

Transzgénikus búza (*Triticum aestivum* L.) előállítása Magyarországon

¹PAUK JÁNOS–²HÄNSCH ROBERT–²SCHWARZ GÜNTER–²NERLICH ANDREA–
^{4,1}MONOSTORI TAMÁS–^{4,1}MÉSZÁROS ATTILA–³JENES BARNABÁS–
¹KERTÉSZ ZOLTÁN–¹MATUZ JÁNOS–²SCHULZE JUTTA–²MENDEL R. RALF

¹Gabonatermesztési Kutató Közhasznú Társaság,
Szeged

²Botanisches Institut, Technische Universität,
Braunschweig

³Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont,
Gödöllő

⁴DATE MFK,

Hódmezővásárhely

Összefoglaló

Dolgozatunkban az első magyar *in vitro* módszerrel előállított herbicidrezisztens búza előállításáról számolunk be. A marker gént (*bar*) részecskebelövő (génpuska) berendezéssel juttattuk be fiatal kalluszkba, ezután *in vitro* szelekció, növényregenerálás, magfogás és ezzel párhuzamosan a gén bejuttatását igazoló kísérletek következtek.

Első kísérleteinkben kiválasztottunk génbelövési célra – magyar körülmények között – jól használható tavaszi búza-genotípust (*CY-45*). A tavaszi jelleg a vernalizáció elkerülésével felgyorsította a transzgénikus kísérleteket.

Transzformációs célra a *pAHC20* jelű plazmid molekulát használtuk, amely tartalmazta a *Streptomyces hygroscopicus*-ból izolált *bar* gént. A gén foszfinotricin (ppt) herbicid hatóanyaggal szembeni rezisztenciát kölcsönöz a recipiens szervezetnek.

Az éretlen embrió eredetű kalluszkba *PDS-1000/He* génpuskával juttattuk be a rezisztenciáért felelős gént. A markergénre történő szelekciót 3–5 mg/l bialaphos hatóanyaggal végeztük. Kísérletünkben az 5, 10 és 15 napos kalluszkokat találtuk legalkalmasabbnak génbelövésre. Az idősebb korban (20, 25 napos) transzformált kalluszkok már nehezítették a szelekciós munkát. Eredményeink alapján háromhetes kortól az éretlen embrió eredetű kalluszkok belövését már nem javasoljuk.

5700 éretlen embrió belövéséből, következetes szelekciót alkalmazva, hat független, fertilis transzgénikus búzanövényt állítottunk elő. Az idegen gén jelenlétét a szelektált kalluszkok és az előállított növények foszfinotricin acetyltransferáz enzim (PAT) teszttel bizonyítottuk. Az üvegházba kiültetett növények a 0,1%-os bialaphos hatóanyag permetezését egyértelműen túlélték, azaz herbicid rezisztenciát mutattak. Mind a hat növényünk életképes szemeket termelt az erre a célra fenntartott biztonsági üvegházban.

Genetic transformation of wheat (*Triticum aestivum* L) in Hungary

¹J. PAUK–²R. HÄNSCH–²G. SCHWARZ–²A. NERLICH–^{4,1}T. MONOSTORI–^{4,1}A. MÉSZÁROS–
¹B. JENES–¹Z. KERTÉSZ–¹J. MATUZ–²J. SCHULZE–²R. R. MENDEL

¹Cereal Research Non-profit Company,
Szeged

²Botanical Institute, Technical University,
Braunschweig

³Agricultural Biotechnology Center,
Gödöllő

⁴Agricultural College of Debrecen, University of Agricultural Sciences,
Hódmezővásárhely

Summary

This paper reports on the first Hungarian herbicide-resistant wheat genotype generated using an *in vitro* method. The *bar* marker gene was introduced by a particle gun device into still immature embryo-derived calli of different ages, followed by marker gene selection, plant regeneration and seed production. The effect of a foreign gene integrated into the wheat genome was confirmed by phosphinothricin acetyltransferase (PAT) enzyme assay and bialaphos spraying.

In the first experiment a spring wheat genotype responsive to tissue culture (*CY-45*) was selected for gene gun transformation. The spring growth character, avoiding vernalization, accelerated the transformation experiments.

In the present genetic transformation experiments the *pAHC20* plasmid molecule bearing *bar* gene was used. The *bar* gene – originating from *Streptomyces hygroscopicus* – lends herbicide resistance to the recipient organism.

The plasmid, which was coated onto the surface of Heraeus gold particles, was bombarded into young embryo-derived calli by a *PDS-1000/He* gene gun device. The marker gene selection was carried out by adding 3–5 mg/l bialaphos to the medium. In this experiment 5-, 10- and 15-day-old microcalli produced the best results in PAT⁺ callus selection. When calli older than two weeks were bombarded, it hampered selection. The results suggest that bombardment is not to be recommended for calli over three weeks old.

After bombarding 5700 calli followed by bialaphos selection six independent transformants were obtained. The expression of the *bar* gene in the wheat genome was confirmed by a PAT assay of selected calli and regenerated plants. Plants transplanted into the greenhouse showed resistance against 0.1% bialaphos spraying. The transformants matured fertile seeds under safe greenhouse conditions.

