorral transzformált kontroll vonalak *A. tumefaciens* A348 törzsszel való fertőzése során a transzgenikus *Arabidopsis* vonalak

szignifikánsan rezisztensnek bizonyultak. A transzgénikus növényeken fejlődött tumorok 90%-a 3 mm-nél kisebb, a kontroll növényeken fejlődött tumorok 44%-a pedig 3 mm-nél nagyobb volt. Ezt követően a transzgénikus és kontroll növényekről származó tumorokat 11 hónapra hormonmentes MS táptalajra helyezték. A kontroll növényekről származó tumorok a legalább egyszeri szétadarabolást követően is 4-6 cm átmérőjű differenciálatlan kallusz tömeggé fejlődtek, a transzgénikus vonalakról származó tumorok nagy része azonban elpusztult a táptalajon. A megmaradt tumorokat sem lehetett szétosztani, mert a kb. 2 cm átmérőjű tumorok nem fejlődtek tovább. A kontroll vonalakkal ellentétben, a transzgénikus növényekről származó tumorokon fejlődött kallusznál gyökérfejlődést tapasztaltak. Rossi és munkatársai (1996) egy *virE2* mutáns *A. tumefaciens* törzsszel való fertőzés során a fejlődött kisméretű tumorokban ún. csonkolt T-DNS-ek jelenlétét mutatták ki. Humann és munkatársai (2006) megfigyeléseik alapján szintén arra a következtetésre jutottak, hogy a transzgénikus növényekről származó tumorok sejtjei a *virE1*-*VirE2* komplexképződés következtében a növényi nukleázok által megcsonkolt T-DNS-t tartalmazzák. Feltételezésüket a nem-patogén *virE2* mutáns (MX358) és az *A. rhizogenes* GALLS nevű fehérjéjét kódoló plazmid (pLH338) felhasználásával támasztották alá. A GALLS fehérje nem homológ a *VirE2* fehérjével, viszont képes helyettesíteni azt (Hodges et al. 2004). A pLH338 plazmidot hordozó MX358 *virE2* mutáns törzsszel való fertőzés a kontroll és transzgénikus vonalak esetében hasonló mértékű tumor fejlődést eredményezett, tehát a transzgénikus vonalak rezisztenciája egyértelműen a *virE1* gén expressziójának volt köszönhető.

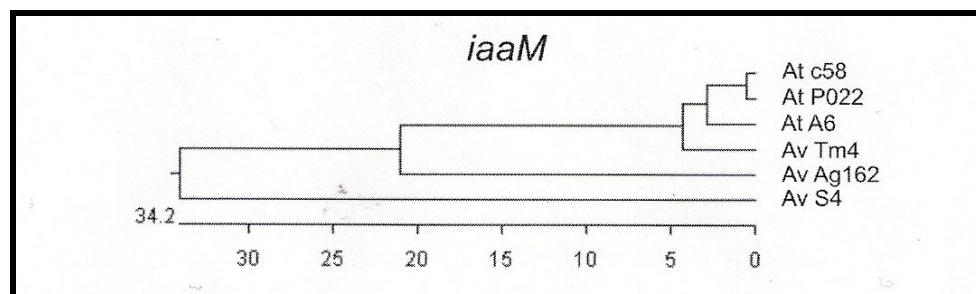
A tumorok kialakulásáért három integrálódó onkogén (*iaaH*, *iaaM* és *ipt*) által kiváltott auxin és citokinin túltermelés a felelős. Két onkogén olyan enzimet határoz meg, amelyek a triptofánt indol-3-ecetsavvá (Inzé et al. 1984) alakítják át: *iaaM* (triptofán-mono-oxigenáz) és *iaaH* (indol-3-acetamid hidroláz). Az *iaaH* és *iaaM* onkogének által kódolt enzimek bármelyikének hiánya meggátolja az auxin termelést. A harmadik onkogén (*ipt*) pedig AMP izopentenil transzferázt kódol, amelyik izopentenil AMP-t (citokininint) állít elő (Winans 1992). Az *ipt* és *iaaM* vagy *iaaH* inaktiválása kikapcsolja a tumorgenezist (Lee et al. 2003). Az *Agrobacterium* esetében speciálisan alkalmazhatóak a poszttranszkripcionális génelhallgattatás (posttranscriptional gene silencing, PTGS) vagy RNS interferencia módszerei is, hiszen az *Agrobacterium* által beépített gének mRNS termékei megjelennek a baktérium által transzformált sejtekben.

A géncsendesítés egy mechanizmus, amely az eukarióta szervezetekben gének expresszióját képes módosítani (Baulcombe 2004). A folyamat során duplaszálú RNS

(double stranded, dsRNS) indukálja a géncsendesítést. A Dicer nevű enzim a dsRNS molekulát a sejtben rövid, jellegzetes struktúrájú és méretű, hozzávetőlegesen 21 nukleotid hosszúságú darabokra vágja (small interfering RNS, siRNS). Ezekhez a rövid siRNS oligonukleotidokhoz kötődik az RNS indukálta géncsendesítő komplex (RNA induced silencing complex, RISC), ami a dsRNS két szála közül, valamilyen felismerő mechanizmus alapján kiválasztja az egyiket. Ez lesz a vezető szál, a másik pedig degradálódik. A kiválasztott szál segítségével a komplex szekvencia specifikusan ismeri fel az mRNS komplementer részét, majd azt a komplementer régió közepén hasítja. Ennek következtében az mRNS degradálódik, így nem képződhet róla fehérje. A PTGS-t kiváltó transzgének jelenléte nem szükséges az összes sejtben, mivel a célzott gén csendesítése a nem transzformált sejtekben szisztemikusan is kiváltható (Voinnet et al. 1998). A PTGS szisztemizációját transzformált alany és transzformálatlan nemes között is megfigyelték (Palauqui et al. 1997).

Lee és munkatársai (2003) létrehoztak több génkonstrukciót az *A. tumefaciens* A348 törzsből származó *iaaM* és *ipt* szekvenciák segítségével, melyek készítésénél figyelembe vették, hogy az idő előtti stop kodont tartalmazó RNS molekulák destabilizáló hatása erősebb. Ezért az elrontani kívánt két gén esetében a harmadik kodont stop kodonra változtatták, és egyben egy „frame shift” mutációt is létrehoztak. Ehhez az *iaaM* génnek csak az első 1797 bázispár hosszú kódoló részét, az *ipt* génnek pedig a teljes kódoló szekvenciáját felhasználták. A két génből egy hibrid génkonstrukciót is létrehoztak úgy, hogy az *ipt* gén *Bam*H1 helyére beépítették az *iaaM* kódoló részt. Az így elkészített konstrukciót egy növényi transzformációs vektorba építették, melyben a CaMV 35S promóterről egy irányban szensz RNS íródik át. A hibrid konstrukció, különösen az *iaaM* gén esetében, hatásosan működött és akadályozta a tumorképződést. Az RNS hibridizációs kísérletekből kiderült, hogy az eredetileg egyszálú RNS átírására alkalmas vektor esetében a nopalin-szintáz promóteréről átíródott az antiszensz RNS is, így duplaszálú RNS is képződhetett, melyről ismert, hogy nagyobb mértékben aktiválja a géncsendesítés mechanizmusát. Ezt a jelenséget kihasználva, készítettek egy olyan konstrukciót is, melyben a két gént egymás után építették, majd ezt két, egymással szemben elhelyezkedő, szensz és antiszensz RNS átírását biztosító promóter közé helyezték és növényi transzformációs vektorba juttatták. Ez a génkonstrukció a pJP17 nevet kapta, amelynek hatásosságát koinokulációs kísérletek segítségével bizonyították. A koinokulációs teszt során a pJP17 konstrukciót tartalmazó törzset és a patogén baktériumot összekeverve kalanchoe növényeket vagy burgonya korongokat fertőztek. A teszt lényege, hogy a

géncsendesítésre tervezett konstrukció és a patogén T-DNS egyaránt bejut a fertőzött sejtekbe, és így a vektor tumorképzést megakadályozó hatása transzgénikus növények létrehozása nélkül, azonnal vizsgálható. Mivel nem minden sejtbe jut be mindkét vektor, tumorképződés is megfigyelhető, csak csökkent mértékben. Lee és munkatársai (2003) kísérleteikben azt is bizonyították, hogy a géncsendesítés létrejöttéhez szükség van a gén translációs start szekvenciájára is, e nélkül hiába tartalmazza a konstrukció akár a teljes gén 90%-át, a csendesítés nem jön létre. A géncsendesítés abban az esetben is hatástalan, ha nincs megfelelő szekvencia azonosság a vektorral bejuttatott gén és a patogén *Agrobacterium* T-DNS részén elhelyezkedő gén között, hiszen a folyamat alapja a szekvencia specifikusan történő felismerés. Ebből következik, hogy ez a módszer nem általánosítható minden *Agrobacterium* törzssre, mert az *iaaM* szekvenciák nagyon eltérőek, még a közeli rokon törzsek esetében is. Galambos Anikó diplomadolgozatában (2007) számítógépes elemzés segítségével összehasonlította néhány *Agrobacterium* törzs *iaaM* génjének szekvenciáját, majd ennek alapján elkészítette a rokonsági viszonyokat ábrázoló törzsfát is (2. ábra). Ahogy az az ábrán is látszik, az *A. tumefaciens* S4 a többi törzstől teljesen elkülönülten, önnálló ágon helyezkedik el, így feltehetően a pJP17 vektorkonstrukció ezzel a törzsszel szemben hatástalan.



**2. ábra:** A különböző *Agrobacterium* törzsek *iaaM* DNS-szekvenciáinak összehasonlításából származó törzsfa. At: *Agrobacterium tumefaciens* törzsek, Av: *Agrobacterium vitis* törzsek (Galambos 2007)

A szülő esetében azonban jelentős kórokozó az *A. vitis* S4 törzs, amelynek *iaaM* szekvenciája jelentősen eltér a többi *Agrobacterium* törzstől, ezért a Pécsi Tudomány Egyetem Biológiai Intézetének Genetika és Molekuláris Biológiai Tanszékén (Galambos 2007) a PCR technika segítségével izolálták az *A. vitis* S4 törzs *iaaM* génjének egy részletét, majd számos klónozási lépésen keresztül hozzákapcsolták azt az *A. tumefaciens* *iaaM* génből származó szakaszhoz. Az így létrehozott T-DNS konstrukciót (pJP17-S4)

megfelelő („disarmed”) *A. tumefaciens* törzsbe juttatva kalanchoe koinokulációs és dohány transzformációs kísérletekben tesztelték.

Viss és munkatársai (2003) az agrobaktérium transzformációs rendszert alkalmazva két különböző génkonstrukciót (pJP17, pJP20) használtak fel a géncsendesítés mechanizmusának indukálásához a ‘Jonagold’ almafajtában. Az előző bekezdésben ismertetett pJP17 konstrukció esetében a két egymással szemben elhelyezkedő, szensz és antiszensz RNS átírását biztosító promóter közé helyezett, egymás után épített *iaaM* és *ipt* géneket növényi transzformációs vektorba juttatták. A pJP20 plazmid esetében a két gén szeparáltan helyezkedett el, mindegyik a normál és az inverz átírást biztosító promóterekkel körülvéve. Az ötven regenerált és bizonyítottan transzformáns alma vonal közül kiválasztottak 14 vonalat a további tesztelésekhez. Ezek közül négy vonal a pJP17, tíz pedig a pJP20 génkonstrukciót hordozta. Mivel a tumoros megbetegedés általában a gyökéren jelentkezik, ezért a transzformáns növényekből származó gyökérkorongokat (vonalanként legalább 180 explantátum) fertőzték az *A. tumefaciens* A348 törzsszel. Három hónappal a fertőzés után hat vonal esetében egyáltalán nem találtak tumorfejlődést. A rezisztens vonalak közül három a pJP17, a másik három pedig a pJP20 konstrukcióval volt transzformálva. Kísérleteik során mindkét konstrukció alkalmasnak bizonyult almában az *iaaM* onkogén csendesítésére.

A lehetséges megoldások közé tartozik még a speciális antibakteriális fehérjék termeltetése (pl. a bakteriális membránt, sejtfalat vagy anyagcserét károsító peptidek), a bakteriális toxinok gátlása (pl. a toxint inaktiváló fehérje termeltetésével), izolált növényi rezisztenciagének felhasználása vagy az oxidatív stressz okozta károsodás mérséklése (Dudits és Heszky, 2003). Azonban figyelembe kell venni azt is, hogy a lítikus peptidek toxikusak lehetnek a növények és emlős állatok sejteire, egy ilyen növény felboríthatja a mikroflóra természetes egyensúlyát.

#### **4.8. Az *in vitro* körülmények és az akklimatizáció hatékonysága közötti összefüggések**

A mikroszaporítás a legelterjedtebb szaporítási technika, amely lehetőséget nyújt a nemesítési programok során szelektált növények gyors felszaporítására. Az *in vitro* tenyésztés minden szakasza hatással van a szaporulatok számára és minőségére, de a legvégső siker leginkább a növények gyökereztetésén, edzésén és akklimatizálásán múlik, amelynek magas túlélési arányt és megfelelő *ex vitro* fejlődést kell eredményeznie.

A steril körülmények között előállított mikrodugványok gyökereztetése elvégezhető *in vitro* vagy *ex vitro* körülmények között (McCown 1988). Az *in vitro* gyökereztetés steril körülmények között zajlik, az *ex vitro* gyökereztetéssel ellentétben. *In vitro* gyökereztetéshez általában agarral szilárdított táptalajt használnak, ebbe helyezik a hajtásokat a gyökér iniciációhoz és a gyökér elongációhoz is. Használható külön auxintartalmú táptalaj a gyökér iniciációhoz, majd egy auxinmentes táptalaj a gyökér elongációhoz. Az *in vitro* növények növényházba történő áthelyezéséhez, valamint talajba ültetéséhez a gyökereztető közeg teljes eltávolítására van szükség, hogy megelőzzük a fertőzéseket. Az agarral szilárdított táptalajban fejlődött gyökerek vékonyak, törékenyek és általában sérülnek a mosás során, pedig a működőképes gyökérrendszer megléte az egyik legfontosabb feltétele annak, hogy a növény vizet és ásványi anyagokat tudjon felvenni és megfelelő módon reagáljon a stresszhatásokra kiültetés után, üvegházi vagy szabadföldi körülmények között (Nowak and Shulaev 2003).

A gyökeresedés, valamint a növényházi körülményekhez történő alkalmazkodás hatékonyságának növelésére Roberts és munkatársai (1990, 1994) cellulóz alapú (Sorbarod) közeget, Roche és munkatársai (1996) habot, Rugini és Verma (1982) vermikulitot, Jay-Allemand és munkatársai (1992) vermikulit és gerlit keveréket, Gebhardt és Friedrich (1987) tőzeget, Gangopadhyay és munkatársai (2002) pedig kókuszrostot alkalmaztak. A gyökeres mikrodugványokat minden esetben cserépben nevelték tovább üvegházi körülmények között.

A szőlő *in vitro* szaporítása napjainkban egy megalapozott és rutinszerűen alkalmazható eljárásnak számít (Torregrosa et al. 2001), azonban a gyökereztetés és az akklimatizáció hatékonysága még mindig nem megfelelő az általában agarral vagy gerlittel szilárdított közegekben fejlődő gyökerek törékenysége, valamint a kiültetés utáni befertőződési problémák miatt. Torregrosa és munkatársai (2001), valamint Gribaudo és munkatársai (2003) az akklimatizáció hatékonyságának növeléséhez inorganikus folyadék használatát, fokozatos szellőztetést, illetve jól szellőző edények használatát javasolják.



## 5. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 5.1. Felhasznált anyagok

#### 5.1.1. Felhasznált növények

Kísérleteink során az ‘Arany sárféher’, ‘Cabernet franc’, ‘Odysseus’, ‘Orpheus’, ‘Taurus’, ‘Chardonnay’, ‘Kékfrankos’, ‘Korai Bíbor’, ‘Pannon frankos’, ‘Rajnai rizling’ nemes-, és a ‘Teleki 5C’, ‘Richter 110’ alanyfajtákkal dolgoztunk, amelyeket a Budapesti Corvinus Egyetem Genetika és Növénynemesítés Tanszéke, valamint a Budapesti Corvinus Egyetem Szőlészeti és Borászati Kutató Intézete (Kecskemét) bocsátott a rendelkezésünkre.

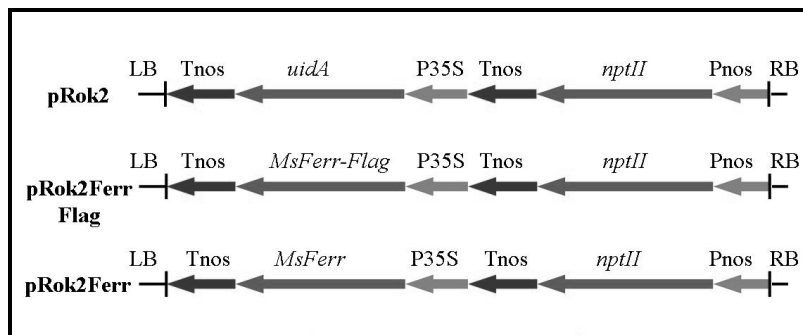
#### 5.1.2. Felhasznált transzformációs vektorok

<b>baktériumtörzsek és plazmidok</b>	<b>jellemző tulajdonságok</b>	<b>irodalom</b>	<b>származás</b>
EHA105 (pEHA105+pRok2)	pTiBo542-ből származó onc-plazmid, Kmr	Deák et al. 1999	BCE SzBKI, Kecskemét
EHA105 (pEHA105+pRok2Ferr)	pTiBo542-ből származó onc-plazmid, Kmr	Baulcombe et al. 1986 Deák et al. 1999	BCE SzBKI, Kecskemét
EHA105 (pEHA105+pRok2FerrFLAG)	pTiBo542-ből származó onc-plazmid, Kmr	Deák et al. 1999	BCE SzBKI, Kecskemét
EHA101 (pEHA101+pTd93virE1)	pTiBo542-ből származó onc-plazmid, Kmr, Gmr	Szegedi et al. 2001	BCE SzBKI, Kecskemét
EHA101 (pEHA101+pJP17)	pTiBo542-ből származó onc-plazmid, Kmr, Gmr	Viss et al. 2003	BCE SzBKI, Kecskemét
EHA101 (pEHA101+pJP17-S4)	pTiBo542-ből származó onc-plazmid, Kmr, Gmr	Galambos 2007	BCE SzBKI, Kecskemét

#### 5.1.3. A transzformációs vektorok ismertetése

Az általunk felhasznált pRok2Ferr, pRok2FerrFLAG és pRok2 plazmidok (3. ábra) a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központjának Növénybiológiai

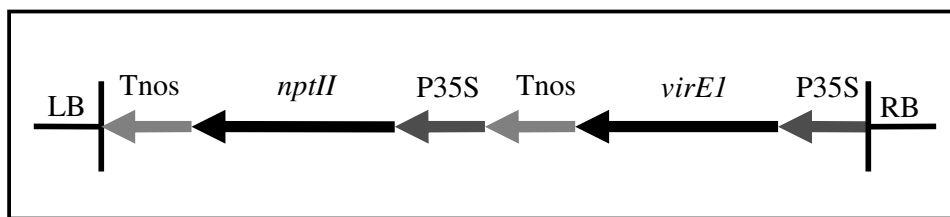
Intézetéből származnak, és a Budapesti Corvinus Egyetem Szőlészeti és Borászati Kutató Intézete (Kecskemét) bocsátotta őket a rendelkezésünkre. A pRok2Ferr plazmid T-DNS tartalmazza a nopalin-szintáz gén (*nos*) promóterének kontrollja alatt álló *nptII* (neomicin-foszfo-transzferáz) szelekciós markergént és a lucerna ferritin gént. A ferritin gén működését az elé beépített karfiol mozaikvírus CaMV 35S promóter szekvenciája irányítja. A plazmid bakteriális szelekciós génként kanamicin rezisztenciát biztosít a baktérium számára. Deák és munkatársai (1999) bizonyították, hogy a gén kezdő szakasza felelős a fehérjetermék kloroplasztisban történő megnyilvánulásáért. A pRok2FerrFLAG plazmid konstrukció esetében a lucerna ferritin cDNS szakaszához egy FLAG-tag kapcsolódik, ezért a termelődő fehérje feldolgozatlan formában a citoplazmában marad. A pRok2 plazmid konstrukció hordozza az CaMV 35S promóter irányítása alatt álló *uidA* (*gus*) és a nopalin-szintáz gén (*nos*) promóterének kontrollja alatt álló *nptII* (neomicin-foszfo-transzferáz) géneket. A *Medicago sativa*-ból származó *MsFerr* gén teljes szekvenciája az X 97 057 szabadalmi szám alatt került be az Európai Molekuláris Biológiai Laboratórium (EMBL) adatbankjába.



**3. ábra:** A pRok2, pRok2FerrFLAG és pRok2Ferr plazmidok T-DNS-ének vázlatos bemutatása.

RB, LB: jobb és baloldali határoló régiók, Pnos: nopalin-szintáz gén promóter régiója, Tnos: nopalin-szintáz gén terminációs régiója, P35S: karfiol mozaikvírus CaMV 35S promóter szekvenciája (Deák et al. 1998 nyomán).

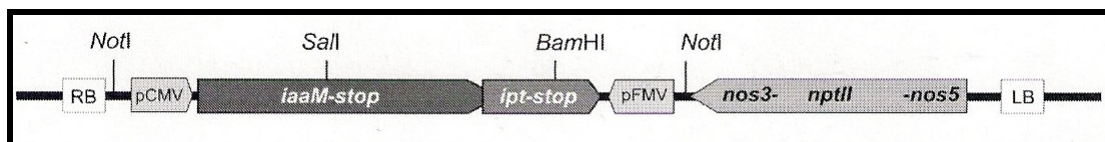
A pTd93virE1 plazmid Bruno Tinland-tól származik (ETH Zentrum, Zürich, Svájc), és szintén a Budapesti Corvinus Egyetem Szőlészeti és Borászati Kutató Intézete (Kecskemét) bocsátotta azt a rendelkezésünkre. A konstrukció hordozza az CaMV 35S promóter irányítása alatt álló *nptII* (neomicin-foszfo-transzferáz) és az *A. tumefaciens virE1* géneket (4. ábra). A plazmid bakteriális szelekciós génként gentamicin rezisztenciát biztosít a baktérium számára.



**4. ábra:** A pTd93virE1 plazmid T-DNS vázlatos bemutatása.

RB, LB: jobb és baloldali határoló régiók, *nptII*: neomicin foszfotransferáz gén, Tnos: nopalín-szintáz gén terminációs régiója, P35S: karfiol mozaikvírus CaMV 35S promóter szekvenciája (Szegedi et al. 2001 nyomán).

A pJP17 konstrukciót Walter Ream (Oregon State University, USA) a Monsanto hozzájárulásával bocsátotta a Budapesti Corvinus Egyetem Szőlészeti és Borászati Kutató Intézetének (Kecskemét) rendelkezésére. A konstrukció a két csendesíteni kívánt (A348) onkogénnek, az *iaaM* génnek az első 1797 bázispár hosszú kódoló részét, az *ipt* génnek pedig a teljes kódoló szekvenciáját tartalmazza. Mindkét gén esetében a harmadik kodont stop kodonra változtatták, és egyben egy „frame shift” mutációt is létrehoztak. A két gént egymás után építették, majd ezt két, egymással szemben elhelyezkedő, szensz és antiszensz RNS átírását biztosító promóter közé helyezték (5. ábra). A plazmid bakteriális szelekciós génként gentamicin rezisztenciát biztosít a baktérium számára.

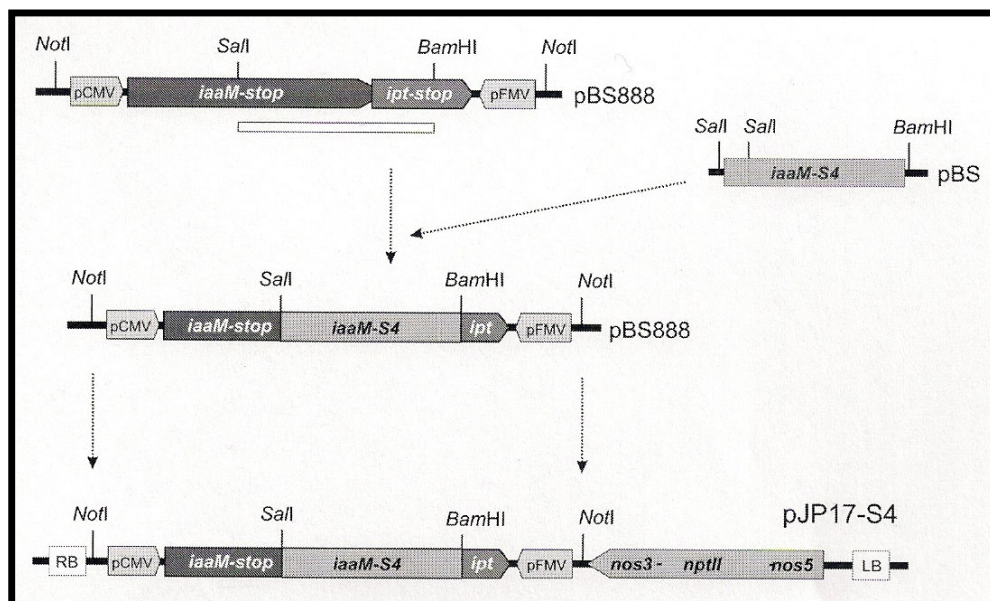


**5. ábra:** A pJP17 konstrukció T-DNS része (Galambos 2007).

RB, LB: jobb és baloldali határoló régiók, *nptII*: neomicin foszfotransferáz gén, nos3' és nos5': nopalín-szintáz 3' és 5' szekvencia, pCMV és pFMV növényi promóterek, *NotI*, *SalI* és *BamHI*: enzimek hasítóhelyei.

Az *A. vitis* S4 *iaaM* szekvenciát is tartalmazó pJP17-S4 konstrukció a pJP17 konstrukció átalakított változata azáltal, hogy a 6. ábrán feltüntetett *SalI* és *BamHI* fragment helyére történt az új szekvencia beillesztése. A plazmid bakteriális szelekciós génként gentamicin rezisztenciát biztosít a baktérium számára. A pJP17-S4 konstrukciót Galambos Anikó (PTE TTK Biológiai Intézet Genetika és Molekuláris Biológiai Tanszék, Pécs) állította elő Szegedi Ernővel (BCE Szőlészeti és Borászati Kutató Intézet, Kecskemét) együttműködésben.

Az pTd93virE1, pJP17 és pJP17-S4 vektorokkal végzett munkát Szegedi Ernő (BCE Szőlészeti és Borászati Kutató Intézet, Kecskemét) felügyelete alatt végeztük.



**6. ábra:** A pJP17-S4 konstrukció T-DNS része (Galambos 2007).

RB, LB: jobb és baloldali határoló régiók, *nptII*: neomicin foszfortranszferáz gén, *nos3'* és *nos5'*: nopalín-szintáz 3' és 5' szekvencia, pCMV és pFMV növényi promóterek. *NotI*, *SalI* és *BamHI*: enzimek hasítóhelyei.

## 5.2. Alkalmazott módszerek

### 5.2.1. Embriogén kallusz indukció

Az embriogén kallusz indukálását 12 különböző szőlőfajta portok tenyészetein kíséreltük meg. Az 'Arany sárféher', 'Cabernet franc', 'Odysseus', 'Orpheus', 'Taurus', 'Richter 110' fajták embriogén kapacitását két különböző táptalajon (MSE, MST); a 'Chardonnay', 'Kékfrankos', 'Korai Bíbor', 'Pannon frankos', 'Rajnai rizling', 'Teleki 5C' fajták embriogén kapacitását pedig négy különböző táptalajon (MSE, MST, MSE/2, NNE) teszteltük. A felhasznált MS alapú táptalajok (MSE, MSE/2, MST) a Murashige és Skoog (1962) által leírt komponensek mellett 20 g/l szacharózt, 70 mg/l Fe-EDTA-t és 7 g/l Oxoid agart tartalmaztak (pH 5,8). Az (1.) MSE táptalaj (Mozsár and Süle, 1994) 0,1 mg/l BA-t és 1,1 mg/l 2,4-D-t tartalmazott, az (2.) MSE/2 egy módosított MSE táptalaj, amely fele koncentrációban tartalmazta a makroelemeket, az (3.) MST táptalaj (Oláh et al. 2003a) pedig 0,05 mg/l TDZ-t és 1,1 mg/l 2,4-D-t tartalmazott. Az (4.) NNE táptalaj a Nitsch és

Nitsch (1969) által leírt táptalaj, amely az 1,1 mg/l 2,4-D és 0,1 mg/l BA hormonkombinációt tartalmazta.

Az embriogén kultúra indításához a portokokat a szabadföldi növények, illetve a szabadföldről begyűjtött és üvegházban hajtatott vesszők még zárt virágbimbóiból nyertük. Hajtatáshoz a beérett vesszőket november-decemberben gyűjtöttük be szabadföldről, majd 4°C-os vernalizációs kezelést követően a vesszőket szakaszosan (januártól májusig), kétrügyes dugványra vágva helyeztünk a perlittel megtöltött konténerekbe (7. ábra). A csapvízzel nedvesített perlitben lévő vesszőkről a 2-3 hét után megjelent leveleket naponta eltávolítottuk, hogy egyéb fotoszintetizációs felület hiányában a virágfejlődést indukáljuk. Ezzel a módszerrel a vesszők perlitbe helyezését követően körülbelül 5 hét után kapunk az embriogén kallusz indukciós kísérletekhez megfelelő stádiumú (III. és IV., Gribaudo et al. 2004) virágzatokat. A vesszők hajtatását a munkacsúcs széthúzása, valamint az üvegházi körülmények között nevelt növények nagyobb hatékonyságú sterilizációja miatt alkalmaztuk. Nem elhanyagolható az a különbség sem, hogy az üvegházban hajtatott vesszők nincsenek kitéve az időjárás viszontagságainak a virágzás idején, szemben az ültetvényben lévő tőkékkel.



**7. ábra:** Üvegházi körülmények között perlitben hajtatott ‘Chardonnay’ vesszők.

A közvetlenül virágzás előtt begyűjtött, közel azonos fenofázisban lévő virágzatokat 7 napig 4°C-on, hűtőben tároltuk. A virágbimbókat 0,6%-os NaOCl oldatban 10 percig fertőtlenítettük, majd háromszor 10 percre desztillált vízbe merítettük. A virágot (esetenként sztereómikroszkóp alatt) lándzsátű és csipesz segítségével bontottuk szét, a portokokat az eljárás során steril csapvízzel nedvesítve. A kipreparált portokokat portoknyéllel együtt helyeztük a táptalajra. Az embriogén kallusz indukciós kísérleteket 6 ismételtsben végeztük el, egy Petri-csészébe kb. 50 db portok került. A kultúrákat indítás után 26°C-on sötétben inkubáltuk. A három hónapos inkubációs időt követően a portokon megjelent kalluszt értékeltük.

Kísérleteink során felmerült, hogy a sterilizáció módja hatással lehet az embriogén kallusz indukcióra, ezért a hajtatott ‘Chardonnay’ vesszőkről begyűjtött virágzatokat 7%-os  $\text{Ca(OH)}_2$  oldatban illetve 0,6% NaOCl oldatban (Chlorox 15%) fertőtlenítettük. A sterilizációt követően a virágzatokból kipreparált portokokat mindkét sterilizációs eljárást követően négy különböző táptalajra helyeztük: (1.) MSE; (2.) MSEC, amely egy módosított MSE táptalaj 2,5 g/l aktív szénnel kiegészítve; (3.) MSE táptalaj, amely 4 g/l polyvinylpyrrolidont (Policlar AT, Perl et al. 1996; Mozsár et al. 1998) és 0,1 g/l

dithioerythritolt (Bornhoff and Harst 2000) tartalmazott; (4.) CPE amely a Cheé és Pool (1987) által leírt szőlőre optimalizált táptalaj 0,1 mg/l BA-nel és 1,1 mg/l 2,4-D-vel kiegészített változata. A kísérletet 10 ismétlésben végeztük el, és a portokokon megjelent kalluszt három hónap elteltével értékeltük. Az 1. táblázat összefoglalóan tartalmazza az embriogén kallusz indukciós kísérletekben felhasznált táptalajokat.

**1. táblázat:** Felhasznált táptalajok.

<b>Táptalaj</b>	<b>Alap-táptalaj</b>	<b>Szénforrás</b>	<b>Makroelemek (konc.)</b>	<b>Mikroelemek (konc.)</b>	<b>Növekedés-szabályozók</b>
<b>MS/2</b>	Murashige & Skoog	szacharóz	fél	teljes	-
<b>MSE</b>	Murashige & Skoog	szacharóz	teljes	teljes	BA, 2,4-D
<b>MSE/2</b>	Murashige & Skoog	szacharóz	fél	teljes	BA, 2,4-D
<b>MST</b>	Murashige & Skoog	szacharóz	teljes	teljes	TDZ, 2,4-D
<b>MSNOA</b>	Murashige & Skoog	maltóz, glicerín	teljes	teljes	NOA
<b>CP</b>	Cheé & Pool	szacharóz	teljes	teljes	-
<b>CPE</b>	Cheé & Pool	szacharóz	teljes	teljes	BA, 2,4-D
<b>NN</b>	Nitsch & Nitsch	szacharóz	teljes	teljes	-
<b>NNE</b>	Nitsch & Nitsch	szacharóz	teljes	teljes	BA, 2,4-D

#### 5.2.2. Az embriogén kallusz felszaporítása

Oláh és munkatársai (2008) kísérleteikben az 1,1 mg/l 2,4-D-t és 0,1 mg/l BA-t tartalmazó MSE táptalajt találták legmegfelelőbbnek a portokon fejlődött embriogén kallusz felszaporítására, ezért mi is ezt a táptalajt használtuk erre a célra. Emellett a 'Richter 110' alanyfajta esetében kipróbáltuk az 1,1 mg/l 2,4-D-t és 0,1 mg/l BA-t tartalmazó CPE táptalajt embriogén kallusz felszaporítására. A kísérletben kontrollként az azonos hormonkombinációt tartalmazó MSE táptalajt használtuk, majd az 1. és 2. hónap után megmértük a folyamatosan osztódó kallusz tömegét. A kapott eredményeket egytényezős variancia-analízissel értékeltük.

### 5.2.3. Szomatikus embrió indukció és növényregeneráció

A portok eredetű és felszaporított embriogén kalluszt 10 g/l szacharózzal és 7 g/l agarral kiegészített szilárd hormonmentes MS/2 táptalajra (1. táblázat) helyeztük, hogy szomatikus embriófejlődést indukáljunk (sötétben 26°C-on). Egy hónap elteltével a szilárd táptalajon lévő kultúrákat egy hétre fényre helyeztük, majd a csírázó embriókat egyesével 30 ml hormonmentes MS/2 táptalajt tartalmazó üvegfiolákban neveltük tovább 24°C-on 16 órás megvilágítás mellett. Ezt követően kb. három hónapon belül a regenerálódott, gyökérrel és hajtással rendelkező 4-5 leveles szőlő növények felszaporíthatók.

#### 5.2.3.1. A növényregenerációs kísérletek optimalizálása

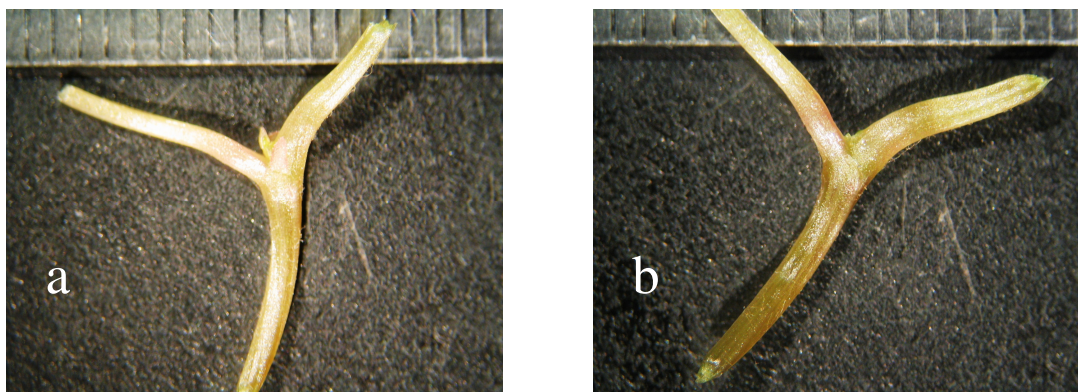
A ‘Teleki 5C’, ‘Richter 110’ és ‘Chardonnay’ fajták esetében a portok eredetű embriogén kalluszt folyékony MSNOA táptalajban (1. táblázat) kívántuk homogenizálni. A kísérletben az 5 µM NOA hatását teszteltük, a táptalaj a Mauro és mtsai (1995) által leírt mennyiségű maltózt és glicerint tartalmazta. A folyékony táptalajban felszaporított homogén kalluszt 2 hét sötétben történő rázatást követően hormonmentes MS/2 helyezettük. A kísérlethez kontrollként az 1,1 mg/l 2,4-D-t és 0,1 mg/l BA-t tartalmazó szilárd MSE táptalajról származó embriogén kalluszt használtuk, mindhárom fajtánál MS/2 táptalajon vizsgáltuk az embriogén anyag további fejlődését, összevetve a folyékony MSNOA táptalajban homogenizált embriogén kallusz regenerációjával.

Ezen kívül a ‘Chardonnay’ fajta esetében az 1,1 mg/l 2,4-D-t és 0,1 mg/l BA-t tartalmazó szilárd MSE táptalajról származó embriogén kallusz regenerációját hormonmentes MS/2 és CP (1. táblázat) táptalajokon hasonlítottuk össze, a regenerációs idő hosszát figyelembe véve.

### 5.2.4. Szőlő direkt organogenezis

Szőlő organogenezist célzó kísérleteinkben a rügy eltávolítása után a rügyalap sejtjeiből próbáltunk hajtást regenerálni citokinin típusú hormonok segítségével. A kísérletben az *in vitro* körülmények között nevelt ‘Richter 110’ alanyfajtát teszteltük. Egyrügyes mikrodugványokat készítettünk (8a. ábra) és a levélhónaljakban található szemeket kipattintottuk (8b. ábra). A rügy eltávolítását mikroszkóp alatt ellenőriztük. A mikrodugványokat merőlegesen helyeztük a két különböző hormonnal - (1.) 0,1 mg/l BA illetve (2.) 0,25 mg/l TDZ - kiegészített szilárd MS táptalajra.





**8. ábra:** A szőlő organogenezishez felhasznált egyrügyes (a) és kivakított (b) mikro dugvány.

#### 5.2.5. Szőlőtranszformáció

##### 5.2.5.1. Embrió fejlődés indukálása és agrobaktériumos kezelés

A 'Richter 110' portokokon fejlődött és felszaporított embriogén kalluszt használtuk fel a transzformációs kísérletekhez. Az embriogén kallusz tenyészeteket 2 hétre MS/2 táptalajra helyeztük, hogy szomatikus embriófejlődést indukáljunk.

Az előzőleg AB-minimál táptalajra (2. Táblázat) kikent és felszaporított baktériumból szuszpenziót készítettünk ( $10^8$  sejt/ml), amelyet pipettával juttattunk rá a szilárd táptalajon indukált 1-2 mm-es embriókból álló tenyészetek felületére, majd két nap kokultiváció következett hormonmentes (MS/2) táptalajon.

**2. táblázat:** AB minimál táptalaj (Lichtenstein and Draper 1986).

AB táptalaj összetevői	koncentráció
$K_2HPO_4$	3 g/l
$NaH_2PO_4$	1 g/l
$NH_4Cl$	1 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,3 g/l
KCl	0,15 g/l
FeEDTA	70 mg/l
MS Vitamin	1 ml/l

Kiegészítésként még 0,2-0,5% szénforrás és agar (1,2%) szükséges (pH 7).

#### 5.2.5.2. Az *Agrobacterium* előlése

A baktérium előlése a kokultiváció után 1-2 mm-es embriók esetén megfelelő módszer a 300 mg/l carbenicillint és 300 mg/l claforánt (cefotaxim) tartalmazó szilárd táptalajra történő passzálás és fenntartás (Oláh et al. 2003b). Kísérleteink során szelekciós ágensként 20 mg/l kanamicint használtunk. Antioxidánsnak 4 g/l vízben oldhatatlan polyvinylpyrrolidont (Polyclar AT) és 0,1 g/l dithioerythritolt (DTE) használtunk (Oláh et al. 2003b), hogy megfelelő védelmet nyújtsanak a transzformált sejtek számára, a szelekció miatt nagy számban elpusztult sejtek által a táptalajba juttatott anyagokkal szemben. Az így kiegészített MS/2 táptalajt MS/2Km jelöléssel láttuk el.

#### 5.2.5.3. Növényregeneráció szelekciós táptalajon

A tenyészetek havonkénti passzálása során a torpedó és korai szikleveles stádiumú embriókat folyamatosan leválasztottuk és Petri-csészében továbbra is MS/2Km táptalajon fényre helyeztük (24°C, 16 óra megvilágítás).

A fényen a folyamatos passzálás során a szelekciós nyomás mellett levél- és gyökérkezdeményekkel rendelkező embriókat egyenként 30 ml, antioxidánsokat már nem tartalmazó MS/2Km szilárd táptalajjal töltött tenyészmedényekbe helyeztük át. A regenerálódott növényekből a havonta történő átrakás és felszaporítás során a hajtáscsúcsot és az alatta található két-rügyes hajtásrészt helyeztük friss táptalajra. Egy évvel a transzformációs kísérletek megkezdése után fokozatosan megvontuk az antibiotikumokat és a szelekciós ágenszt a táptalajból. A jól meggyökeresedett egyedeket kondicionálás után üvegházban neveljük tovább (lásd 4.2.6. fejezet).

#### 5.2.5.4. A szőlőtranszformáció az *MsFerr*, *iaaM* és *virE1* gének felhasználásával

Hasznos génkonstrukciók felhasználásával genetikai transzformációs kísérleteket végeztünk a 'Richter 110' fajtán. Az oxidatív stressztűrő képesség növelésére irányuló kísérleteinkben az EHA105(pRok2Ferr) és EHA105(pRok2FerrFLAG); az *Agrobacterium* rezisztens növények előállítását célzó kísérleteinkben az EHA101(pTd93virE1), EHA101(pJP17) és EHA101(pJP17-S4) vektorkonstrukciókat használtuk fel. A pRok2Ferr és pRok2FerrFLAG konstrukciók lehetővé teszik a lucerna ferritin gén expresszióját a szőlő kloroplasztiszokban ill. citoplazmában, a megnövekedett ferritin szint pedig hozzájárulhat a szabad vasionok mennyiségének csökkentésével a Fenton-reakció limitálásához és ezen keresztül az oxidatív stresszel szemben ellenállóbb vonalak

kialakításához (lásd 3.6 fejezet). A pTd93virE1 konstrukció segítségével *Agrobacterium* VirE1 fehérjét termelhetünk a növényi sejtekben. Mivel az *Agrobacterium* fertőzés során a T-DNS komplex és a VirE2 fehérjék elkülönülten jutnak be a növényi sejtekbe, így a VirE2 fehérjék gátlásával (VirE1 és VirE2 komplex képződés) valószínűleg a szőlő agrobaktériumos vesszőgolyvával szemben ellenállóbb vonalak alakíthatóak ki (lásd még 3.7. fejezet). A géncsendesítés mechanizmusának indukálásához két különböző génkonstrukciót használtunk fel. A pJP17 konstrukció tartalmazza az egymás után épített (A348) *iaaM* és *ipt* géneket egymással szemben elhelyezkedő, szensz és antiszensz RNS átírását biztosító promóter közé helyezve; a pJP17-S4 konstrukció az *A. vitis* S4 *iaaM* szekvenciát is tartalmazza, amelyben az új szekvencia beillesztése a *SalI* és *BamHI* fragment helyére történt (lásd még 3.7. fejezet).

#### 5.2.5.5. A transzformációs kísérletek optimalizálása

Kísérleteink során többféle módszert is kipróbáltunk a növényregeneráció nehézségeinek leküzdése érdekében. Az abnormális fejlődést mutató embriók (9. ábra) pusztuló gyökérnyaki részének eltávolításával megpróbáltuk a normális gyökérfejlődést indukálni, amely a későbbiekben kiválthatja a normális hajtásfejlődést; valamint (1.) antibiotikummentes MS/2 illetve (2.) citokinin tartalmú (0,22 mg/l BA) MS/2Km táptalajra helyeztük a korábban MS/2Km szelekciós táptalajon tartott rendellenes fejlődésű embriókat.



**9. ábra:** EHA105(pRok2Ferr) vektorral transzformált rendellenes fejlődésű 'Richter 110' embriók.

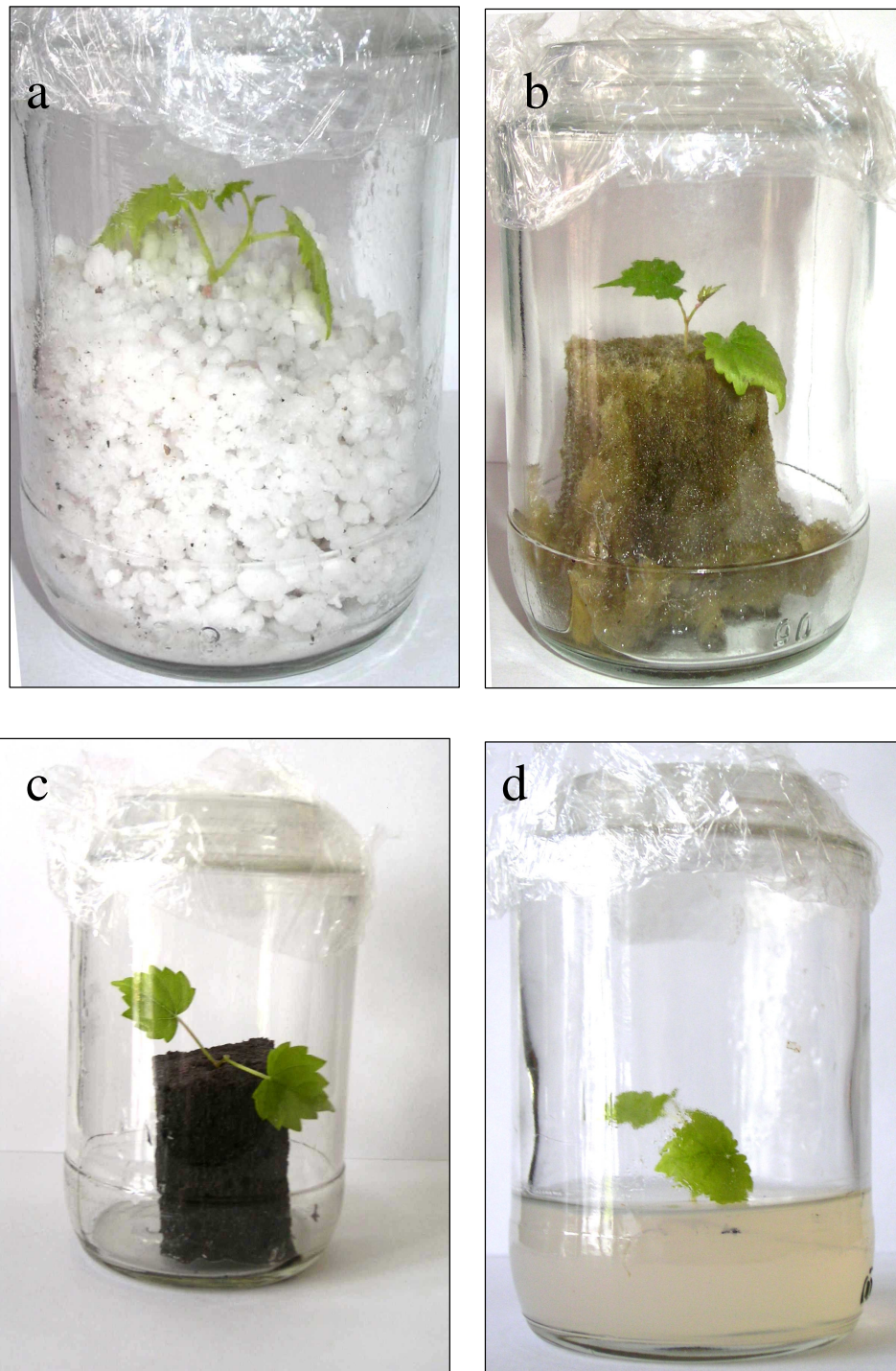
### 5.2.6. Akklimatizációs kísérletek

A kísérletekhez az *in vitro* körülmények között nevelt portok eredetű ‘Richter 110’ szőlőnövényeket használtuk. A kétrügyes mikrodugványokat hormonmentes, 10 g/l szacharózt, 70 mg/l Fe-EDTA-t, és 7 g/l Oxoid agart tartalmazó MS/2 táptalajon (pH 5,8) felszaporított növényekről, olló és csipesz segítségével szedtük steril fülke alatt.

Munkánk során a különböző nedvesítő-, és gyökereztető közegek hatását, valamint a tenyészedények eltérő zárásának (levegőzöttségének) következményeit vizsgáltuk a gyökérképződés mennyiségi és minőségi jellemzőire. A kísérletekben felhasznált kétrügyes mikrodugványokat fényszobában, 24°C-on, 16 órás megvilágítás mellett gyökerezettük. 18-20 nap elteltével a gyökeres növényeket megvizsgáltuk és értékeltük a gyökerek száma és hossza alapján. Minden kísérletet három ismételtsben végeztünk el. A kapott adatokból növényenkénti átlagos gyökérszámot, átlagos gyökérhosszt, valamint összes gyökérhosszt számoltunk.

Az első kísérletben háromféle nedvesítő közeget használtunk: (1.) steril csapvizet, (2.) 1 mM foszforsav oldatot (pH 6,0), valamint (3.) 1-1 mM dikálium-hidrogén-foszfát és salétromsav oldat kombinációját (pH 6,0). A kísérlet célja az volt, hogy kiválasszuk a legmegfelelőbb nedvesítő közeget a gyökereztetéshez. A közegekhez nem adtunk szerves komponenseket, hogy csökkentsük befertőződés veszélyét. Az autoklávban sterilizált 270 ml-es tenyészedényekbe (bébiételes üvegek) töltött kb. 50 ml perlitet laminált fülke alatt nedvesítettük. 15 üvegbe steril csapvizet, 15 üvegbe foszforsav oldatot, 15 üvegbe pedig dikálium-hidrogén-foszfát és salétromsav oldat kombinációját töltöttük, úgy, hogy a perlit megszívja magát és még 2-3 mm folyadék legyen az edény alján.

A második kísérletben négyféle gyökereztető közeget alkalmaztunk (10. ábra). 15-15 üvegbe perlitet (50 ml), kőzetgyapotot (4x4x4 cm-es, Grodan; [www.grodan.com](http://www.grodan.com)) és előnedvesített tőzegkockát (3x3x4 cm-es, pit-pot; [www.pit-pot.com](http://www.pit-pot.com)) helyeztünk, kontrollként pedig 6 g/l agarral szilárdított csapvizes agart használtunk (30 ml tenyészedényenként). Autoklávozás után a perlitre, a kőzetgyapotra és a tőzegkockákra az előkísérletek (nedvesítő közeg kiválasztása) eredményei alapján steril csapvizet öntöttünk úgy, hogy jól megszívják magukat, és az edény alján kb. 2-3 mm folyadék álljon.



**10. ábra:** 'Richter 110' mikrodugvány perlitben (a), kőzetgyapotban (b), tőzegkockában (c), csapvizes agarban (d).

Felmerült, hogy a tenyészedények szellőzése is hatással lehet a növények gyökeresedésére, ezért a harmadik kísérletben két különböző zárási módot alkalmaztunk. A bébiételes üvegekbe 30 ml csapvizet agart töltöttünk, és autoklávban sterilizáltuk. A mikrodugványok ültetését követően 15 üveget 3 réteg háztartási fóliával (Folpack), 15-öt pedig csavaros tetővel fedtünk le, ahol a légcserét a közepén fúrt lyukba helyezett szivacsdarab biztosítja.

Az adatok kiértékelésében igyekeztünk az adatok jellegének megfelelő programot és statisztikai módszert kiválasztani. Így az első kísérlet eredményeinek kiértékeléséhez a ROPSTAT programot használtuk, míg a másik két vizsgálathoz az SPSS 16.0 programot találtuk megfelelőnek. Az eltérő programok használatát az adatok eltérő tulajdonságai indokolták. A nedvesítő közeg, valamint a gyökereztető közeg kiválasztásakor egytényezős varianciaanalízissel elemeztük az eredményeket, 95%-os megbízhatósági szinten. A zárások vizsgálatánál, mivel csak két kezelést kellett összehasonlítanunk, az adatok értékeléséhez kétmintás t-próbát végeztünk, 95%-os megbízhatósági szinten.

#### 5.2.7. A beépített DNS jelenlétének ellenőrzése PCR analízissel

A DNS izoláláshoz a fényen nevelt növények hajtásairól steril körülmények között begyűjtött leveleket dolgoztuk fel. A levelekből a Qiagen cég DNEasy Plant System Mini Kit DNS-kivonó rendszer segítségével vontuk ki a genomiális DNS-t. A munka során folyékony nitrogént, 95%-os etanolt, illetve a készlet pufferoldatait (AP1, AP2, AP3, AW, AE) használtuk. Az eljárás lépései:

1. A sejtek feltárása: 0,1-0,2 g levélszövetet folyékony nitrogénben, dörzsmozsárban eldörzsölünk.
2. A mintákat Eppendorf-csövekbe helyezük, 400 µl AP2 puffert és 4 µl RN-áz enzimet adunk hozzá. A puffer a fehérjéket és poliszacharidokat kicsapja.
3. Az oldatot vortex-szel történő rázatást követően 10 percig 65°C-on inkubáljuk (2-3 átforgatással), majd 130 µl AP2 puffert adunk hozzá és 5 percig jégen állni hagyjuk.
4. A lizátumot új Eppendorf-csövekbe, a kithez tartozó QIAshredder szűrőre áttöltjük, majd 2 percig centrifugáljuk 13000 fordulat/perc sebességen. Ezzel a nagyobb szennyeződésektől, sejtödésektől tisztítjuk az oldatot, a szűrőn átjutó rész pedig tovább homogenizálódik.



5. A szűrlet újabb Eppendorf-csövekbe kerül (az üledék nélkül), másfélszeres mennyiségű (kb. 675 µl) AP3/E (az AP3 koncentrátuma 95%-os etanollal hígítva 1:2 arányban) oldatot adunk hozzá; finoman összekeverjük vágotthegyű pipettával.
6. Ebből 650 µl-t üledékkel együtt Dneasy szűrőkre, új Eppendorfba pipetázunk, majd 8000 fordulat/perc-en 1 percig centrifugáljuk, utána a maradék lizátummal ezt megismételjük. A szűrő membránján (a szilíciumgélén) magas sókoncentrációnál a DNS-molekulák megtapadnak, a lizátum kicsapott fehérjei és poliszacharidjai átjutnak rajta.
7. A szűrőt Eppendorf-csőbe helyezzük és 500 µl AW puffert adunk hozzá a maradék szennyeződések eltávolítására, majd 1 percig 8000 fordulat/perc-en centrifugáljuk. A szűrlet eltávolítása után ismét a szűrőre pipetázunk 500 µl AW puffert és 2 percig 13000 fordulat/perc-en centrifugáljuk, így a szűrő membránja kiszárad.
8. A DNS-szűrőt új Eppendorfba helyezzük, 100 µl 65°C-os AE puffert teszünk a membránra és 5 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk, majd 1 percig 8000 fordulat/perc-en centrifugáljuk. A DNS leoldást még egyszer megismételjük. A puffer hatására a megváltozott közegben (alacsony sókoncentrációnál) a DNS molekulák leválnak a szilíciumgélről és átjutnak az Eppendorf-csőbe. Az így nyert kb. 200 µl-nyi oldat kiváló tisztaságban tartalmazza a DNS-t (Qiagen, 2000).

A koncentráció meghatározásához spektrofotométerrel megmértük az oldat fényáteresztését 200 nm és 300 nm hullámhossz között. A kapott görbe alapján látható, mennyire tiszta a DNS-oldat (a fehérjék 280 nm hullámhosszon mutatnak speciális abszorpciót). Ezután megmértük az oldat optikai denzitását 260 nm hullámhosszon. A kapott érték alapján pontosan kiszámíthattuk, milyen töménységű a DNS-oldat. 1 OD (=optikai denzitás) 50 µg/ml töménységű DNS-oldatnak felel meg (Velich 2001).

A PCR analízis során célunk a bevitt gének jelenlétének kimutatása és a növényi minta *Agrobacterium* mentességének bizonyítása volt. Az eljárás során a növényi mintából kivont DNS-ből specifikus primerekkel amplifikáltuk az *MsFerr*, *iaaM*, *virE1*, *nptII*, és *virC* (*Agrobacterium* virulencia gén) gének megfelelő szakaszait. A PCR reakció során az *nptIIR* (5'-AGGCGAGGCGGCTATGACTG-3') és *nptIIF* (5'-ATCGGGAGCGGCGATACCGTA-3') primereket használtuk a szelekciós markergén (kanamicin) jelenlétének ellenőrzésére (Hoffmann et al. 1997), amellyel az *nptII* 700 bp hosszúságú szakaszát amplifikáltuk. Az *Agrobacterium* növényben való esetleges jelenlétének ellenőrzésére a VCR (5'-AGCTCAAACCTGCTTC-3') és VCF (5'-

ATCATTTGTAGCGACT-3') primereket használtuk, amely a T-DNS-en kívül elhelyezkedő 730 bp hosszúságú *virC* régiót (Sawada et al. 1995) amplifikálja. A vizsgálat negatív eredménye bizonyítja, hogy a növényi DNS mintában nincs vektor DNS szennyeződés.

A lucerna ferritin gén jelenlétének ellenőrzésére az MTA Szegedi Biológiai Központjának Növénybiológiai Intézetében tervezett különböző primer kombinációk közül a FerrFw1 (5'-GTCACGGTGTGTGGCACTTTGA-3') és FerrRev2 (5'-AGACAGAGCCAATTCCATGGCA-3') primereket használtuk, amelyekkel a gén 513 bp hosszúságú szakaszát amplifikáltuk (Oláh 2005). Az *iaaM* gén jelenlétének ellenőrzésére az (5'-GAACCAAGCGGTTGATAACAGCC-3') és (5'-CTGCGACTCATAGTCCAGGAATAC-3') primereket használtuk, amelyekkel a gén 150 bp hosszúságú szakaszát amplifikáltuk (Viss et al. 2003) a pJP17 és pJP17-S4 konstrukciókkal transzformált növények mintáiban. A *virEI* gén jelenlétét pedig az (5'-CCATCATCAAGCCGCA-3') és (5'-CTCCTTCTGACCAGCAAGA-3') primerekkel ellenőriztük (Szegedi et al. 2001).

A PCR során a 25 µl reakcióelegy 1x Taq puffert, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>-ot, 5% DMSO-t, 200 µM-t minden dNTP-ből, 0,5 µM-t a két primerből, 2 µl templát DNS-t (50 µg/ml) valamint 1,25 egység Taq polimerázt tartalmazott. A reakciókat 94°C-on indítottuk (1 perc), majd ezt követően 30 ciklusban 92°C-on denaturáltuk a DNS-t (1 perc), 54°C-on történt a primerek bekötődése (1 perc) és 72°C-on (1,5 perc) a lánchosszabbítás. A reakció lezárása 72°C-on történt (3 perc). A fent leírtaktól eltérően a lucerna ferritin primerek bekötődése 52°C-on történt. Az *iaaM* gén jelenlétének ellenőrzésére használt primerek használatakor a reakciót 94°C-on indítottuk (2 perc), majd ezt követően 35 cikluson keresztül a denaturáció 94°C-on 1 percre, a bekötődés 50°C-on fél percre, a lánchosszabbítás 72°C-on 1 percre, a reakció lezárása pedig 72°C-on 5 percre tartott. Az amplifikációhoz az MJ Research PTC 200 típusú PCR-készülékét használtuk. A minták futtatása 1,5%-os agaróz gélen történt, majd az amplifikált DNS-t ethidium bromiddal tettük láthatóvá.

#### 5.2.8. A transzformánsok oxidatív stressztűrő képességének vizsgálata

A klorofillfluoreszcencia-indukciós mérés megbízhatóan alkalmazható vizsgálati módszer az abiotikus stressz és a fotoinhibíció kimutatására. A klorofillfluoreszcencia vizsgálatának alapelve viszonylag egyszerű. A klorofill molekulák által elnyelt fény sorsa



háromféle lehet: felhasználódhat fotokémiai energiaként, fölösleges energiaként kibocsátható hő formájában, vagy fény formában visszasugárzódhat. Ez a három folyamat versenyez egymással, bármelyik teljesítményének emelkedése a másik kettő teljesítményének csökkenésével jár. Ezért a klorofillfluoreszcencia vizsgálatával információkhoz jutunk a fotoszintézis teljesítményéről és a kibocsátott hő mennyiségéről is. A klorofillfluoreszcencia-méréseket pulzus amplitúdó-modulált fluoriméter, Imaging PAM (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany) segítségével végeztük a Schreiber és munkatársai (1986) által leírt protokoll szerint. A mérés a mérőfej bekapcsolásával kezdődik, amivel meghatározzuk a minimális fluoreszcencia szintet ( $F_0$ ). Utána egy telítő villanófényt használunk, ami lehetővé teszi a maximális fluoreszcencia ( $F_m$ ) mérését.  $F_m$  és  $F_0$  különbsége adja az ún. változó fluoreszcenciát ( $F_v$ ), ami a II. fotokémiai rendszer (PSII) fényenergia befogadás hatásfokával arányos. A PSII potenciális hatékonysága jól jellemezhető az  $F_v/F_m$  aránnyal, amely az  $F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$  összefüggés alapján határozható meg. Optimális esetben ez az érték 0,72-0,85 közötti tartományba esik, míg a különböző stresszhatásoknak kitett növények esetében ennél kisebb (Bolhár-Nordenkamp and Lechner 1988).

A transzformánsok oxidatív stressztűrő képességének vizsgálatát a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központjának Növénybiológiai Intézetével és a Budapesti Corvinus Egyetem Szőlészeti és Borászati Kutató Intézetével (Kecskemét) együttműködésben, két különböző kísérletben végeztük el. A paraquat hatására fényen oxigén szabadgyökök képződnek a kloroplasztiszokban, ezért első lépésben a transzformánsok oxidatív stressztűrő képességének vizsgálatához a paraquat-diklorid (1,1-dimetil-4,4-bipiridilium-diklorid) hatóanyagú Gramoxone nevű gyomirtó szert használtuk. A por alakban rendelkezésünkre álló gyomirtó szerből 5 különböző koncentrációjú (0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$ ) oldatot használtunk a vizsgálatok során. Kontrollként pedig csapvízben úsztatót leveleket használtunk. Az üvegházban nevelt növények közül 6 db független pRok2Ferr transzformáns és 1 db nem-transzformált kontroll 'Richter 110' növényt választottunk ki. Minden növényről leválasztottunk 3-3 db levelet, amit három órán keresztül sötétben úsztattunk az oldatban, a levelek színével felfelé. A 3 órás sötét periódust azért alkalmaztuk, hogy biztosítsuk a herbicid ozmotikus felvételét. Ezután a mintákat 1 órán keresztül  $35 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotoszintetikusan aktív fénnel világítottuk meg. Fényen a paraquat a fotoszintetikus elektrontranszportláncból származó elektronok felhasználásával szuperoxidgyököket képez, ami a növények oxidatív károsodásához vezet (Babbs et al. 1989) és a fotoszintetikus teljesítmény csökkenését eredményezi. A

fluoreszcenciaindukció mérése során a 20 percig sötétadaptált levélmintákat  $8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fényintenzitású gerjesztő fénnel világítottuk meg. A kísérletet három ismételtsben végeztük el, majd a kapott  $F_v/F_m$  értékeket átlagoltuk. A szőlőtermesztési gyakorlatban alanyként használt ‘Richter 110’ fajta esetében a növények gyökérzetét érő stresszhatásokra adott válasz fontos információkkal szolgálhat számunkra, ezért a második kísérletben az üvegházban nevelt 6 db pRok2Ferr transzformáns és 1 db kontroll ‘Richter 110’ növényeket 50 mM  $\text{NaHCO}_3$  oldattal árasztottuk el, hogy szárazság-, és sóstresszt indukáljunk. A kezelés hatását 15 nap elteltével vizuálisan értékeltük. Annak ellenére, hogy a kloroplasztisban lokalizálódó lucerna ferritin fehérje az alanyfajták esetében nem bír gyakorlati jelentőséggel, számunkra fontos információkkal szolgálhat. A pRok2FerrFLAG transzformáns növényeket fejlődési rendellenességük miatt nem tudtuk bevonni a kísérletekbe (lásd 5.6. fejezet).

#### 5.2.9. *Agrobacterium* rezisztencia vizsgálatok

Az EHA101(pJP17) vektorral transzformált akklimatizált és üvegházba kiültetett ‘Richter 110’ növények ellenállóságát az *A. tumefaciens* A348 és C58, valamint az *A. vitis* Tm4, AT1 és S4 törzsekkel szemben teszteltük. Az EHA101(pTd93virE1) vektorral transzformált ‘Richter 110’ növényeket a fejlődési rendellenességből eredő felszaporítási és akklimatizációs nehézségek miatt kizárólag *A. vitis* Tm4 törzsszel fertőztük, valamint a fertőzések nagy részét *in vitro* körülmények között, a fényszobában fenntartott transzgénikus vonalakon végeztük el. A kísérletekben pozitív kontrollként nem-transzformált akklimatizált, illetve *in vitro* körülmények között nevelt ‘Richter 110’ növényeket használtunk. A fertőzéshez a különböző törzsekből steril desztillált víz felhasználásával baktérium szuszpenziót készítettünk (30 ml vízben 3 kacsnyi baktérium), majd a növények hajtásain a náduszok közelében lándzsatű segítségével ejtett sebzésekbe pipettával vittük fel a baktérium szuszpenziót és azt a lándzsatűvel be is dolgoztuk a sebbe. Növényenként három fertőzést végeztünk. A továbbra is üvegházban, illetve *in vitro* fertőzés esetén a fényszobában tartott növényeken az eredményeket másfél hónap elteltével értékeltük. Az értékelés után a tesztelt növényeket autoklávozással megsemmisítettük.

Kísérleteinkben a tanszéki nemesítésű fajták *Agrobacterium* ellenállóságát is teszteltük. Az *Agrobacterium* fertőzéshez a novemberben begyűjtött vesszőket tavasszal üvegházi körülmények között hajtottuk a Budapesti Corvinus Egyetem Szőlészeti és Borászati Kutató Intézetében (Kecskemét). A tesztelés során az *A. tumefaciens* C58, az *A.*

*vitis* Tm4, AB3, AT1, és S4 törzsekkel fertőztük a ‘Pegazus’ (N58), ‘Csépi muskotály’ (N127), ‘Borostyán’ (N200), ‘Odysseus’, ‘Orpheus’, ‘Taurus’, ‘Korai bíbor’ és ‘Pannon frankos’ fajtákat. Pozitív kontrollként a fogékony ‘Kékfrankos’ és ‘Szürkebarát’, negatív kontrollként pedig a rezisztens ‘Kunbarát’ fajtát használtuk (Szegedi 1981).

## 6. EREDMÉNYEK

### 6.1. Embriogén kallusz indukálása portokon

A szőlő embriogén kapacitása erősen genotípus-függő, ezért az embriogén kallusz indukációs kísérleteinkben 12 különböző szőlőfajtát vizsgáltunk. A táptalajra helyezett portokokon 3 hónap inkubációs időt követően 0,25-12%-os hatékonysággal (3. és 4. táblázat) 11 genotípus esetében kaptunk embriogén kalluszt (11. ábra). Az ‘Arany sárfehér’ fajtánál nem sikerült embriogén kallusz fejlődést indukálnunk az MSE táptalajon. A ‘Korai bíbor’, ‘Odysseus’, ‘Orpheus’ és ‘Pannon frankos’ fajtáknál elsőként sikerült embriogén kallusz fejlődést indukálnunk. Az embriogén kallusz indukációs kísérletek eredményeit a táptalajra helyezett portokokon fejlődött embriogén struktúrájú kallusz százalékos értékében adtuk meg [(embriogén kalluszt produkáló portokok száma / összes portokok száma) x 100]. Kísérleteinkben többféle típusú kallusz jelent meg, ezek közül csak a világossárga, keményebb állagú, proembrionális szerkezetet mutató, gömbszerű képletekből felépülő kalluszcsoportok bizonyultak később embriogén jellegűnek. Kalluszindukáció tekintetében az MSE táptalaj bizonyult a legsikeresebbnek, alkalmazásával 9 fajtán kaptunk embriogén kalluszt. Az MST táptalaj 4, a NNE táptalaj 5, az MSE/2 táptalaj pedig csak 1 fajtánál adott pozitív eredményt.

Az embriogén kallusz indukációs kísérletek céljára begyűjtött ‘Chardonnay’ virágzatok sterilizációja során alkalmazott két különböző eljárás vizsgálatakor arra a következtetésre jutottunk, hogy a NaOCl oldat helyett ugyanolyan jó eredménnyel használható a klór-mentes  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  oldat is (5. táblázat), melynek létjogosultsága a szőlő klórérzékenységeivel indokolható. A kísérletben felhasznált négyféle táptalaj közül az MSE és CPE táptalajokon közel azonos hatékonysággal sikerült embriogén kalluszt indukálnunk. Az antioxidáns és fenolkötő vegyülettel kiegészített MSE táptalaj, valamint az aktív szénrel kiegészített MSE táptalaj negatív hatással volt az embriogén kallusz indukációra (5. táblázat).



**11. ábra:** ‘Chardonnay’ portokon fejlődött embriogén kallusz.

**3. táblázat:** Az embriogén kallusz indukciós kísérletek eredményei MSE ill. MST táptalajon.

Fajták	Az embriogén kallusz indukció eredményei (%)		
	Táptalaj	Átlag	Szórás
‘Arany sárfehér’	MSE	-	-
‘Cabernet franc’	MSE	7,5	5
‘Odysseus’*	MSE	1,25	1,37
‘Orpheus’*	MSE	6	7,2
‘Richter 110’	MST	8	4,8
‘Taurus’	MSE	3,33	3,81

\* Azok a fajták, amelyeknél elsőként sikerült portokon embriogén kalluszt indukálni

**4. táblázat:** Az embriogén kallusz indukciós kísérletek eredményei (%) négy különböző táptalajon átlag és szórás értékekkel feltüntetve.

Fajták	MSE	MSE/2	NNE	MST
‘Chardonnay’	4,46 ± 7,08	9,17 ± 5,84	1,5 ± 3,64	0,25 ± 0,79
‘Kékfrankos’	7,8 ± 3,67	0	12 ± 6,02	1,25 ± 0,7
‘Korai bíbor’*	1,25 ± 1,37	0	2 ± 3,26	0
‘Pannon frankos’*	0	0	11,08 ± 7,81	0
‘Rajnai rizling’	4,2 ± 3,75	0	2,5	0
‘Teleki 5C’	5	0	0	6,67 ± 5,2

\* Azok a fajták, amelyeknél elsőként sikerült portokon embriogén kalluszt indukálni

**5. táblázat:** Embriogén kallusz indukció eredményei négy különböző táptalajon NaOCl és  $\text{Ca(OH)}_2$  oldatban sterilizált ‘Chardonnay’ virágzatokból kipreparált portokokon.

Sterilizáció módja	Az embriogén kallusz indukció eredményei (%)			
NaOCl oldat	MSE	MSE+C	MSE+Polyclar AT+DTE	CPE
1.	0	0	0	5
2.	10	0	0	10
3.	10	0	0	5
4.	5	0	5	10
5.	0	0	0	0
6.	5	0	5	0
7.	0	0	5	5
8.	0	0	5	15
9.	5	0	0	10
10.	0	0	na	10
Átlag	3,5	-	2,2	7
Szórás	4,11	-	2,63	4,83
$\text{Ca(OH)}_2$ oldat	MSE	MSE+C	MSE+Polyclar AT+DTE	CPE
1.	5	0	0	15
2.	15	0	0	5
3.	0	0	0	30
4.	0	0	0	5
5.	10	0	5	5
6.	10	0	0	0
7.	15	0	5	25
8.	na	0	0	10
9.	na	0	0	0
10.	na	0	5	20
Átlag	11,5	-	1,5	11,5
Szórás	6,36	-	2,29	10,55

na: Nincs adat a tenyészetek befertőződése miatt

## 6.2. Embriogén kallusz felszaporítása

A transzformációs és regenerációs kísérletekhez szükséges kiindulási anyag mennyiségének folyamatos biztosításához a portokokon fejlődött kalluszt első lépésben fel kell szaporítanunk. Ezt havonként friss táptalajra történő átrakással érhetjük el, azonban a hosszú ideig fenntartott kalluszban különböző minőségi változások következhetnek be. Mivel az embriogén kallusz indukció a különböző környezeti tényezőknek köszönhetően nem minden évben működik azonos hatékonysággal, ezért fontos a már meglévő kallusz tenyészeinket a lehető legjobb minőségben megőrizni és fenntartani, hogy az egy-egy

kieső év ellenére is folyamatosan álljon rendelkezésünkre megfelelő struktúrájú embriogén anyag a már meglévő tenyészetekből.

Kísérleteinkben az embriogén kallusz felszaporítását két különböző táptalajon végeztük a ‘Richter 110’ alanyfajtánál, azonban a kallusz tömeg értékekben nem kaptunk statisztikailag értékelhető különbséget. Az MSE és CPE táptalajokon az átlagokat tekintve az 1. és 2. hónap után is nagyon hasonló értékeket kaptunk (6. táblázat), azonban a két különböző táptalajon minőségbeli eltéréseket figyeltünk meg. A CPE táptalajon fenntartott kallusz morfológiailag eltért az MSE táptalajon fenntartott kallusztól, ami valószínűsíthetően az embriogén jellegű struktúrák kisselektálódásából és felszaporodásából valamint a nem-embriogén struktúrák nekrozisából adódott. Ezért a CPE táptalajt alkalmasabbnak találtuk az embriogén kapacitás megőrzésére a szignifikáns különbség hiányának ellenére is.

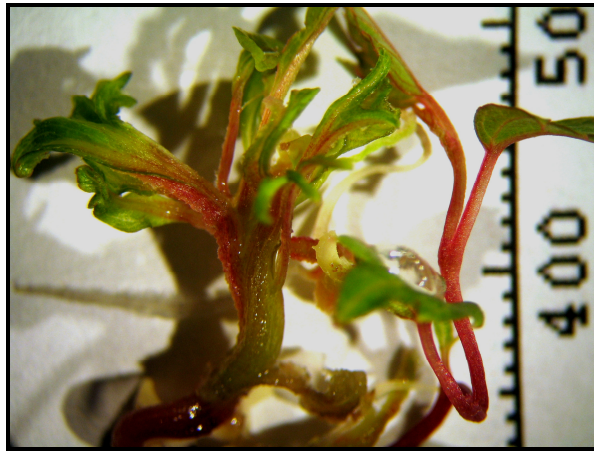
**6. táblázat:** Az MSE és CPE táptalajon felszaporított ‘Richter 110’ embriogén kallusz tömegében mért különbségek az 1. és 2. hónap után.

Táptalaj	Idő (hónap)	Ismétlések					Átlag	Szórás
		1.	2.	3.	4.	5.		
MSE	1.	1,8 g	1,7 g	2,4 g	3,2 g	3,3 g	2,48 g	0,75
CPE	1.	2,2 g	2,2 g	2,2 g	nt	2,3 g	2,23 g	0,05
MSE	2.	2,8 g	2,8 g	3,7 g	5,1 g	4,7 g	3,82 g	1,06
CPE	2.	3,1 g	3,0 g	3,3 g	nt	3,3 g	3,18 g	0,15

nt: nem tesztelt

### 6.3. Növényregeneráció embriogén kalluszból

Az embriogén tenyészetek embriogén kapacitását hormonmentes szilárd MS/2 táptalajon növényregenerációval bizonyítottuk (12. ábra). A sikeres növényregeneráció limitáló tényezői közül leggyakrabban a hajtásdifferenciálódás elmaradásával találkoztunk, ez pedig jelentősen lecsökkentette a regeneráció hatékonyságát.



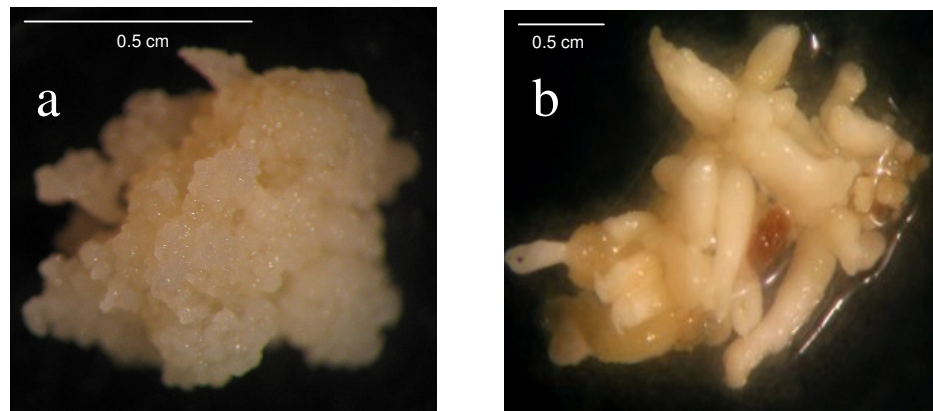
**12. ábra:** A 'Richter 110' fajta regenerációja embriogén kalluszból hormonmentes MS/2 táptalajon.

#### 6.3.1. A növényregeneráció hatékonyságának optimalizálása

A növényregeneráció nehézségekbe ütközhet, ha a regenerációs kísérletekben felhasznált embriók nincsenek azonos fejlettségi állapotban, ezen kívül a sokáig fenntartott embriogén kultúrák regenerációs képessége csökken (Martinelli et al. 2001a). A 'Richter 110', 'Teleki 5C' és 'Chardonnay' fajták esetében a folyékony MSNOA táptalajt használtunk a számunkra legoptimálisabb állapotú, kis vakuolumokkal rendelkező, gyorsan osztódó sejtek felszaporítására. A folyékony MSNOA táptalaban homogenizált embriogén tenyészetek a két hetes sötétben történő rázatást követően hormonmentes MS/2 táptalajon gyorsabban regenerálódtak, mint a szilárd MSE táptalajról származó, ugyancsak hormonmentes MS/2 táptalajra helyezett embriogén tenyészetek. A folyékony táptalajban történt kezelés után - hormonmentes MS/2 táptalajon - 1 hónap elteltével tömeges hajtás és gyökér differenciálódást (13. ábra) tapasztaltunk mindhárom fajtánál. A szilárd MSE táptalajról származó kultúrákon azonban ekkor még csak a szomatikus embriogenezis kezdeti stádiumait lehetett megfigyelni. Eredményeink alátámasztják a folyékony táptalaj

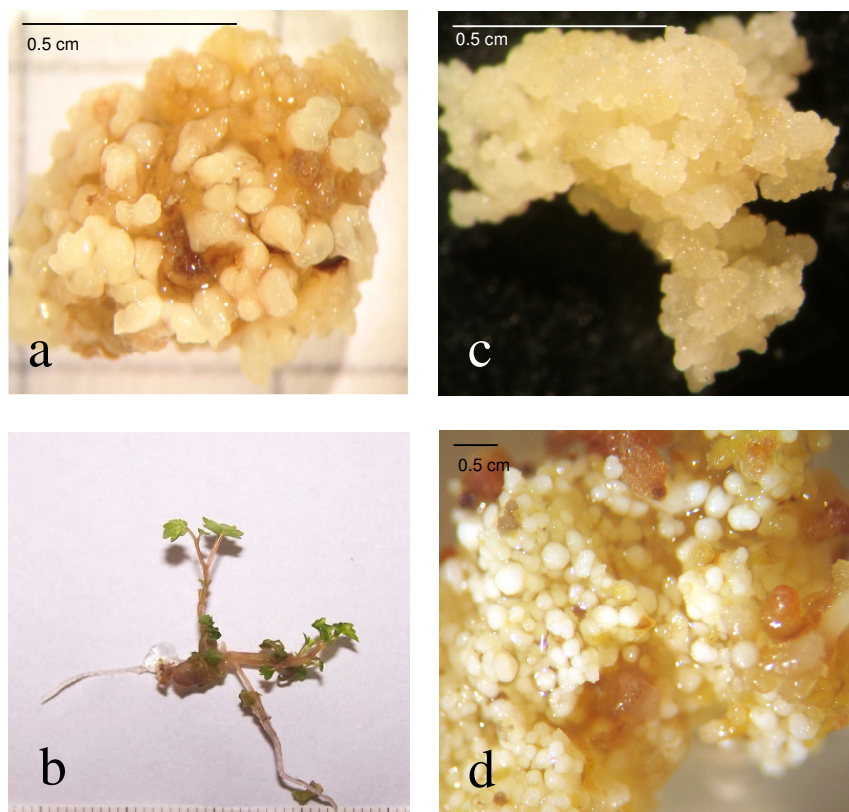


használatának jótékony hatását a szomatikus embriogenezisre, illetve a növényregenerációra.



**13. ábra:** szilárd MSE táptalajon (a, *nagyítás: 6,5x*) és MSNOA folyékony táptalajban (b, *nagyítás: 2,5x*) felszaporított ‘Richter 110’ embriogén kallusz közötti regenerációbeli különbségek egy hónappal az MS/2 táptalajra helyezés után.

A CP és MS/2 táptalajt összehasonlító növényregenerációs kísérleteinkben a ‘Chardonnay’ fajta esetében a regenerációs idő hosszát illetően eltérést tapasztaltunk. A CP táptalajon 2 hónap elteltével hajtással és gyökérrel rendelkező kis szőlő növényeket kaptunk, az MS/2 táptalajon ugyanennyi idő múlva még csak csírázó embriókat figyelhettünk meg (14. ábra).



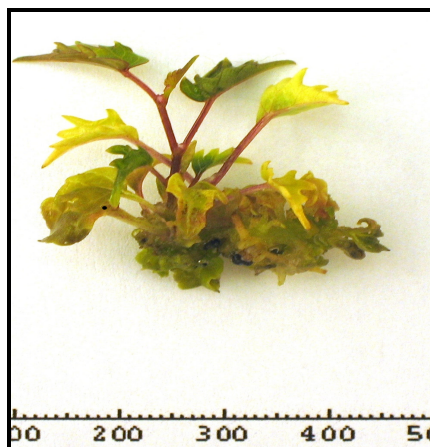
**14. ábra:** A 'Chardonnay' embriogén kallusz regenerációjának összehasonlítása CP (a, b, *nagyítás: 6x*) és MS/2 (c, d, *nagyítás: 1,5 x*) táptalajon.

a, c egy hónappal a táptalajra helyezés után,

b, d két hónappal a táptalajra helyezés után.

#### 6.4. Direkt organogenezis

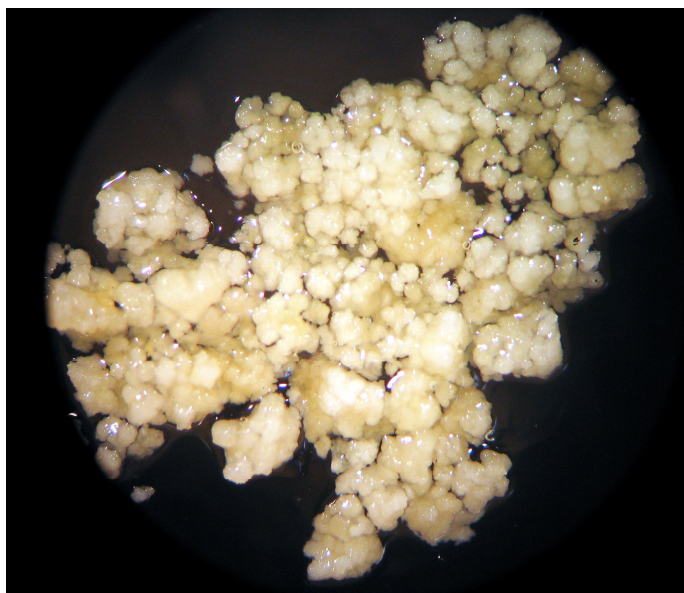
Kísérleteket végeztünk a rügyalap sejteinek organogenetikus potenciáljának felmérésére, vizsgáltuk milyen mértékben képes a 'Richter 110' alanyfajta a rügy kivakítása illetve szem eltávolítása után hajtást képezni a megmaradt szövetekből. A kísérletekben a 0,25 mg/l thidiazuron (TDZ) használata bizonyult sikeresnek (15. ábra), azonban a regeneráció hatékonysága 1% alatt maradt.



**15. ábra:** A 'Richter 110' rügyalap sejtjeinek organogenezise.

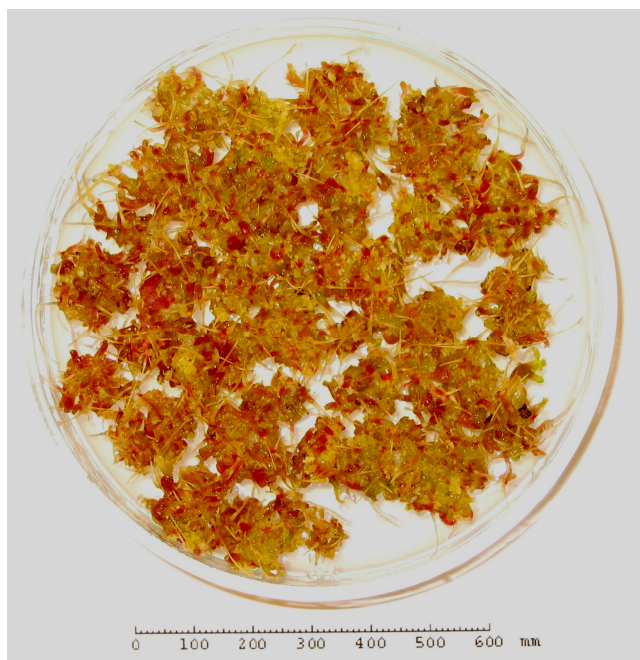
### 6.5. Szőlőtranszformáció

A szőlőtranszformációs kísérleteket az *A. tumefaciens* EHA105(pRok2Ferr), EHA105(pRok2FerrFLAG), EHA105(pRok2), EHA101(pTd93virE1), EHA101(pJP17) és EHA101(pJP17-S4) transzformációs vektorokkal végeztük el. Transzformálandó növényanyagként a *V. rupestris* x *V. berlandieri* eredetű 'Richter 110' alanyfajtából előállított embriogén kalluszt használtuk. A hormonmentes táptalajon fejlődött 1-2 mm nagyságú szomatikus embriókat (16. ábra) *Agrobacterium* szuszpenzióval kezeltük, majd a kokultiváció után a növényanyagot az MS/2Km jelöléssel ellátott szelekciós táptalajra helyeztük át.



**16. ábra:** Szomatikus embriók indukálása MS/2 táptalajon.

A szelekciót kb. 1,5 évig végeztük havonta friss szelekciós táptalajra történő passzálással, miközben a gyökérrel és levélkezdeménnyel rendelkező embriókat tartalmazó tenyészederényeket folyamatosan fényre helyeztük (17. ábra).



**17. ábra:** A fejlődő embriók fényre helyezése.

A fényre helyezett embriókat egyedenként az antioxidánsokat már nem tartalmazó MS/2Km táptalajon neveltük tovább. A növényregenerációt addig végeztük, amíg megfelelő számú növényt kaptunk a további vizsgálatokhoz. A transzformáns növények konstrukciónként egy kísérletből származtak. A gyökérrel és hajtással rendelkező egyedek felszaporításra kerültek azáltal, hogy feldaraboltuk őket és nem csak a hajtáscsúcs, hanem az alatta lévő kétrügyes dugvány is friss táptalajra került (18. ábra). Ezt követően a szelekciós ágenst (kanamicin) és az antibiotikumokat (carbenicillin, claforán) fokozatosan megvontuk a táptalajból (az 1. év után).



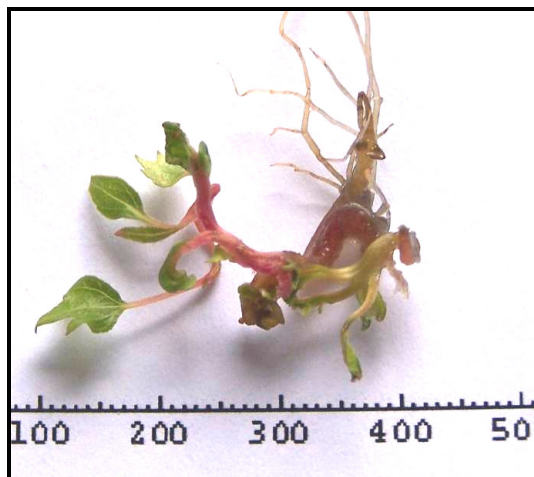
**18. ábra:** A feltételezett transzformáns ‘Richter 110’ növény felszaporítása.

#### 6.5.1. A transzformációs kísérletek optimalizálása

A transzformált embriók sokszor rendellenes fejlődésűek, ez pedig a regenerációs idő kitolódását, illetve rosszabb esetben a regeneráció teljes hiányát eredményezi. Az EHA105(pRok2Ferr) vektorral transzformált embriogén anyag regenerációja során nagy mennyiségben (60%) figyeltünk meg abnormális embrió-fejlődést. A probléma leginkább a sziklevel-, és gyökérkezdeménnyel rendelkező szomatikus embrioidok fényre helyezését követően jelentkezett, melynek köszönhetően két év folyamatos szelekció után sem tapasztaltunk megfelelő hatékonyságú növényregenerációt. Az MS/2Km szelekciós táptalajon tartott, abnormális fejlődést mutató, EHA105(pRok2MsFerr) vektorral transzformált ‘Richter 110’ embriók pusztuló gyökérnyaki részének eltávolítása, vagy a szelekciós ágens megvonása nem növelte a regenerált növények számát, de jelentősen lerövidítette a regeneráció idejét. A 0,22 mg/l BA használata azonban jelentősen megnövelte az EHA105(pRok2MsFerr) vektorral transzformált ‘Richter 110’ növények számát (19. ábra), a szelekciós táptalajon két év alatt regenerálódott növények száma 24%-ról 62%-ra változott a hormon használatának köszönhetően további 3 hónap alatt. A kísérlet eredményeit a 7. táblázat tartalmazza. Ezért a további transzformációs kísérletekben, ha a szomatikus embriók fényre helyezését követően fejlődésbeli



rendelleneségeket tapasztaltunk, a legközelebbi friss táptalajra történő átrakásnál a szelekciós táptalajt 0,22 mg/l BA-nel egészítettük ki. A hormont csak akkor vontuk meg a táptalajból, amikor az embriókból levéllel és gyökérrel rendelkező növények regenerálódtak. A transzformációs kísérletek optimalizálásának köszönhetően mind a hat génkonstrukció esetében sikeresen regeneráltuk és felszaporítottuk a további vizsgálatokhoz szükséges mennyiségű független transzformáns vonalat.



**19. ábra:** A citokinin tartalmú MS/2Km táptalajra helyezett EHA105(pRok2MsFerr) vektorral transzformált rendellenes fejlődésű 'Richter 110' embrió regenerációja.

**7. táblázat:** Az MS/2Km és a 0,22 mg/l BA-nel kiegészített MS/2Km táptalaj hatásának összehasonlítása az EHA105(pRok2MsFerr) vektorral transzformált abnormális fejlődést mutató 'Richter 110' embrióknál.

Petri-csésze	MS/2Km	MS/2Km+BA
1	0/38 (0)	5/26 (19,2%)
2	0/30 (0)	2/23 (8,7%)
3	3/33 (9%)	9/25 (36%)
4	0/32 (0)	2/15 (13,3%)
5	1/17 (5,8%)	6/17 (35,3%)
6	0/28 (0)	7/22 (31,8%)
Átlag (szórás)	2,46% (3,95)	24,05% (11,87)

## 6.6. Az akklimatizációs kísérletek eredményei

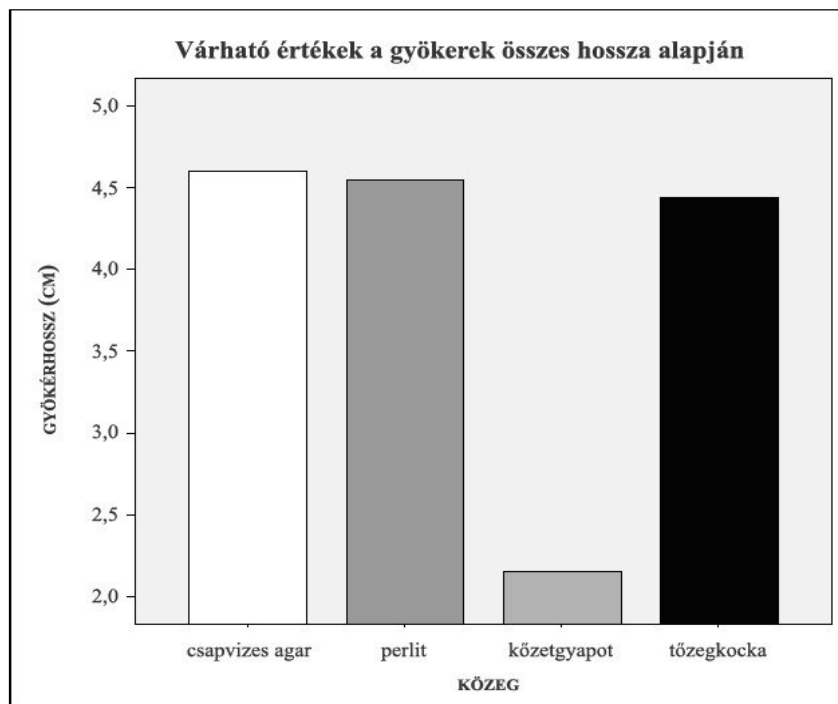
Az EHA105(pRok2Ferr) transzformánsok akklimatizációja során találkoztunk azzal a problémával, hogy a regenerációs táptalajon felnevelt és felszaporított, gyökérrel és hajtással rendelkező növények a kiültetést követően nem fejlődtek tovább, nagy részük elpusztult. Véleményünk szerint a sikertelenség oka a kiültetett növények nem megfelelő minőségű és mennyiségű gyökérzete, ezért kísérleteket végeztünk annak érdekében, hogy a mikroszaporított növények edzését és üvegházba történő kiültetését hatékonyabbá tegyük. Kísérleteink során megpróbáltunk olyan körülményeket kialakítani, amelyben a növények rövid idő alatt megfelelő mennyiségű és jó minőségű (elágazó) gyökérzetet fejlesztenek. A különböző kórokozók és mikroorganizmusok felszaporodásának megakadályozása céljából olyan gyökereztető közeget kerestünk, amely nem tartalmaz szerves komponenseket. Fontos szempont volt, hogy kiültetéskor ne kelljen lemosni a közeget a gyökerekről, ezáltal minimálisra csökkentsük a sérüléseket.

A három ismételtes eredményei alapján 95%-os valószínűségi szinten nem volt szignifikáns különbség a háromféle nedvesítő közeg/oldat (steril csapvíz, 1 mM foszforsav oldat, 1-1 mM dikálium-hidrogén-foszfát és salétomsav oldat kombinációja) között a gyökerek növényenkénti száma, átlagos hosszúsága és összes hosszúsága szerint. A 'Richter 110' növények tehát a gyökerezésükhöz nem igényeltek szervesen sokat, sterilizált csapvízben is megfelelően gyökereztek, ezért a további kísérletekhez az egyszerűség kedvéért csapvízzel nedvesítettük a közegeket.

A négyféle gyökereztető közeg (perlit, pit-pot, kőzetgyapot és agar) között a gyökerek számát illetően nem volt szignifikáns különbség a statisztikai számítások alapján. A növényenkénti összes gyökérhossz adatok értékelése során azonban különbségeket tapasztaltunk. A kőzetgyapotban nevelt mikrodugványok szignifikánsan kisebb gyökérméretekkal rendelkeztek, mint amelyek csapvizes agarban vagy perlitben neveltek. Ez utóbbi két közeg között nem volt szignifikáns különbség. A tőzegkockában gyökereztetett növények, gyökérméretük alapján, a kőzetgyapotban és a csapvizes agarban illetve a perlitben gyökereztetett növények között helyezkednek el (20. ábra). A növényenkénti átlagos gyökérhossz értékek alapján csupán a kőzetgyapotban gyökereztetett szőlő növények múltak alul szignifikánsan a többi gyökereztető közegben nevelt növényeket (21. ábra). A csapvizes agarban, a perlitben és a tőzegkockában gyökereztetett dugványok átlagos gyökérhossz értékei szignifikánsan nem különböztek

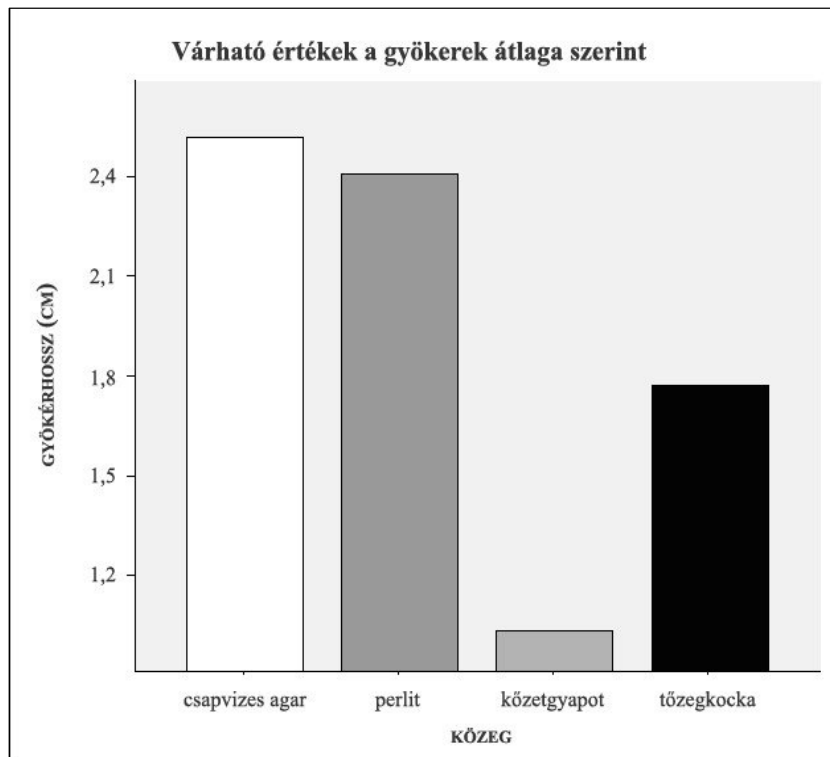
egymástól. A mért adatokon kívül megfigyeltük még, hogy a perlitben képződött gyökerek elágazóak voltak, míg a másik három közegben a gyökerek nem ágaztak el (22. ábra).

A gyökereztető közegek közül a perlit és a tőzegkocka is megfelelőnek bizonyult az agar kiváltására. A tőzegkockában ugyan rövidebb gyökerek fejlődtek, mint a perlitben, de mivel több gyökér képződött benne, ezért az összes gyökértömeg megközelítőleg ugyanakkora volt mindkét közegben. A perlit előnye, hogy a benne gyökeresített növények elágazó gyökérzetet fejlesztettek, ez nagymértékben növeli életképességüket. A vizes agar várakozásainkkal ellentétben meglepően jól szerepelt a kísérletekben, amit indokolhat, hogy a 'Richter 110' alanyfajta a gyökérképzésnél kevésbé érzékeny a levegőellátottságra, mint pl. a nemes fajták.

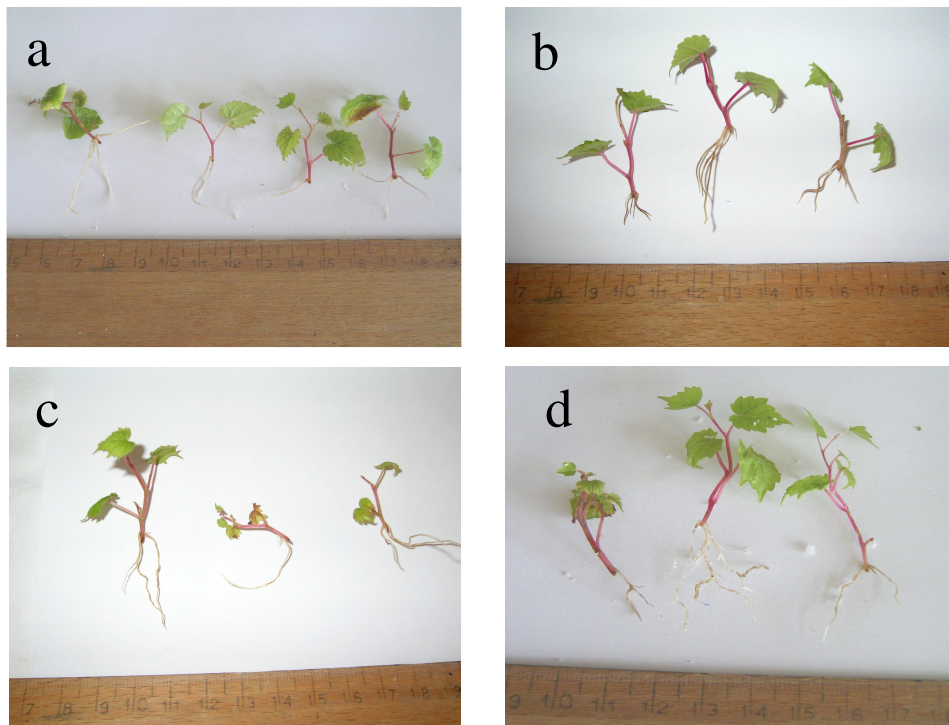


**20. ábra:** A gyökerek összes hosszúsága csapvizes agarban, perlitben, kőzetgyapotban és tőzegkockában.



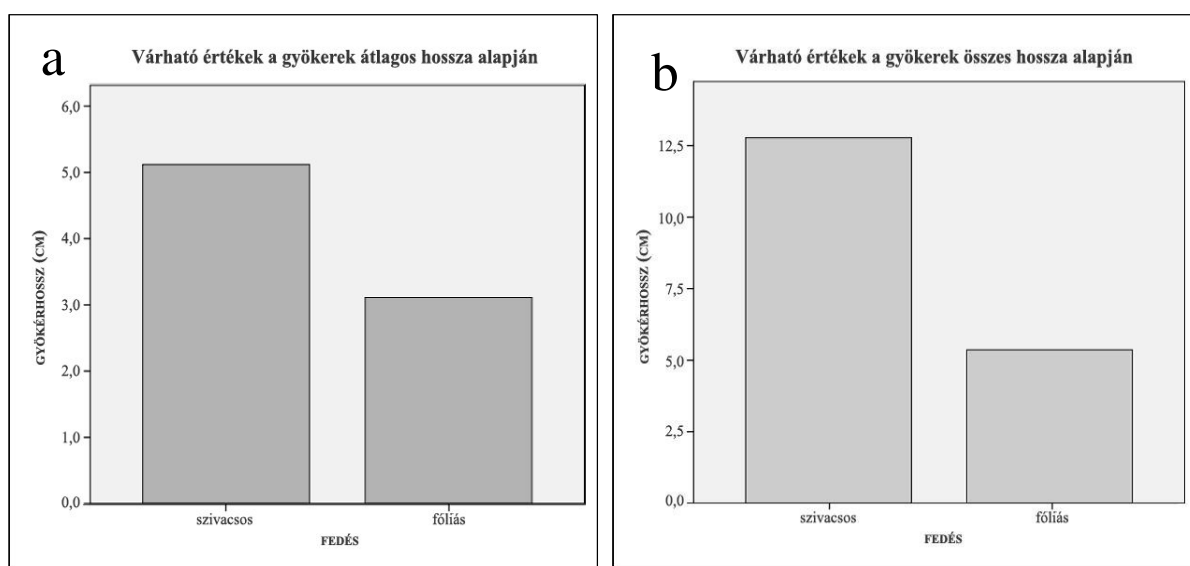


**21. ábra:** A gyökerek átlagos hosszúsága csapvizet agarban, perlitben, kőzetgyapotban és tőzegkockában.



**22. ábra:** Csapvizet agarban (a), kőzetgyapotban (b), tőzegkockában (c) és perlitben (d) gyökereztetett 'Richter 110' mikro dugványok.

A fóliával illetve a szivacsos tetővel fedett üvegekben gyökereztetett mikrodugványok között nem találtunk szignifikáns különbséget a gyökerek számát illetően. Az egy növényen lévő gyökerek összes hosszát illetően és az alapján, hogy hány centiméter volt a gyökerek átlagos hossza (23. ábra) már szignifikáns különbséget tapasztaltunk. Ez azt mutatja, hogy a szivacsos tetővel való fedés előnyösebb a háromrétegű fóliafedéssel szemben a ‘Richter 110’ alanyfajta esetében. A fóliával illetve a szivacsos tetővel fedett edényekben is csaknem 100%-ban meggyökeresedtek a növények, de a három réteg fólia valamelyest akadályozta az üvegek levegőzését. Ezért a szivacsos tetővel való fedés hatékonyabbá teheti az *in vitro* nevelt növények gyökeresítését.



**23. ábra:** A gyökerek növényenkénti átlagos (a) és összes (b) hossza a szivacsos tetővel illetve a fóliával fedett üvegekben.

Az EHA105(pRok2Ferr), EHA105(pRok2FerrFLAG), EHA105(pRok2), EHA101(pTd93virE1), EHA101(pJP17) vektorral transzformált ‘Richter 110’ növényekről származó kétrügyes mikrodugványokat a kapott eredmények alapján steril csapvízzel nedvesített perlittel megtöltött bébiételes üvegekben gyökereztetettük fényszobában, 24°C-on 16 órás megvilágítás mellett. 18-20 nap elteltével, miután a mikrodugványok meggyökeresedtek, a bébiételes üvegek tetejét fokozatosan megnyitottuk, majd teljesen eltávolítottuk. Ezt követően a gyökerező mikrodugványokat megfelelő tápanyagokat tartalmazó perlit és tőzeg 1:1 arányú keverékével megtöltött cserepekbe ültettük. A szőlő növényeket üvegházban természetes megvilágítás és 20°C körüli hőmérséklet mellett

neveltük tovább, párásítást naponta egy alkalommal végeztünk. Az EHA101(pJP17-S4) vektorral transzformált növények akklimatizációja folyamatban van.

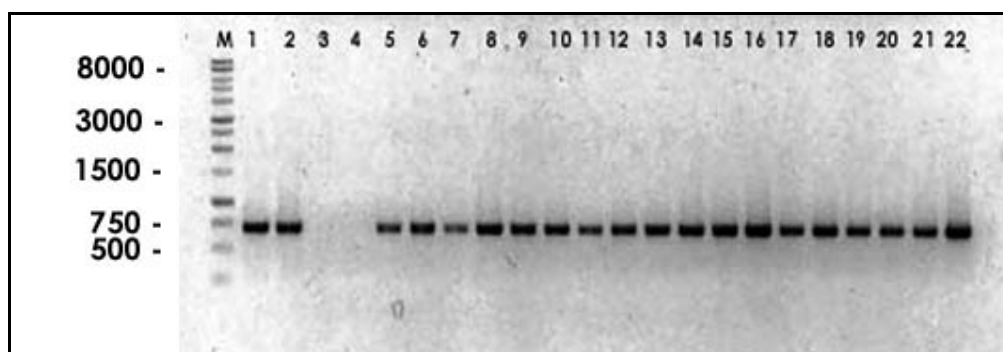
A pTd93virE1 transzformáns 'Richter 110' növények akklimatizációja során megfigyeltük, hogy azok csökkent életképességgel rendelkeznek. Üvegházi körülmények között vált egyértelműen láthatóvá, hogy törpe növekedésűek és elszáradó hajtáscsúcsokkal rendelkeznek, ebből kifolyólag pedig nem tudtuk felszaporítani őket a különböző agrobaktériumos fertőzési kísérletekhez sem. A 24. ábra a perlit és tőzeg keverékével megtöltött edényekbe ültetett meggyökeresedett pTd93virE1 transzformáns (1. és 2. növény) és a nem-transzformált kontroll (3. és 4. növény) 'Richter 110' mikrodugványok hajtásfejlődése közötti különbségeket mutatja az átültetés után 2 hónappal. A pTd93virE1 transzformáns növények rendellenes növekedésével megegyező tüneteket tapasztaltunk a pRok2FerrFLAG transzformáns növények egy részénél is, ezért ez a jelenség nem tulajdonítható egyértelműen a felhasznált konstrukciónak. Véleményünk szerint a szomaklonáris variabilitás állhat a háttérben, melyet az embriogén anyag folyamatos átrakása során felszaporítottunk.



**24. ábra:** A meggyökeresedett pTd93virE1 transzformáns (1. és 2. növény) és nem-transzformált kontroll (3. és 4. növény) 'Richter 110' mikrodugványok hajtásfejlődése az átültetés után 2 hónappal.

### 6.7. PCR-analízis

A PCR analízis során célunk a bevitt gének jelenlétének kimutatása és a növényi minta *Agrobacterium* mentességének bizonyítása volt. Az eljárás során a növényi mintából kivont DNS-ből specifikus primerekkel próbáltuk az *MsFerr*, *iaaM* és *virE1*, *nptII* és *virC* (*Agrobacterium* virulencia gén) gének megfelelő hosszúságú szakaszait amplifikálni. A PCR-reakció során nyert fragmentumokat agaróz gélelektroforézissel választottuk el egymástól. A futtatás után kapott DNS-mintázatot értékeltük. A méret markerrel (1 kb DNA Ladder, Promega) történő összehasonlítás során megállapítottuk, hogy a kanamicin rezisztenciát okozó *nptII* gén keresett szakaszát sikeresen amplifikáltuk az összes vizsgált feltételezett 'Richter 110' transzformáns DNS mintájából (25. ábra). A vizsgált növényi minták egyikénél sem sikerült az *Agrobacterium virC* gén megfelelő szakaszát amplifikálni (26. ábra), ami azt mutatja, hogy a keresett gének esetében a pozitív eredményt nem az *Agrobacterium* sejtek növényben való jelenléte okozza.



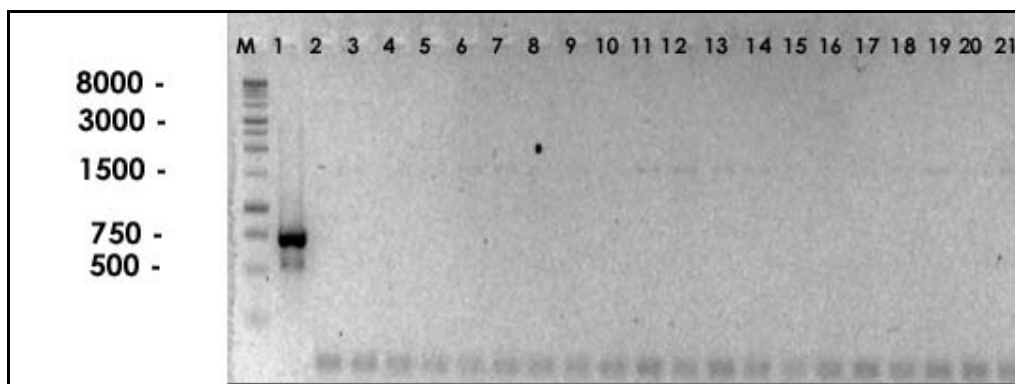
**25. ábra:** Transzformált DNS szakasz amplifikálása szőlő növényekből *nptII* specifikus primerekkel.

sáv 1-2: *A. tumefaciens* EHA105(pRok2Ferr)

sáv 3: 0 kontroll (templát DNS nélkül)

sáv 4: kontroll 'Richter 110'

sáv 5-22: 18 független transzformáns 'Richter 110'



**26. ábra:** *A. tumefaciens* DNS szakasz amplifikálása szőlő növényekből *virC* specifikus primerekkel.

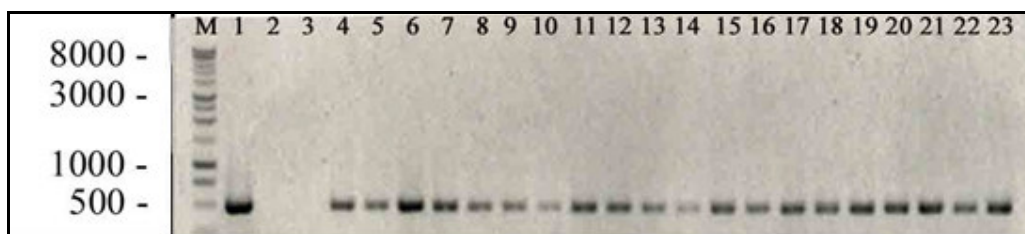
sáv 1: *A. tumefaciens* EHA105(pRok2Ferr)

sáv 2: 0 kontroll (templát DNS nélkül)

sáv 3: kontroll 'Richter 110'

sáv 4-21: 18 független transzformáns 'Richter 110'

A lucerna ferritin gén jelenlétének ellenőrzésére az Oláh Róbert által (2005) kiválasztott, a gén kimutatására alkalmas Fw1-Rev2 primer kombinációt használtuk. A temelődő fehérje kloroplasztisban történő kifejeződéséért felelős EHA105(pRok2Ferr) vektorral transzformált 'Richter 110' növények mintáiban sikeresen amplifikáltuk a gén 513 bp hosszúságú szakaszát (27. ábra), a fehérje citoplazmában történő felhalmozódását eredményező EHA105(pRok2FerrFLAG) vektorral transzformált növények esetében azonban csak kb. a minták felénél tudtuk amplifikálni a kívánt szakaszt (saját, nem közölt adatok). Az agaróz gélelektroforézissel elválasztott DNS-mintázatot a Promega cég 1 kb DNA Ladder méretmarkerének segítségével értékeltük.



**27. ábra:** Transzformált DNS szakasz amplifikálása szőlő növényekből *MsFerr* Fw1-Rev2 primerekkel.

sáv 1: *A. tumefaciens* EHA105(pRok2Ferr)

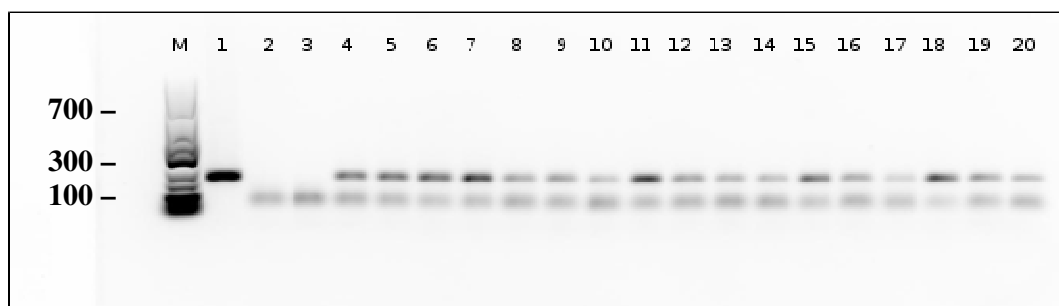
sáv 2: 0 kontroll (templát DNS nélkül)

sáv 3: kontroll 'Richter 110'

sáv 4-23: 20 független transzformáns 'Richter 110'

A Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központjának Növénybiológiai Intézetében Horváth V. Gábor és munkatársai elvégezték 16 PCR analízissel alátámasztott pRok2Ferr pozitív ‘Richter 110’ vonal levélmintáinak mRNS és fehérje szintű vizsgálatait qPCR illetve Western blot analízissel (Zok et al. 2009a., b). A vizsgált növényi mintákban fokozott lucerna ferritin gén expressziót tapasztaltak. A levélminták Western blot analízise során megállapították, hogy a lucerna ferritin fehérje nagy mennyiségben akkumulálódott a levelekben. A keresett fehérje molekuláris súlya alapján a fehérje feldolgozott formában történő felhalmozódását feltételezték, ahogy az a pRok2Ferr konstrukció alapján várható is volt (lásd 3.6. fejezet).

A géncsendesítés mechanizmusán alapuló, feltételezhetően *Agrobacterium* rezisztenciát biztosító EHA101(pJP17) és EHA101(pJP17-S4) vektorokkal transzformált ‘Richter 110’ növények esetében az *iaaM* gén jelenlétének ellenőrzésére használt primerekkel az összes vizsgált növényi mintában sikerült a gén 150 bp hosszúságú szakaszát amplifikálni (28. ábra). Az agaróz gélelektroforézissel elválasztott DNS-mintázatot a Fermentas cég Low Range DNA Ladder méretmarkerének segítségével értékeltük.



**28. ábra:** Transzformált DNS szakasz amplifikálása szőlő növényekből *iaaM* specifikus primerekkel.

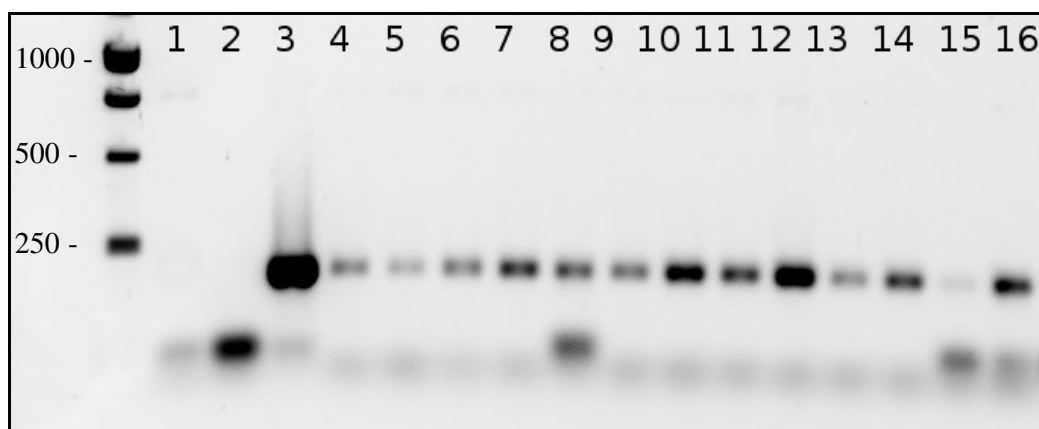
sáv 1: *A. tumefaciens* EHA101(pJP17)

sáv 2: 0 kontroll (templát DNS nélkül)

sáv 3: kontroll ‘Richter 110’

sáv 4-20: 16 független transzformáns ‘Richter 110’

A VirE1-VirE2 fehérjék komplexképződésére alapozott, feltételezhetően *Agrobacterium* rezisztenciát biztosító EHA101(pTd93virE1) vektorral transzformált ‘Richter 110’ növények mintáiban sikeresen amplifikáltuk a gén megfelelő szakaszát *virE1* specifikus primerekkel (29. ábra). Az agaróz gélelektroforézissel elválasztott DNS-mintázatot a Promega cég 1 kb DNA Ladder méretmarkerének segítségével értékeltük.



**29. ábra:** Transzformált DNS szakasz amplifikálása szőlő növényekből *virE1* specifikus primerekkel.

sáv 1: kontroll 'Richter 110'

sáv 2: 0 kontroll (templát DNS nélkül)

sáv 3: *A. tumefaciens* EHA101(pTd93virE1)

sáv 4-16: 13 független transzformáns 'Richter 110'

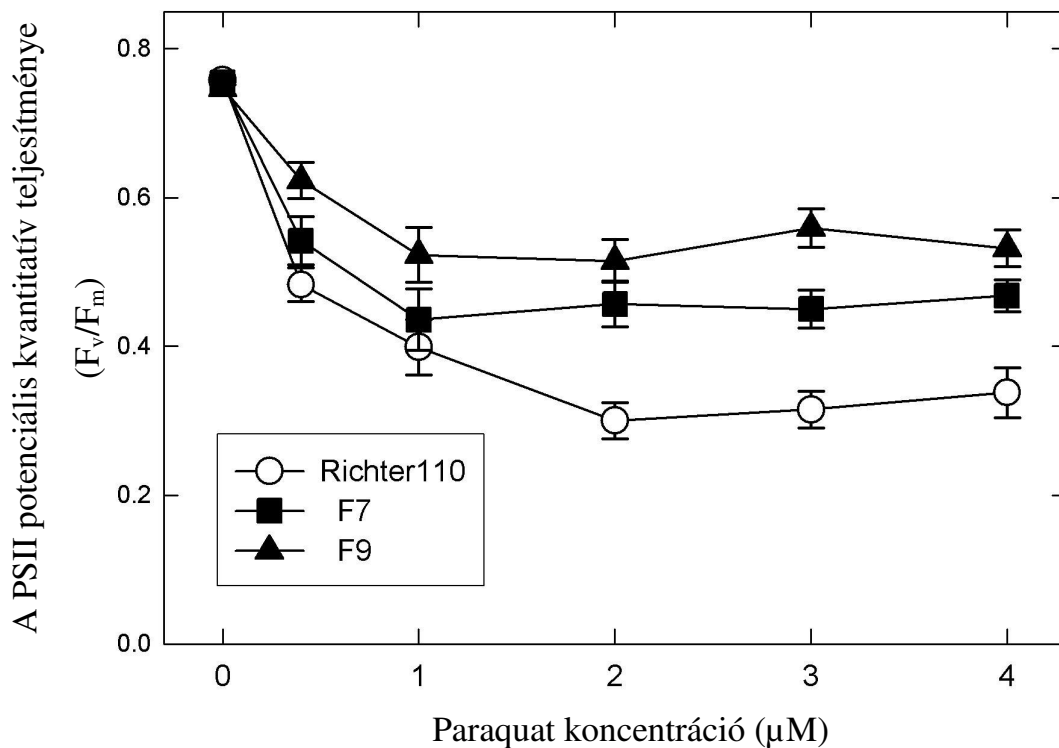
#### 6.8. A transzformánsok oxidatív stressztűrő képességének tesztelése

Elvégeztük 6 pRok2Ferr transzformáns 'Richter 110' vonal fiziológiai jellemzését annak érdekében, hogy megállapítsuk, ezek a genotípusok valóban nagyobb oxidatív stressz toleranciával rendelkeznek-e, mint a kísérletben kontrollként felhasznált nem-transzformált 'Richter 110' növény. Vizsgálataink a klorofill fluoreszcencia indukció mérésére terjedtek ki, amikor is a sötétadaptált levélminták PSII reakciócentrumának potenciális kvantitatív teljesítményét az  $F_v/F_m$  arány meghatározásával mértük. A különböző koncentrációjú paraquat oldatban úsztatott, pRok2Ferr transzformáns és kontroll szőlő növényekről származó levelek fluoreszcencia indukciós mérése során 2 független transzformált vonal (F7 és F9, 30. ábra) esetében tapasztaltunk eltérést a nem-transzformált kontroll 'Richter 110' vonalhoz viszonyítva. A kontroll növényről származó levelek esetében az  $F_v/F_m$  arány értéke már az 1  $\mu$ M paraquat oldattal történő kezelés után 50%-kal, majd a koncentráció emelésével folyamatosan tovább csökkent. Az F7 és F9 lucerna ferritint termelő transzformánsok esetében azonban az  $F_v/F_m$  arány értékben bekövetkező csökkenés kisebb mértékű volt, a transzgénikus vonalak leveleiben a PSII potenciális kvantitatív teljesítménye még a 4  $\mu$ M paraquat koncentráció mellett sem esett vissza a felére. Amikor a pRok2Ferr transzformáns és kontroll szőlő növények leveleit

csapvízben úsztattuk, nem tapasztaltunk számottevő különbséget azok fotoszintetikus teljesítményében.

A szőlőtermesztési gyakorlatban a 'Richter 110' fajtát alanynak használják, ezért a pRok2Ferr transzformáns és a nem-transzformált kontroll 'Richter 110' vonalak 50 mM NaHCO<sub>3</sub> oldattal történő elárasztása során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy vajon a lucerna ferritin fehérjét túltermelő növények a kontroll növényhez képest nagyobb szárazság-, és sóstressz toleranciával rendelkeznek-e. A kísérlet kiértékelésekor - 15 nap elteltével - a kontroll növény estében levélszáradást tapasztaltunk (31.a. ábra), ez a tünet azonban a vizsgált pRok2Ferr transzformáns vonalak egyikén sem jelentkezett, ezen növények levelein helyenként klorotikus tünetek voltak megfigyelhetők (31.b. és c. ábra). A pRok2Ferr transzformáns szőlő növények esetében a termelődő lucerna ferritin fehérje a kloroplasztisban lokalizálódik, ezért a szőlőtermesztési gyakorlat számára is hasznosítható információkat csak a pRok2ferrFLAG transzformánsok vizsgálatával nyerhetünk, ahol ez a túltermeltetett fehérje a citoplazmában akkumulálódik. Megfigyeléseink ennek ellenére valószínűsítik, hogy a transzformált vonalak közül néhány esetben az oxidatív stresszel szembeni növekedett ellenálló képesség mutatható ki.





**30. ábra:** A nem-transzformált kontroll és a pRok2Ferr transzformáns 'Richter 110' növények leveleinek fotoszintetikus teljesítményében bekövetkezett változások a különböző koncentrációjú paraquat oldatokban.

Richter110: nem-transzformált kontroll 'Richter 110'; F7, F9: pRok2Ferr transzformáns 'Richter 110' vonalak.



**31. ábra:** A nem-transzformált kontroll (a) és a pRok2Ferr transzformáns (b, c) 'Richter 110' növények levelein bekövetkezett változások az 50 mM NaHCO<sub>3</sub> oldattal történő kezelés hatására.

### 6.9. *Agrobacterium* rezisztencia vizsgálatok

Az EHA101(pJP17) vektorral transzformált, bizonyítottan transzgénikus (lásd 5.7. fejezet) 'Richter 110' növények *Agrobacterium* rezisztencia vizsgálatainak eredményeit a 8. táblázat tartalmazza. A táblázatban „+” jelöléssel láttam el azokat a vonalakat, amelyeknél intenzív, „(+)” jelöléssel, amelyeknél gyenge tumorfejlődést tapasztaltunk. Az adott törzzsel szemben egyértelműen ellenálló vonalakat „-” jelöléssel tüntettem fel. A táblázatban szereplő értékek a fejlődött tumorok/sebzési helyek arányát mutatják. A 21 független vonal mintegy harmada bizonyult egyértelműen rezisztensnek az A348 törzzsel szemben (32. ábra), és ezek közül 3 vonalon az AT1 törzs sem tudott tumorfejlődést indukálni. A C58, Tm4 és S4 *Agrobacterium* törzsekkel való fertőzés a vizsgált vonalak nagy részén tumorfejlődést eredményezett.

Az *A. tumefaciens* A348 törzzsel való fertőzés során kapott negatív eredmények valószínűleg azzal magyarázhatóak, hogy a pJP17 konstrukció elkészítésénél ennek a törzsnek az *iaaM* és *ipt* szekvenciáit használták fel. Az *A. vitis* S4 törzzsel való fertőzés mindegyik vizsgált növényen tumorfejlődést eredményezett, ami az A348 és S4 törzsek távoli rokonsági kapcsolatával magyarázható. Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy az alkalmazott eljárással lehetséges *Agrobacterium* rezisztens szőlő vonalak létrehozása, de az is bebizonyosodott, hogy a patogén törzsekben lévő *iaaM* szekvenciák közötti eltérések miatt nem lehet egyetlen "védő" szekvenciát tartalmazó, minden törzsnek ellenálló transzgénikus növényt létrehozni. Az *A. vitis* S4 *iaaM* szekvenciát is tartalmazó pJP17-S4 konstrukcióval transzformált növények teszteléseit az akklimatizációt követően kívánjuk elvégezni, valamint szeretnénk a pJP17 konstrukcióval transzformált növények fertőzését is megismételni, hogy egyértelmű következtetéseket tudjunk levonni arra vonatkozóan, hogy a konstrukciók eredményesen felhasználhatóak-e szőlőben *Agrobacterium* rezisztencia kialakítására.

**8. táblázat:** Az EHA101(pJP17) vektorral transzformált 'Richter 110' növények A348, C58, Tm4, AT1 és S4 *Agrobacterium* törzsekkel szembeni ellenállóságának vizsgálata.

Vonal	A348	C58	Tm4	AT1	S4
'Richter 110'	+ 2/3	+ 3/3	(+) 2/3	+ 2/3	+ 2/3
pJP17/3	- 0/3	(+) 3/3	+ 3/3	- 0/3	+ 3/3
pJP17/4	(+) 2/2	(+) 3/3	(+) 1/3	(+) 3/3	+ 3/3
pJP17/5	+ 3/3	+3/3	+ 3/3	(+) 3/3	+ 2/3
pJP17/6	- 0/3	(+) 3/3	+ 3/3	(+) 3/3	+ 2/3
pJP17/9	- 0/3	(+) 3/3	+ 3/3	(+) 3/3	+ 3/3
pJP17/21	- 0/3	(+) 2/3	+ 2/3	(+) 3/3	n.t.
pJP17/22	+ 3/3	(+) 3/3	(+) 1/3	(+) 3/3	(+) 2/2
pJP17/23	- 0/3	(+) 3/3	+ 3/3	- 0/3	+ 3/3
pJP17/35	+ 3/3	+ 3/3	+ 2/3	(+) 3/3	+ 3/3
pJP17/38	+ 3/3	(+) 3/3	(+) 2/2	+ 2/3	(+) 2/3
pJP17/42	(+) 1/3	+ 3/3	(+) 3/3	(+) 2/3	(+) 3/3
pJP17/43	+ 2/3	(+) 3/3	+ 3/3	(+) 1/3	+ 3/3
pJP17/44	(+) 2/3	(+) 3/3	+ 2/3	(+) 1/3	(+) 2/2
pJP17/46	(+) 3/3	(+) 3/3	+ 1/3	(+) 3/3	+ 2/3
pJP17/48	(+) 1/3	(+) 3/3	- 0/3	(+) 2/3	+ 2/3
pJP17/50	(+) 1/3	(+) 3/3	+ 2/2	(+) 3/3	(+) 3/3
pJP17/57	- 0/3	(+) 2/3	+ 2/3	(+) 2/3	+ 2/3
pJP17/58	- 0/3	(+) 3/3	+ 2/3	(+) 1/3	+ 1/3
pJP17/61	+ 2/2	(+) 3/3	+ 3/3	(+) 1/3	+ 3/3
pJP17/62	- 0/3	+ 3/3	+ 3/3	- 0/3	+ 3/3
pJP17/63	+ 1/3	(+) 3/3	+ 3/3	+ 3/3	+ 2/3

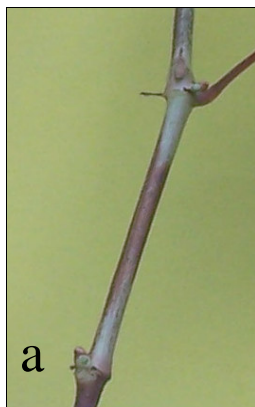
nt: nem tesztelt

+ intenzív tumorfejlődés

(+) gyenge tumorfejlődés

- nincs tumorfejlődés

fejlődött tumorok/sebzési helyek



**32. ábra:** *Agrobacterium tumefaciens* A348 törzsszel szemben ellenálló (a) és fogékony (b) EHA101(pJP17) vektorral transzformált 'Richter 110' növények másfél hónappal a fertőzés után.

Az EHA101(pTd93virE1) vektorral transzformált növények *Agrobacterium* rezisztencia vizsgálatai során az akklimatizált növények esetében 8 növény rezisztensnek 5 növény pedig fogékonynak bizonyult az *A. vitis* Tm4 törzssel szemben. A fényszobából származó növények esetében a rezisztens és fogékony növények megoszlása 17:9 volt (33. ábra). Az *in vitro* körülmények között nevelt és fertőzött növényeknél megfigyeltük, hogy a tumorfejlődés a fogékony növényeken sokkal egyértelműbb volt (morfológiailag egyértelműen meghatározható), mint az akklimatizált növényeken. Ez a különbség valószínűleg az eltérő szöveti struktúrával magyarázható. Mivel a növények csökkent életképessége miatt nem tudtuk azokat felszaporítani és így csak egy *Agrobacterium* törzssel végeztük el a fertőzéseket, ezért egyértelmű következtetéseket nem tudunk levonni arra vonatkozólag, hogy EHA101(pTd93virE1) vektor alkalmas-e a szőlőben *Agrobacterium* rezisztencia kialakítására. Ehhez egy új transzformációs kísérlet elvégzésére lenne szükség.



**33. ábra:** Az EHA101(pTd93virE1) vektorral transzformált, *in vitro* körülmények között nevelt és fertőzött fogékony (a) és ellenálló (b) ‘Richter 110’ növények az *Agrobacterium vitis* Tm4 törzssel való fertőzés után másfél hónappal.

A *V. amurensis* eredetű, tanszéki nemesítésű fajták *Agrobacterium* rezisztencia vizsgálatainak eredményeit a 9. táblázat tartalmazza. A táblázatban feltüntettem az adott törzssel fertőzött növények számát, az érzékenység fokát („+”: fogékony, „(+)”: gyengén fogékony, „-”: rezisztens), a zárójelben szereplő értékek pedig a fejlődött tumorok / sebzési helyek arányát mutatják. A tesztelt fajták közül a ‘Korai bíbor’ és ‘Orpheus’ az *A. tumefaciens* C58 törzssel szemben; az ‘Odysseus’ és ‘Pannon frankos’ az *A. tumefaciens* C58, *A. vitis* AT1 és S4 törzsekkel szemben bizonyult rezisztensnek. A ‘Taurus’ mind az 5 *Agrobacterium* törzssel szemben egyértelműen rezisztensnek bizonyult. A kísérletet ezen a

fajtan a következő évben is megismételtük, kibővítvé még néhány újabb *Agrobacterium* törzzsel (*A. tumefaciens* A348, *A. vitis* AB4 és Sz1) és ekkor is egyértelmű rezisztenciát tapasztaltunk. Ezután elvégeztük a 'Taurus' öntermékenyítéséből származó utódok vizsgálatát, és a kapott 33 rezisztens : 20 fogékony hasadási arányból arra következtetésre jutottunk, hogy a tulajdonság monogénesen öröklődik és a rezisztencia kialakulásáért domináns allél felelős.

**9. táblázat:** *A Vitis amurensis* eredetű tanszéki nemesítésű fajták *Agrobacterium* rezisztencia vizsgálatainak eredményei.

Fajta	Kontroll (0)	<i>A. tumefaciens</i> C58	<i>A. vitis</i> Tm4	<i>A. vitis</i> AB3	<i>A. vitis</i> AT1	<i>A. vitis</i> S4
'Kékfrankos' (+ kontroll)	3 – (0/7)	3 - (1/7)	3 + (8/9)	3 + (8/9)	3 + (9/9)	3 + (9/9)
'Szőrkebarát' (+ kontroll)	3 - (0/9)	3 - (1/9)	3 + (10/10)	3 + (9/9)	3 + (6/9)	3 (+) (8/8)
'Kunbarát' (- kontroll)	3 - (0/8)	3 - (0/8)	3 - (0/6)	3 - (0/9)	3 - (0/9)	3 - (0/7)
'Pegasus'	3 – (0/6)	3 + (9/9)	3 + (9/9)	2 + (6/6)	3 + (9/9)	3 + (9/9)
'Csépi muskotály'	2 - (0/5)	3 (+) (3/8)	3 + (8/8)	2 + (5/6)	3 + (9/9)	2 + (4/6)
'Borostyán'	3 - (0/9)	3 (+) (6/9)	3 + (8/8)	2 + (6/6)	3 + (9/9)	3 + (9/9)
'Odysseus'	3 - (0/9)	3 – (0/8)	3 + (4/7)	3 + (9/9)	3 - (0/9)	3 - (0/9)
'Orpheus'	3 - (0/7)	3 – (0/8)	3 + (8/9)	3 (+) (8/9)	3 + (8/9)	3 (+) (4/8)
'Taurus'	3 - (0/9)	3 – (0/8)	3 - (0/8)	3 - (0/9)	3 - (0/8)	1 - (0/3)
'Korai bíbor'	3 - (0/9)	3 – (0/7)	3 + (7/8)	3 + (8/9)	3 (+) (1/9)	3 (+) (6/9)
'Pannon frankos'	3 - (0/9)	3 - (1/9)	3 (+) (8/8)	3 (+) (9/9)	3 - (0/9)	3 - (0/9)

+ intenzív tumorfejlődés

(+) gyenge tumorfejlődés

- nincs tumorfejlődés

fertőzött növények száma, az érzékenység foka, (fejlődött tumorok/sebzési helyek)

### 6.10. Új tudományos eredmények

1. Elsőként sikerült embriogén kallusz fejlődést indukálnunk a 'Korai bíbor', 'Odysseus', 'Orpheus' és 'Pannon frankos' fajták tenyészetében
2. Elsőként próbáltuk ki és sikeresen alkalmaztuk az 1,1 mg/l 2,4-D-t és 0,1 mg/l BA-t tartalmazó Cheé és Pool (1987) által leírt, szőlőre optimalizált táptalajt, embriogén kallusz felszaporítására a 'Richter 110' alanyfajta esetében.
3. Bizonyítottuk, hogy az 0,22 mg/l BA használata a szelekciós táptalajban növeli az EHA105(pRok2Ferr) vektorral transzformált 'Richter 110' embriogén kultúrák regenerációs hatékonyságát az abnormális fejlődésű embriók arányának csökkentése által.
4. Megállapítottuk, hogy a 'Richter 110' fajta számára a perlitben történő gyökereztetés a legmegfelelőbb eljárás az akklimatizáció hatékonyságának növelése érdekében.
5. Transzgénikus 'Richter 110' növényeket állítottunk elő az EHA105(pRok2Ferr) és EHA105(pRok2FerrFLAG) vektorkonstrukciók felhasználásával a szőlő oxidatív stressztűrő képességének növelésére irányuló kísérleteinkben.
6. Két transzgénikus vonalról bebizonyítottuk, hogy a nem-transzformált 'Richter 110' kontroll vonalhoz képest nagyobb oxidatív stressz toleranciával rendelkeznek.
7. Transzgénikus 'Richter 110' növényeket állítottunk elő az EHA101(pTd93virE1), EHA101(pJP17) és EHA101(pJP17-S4) vektorkonstrukciók felhasználásával az *Agrobacterium* rezisztens szőlő növények előállítását célzó kísérleteinkben.
8. Megállapítottuk, hogy a pJP17 konstrukció csak azon törzzsel szemben biztosít rezisztenciát, amelynek *iaaM* és *ipt* szekvenciáit a konstrukció elkészítésénél felhasználták.
9. A tanszéki nemesítésű fajták *Agrobacterium* rezisztencia vizsgálatai során megállapítottuk, hogy a 'Korai bíbor' és 'Orpheus' az *A. tumefaciens* C58 törzzsel szemben; az 'Odysseus' és 'Pannon frankos' az *A. tumefaciens* C58, *A. vitis* AT1 és S4 törzsekkel szemben; a 'Taurus' pedig mind az 5 *Agrobacterium* törzzsel szemben rezisztens.

## 7. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

### Embriogén kallusz indukció és felszaporítás

A transzformációs módszerek alkalmazásának lehetősége a regenerációs rendszer meglétéén, illetve a fajták regenerációs hatékonyságán múlik. A szőlő regenerációs rendszerek közül számos fajtánál a portokon indukált embriogén sejttenyészeteket alkalmazzák és saját kísérleteink is ezen a területen bizonyultak a legeredményesebbnek. Az MSE táptalaj használata a legtöbb fajta (9) esetében sikeresnek bizonyult az embriogén kallusz indukciós kísérletekben, ami egyértelműen jelzi a 2,4-D és BA hormonkombináció hatékonyságát, melyet korábbi kísérletek is alátámasztanak: Mozsár és Süle (1994), Perrin és mtsai. (2004), López-Pérez és mtsai. (2005) és Pino-Sintra (2007). Az MST táptalaj alkalmazásával a 'Richter 110' és a 'Teleki 5C' alanyfajták portoktenyészetein 8-, ill. 6,67%-ban sikerült embriogén kallusz fejlődést indukálni. A kapott értékek jelentős mértékben különböznek a 'Chardonnay' és 'Kékfrankos' *V. vinifera* fajták eredményeitől (0,25% ill. 1,25%). Oláh és munkatársai (2003a) a TDZ (0,05 mg/l) tartalmú táptalajt szintén eredményesen használták több alanyfajta esetében is ('Börner', 'Richter 110', 'SO4', 'St. George', 'Teleki 5C'). A 'Pannon frankos' fajta esetében csak az NNE táptalajon tapasztaltunk embriogén kallusz fejlődést, ezért véleményünk szerint a táptalaj hatása erősen genotípus függő. Yang és munkatársai (2006) 2,4-D és BA hormonkombinációt tartalmazó (Mauro et al. 1986) szilárd NN táptalajt alkalmazva sikeresen indukáltak embriogén kalluszt különböző *V. vinifera* fajtákról származó portokokon; valamint csak 2,4-D-t tartalmazó NN táptalajon, éretlen zigotikus embriókon. Az MS táptalajhoz képest a NN táptalaj egyes mikroelemekből (Mn, Mo, Zn, B) többet tartalmaz, makroelem tartalma viszont csökkentett. A szőlőfajták esetében megfigyelt különbségek rávilágítanak arra, hogy a makro-, és mikroelemek mennyiségének illetve minőségének változtatása a táptalajban, valamint a különböző növényi növekedés szabályozó anyagok jelentős mértékben befolyásolják az embriogén kallusz indukciót.

A 'Chardonnay' virágzatok sterilizációja során alkalmazott két különböző sterilizálási eljárás ugyanolyan hatékonysággal működött, ezért a szőlő esetében a NaOCl oldat helyett a klór-mentes  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  oldat használatát javasoljuk erre a célra. Chée és Pool (1987) *in vitro* szőlő hajtástenyészetekben figyelték meg a csökkentett klórtartalmú táptalaj használatának pozitív hatását. A kísérletben felhasznált négyféle táptalaj közül az MSE és CPE táptalajokon közel azonos hatékonysággal sikerült embriogén kalluszt

indukálnunk. Bouamama és munkatársai (2009) szintén sikeresen indukáltak embriogén kalluszt CP táptalajon, azzal a különbséggel, hogy az általuk felhasznált táptalaj a 2,4-D és TDZ hormonkombinációt tartalmazta. Az antioxidáns és fenolkötő vegyülettel kiegészített MSE táptalaj használata negatív hatással volt az embriogén kallusz indukcióra, ezért ezekben a kísérletekben nem javasoljuk a használatát. Az aktív szénrel kiegészített MSE táptalaj szintén gátló hatással volt az embriogén kallusz indukcióra. Ez a hatás valószínűleg azzal magyarázható, hogy az aktív szén alkalmazásának van egy olyan mellékhatása, hogy lecsökkenti a hormonok és más szerves anyagok szintjét a táptalajban (Ebert and Taylor 1990).

Az embriogén kallusz indukció a különböző környezeti tényezők miatt nem minden évben működik azonos hatékonysággal, ezért fontos a már meglévő kallusz tenyészeteket a lehető legjobb minőségben megőrizni és fenntartani. Az embriogén tenyészetek fenntartása és felszaporítása azonban számos fajta esetében problémát jelentett. A 'Richter 110' alanyfajta esetében kipróbált, és sikeresen alkalmazott 1,1 mg/l 2,4-D-t és 0,1 mg/l BA-t tartalmazó, Cheé és Pool (1987) által leírt, szőlőre optimalizált táptalaj használata megoldást jelenthet ezekre a problémákra.

### **Szőlő organogenezis**

Munkánk során a portok indukciós kísérletek mellett megpróbáltunk direkt organogenezissel a rügyalapból növényregenerációt előidézni. A vizsgált 'Richter 110' fajta esetében azonban ez a módszer nem működött megfelelő hatékonysággal. A 'Richter 110' fajtánál tapasztalt csekély regenerációs hatékonyság ellenére a módszer alkalmazásának lehetőségét abban látjuk, hogy megoldás lehet génbevitelre olyan fajtáknál, amelyeknél jelenleg nem tudunk embriogén kalluszt létrehozni.

### **A növényregeneráció hatékonyságának optimalizálása**

Tapasztalataink szerint az embriogén tenyészetek kora jelentősen befolyásolja a regenerációs képességet és a sejtenyészetek homogenitását. Mivel a homogén sejt kultúrák nagyobb regenerációs potenciállal rendelkeznek (Jayasankar et al. 2003), mint a különböző sejtaggregátumokat tartalmazó heterogén tenyészetek, a 'Richter 110', 'Teleki 5C' és 'Chardonnay' fajták esetében sikeresen alkalmazott folyékony MSNOA táptalaj használata megoldást jelenthet a legoptimálisabb állapotú, kis vakuolumokkal rendelkező, gyorsan osztódó sejtek felszaporítására. Az embriogén szuszpenziók használatának előnyeire számos publikáció hívja fel a figyelmet (pl. Coutos-Thévenot et al. 1992, Amar et al.



2007), Vidal és munkatársai (2003) pedig a genetikai módosítások leghatékonyabb kiindulási anyagának tartják a szuszpenziós kultúrákat.

A hormonmentes CP táptalaj használata a 'Chardonnay' fajta esetében pozitív hatással volt a szomatikus embriók regenerációjára. A táptalaj kedvező hatása a szőlő *in vitro* tenyészetekre valószínűsíthetően annak köszönhető, hogy a kalciumot nem kalcium-klorid hanem kalcium-nitrát formában tartalmazza, emellett a jód és a mangán csökkentett koncentrációban van jelen a táptalajban. Cheé és Pool (1987) a két elem koncentrációjának megváltoztatásával tömeges hajtás differenciációt tapasztalt, amely mindkét ionnak az auxin metabolizmusban és transzportban betöltött szerepével magyarázható.

Az EHA105(pRok2Ferr) vektorral transzformált rendellenes fejlődésű 'Richter 110' szomatikus embriók esetében a 0,22 mg/l BA használata a szelekciós táptalajban alkalmasnak bizonyult az abnormális fejlődésű transzformált embriók regenerációs hatékonyságának növelésére. Valerii és munkatársai (2003) az IAA és a BA hormonok hatásának szőlő regenerációs kísérletekben történő vizsgálatok során szintén azt tapasztalták, hogy a BA kedvező hatással van a sziklevéllal rendelkező szomatikus embrioidok további fejlődésére. A transzformációs kísérletekben gyakran tömegesen előforduló rendellenes fejlődésű embriók regenerációs idejének lerövidítésében az embriók pusztuló gyökérnyaki részének eltávolítása, vagy a szelekciós ágens táptalajból való megvonása (megfelelő hosszúságú szelekciós periódus után) nyújthat segítséget. A rendellenes fejlődésű embriók pusztuló gyökérnyaki részének eltávolítását Perl és munkatársai javaslatára végeztük el, elmondásaik szerint ez a módszer náluk is hasonló eredménnyel működött.

### **Akklimatizáció**

A transzformált növények akklimatizációs hatékonyságának növelése érdekében végzett kísérleteink során megtaláltuk a 'Richter 110' fajta számára legmegfelelőbb gyökereztetési eljárást. A módszer előnye, hogy olcsó, egyszerűen kivitelezhető, valamint a kiültetés előtti további felszaporítás és akklimatizáció egy lépésben megoldható, amely gazdaságossá teszi. A perlit inorganikus, levegős közeg, akklimatizációkor nem fertőződik. Az üvegházi kiültetés során nem kell a növény gyökereiről eltávolítani a közeget, mint az agaros táptalajok esetében, amikor sok gyökér leszakadhat, és a növény is sérülhet. A megfelelő minőségű gyökérzet megléte esetén pedig nő az adaptáció hatékonysága az akklimatizáció során.

### **Szőlőtranszformáció**

A regenerációs rendszer hatékonyságának növelése érdekében végzett kísérleteink eredményeit felhasználva mind a hat konstrukció esetében sikerült a további kísérletekhez szükséges (min. 20) transzformált vonalat regenerálnunk. A transzgének jelenlétét PCR reakcióval igazoltuk. Horváth V. Gábor és munkatársai a pRok2Ferr transzformáns ‘Richter 110’ vonalak levélmintáinak mRNS és fehérje szintű vizsgálatait is elvégezték (Zok et al. 2009a., b).

### **A transzformánsok oxidatív stressztűrő képességének tesztelése**

A vizsgált pRok2Ferr transzformáns ‘Richter 110’ vonalak fiziológiai jellemzése során a két transzgénikus vonal esetében tapasztalt megnövekedett oxidatív stressz tolerancia valószínűsíti a szója ferritin fehérje szőlőlevelekben kifejtett pozitív hatását, ahogy azt Deák és munkatársai (1999) korábban, dohány transzformációs kísérleteikben is megfigyelték.

### **Agrobakterium rezisztencia vizsgálatok**

Az EHA101(pJP17) vektorral transzformált ‘Richter 110’ vonalak *Agrobacterium* fertőzése során leggyakrabban az A348 törzssel szemben tapasztaltunk rezisztenciát. Mivel a géncsendesítés mechanizmusának alapja a szekvencia specifikusan történő felismerés, az *Agrobacterium iaaM* szekvenciák pedig nagyon eltérőek még a közeli rokon törzsek esetében is (Galambos 2007), ezért valószínűsíthető volt, hogy ez a konstrukció nem biztosíthat rezisztenciát minden *Agrobacterium* törzssel szemben. A szőlő esetében jelentős *A. vitis* S4 törzssel szemben - amelynek *iaaM* szekvenciája nagymértékben eltér a többi *Agrobacterium* törzsetől – a Galambos Anikó (2007) által elkészített pJP17-S4 konstrukció biztosíthat rezisztenciát, melynek hatásosságát kalanchoe koinokulációs és dohány transzformációs kísérletek segítségével bizonyították. Ream és munkatársai (2003) szintén az *iaaM* és *ipt* onkogének elhallgattatásához szükséges transzformációval *A. tumefaciens* A348 törzssel szemben ellenálló alma (*Malus domestica*) vonalakat, Escobar és munkatársai (2001, 2002) pedig az *A. tumefaciens* 20W-5A, K12, 53-1B törzsekre rezisztens lúdfű (*Arabidopsis thaliana*), paradicsom (*Lycopersicon esculentum*) és dió (*Juglans regia*) növényeket állítottak elő.

A *V. amurensis* eredetű, tanszéki nemesítésű fajták *Agrobacterium* rezisztencia vizsgálatait során a ‘Korai bíbor’ és ‘Orpheus’ az *A. tumefaciens* C58 törzssel szemben; az ‘Odysseus’ és ‘Pannon frankos’ az *A. tumefaciens* C58, *A. vitis* AT1 és S4 törzsekkel

szemben bizonyult rezisztensnek. A 'Taurus' mind az 5 *Agrobacterium* törzzsel szemben egyértelműen rezisztensnek bizonyult. Szegedi (1981) és munkatársai különböző *Vitis* genotípusokat teszteltek agrobaktérium fertőzéssel szembeni fogékonyságra. A tesztelt fajták közül a *V. riparia* cv. 'Portalis' alanyfajtán, a *V. amurensis* eredetű 'Kunbaráton', valamint a 'Szultán' fehér szőlőn nem képződött tumor az *A. tumefaciens* és *A. vitis* törzsekkel történő fertőzés után. Ezt követően a golyvásodással szembeni rezisztenciát kimutatták a *V. amurensis* fajtán és számos hibridjén, továbbá bizonyították Mendeli, domináns öröklődését (Szegedi and Kozma, 1984). Az *Agrobacterium*-rezisztens szőlő genotípusok, a betegséggel szemben ellenálló fajták létrehozása mellett felhasználhatóak az ellenállóképesség természetének megismerésére; valamint a természetesen előforduló, ismeretlen funkciójú rezisztenciagének izolálása és vizsgálata fontos információkkal szolgálhat a modern, molekuláris alapú nemesítés számára.

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

A sikeres genetikai transzformációs kísérletek alapja a hatékony növény-sejt-növény regenerációs rendszer. Napjaink irodalmát áttekintve elmondhatjuk, hogy a különböző transzformációs eljárásoknál gyakran indulnak ki szomatikus embriókból. A szomatikus embriók indukciójára, valamint a transzgénikus növények regenerációjára többféle eljárás létezik. Különbség mutatkozhat a fajták között, a felhasznált növényi részben, a táptalaj összetételében és a kísérleti körülményekben. A portokokon végzett embriogén kallusz indukciós kísérletekben a tesztelt 12 szőlőfajtából 11 esetben kaptunk embriogén kalluszt. A 'Korai bíbor', 'Odysseus', 'Orpheus' és 'Pannon frankos' fajtáknál elsőként számolhattunk be sikeres embriogén kallusz indukcióról. A portokon megjelent kallusz embriogén kapacitását növényregenerációval bizonyítottuk.

A portok indukciós kísérletek mellett megkíséreltünk direkt organogenezissel a rügyalapból növényregenerációt előidézni a 'Richter 110' fajta esetében, azonban ennél a fajtánál ez a módszer nem működött megfelelő hatékonysággal. Ennek ellenére a módszer alkalmazása azon fajták esetében jelenthet egy lehetséges megoldást génbevitelre, amelyek portok tenyészetein jelenleg nem tudunk embriogén kalluszt létrehozni.

A különböző indukciós kísérletekben nyert embriogén kalluszt fel kell szaporítanunk, hogy megfelelő mennyiségű kiindulási anyag álljon rendelkezésünkre a transzformációs kísérletekhez. Az embriogén tenyészetek fenntartása és felszaporítása azonban számos fajta esetében problémát jelentett. A 'Richter 110' alanyfajta esetében kipróbáltuk, és sikeresen alkalmaztuk az 1,1 mg/l 2,4-D-t és 0,1 mg/l BA-t tartalmazó CPE táptalajt embriogén kallusz felszaporítására. A CPE a Cheé és Pool (1987) által leírt szőlőre optimalizált táptalaj hormonokkal kiegészített változata, valószínűsíthetően más fajtáknál is eredményesen alkalmazható embriogén kallusz felszaporítására.

A növényregeneráció hatékonyságát jelentősen befolyásolja a kiindulási anyag minősége. Az 5  $\mu$ M NOA tartalmú folyékony kultúrák alkalmazásával célunk a kis vakuolumokkal rendelkező, gyorsan osztódó sejtek felszaporítása volt, kísérleteink a 'Richter 110', 'Teleki 5C' és 'Chardonnay' fajták esetében eredményesnek bizonyultak. Ezen kívül a 'Chardonnay' fajta esetében a hormonmentes CP táptalajt is eredményesen alkalmaztuk a regenerációs hatékonyság növelésére. Kísérleteinkben a CP táptalajt a szintén hormonmentes MS/2 táptalajjal összehasonlítva az embriogén anyag regenerációs idejének hosszában mutatkozott jelentős eltérés a CP táptalaj javára.

A transzformált és mikroszaporított növények akklimatizációs hatékonyságának növelése érdekében különböző kísérleteket végeztünk el a 'Richter 110' fajta kétrügyes dugványain. Munkánk során háromféle nedvesítő-, és négyféle gyökereztető közeget teszteltünk, valamint kétféle eljárást alkalmaztunk a tenyészedények zárására. A 'Richter 110' fajta számára a csapvízzel nedvesített perlitben történő gyökereztetés bizonyult a legmegfelelőbbnek, ezért a különböző vektorkonstrukciókkal transzformált növények akklimatizációja során ezt az eljárást alkalmaztuk.

Genetikai transzformációs kísérleteink során sikeresen állítottunk elő lucerna ferritin génnel transzformált 'Richter 110' növényeket az EHA105(pRok2Ferr) és EHA105(pRok2FerrFLAG) vektorkonstrukciók felhasználásával. *Agrobacterium* rezisztens növények előállítását célzó transzformációs kísérleteinket az EHA101(pTd93virE1) vektorkonstrukció felhasználásával, az *Agrobacterium tumefaciens virE1* génjének expresszáltatásával; valamint az EHA101(pJP17) és EHA101(pJP17-S4) vektorkonstrukciók felhasználásával, a géncsendesítés mechanizmusán keresztül kívántuk megvalósítani. A 0,22 mg/l BA használata a szelekciós táptalajban, illetve az abnormális fejlődésű embriók pusztuló gyökérnyaki részének eltávolítása alkalmasnak bizonyult a transzformációs eljárásnak köszönhetően nagy mennyiségben előforduló abnormális fejlődésű transzformált embriók hajtásfejlődésének helyreállítására.

A hat pRok2Ferr transzformáns 'Richter 110' vonal fiziológiai jellemzése során két transzgenikus vonal esetében megnövekedett oxidatív stressz toleranciát tapasztaltunk, ami a lucerna ferritin fehérje szőlőlevelekben kifejtett pozitív hatását valószínűsíti.

*Agrobacterium* rezisztencia vizsgálataink során a 21 független EHA101(pJP17) vektorral transzformált 'Richter 110' vonal harmada bizonyult egyértelműen rezisztensnek az A348 törzzsel szemben. Az EHA101(pTd93virE1) vektorral transzformált 'Richter 110' növények csökkent életképessége miatt csak egy *Agrobacterium* törzzsel tudtuk elvégezni a fertőzéseket, ezért egyértelmű következtetéseket nem tudtunk levonni arra vonatkozólag, hogy ez a vektorkonstrukció alkalmas-e a szőlőben *Agrobacterium* rezisztencia kialakítására. A tanszéki nemesítésű fajták *Agrobacterium* rezisztencia vizsgálatai során a 'Korai bíbor' és 'Orpheus' az *A. tumefaciens* C58 törzzsel szemben; az 'Odysseus' és 'Pannon frankos' az *A. tumefaciens* C58, *A. vitis* AT1 és S4 törzsekkel szemben; a 'Taurus' pedig mind az 5 *Agrobacterium* törzzsel szemben egyértelműen rezisztensnek bizonyult.

## 9. SUMMARY

The availability of an effective plant-cell-plant regeneration system is a basic prerequisite of genetic transformation. According to the recently published articles it can be concluded that embryogenic cultures are most frequently used for grapevine transformation experiments. To induce somatic embryos and regenerate transgenic plants different methods are used. Among callus initiation conditions, essential differences are detectable in the medium, genotype and explant of grapevine used for induction. In our embryogenic callus initiation experiments 12 different cultivars were tested, and anther derived embryogenic callus was successfully obtained in 11 genotypes. Moreover, this is the first report on embryogenesis in 'Korai bíbor', 'Odysseus', 'Orpheus' and 'Pannon frankos'. The embryogenic capacity of anther derived callus was confirmed by plant regeneration.

Besides producing embryogenic callus on anthers we have studied direct shoot regeneration from the cells of the base of the bud of 'Richter 110', but its efficiency was low. However, this method might be a potential way for gene transfer in case of cultivars on which anthers embryogenic callus induction has not been solved yet.

The embryogenic callus obtained on anthers should be propagated to have enough starting material for transformation experiments, but the maintenance and propagation of embryogenic callus caused a problem in many case of cultivars. CPE medium proved applicable to propagate embryogenic callus in case of 'Richter 110'. CPE is the medium described by Cheé and Pool (1987) supplemented with 1,1 mg/l 2,4-D and 0,1 mg/l BA, and it might be successfully used for propagation of embryogenic callus of many other cultivars.

Effectivity of plant regeneration is highly affected by the quality of starting material. Using liquid medium containing 5  $\mu$ M NOA we achieved homogeneous 'Richter 110', 'Teleki 5C' and 'Chardonnay' embryogenic cultures propagated rapidly and contained cells with small vacuoles. Besides, CP medium was successfully used in case of 'Chardonnay' to increase the efficiency of regeneration. Comparing CP medium to MS/2 hormon-free medium we found CP that shortens the time of regeneration.

To improve hardening and transfer of regenerated transgenic grapevine, *in vitro* grown 'Richter 110' plants were multiplied by cutting them into double-node internodes with the whole leaf. In our experiments microcuttings were tested using three different

moisturing and four rooting media, and for cover of culture vessels two different methods were tried. When perlite was used and moistened with tapwater proper rooting of 'Richter 110' microcuttings was observed, therefore this method was used further to harden transgenic 'Richter 110' plants harbouring the different gene constructions.

We have carried out genetic transformation experiments using EHA105(pRok2Ferr) and EHA105(pRok2FerrFLAG) transformation vectors and have successfully obtained 'Richter 110' plants transformed with alfalfa ferritin gene. In the transformation experiments to introduce enhanced resistance to *Agrobacterium*, EHA101(pTd93virE1), EHA101(pJP17) and EHA101(pJP17-S4) transformation vectors were used. Overexpressing *Agrobacterium* VirE1 proteins may provide resistance to *Agrobacterium* by inhibiting VirE2. Applying EHA101(pJP17) and EHA101(pJP17-S4) vector constructions we aimed to provide *Agrobacterium* resistance through posttranscriptional gene silencing.

Shoot formation of transformed 'Richter 110' embryos was best restored by using 0,22 mg/l BA in the selection medium and cutting the abnormal embryos under the hypocotyl. Applying these methods we observed the recovery of shoot development of embryos that showed developmental disorder due to the transformation process.

For physiological studies 6 pRok2Ferr transgenic lines and the non-transformed 'Richter 110' plants were used. In case of two transgenic lines we found an increased tolerance to oxidative stress effects, which suggests the protective role of ferritin in grapevine leaves.

*Agrobacterium* resistance of 21 'Richter 110' transgenic lines harbouring EHA101(pJP17) construction were studied, and 1/3 part of the investigated transgenic lines was found to be resistant to *Agrobacterium tumefaciens* A348 strain. Because the pTd93virE1-transformed plants showed abnormal shoot and leaf morphology accompanied by weak growth, we could not say if this gene construction is suitable in grapevine for engineering *Agrobacterium* resistance. These plants were infected only with one *Agrobacterium* strain due to propagation problems caused by their abnormal growth. Of the new cultivars bred at our Department 'Korai bíbor' and 'Orpheus' showed resistance to *A. tumefaciens* C58; 'Odysseus' and 'Pannon frankos' to *A. tumefaciens* C58, *A. vitis* AT1 and S4; while 'Taurus' was resistant to all of the five tested *Agrobacterium* strains.

## 10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek Dr. Pedryc Andrzejnek és Dr. Oláh Róbertnek, valamint Dr. Szegedi Ernőnek munkám során nyújtott értékes tanácsaiért.

Köszönöm Hermán Rita, Tóth Vera, Gyurcsáné Millei Ágnes és Bacskainé Papp Anna segítőkészségét, kedvességét.

Köszönettel tartozom a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központ, Növénybiológiai Intézet, a Budapesti Corvinus Egyetem Szőlészeti és Borászati Kutató Intézet (Kecskemét) és a Pécsi Tudomány Egyetem Természettudományi Kar, Biológiai Intézet, Genetika és Molekuláris Biológiai Tanszék munkatársainak önzetlen segítségükért.

Ezúton szeretném megköszönni a Tanszék valamennyi munkatársának segítségét.

Munkánkat a TÁMOP 4. 2. 1./B-09/01/KMR/2010-0005 és az NKTH-OTKA K68053 pályázat támogatta.



## 11. IRODALOMJEGYZÉK

1. Agüero, C. B., Meredith, C. P. and Dandekar, A. M. 2006. Genetic transformation of *Vitis vinifera* L. cvs Thomson Seedless and Chardonnay with the pear PGIP and GFP encoding genes. *Vitis* 45: 1-8.
2. Amar, B. A., Cobanov, P., Boonrod, K., Krczal, G., Bouzid, S., Ghorbel, A. and Reustle, G. M. 2007. Efficient procedure for grapevine embryogenic suspension establishment and plant regeneration: role of conditioned medium for cell proliferation. *Plant Cell Rep.* 26:1439-1447.
3. Ammirato, P. V. 1983. Embriogenesis. In: Evans, D. A., Sharp, W. R., Ammirato, P. V., Yamada, Y. (eds.) 1983. *Handbook of Plant Cell Culture*. 1: 82-123. Mc Millen Publishing Company, New York – London.
4. Apel, K. and Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 373-399.
5. Babbs, C. E., Pham, J. A. and Coolbaugh, R. C. 1989. Lethal hydroxyl radical production in paraquat treated plants. *Plant Physiol.* 90: 1267-1270.
6. Baker, C. J. and Orlandi, E. W. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Ann. Rev. Phytopathol.* 33: 299-321.
7. Balla, Gy., Jacob, H. S., Balla, J., Rosenberg, M., Narth, K. and Apple, F. 1992. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J. Biol. Chem.* 267: 18148-18153.
8. Bartels, D. and Sunkar, R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21: 1-36.
9. Baulcombe, D. C., Saunders, G. R., Bevan, M. W., Mayo, M. A. and Harrison, B. D. 1986. Expression of biologically-active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. *Nature* 321: 446-449.
10. Baulcombe, D. 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 2005: 356-363.
11. Berres, R., Otten, L., Tinland, B., Malgarini-Clog, E. and Walter, B. 1992. Transformation of *Vitis* tissue by different strain of *Agrobacterium tumefaciens* containing the T-6b gene. *Plant Cell Rep.* 11:192-195.
12. Beyer, Y., Imaly, J. and Fridovich, I. 1991. Superoxide dismutases. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 40: 221-253.
13. Bhatnagar-Mathur, P., Vadez, V. and Sharma, K. K. 2008. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant Cell Rep.* 27: 411-424.
14. Bingham, D., Heszky, L., Gyulai, G., Kiss, E. and Csillag, A. 1989. Plant regeneration from callus of *Puccinellia clistans* (L.). *Parl. PCTOC* 18: 195-200.
15. Bolhár-Nordenkamp, H. R. and Lechner, E. 1988. Winter stress and chlorophyll fluorescence in norway spruce (*Picea abies*, L., Karst.). In: Lichtenthaler, H. K. (ed.) 1988. *Applications of Chlorophyll Fluorescence*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 173-180.

16. Bonner, D. M., Haagen-Smit, A. J. and Went, F. W. 1939. Leaf growth hormones. I. A bioassay and source for leaf growth factors. Bot. Gaz. 101: 128-144. In: Dudits, D. and Heszky, L. (eds.) 1990. Növénybiotechnológia. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.
17. Bornhoff, B. A. and Harst, M. 2000. Establishment of embryo suspension cultures of grapevines (*Vitis* L.). Vitis 39: 27-29.
18. Bornhoff, B. A., Harst, M., Zyprian, E. and Töpfer, R. 2005. Transgenic plants of *Vitis vinifera* cv Seyval blanc. Plant Cell Rep. 24: 433-438.
19. Bouamama, B., Jardak, R., Salem, A. B., Ghorbel, A. and Mliki, A. 2009. Preservation of endangered Tunisian grapevine using embryogenic cultures. Electr. J. Biotechnol. ISSN: 0717-3458. 12: 6-7.
20. Brencic, A., Angert, E. R. and Winans, S. C. 2005. Unwounded plants elicit *Agrobacterium vir* gene induction and T-DNA transfer: transformed plant cells produce opines yet are tumour free. Mol. Microbiol. 57: 1522-1531.
21. Brisson, N., Paszkowski, J., Penswick, J. R., Gronenborn, B., Potrykus, J. and Hohn, T. 1984. Expression of a bacterial gene in plants by using viral vector. Nature 310: 511-514.
22. Burgyán, J. 2006. Virus Induced RNA silencing and suppression: Defence and Counter defence. J. Plant Pathol. 88: 233-244.
23. Burr, T. J., Bazzi, C., Süle, S. and Otten, L. 1998. Crown gall of grape: Biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. Plant Dis. 82: 1288-1297.
24. Cario, G., Tacchini, L., Pogliaghi, G., Anzon, E., Tornasi, A. and Bernelli-Zazzera, A. 1995. Induction of ferritin synthesis by oxidative stress. Transcriptional and post-translational regulation by expansion of the free iron pool. J. Biol. Chem. 270: 700-703.
25. Cersosimo, A., Crespan, M., Paludetti, G. and Altamura, M. 1990. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration from anther culture in *Vitis*. Acta Hort. 280: 307-314.
26. Cheé, R. and Pool, R. M. 1987. Improved inorganic media constituents for *in vitro* shoot multiplication of *Vitis*. Sci. Hortic. 32: 85-89.
27. Chia, L. S., Mayfield, C. I. and Thompson, J. E. 1984. Simulated acid rain induces lipid peroxidation and membrane damage in foliage. Plant Cell Environ. 7: 333-338.
28. Christie, P. J. 1997. *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in Eubacteria. J. Bacteriol. 179: 3085-3094.
29. Colova-Tsolova, V., Perl, A., Krastanova, S., Tsetkov, I. and Atanasov, A. 2001. Genetically engineered grape for disease and stress tolerance. In: Roubelakis-Angelakis, K. A. (ed.) 2001. Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine. pp. 411-432. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht-Boston-London.
30. Coutos-Thevenot, P., Goebel-Tourand, I., Mauro, M. C., Jouanneau, J. P., Boulay, M., Deloire, A. and Guern, J. 1992. Somatic embryogenesis from grapevine cells I-Improvement of embryo development by changes in culture conditions. PCTOC 29: 25-133.

31. Coutos-Thévenot, P., Poinssot, B., Bonomelli, A., Yean, H., Breda, C., Buffard, D., Esnault, R., Hain, R., and Boulay, M. 2001. *In vitro* tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *VstI* gene under the control of a pathogeninducible PR10 promoter. J. Exp. Bot. 52: 901-910.
32. Crossway, A., Dakes, J. V., Irvine, J. M., Ward, B., Knauf, V. C., and Schewmaker, C. K. 1986. Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. Mol. Gen. Genet. 202: 179-185.
33. Cutanda, M. C., Bouquet, A., Chatelet, P., Lopez, G., Botella, O., Montero, F. J. and Torregosa, L. 2008. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Vitis vinifera* cultivars 'Macabeo' and 'Tempranillo'. Vitis 47: 159-162.
34. Davey, M. R., Cocking, E. C., Freeman, J., Pearce, N., and Tudor, J. 1980. Transformation of *Petunia* protoplasts by isolated *Agrobacterium* plasmids. Plant Sci. Lett. 18: 307-313.
35. Deák, M., Horváth, V. G., Davletova, S., Török, K., Sass, L., Vass, I., Barna, B., Király, Z. and Dudits, D. 1998. Plants ectopically expressing the iron-binding protein, ferritin are tolerant to oxidative damage and pathogens. Nat. Biotechnol. 17: 192-196.
36. DeBlock, M., Herrera-Estrella, L., Van Montagu, M., Schell, J. and Zambrisky, P. 1984. Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny. EMBO J. 3: 1681-1689.
37. Deng, W., Chen, L., Peng, W.-T., Liang, X., Sekiguchi, S., Gordon, M. P., Comai, L. & Nester, E. W. (1999): VirE1 is a specific molecular chaperone for the exported single-stranded DNA-binding protein VirE2 in *Agrobacterium*. Mol. Microbiol. 31: 1795-1807.
38. Dudits, D. and Heszky, L. 1990. Növénybiotechnológia. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. pp. 24-52., 168-201.
39. Ebert, A. and Taylor, H. F. 1990. Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. PCTOC 20: 165-172.
40. Elstner, E. F. 1982. Oxygen activation and oxygen toxicity. Ann. Rev. Plant Physiol. 33: 73-96.
41. Elstner, E. F. and Osswald, W. 1994. Mechanism of oxygen activation during plant stress pp. 131-154. In: Crawford, R. M. M., Hendry, G. A. F. and Goodman, B. A. (eds.) 1994. Oxygen and environmental stress in plants. The Royal Society of Edinburgh, Edinburgh, Scotland.
42. Escobar, M. A., Civerolo, E. L., Summerfelt, K. R. and Dandekar, A. M. 2001. RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. 98: 13437-13442.
43. Escobar, M. A., Leslie, C. A., McGranahan, G. H. and Dandekar, A. M. 2002. Silencing crown gall disease in walnut (*Juglans regia* L.). Plant Sci. 163: 591-597.
44. FAO statistics: [http:// faostat.fao.org](http://faostat.fao.org). 2011.05.14.
45. Flich, C. E., Evans, D. A. and Sharp, W. E. 1983. Organogenesis. In: Evans, D. A., Sharp, W. R., Ammirato, P. W., Yamada, Y. (eds.) 1983. Handbook of Plant Cell Culture 1: 13-81.

46. Folk, G. és Glits, M. 1993. Kertészeti növénykórtan. Mezőgazda kiadó, Budapest. pp. 264-265.
47. Forgács, I., Zok, A., Novák, E., Pedryc, A. and Oláh, R. 2011. Establishment of grapevine embryogenic suspension culture and induced somatic embryogenesis. 7th international IVCHB symposium. Ghent, Belgium. 133.
48. Foyer, C. H., Descourvières, P., and Kunert, K. J. 1994. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.* 17: 507-523.
49. Fromm, F., Taylor, L., and Walbot, V. 1986. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature* 319: 791-793.
50. Galambos, A. 2007. *Agrobacterium vitis* rezisztencia kialakítása az *iaaM* szekvencia segítségével. PTE TTK Biológiai Intézet, Genetika és Molekuláris Biológiai Tanszék, Diplomamunka. pp. 7-26.
51. Gambino, G., Ruffa, P., Vallania, R. and Gribaudo, I. 2007. Somatic embryogenesis from whole flowers, anthers and ovaries of grapevine (*Vitis* spp.). *PCTOC* 90: 79-83.
52. Gangopadhyay, G., Das, S., Mitra, S. K., Poddar, R., Modak, B. K. and Mukherjee, K. K. 2002. Enhanced rate of multiplication and rooting through the use of coir in aseptic liquid culture media. *PCTOC* 68: 301-310.
53. Gasser, C. S., and Fraley, R. T. 1989. Genetically engineering plants for crop improvement. *Science* 244: 1293-1299.
54. Gebhardt, K. and Friedrich, M. 1987. Micropropagation of *Calluna vulgaris* cv. 'H.E. Beale'. *PCTOC* 9: 137-145.
55. Gheysen, G., van Montagu, M. and Zambrysky, P. 1987. Integration of *Agrobacterium tumefaciens* DNA (T-DNA) involves rearrangements of target plant DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6169-6173.
56. Göller, R., da Camara Machado, A., Minafra, A., Savino, V., Saldarelli, G., Martelli, G. P., Pühringer, H., Katinger, H. and Laimer da Camara Machado, M. 1998. Transgenic grapevines expressing coat protein gene sequences of grapevine fanleaf virus, arabis mosaic virus, grapevine virus A and grapevine virus B. *Symp. Int. Sur La Genetique Et L'Amelioration De La Vigne. Montpellier. C3.5.*
57. Gray, D. J. and Purohit, A. 1991a. Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. *Crit. Rev. Plant Sci.* 10: 33-61.
58. Gray, D. J. and Purohit, A. 1991b. Quiescence and dormancy in somatic embryos. In: Bajaj Y. P. S. (ed.) 1992. *Biotechnology in agriculture and forestry.* 17: 382-394. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
59. Gregory, W. C. 1940. Experimental studies on the cultivation of excised anthers in nutrient solution. *Am. J. Bot.* 27: 687-692. In: Dudits, D. and Heszky, L. (eds.) 1990. *Növénybiotechnológia. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.*
60. Gribaudo, I., Restagno, M. and Novello, V. 2003. Vented vessels affect growth rate of in vitro *Vitis vinifera* cv. Nebbiolo. *Acta Hort.* 616: 129-133.
61. Gribaudo, I., Gambino, G. and Vallania, R. 2004. Somatic embryogenesis from grapevine anthers: the optimal developmental stage for collecting explants. *Am. J. Enol. Vitic.* 55(4): 427-430.

62. Grimsley, N., Hohn, T., Davis, J. W. and Hohn, B. 1987. *Agrobacterium*-mediated delivery of infectious maize streak virus into maize plants. *Nature* 325: 177-179.
63. Guellec, V., David, C., Branchard, M. and Tempé, J. 1990. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *PCTOC* 20: 211-215.
64. Haberland, G. 1902. Kulturversuche mit isolierten Pflanzzellen. Sitzwurgsber. Akad. Wiss. Wien, Math-Naturwiss. Ki. 111: 69-92. In: Dudits, D. and Heszky, L. (eds.) 1990. Növénybiotechnológia. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.
65. Hajdukiewicz, P., Svab, Z. and Maliga, P. 1994. The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 25: 989-994.
66. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* 246: 501-514.
67. Hammond-Kosack, K. E. and Jones, J. D. G. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773-1791.
68. Hannig, E. 1904. Zur Physiologie pflanzlicher Embryonen. I. Über die Kultur von Cruciferen-Embryonen außerhalb des Embryosacks. *Bot. Z.* 62: 45-80. In: Dudits, D. and Heszky, L. (eds.) 1990. Növénybiotechnológia. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.
69. Harst, M. 1995. Development of a regeneration protocol for high frequency somatic embryogenesis from explants of grapevines. *Vitis* 34 (1): 27-29.
70. Harst, M., Bornhoff, B-A., Zyprian, E. and Töpfer, R. 1998. Regeneration and transformation of different explants of *Vitis vinifera* spp. *Symp. Int. Sur La Genetique Et L'Amelioration De La Vigne*. Montpellier. C3.2.
71. Harst-Langenbucher, M. and Alleweldt, G. 1993. The effect of different pretreatments on induction of somatic embryogenesis on anthers of grapevine cultivar Riesling. *Vitis* 32: 1-7.
72. Hébert-Soulé, D., Kikkert, J. K., Smith, F. D., and Reisch, B. I. 1995. Phosphinothricin stimulates somatic embryogenesis in grape (*Vitis sp.* L.). *Plant Cell Rep.* 14: 380-384.
73. Hegedűs, A., Janda, T., Horváth, V. G. and Dudits, D. 2008. Accumulation of overproduced ferritin in the chloroplast provides protection against photoinhibition induced by low temperature in tobacco plants. *J. Plant Physiol.* 165: 1647-1651.
74. Henle, E. S. and Linn, S. 1997. Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 272: 19095-19098.
75. Hideg, É., Oberschall, A., Horváth, V. G., Vass, I. and Dudits, D. 2000. Enhanced oxidative stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant Physiology and Biochemistry*, Vol. 38. – Supplément: s234., 12<sup>th</sup> Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology, 2000. August 21-25.
76. Hodges, L. D., Cuperus, J. and Ream, W. 2004. *Agrobacterium rhizogenes* GALLS Protein Substitutes for *Agrobacterium tumefaciens* Single-Stranded DNA-Binding Protein VirE2. *J. Bacteriol.* 186: 3065-3077.
77. Hoekema, A., Hirsh, P. R., Hooykaas, P. J. J. and Schilperoort, R. A. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-regions of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Nature* 303: 179-181.

78. Hoffmann, B., Trinh, T. H., Leung, J., Kondorosi A. and Kondorosi E. 1997. A new *Medicago truncatula* line with superior *in vitro* regeneration, transformation and symbiotic properties isolated through cell culture selection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 307-315.
79. Hood, E. E., Gelvin, S. B., Melchers, L. S., and Hoekema, A. 1993. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgen. Res.* 2: 208-218.
80. Hooykaas, P. J. J. and Beijersbergen, A. G. M. 1994. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32: 157-179.
81. Humann, J., Andrews, S. and Ream, W. 2006. VirE1-mediated resistance to crown gall in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology* 96: 105-110.
82. Inzé, D., Follin, A., Van Lijsebettens, M., Simoens, C., Genetello, C., Van Montagu, M., and Schell, J. 1984. Genetic analysis of the individual T-DNA genes of *Agrobacterium tumefaciens*; further evidence that two genes are involved in indole-3-acetic acid synthesis. *Mol. Gen. Genet.* 194: 265-274.
83. Iocco, P., Franks, T. and Thomas, M. R. 2001. Genetic transformation of major wine grape cultivars of *Vitis vinifera* L. *Transgenic Res.* 10: 105-112.
84. Jay-Allemand, C., Capelli, P. and Cornu, D. 1992. Root development of *in vitro* hybrid walnut microcuttings in a vermiculite-containing gelrite medium. *Sci. Hort.* 51: 335-342.
85. Jayasankar, S., Gray, D. J. and Litz, R. E. 1999. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration using suspension culture in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Rep.* 18: 533-537.
86. Jayasankar, S., Bondada, B. R., Li, Z. and Gray, D. J. 2003. Comparative anatomy and morphology of *Vitis vinifera* (Vitaceae) somatic embryos from solid- and liquid-culture-derived proembryogenic masses. *Am. J. Bot.* 90 (7): 973-979.
87. Jenes, B. 1999. Közvetlen DNS bevétel növényekbe, egyszikűek transzformációja. In: Balázs, E., Dudits, D. (szerk.) *Molekuláris növénybiológia szemelvények*. Akadémiai Kiadó, Budapest. pp. 627-664.
88. Kado, C. I. 1994. Promiscuous DNA transfer system of *Agrobacterium tumefaciens*: role of the virB operon in sex pilus assembly and synthesis. *Mol. Microbiol.* 12: 17-22.
89. Kampfenkel, K. M., van Montagu, M. and Inzé, D. 1995. Effect of iron excess on *Nicotiana plumbaginifolia* plants. Implications to oxidative stress. *Plant Physiol.* 107: 725-735.
90. Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shonoaki, K. and Shinozaki, K. 1999. Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress inducible transcription factor. *Nat. Biotechnol.* 17: 287-291.
91. Kikkert, J. R., Reustle, G. M., Ali, G. S., Wallace, P. W. and Reisch B. I. 1998. Expression of a fungal chitinase in *Vitis vinifera* L. 'Merlot' and 'Chardonnay' plants produced by biolistic transformation. *Symp. Int. Sur La Genetique Et L'Amelioration De La Vigne*. Montpellier. C3.4.
92. Kikkert, J. R., Striem, M. J., Vidal, J. R., Wallace, P. G., Barnard, J. and Reisch, B. I. 2005. Long-term study of somatic embryogenesis from anthers and ovaries of twelve grapevine (*Vitis sp.*) genotypes. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 41: 232-239.

93. Király, Z., El-Zahaby, H., Gala, A., Abdou, S., Ádám, A. and Barna, B. 1993. Effect of oxygen free radicals on plant pathogenic bacteria and fungi and on some plant diseases, pp. 9-19. In: Mózsik, Gy., Ernerit, I., Fehér, J., Matkovics, B. and Vincze, Á. (eds.) 1993. Oxygen free radicals and scavengers in the natural sciences, Akadémiai Kiadó, Budapest.
94. Koncz, C. and Schell, J. 1986. The promoter of T<sub>L</sub>-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* 204: 383-396.
95. Kotte, W. 1922. Kultursuche mit isolierten Wurzelspitzen. *Beitr. Allgem. Bot.* 2: 413-434. In: Dudits, D. and Heszky, L. (eds.) 1990. Növénybiotechnológia. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.
96. Krastanova, S., Perrin, M., Barbier, P., Demangeat, G., Cornuet, P., Bardonnet, M., Otten, L., Pinck, L. and Walter, B. 1995. Transformation of grapevine rootstocks with the coat protein gene of grapevine fanleaf nepovirus. *Plant Cell Rep.* 14: 550-554.
97. Krens, F. A., Molendijk, L., Wullems, G. J. and Schilperoort, R. A. 1982. *In vitro* transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. *Nature* 296: 72-74.
98. Laibach, F. 1925. Das Taubwerden von Bestandsamen und die künstliche Aufzucht früh absterbender Bastardembryonen. *Z. Bot.* 17: 417-459. In: Dudits, D. and Heszky, L. (eds.) 1990. Növénybiotechnológia. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.
99. Lamb, C. and Dixon, R. A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 251-275.
100. Lee, H., Humann, J. L., Pitrak, J. S., Cuperus, J. T., Parks, T. D., Whistler, C. A., Mok, M. C. and Ream, L. W. 2003. Translation start sequences affect the efficiency of silencing of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA oncogenes. *Plant Physiol.* 133: 966-977.
101. Lee, Y-W., Jin, S., Sim, W-S. and Nester, E. W. 1996. The sensing of plant signal molecules by *Agrobacterium*: genetic evidence for direct recognition of phenolic inducers by the VirA protein. *Gene* 179: 83-88.
102. LeGall, O., Torregrosa, L., Danglot, Y., Candresse, T. and Bouquet, A. 1994. *Agrobacterium* mediated genetic transformation of somatic embryos and regeneration of transgenic plants expressing the coat protein of grapevine chrome mosaic nepovirus (GCMV). *Plant Sci.* 102: 161-170.
103. Legrand, V., Dalmayrac, S., Latché, A., Pech, J-C., Bouzayen, M., Fallot, J., Torregrosa, L., Bouquet, A. and Roustan, J-P. 2003. Constitutive expression of *Vr-ERE* gene in transformed grapevines confers enhanced resistance to eutypine, a toxin from *Eutypa lata*. *Plant Sci.* 164: 809-814.
104. Lessl, M. and Lanka, E. 1994. Common mechanism in bacterial conjugation and Ti mediated T-DNA transfer to plant cells. *Cell* 77: 321-324.
105. Li, Z., Jayasankar, S. and Gray, D. J. 2001. Expression of a bifunctional green fluorescent protein (GFP) fusion marker under the control of three constitutive promoters and enhanced derivatives in transgenic grape (*Vitis vinifera*). *Plant Sci.* 160: 877-887.

106. Lichtenstein, C. and Draper, J. 1986. Genetic engineering of plants. pp. 67-119. In: Glover, D. M. (ed.) 1995. DNA Cloning: A Practical Approach. Vol. II. IRL Press, Oxford.
107. Linsmaier, E. M. and Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18: 100-127.
108. Liu, P. and Nester, E. W. 2006. Indoleacetic acid, a product of transferred DNA, inhibits vir gene expression and growth of *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 4658-4662.
109. Lobréaux, S. and Briat, J-F. 1991. Ferritin accumulation and degradation in different organs of pea (*Pisum sativum*) during development. *Biochem. J.* 274: 601-606.
110. Lobréaux, S., Hardy, T. and Briat, J-F. 1993. Absciscic acid is involved in the iron-induced synthesis of maize ferritin. *EMBO J.* 12: 651-657.
111. López-Pérez, A. J., Carreno, J., Martínez-Cutillas, A. and Dabauza, M. 2005. High embryogenic ability and plant regeneration of table grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) induced by activated charcoal. *Vitis* 44: 79-85.
112. Low, P. and Merida, J. 1996. The oxidative burst in plant defence: function and signal transduction. *Physiol. Plant.* 96: 533-542.
113. Mailliot, P., Kieffer, F. and Walter, B. 2006. Somatic embryogenesis from stem nodal sections of grapevine. *Vitis* 45: 185-189.
114. Mallyard, M. 1921. Sur le développement des plantules fragmentées. *C. R. Soc. Biol., Paris.* 84: 770-772. In: Dudits, D. and Heszky, L. (eds.) 1990. *Növénybiotechnológia. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.*
115. Maróti, M. 1972. *Növényi szövettenyésztés.* Tank. Kiadó, Bp. In: Dudits, D. and Heszky, L. (eds.) 1990. *Növénybiotechnológia. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.*
116. Martinelli, L. and Mandolino, G. 1994. Genetic transformation and regeneration of transgenic plants in grapevine (*Vitis rupestris* S.). *Theor. Appl. Genet.* 88: 621-628.
117. Martinelli, L. and Gribaudo, I. 2001a. Somatic embryogenesis in grapevine. In: Roubelakis-Angelakis, K. A. (ed.) 2001. *Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine*, 327-352. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht-Boston-London.
118. Martinelli, L. and Mandolino, G. 2001b. Transgenic grapes (*Vitis* species). In: Bajaj, Y. P. S. (ed.) 2004. *Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 47, Transgenic Crops II*, 325-338. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
119. Mauro, M. C., Nef, C. and Fallot, J. 1986. Stimulation of somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* cv. 'Cabernet Sauvignon'. *Plant Cell Rep.* 5: 377-380.
120. Mauro, M. C., Toutain, S., Walter, B., Pinck, L., Otten, L., Coutos-Thevenot, P., Deloire, A. and Barbier, P. 1995. High efficiency regeneration of grapevine plants transformed with the GFLV coat protein gene. *Plant Sci.* 112: 97-106.
121. Mauro, M. C., Walter, B., Pinck, L., Valat, L., Barbier, P., Boulay, M. and Coutos-Thevenot, P. 1998. Analysis of 41B grapevine rootstocks for grapevine fanleaf virus resistance. *Symp. Int. Sur La Genetique Et L'Amelioration De La Vigne.* Montpellier. C3.6.



122. McBride, K. E., Sváb, Z., Schaaf, D. J., Hogan, P. S., Stalker, D. M. and Maliga, P. 1995. Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *BioTechnology* 13: 362-365.
123. McCown, B. H. 1988. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: Davis, T. D., Haissig, B. E. and Sankhla, N. (eds.) *Adventitious root formation in cuttings*. pp. 389-302.
124. Miranda, A., Janssen, G., Hodges, L., Peralta, E. G. and Ream, W. 1992. *Agrobacterium tumefaciens* transfers extremely long T-DNAs by a unidirectional mechanism. *J. Bacteriol.* 174: 2288-2297.
125. Motoike, S. Y., Skirvin, R. M., Norton, M. A. and Otterbacher, A. G. 2001. Somatic embryogenesis and long term maintenance of embryogenic lines from fox grapes. *PCTOC* 66: 121-131.
126. Mozsár, J. and Süle, S. 1994. Rapid method for induction of somatic embryogenesis from *Vitis riparia*. *Vitis* 33: 245-246.
127. Mozsár, J., Viczián, O., Süle, S. 1998. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of an interspecific grapevine. *Vitis* 37: 127-130.
128. Mullins, M. G. and Srinivasan, C. 1976. Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of the grapevine (cultivar 'Cabernet sauvignon') by apomixis *in vitro*. *J. Exp. Bot.* 27: 1022-1030.
129. Mullins, M. G., Archie Tang, F. C. and Facciotti, D. 1990. *Agrobacterium* mediated genetic transformation of grapevines: transgenic plants of *Vitis rupestris* Scheele and buds of *Vitis vinifera* L. *BioTechnology* 8: 1041-1045.
130. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 155: 473-497.
131. Murgia, I. Briat, J-F., Tarantino, D. and Soave, C. 2001. Plant ferritin accumulates in response to photoinhibition but its ectopic overexpression does not protect against photoinhibition. *Plant Physiol. Biochem.* 39:797-805.
132. Murthy, B. N. S., Murch, S. J. and Saxena, P. K. 1998. Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 34: 267-275.
133. Nakano, M., Sakikabara, T., Watanabe, Y. and Mu, M. 1997. Establishment of embryogenic cultures in several cultivars of *Vitis vinifera* and *Vitis x labruscana*. *Vitis* 36: 141-145.
134. Nam, J., Mysore, K. S., Zheng, C., Knue, M., Matthyse, A. G. and Gelvin, S. B. 1999. Identification of T-DNA tagged *Arabidopsis* mutants that are resistant to transformation by *Agrobacterium*. *Mol. Gen. Genet.* 261: 429-438.
135. Neumann, F., Schaefer-Ridder, M., Wang, J. and Hofschneider, P. H. 1982. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1: 841-845.
136. Nitsch, J. P. and Nitsch, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 169: 85-87.
137. Nowak, J. and Shulaev, V. 2003. Priming for transplant stress resistance in *in vitro* propagation. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 39: 107-124.

138. Oberschall, A., Deák, M., Török, K., Sass, L., Vass, I., Kovács, I., Fehér, A., Dudits, D. and Horváth, V. G. 2000. A novel aldose/aldehyde reductase protects transgenic plants against lipid peroxidation under chemical and drought stresses. *Plant J.* 24: 437-446.
139. Oláh, R., Szegedi, E., Ruthner, S. and Korbuly, J. 2003a. Thidiazuron-induced regeneration and genetic transformation of grapevine rootstock varieties. *Vitis* 42: 133-136.
140. Oláh, R., Szegedi, E., Ruthner, S. and Korbuly, J. 2003b. Optimization of conditions for regeneration and genetic transformation of rootstock- and scion grape varieties. *Acta Hort.* 603: 491-497.
141. Oláh, R. 2005. A szőlő genetikai transzformációjának módszertani lehetőségei. BCE Kertészettudományi Kar, Genetika és Növénytermesztés Tanszék, Doktori (PhD) értekezés. pp. 54-78.
142. Oláh, R., Zok, A., Pedryc, A., Howard, S. and Kovács, L. G. 2008. Somatic embryogenesis in a broad spectrum of grape genotypes. *Sci. Hort.* 120: 134-137.
143. Ouf, M. F., Gazar, A. A., Shehata, Z. A., Abdou, El S., Király, Z. and Barna, B. 1993. The effect of superoxide anion on germination and infectivity of wheat stem rust (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *Tritici* Eriks. And Henn.) uredospores. *Cereal Res. Commun.* 21: 31-37.
144. Palauqui, J. C., Elmayan, T., Pollien, J. M. and Vaucheret, H. 1997. Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J.* 16: 4738-4745.
145. Peng, M. and Kuc, J. 1992. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity *in vitro* and on tobacco leaf disks. *Phytopathology* 82: 696-699.
146. Perl, A. and Eshdat, Y. 1998. DNA transfer and gene expression in transgenic grapes. In: Tombs, M. P. (ed.) 1998. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 15: 365-386. Intercept Ltd., Andover.
147. Perl, A., Lotan, O., Abu-Abied, M. and Holland, D. 1996. Establishment of an *Agrobacterium* mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.): the role of antioxidants during grape-*Agrobacterium* interactions. *Nature Biotechnol.* 14: 624-628.
148. Perrin, M., Martin, D., Joly, D., Demangeat, G., This, P. and Masson, J. E. 2001. Medium-dependent response of grapevine somatic embryogenic cells. *Plant Sci.* 161: 107-116.
149. Perrin, M., Gertz, C. and Masson E. J. 2004. High efficiency initiation of regenerable embryogenic callus from anther filaments of 19 grapevine genotypes grown worldwide. *Plant Sci.* 167: 1343-1349.
150. Pino-Sintra, A. 2007. Establishment of embryogenic cultures and plant regeneration in the Portuguese cultivar 'Touriga Nacional' of *Vitis vinifera* L. *PCTOC* 88: 253-265.
151. Prince, A. H., Atherton, N. M. and Headry, G. A. F. 1989. Plant under droughtstress generate activated oxygen. *Free Rad. Res. Commun.* 8: 61-66.
152. Qiagen, G. 2000. Dneasy Plant Mini Kit and Dneasy Plant Maxi Kit Handbook. pp. 15-17.

153. Rajasekaran, K. and Mullins, M. G. 1981. Organogenesis in internode explants of grapevine. *Vitis* 20: 218-227.
154. Rajasekaran, K., Vine, J. and Mullins, M. G. 1982. Dormancy in somatic embryos and seeds of *Vitis*: changes in endogenous abscisic acid during embryogeny and germination. *Planta* 154: 139-144.
155. Ream, L. W., Gordon, M. P. and Nester, E. W. 1983. Multiple mutations in the T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 1660-1664.
156. Reustle, G., Harst, M. and Alleweldt, G. 1995. Plant regeneration of grapevine (*Vitis sp.*) protoplasts isolated from embryogenic tissue. *Plant Cell Rep.* 15: 238-241.
157. Riggs, C. D. and Bates, G. W. 1986. Stable transformation of tobacco by electroporation: evidence for plasmid concatenation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 5602-5606.
158. Roberts, A. V., Smith, E. F. and Mottley, J. 1990. The preparation of micropropagated plantlets for transfer to soil without acclimatization. In: Pollard, J. W. and Walker, J. M. (eds.) 1990. *Methods in Molecular Biology. Plant Cell and Tissue Culture* 6: 314–322. The Humana Press.
159. Roberts, A. V., Smith, E. F., Horan, I., Walker, S., Matthews, D. and Mottely, J. 1994. Stage III techniques for improving water relations and autotrophy in micropropagated plants. In: Lumsden, P. J., Nicholas, J. R. and Davies, W. J. (eds.) 1994. *Physiology, Growth and Development Plants in Culture*, pp. 314–322. Kluwer Academic Publishers.
160. Roche, T. D., Long, R. D., Sayegh, A. J. and Hennerty, M. J. 1996. Commercial scale photo-autotrophic micropropagation applications in Irish agriculture, horticulture and forestry. *Acta Hort.* 440: 515– 520.
161. Romero, C., Belles, J. M., Vaya, J. L., Serrano, R. and Culianez, F. A. 1997. Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta* 201: 293-297.
162. Rossi, L., Hohn, B. and Tinland, B. 1996. Integration of complete transferred DNA units is dependent on the activity of virulence E2 protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 126-130.
163. Rugini, E. and Verma, D. C. 1982. Micropropagation of difficult to propagate almond (*Prunus amygalus* Batsch) cultivar. *Plant Sci. Lett.* 28: 273–281.
164. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1982. Gel Electrophoresis of DNA In: *Molecular cloning – a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press 6.1-6.62.
165. Sawada, H., Ieki, H. and Matsuda, I. 1995. PCR detection of Ti and Ri plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 828-831.
166. Scandalios, J. G. 1990. Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Adv. Genet.* 28: 1-41.
167. Schreiber, U., Schliwa, U. and Bilger, W. 1986. Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.* 10: 51-62.

168. Scorza, R., Cordts, J. M., Ramming, D. W. and Emershad, R. L. 1995. Transformation of grape (*Vitis vinifera* L.) zygotic-derived somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 14: 589-592.
169. Scorza, R., Cordts, J. M., Gray, D. J., Gonsalves, D., Emershad, R. L. and Ramming, D. W. 1996. Producing transgenic 'Thompson Seedless' grape (*Vitis vinifera* L.) plants. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 121: 616-619.
170. Sefc, K. M., Ruckebauer, P. and Regner, F. 1997. Embryogenesis in microspore culture of *Vitis* subspecies. *Vitis* 36: 15-20.
171. Sheng, J. and Citovsky, V. 1996. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. *The Plant Cell* 8: 1699-1710.
172. Srivastava, S., Chandra, A., Bhatnagar, A., Shrivastava, S. K. and Ansari, N. H. 1995. Lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal and its conjugate with GSH are excellent substrates of bovine lens aldose reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217: 741-746.
173. Stamp, J. A. and Meredith, C.P. 1988. Somatic embryogenesis from leaves and anthers of grapevine. *Sci. Hortic.* 35: 235-250.
174. Sundberg, C. D. and Ream, W. 1999. *Agrobacterium tumefaciens* chaperone-like protein, VirE1, interacts with VirE2 at domains required for single-stranded DNA binding and cooperative interaction. *J. Bacteriol.* 181: 6850-6855.
175. Sutherland, M. W. 1991. The generation of oxygen free radical during host plant response to infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39: 79-93.
176. Szegedi, E. 1981. Szőlőfajták *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn-el szembeni fogékonysága. *Növényvédelem* 17: 442-450.
177. Szegedi, E. and Kozma, P. 1984. Studies on the inheritance of resistance to crown gall disease of grapevine. *Vitis* 23: 121-126.
178. Szegedi, E., Váradi, G. and Otten, L. 1997. Purification of plasmid DNA by an improved electrophoretic protocol. *Biotechnol. Techn.* 11: 777-779.
179. Szegedi, E., Oberschall, A., Bottka, S., Oláh, R. and Tinland, B. 2001. Transformation of tobacco plants with *VirE1* gene derived from *Agrobacterium tumefaciens* pTiA6 and its effect on crown gall tumor formation. *Int. J. Hort. Sci.* 7: 54-57.
180. Taylor, J. H. 1950. The duration of differentiation in excised anthers. *A. J. Bot.* 37: 137-143. In: Dudits, D. and Heszy, L. (eds.) 1990. *Növénybiotechnológia. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.*
181. Tesniere, C., Torregrosa, L., Pradal, M., Souquet, J., Gilles, C., Santos, J. D., Chatelet, P. and Gunata, Z. 2006. Effects of genetic manipulation of alcohol dehydrogenase levels on the response to stress and the synthesis of secondary metabolites in grapevine leaves. *J. Exp. Bot.* 57: 91-99.
182. Theil, E. C. 1987. Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants and microorganisms. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 289-315.
183. Tinland, B., Schoumacher, F., Gloeckler, V., Bravo-Angel, A. M. and Hohn, B. 1995. The *Agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protein is responsible for precise integration of T-DNA into the plant genome. *EMBO J.* 14: 3585-3595.

184. Torregrosa, L. 1998. A simple and efficient method to obtain stable embryogenic cultures from anthers of *Vitis vinifera* L. *Vitis* 37: 91-92.
185. Torregrosa, L., Bouquet, A. and Goussard, P. G. 2001. *In vitro* culture and propagation of grapevine. In: Roubelakis-Angelakis, K. A. (ed.) 2001. Molecular biology & biotechnology of the grapevine, pp. 281-326. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London.
186. Tsvetkov, I., Tsoleva, V. and Atanasov, A. 2000. Gene transfer for stress resistance in grapes. *Acta Hort.* 528 (I): 389-394.
187. Valerii, A. Z., Ilia, V. K. and Leonid, P. T. 2003. Effects of IAA and BA on development of globular, heart- and torpedo-stage embryos from cell suspensions of three grape genotypes. *Sci. Hort.* 104: 237-247.
188. Vasil, L. K. 1957. Effect of kinetin and giberellin acid on excised anthers of *Allium cepa*. *Phytomorphology*. 7: 138-149. In: Dudits, D. and Heszky, L. (eds.) 1990. *Növénybiotechnológia. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.*
189. Velich, I. (szerk.) 2001. *Növénygenetika*. pp. 384-406. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
190. Vidal, J. R., Kikkert, J. K., Wallace, P. G. and Reisch, B. 2003. High efficiency biolistic co-transformation and regeneration of 'Chardonnay' (*Vitis vinifera* L.) containing *npt-II* and antimicrobial peptide genes. *Plant Cell Rep.* 22: 252-260.
191. Vidal, J. R., Kikkert, J. R., Malnoy, M. A., Wallace, P. G., Barnard, J. and Reisch, B. I. 2006. Evaluation of transgenic 'Chardonnay' (*Vitis vinifera*) containing magainin genes for resistance to crown gall and powdery mildew. *Transgenic Res.* 15: 69-82.
192. Vidal, J. R., Rama, J., Taboada, L., Martin, C., Ibanez, M., Segura, A. and González-Benito, M. E. 2009. Improved somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera*) with focus on induction parameters and efficient plant regeneration. *PCTOC* 96: 85-94.
193. Vilaplana, M. and Mullins, M. G. 1989. Regeneration of Grapevines (*Vitis spp.*) *in vitro*: Formation of adventitious buds on hypocotils and cotyledons of somatic embryos. *J. Plant Physiol.* 134: 413-419.
194. Vile, G. F. and Tyrrell, R. M. 1993. Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin. *J. Biol. Chem.* 268: 14678-14681.
195. Viss, W. J., Pitrak, J., Humann, J., Cook, M., Driver, J. and Ream, W. 2003. Crown-gall-resistant transgenic apple trees that silence *Agrobacterium tumefaciens* oncogenes. *Mol. Breed.* 12: 283-295.
196. Vivier, M. A. and Pretorius, I. S. 2000. Genetic improvement of grapevine: Tailoring grape varieties for the third millennium – a review. *S. Afr. Enol. Vitic.* 21 (Spec. issue): 5-26.
197. Voinnet, O., Vain, P., Angell, S. and Baulcombe, D. C. 1998. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* 95: 177-187.
198. Waters, V. and Guiney, D. G. 1993. Processes at the nick region link conjugation, T-DNA transfer and rolling circle replication. *Mol. Microbiol.* 9: 1123-1130.
199. Weising, K., Schell, J. and Kahl, G. 1988. Foreign genes in plants: transfer, structure, expression and applications. *Annu. Rev. Genet.* 22: 421-477.

200. Weising, K. and Kahl, G. 1996. Natural genetic engineering of plant cells: the molecular biology of crown gall and hairy root disease. *World J. Microbiol. & Biotechnol.* 12: 327-351.
201. Winans, S. C. 1992. Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. *Microbiol. Rev.* 56: 12-31.
202. Xue, B., Ling, K. S., Reid, C. L., Krastanova, S., Sekiya, M., Momol, E. A., Süle, S., Mozsár, J., Gonsalves, D. and Burr, T. J. 1999. Transformation of five rootstocks with plant virus genes and *virE2* gene from *Agrobacterium tumefaciens*. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 35: 226-231.
203. Yang, X. M., Cao, Z. Y., An, L. Z., Wang, Y. M. and Fang, X. W. 2006. *In vitro* tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Euphytica* 152: 217-224.
204. Zaenen, J., van Larebeke, N., Tenchy, H., and Schell, J. 1974. Supercoiled circular DNA in crown gall inducing *Agrobacterium* strains. *J. Mol. Biol.* 86: 109-127.
205. Zok, A., Oláh, R., Hideg, É., Horváth, V. G., Kós, B. P., Majer, P., Váradi, G. and Szegedi E. 2009a. Effect of *Medicago sativa* ferritin gene on stress tolerance in transgenic grapevine. *PCTOC* 100: 339-344.
206. Zok, A., Kós, B. P., Hideg, É., Váradi, G., Báló, B., Szegedi, E., Horváth, V. G. and Oláh, R. 2009b. Towards the production of stress tolerant grapevine cultivars. *Acta Hort.* 839: 651-657.
207. Zupan, J. R. and Zambryski, P. 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol.* 107: 1041-1047.