Bevezetés

A növénynemesítőknek régi vágya, hogy nemesítési szempontból fontos tulajdonságot úgy vigyenek át egy genotípusba, hogy a recipiens fajta tulajdonságai változatlanul megmaradjanak. Ez az elgondolás egészen napjainkig technikailag kivitelezhetetlennek látszott. Az ivaros, esetleg ivartalan keresztezéssel létrehozott populációkból a neokombinációk kiválogatása hosszú növénynemesítői munkát igényel. Ezentúl a módosítani kívánt genotípus a keresztezést követően legtöbbször jelentősen megváltozik. Tulajdonképpen nem áll rendelkezésünkre növénynemesítési módszer, hogy az első mondatban vázolt célt megvalósítsuk. A növénybiotechnológia fejlődése, a térképezett és izolált gének plazmidokban történő felszaporítása, sejtekbe történő bejuttatása, majd a növények regenerálása napjainkra módszertani és tudományos megoldást kínál.

Dolgozatunkban búza genetikai transzformációjával végzett kutatási eredményeinket foglaljuk össze. Szeretnénk bemutatni az első magyar transzgenikus búza előállításának menetét.

Irodalmi áttekintés

A búza genetikai transzformációja jelentős erőfeszítéseket kívánt a kutatóktól. A mezőgazdaságilag fontos gabonafajok közül a búza volt az utolsó a sikeres *in vitro* gén-beviteli kísérletek között (Weeks et al. 1993). Idegen gének bejuttatására az egyszikűeknél hosszú ideig a protoplaszt technika ígérkezett a leghatékonyabb eljárásnak. Az első búza transzformációs irodalmi adatokat a polietilén-glikollal (PEG) közvetített gén-bevitelre találjuk (Vasil et al. 1991, Marsan et al. 1993). A közleményekből és saját tapasztalatainkból kiderül, hogy a genetikai transzformációnak ez a módja nehézkes és időigényes. A protoplasztok izolálásán és PEG-kezelésén túl az eljárást nehezíti, hogy a protoplaszt eredetű kalluszköböl a fertilis növényregenerálás kis gyakoriságú, ill. genotípushoz kötött (Pauk et al. 1994). Mindezek ellenére örömmel jegyezhető meg, hogy magyar laboratóriumokban kukoricában született eredmények (Mórocz et al. 1990) igazolják, hogy a genetikai transzformációnak a protoplaszttechnika is hatékony eszköze lehet (Omirulleh et al. 1993, Golovkin et al. 1993).

A gének mesterséges bejuttatásában módszertani szempontból nagy jelentőségű a Cornell Egyetemen kifejlesztett részecskebelövő berendezés (Sanford 1988), népszerű nevén génpuska. Ez a berendezés az emberiség több ezer éves „lövöldözési mániáját” egy genetikai esemény újszerű megoldására használja fel. Az első fertilis búza transzformációt ezzel a módszerrel hozták létre kaliforniai kutatók (Weeks et al. 1993). Két különböző eredetű (*Streptomyces hygroscopicus* – *bar*, *Escherichia coli* – *uidA*) mikrobiális gént juttattak be búzába, melyek jelenlétét és működését hitelesen bizonyították. Esetükben a tavaszi búza éretlen embrióinak génbelövéstől a transzgenikus növények virágzásáig mindössze 168 nap telt el, azaz kevesebb, mint fél év. Ezt a transzformációs eredményt Vasil et al. (1992), Nehra et al. (1994) és Becker et al. (1994) is sikeresen megismételték, kisebb módszertani fejlesztéseket közölve. Valamennyi idézett eredményben közös vonás, hogy a *bar* herbicidrezisztenciát kódoló gént juttatták be búzába. Ezt a gént – mint markergént – növénytranszformációkban ma már széles körben használják különböző foszfinotricin (*ppt*) hatóanyagú szelekciós rendszerekben. Ezek a transzformációs eredmények azt is érzékeltetik, hogy agronómiai szempontból – mint pl. herbicidrezisztencia – fontos gének bevitelének nincs technikai akadálya. A jövőbeni munkák sikere elsősorban a klasszikus és molekuláris genetikusok együttműködésén, a géntanszformációs és etikai törvények betartásán múlik.

Anyag és módszer

Növényanyag és az *in vitro* körülmények

A búza donor növényeket (GK Délibáb, GK Góbé, CY-45, GK Kunság) üvegházban neveltük fel, és a kalászatokat virágzás után 11–12 nappal gyűjtöttük be izolálásra. Az éretlen szemeket 2% NaO'Cl és 1 ml/l Tween csapvizes oldatával sterilizáltuk rázógépen 20 percig, majd többszöri steril desztillált vizes öblítés következett. Az izolálást steril körülmények között végeztük D₂ indukciós táptalajra (Sears és Deckar 1982, Purnhauser és Gyulai 1993). A búza genotípusok génbelövési célú kiválasztásához genotípusonként 200 éretlen embriót izoláltunk, fajtánként 8–8 Petri csészébe. Ezután a kallu-

szokat négyhetes ciklusokban ötször passzáltuk. A táptalaj 2,4-D tartalmát az első átrakás után 1 mg/l-re csökkentettük. A ciklus végén a kalluszokat MS_{zizi} táptalajon regeneráltuk, amely az alaptáptalaj (*Murashige és Skoog* 1962) valamennyi komponense mellett 1–1 mg/l zeatint és indolecetsavat tartalmazott. A táptalajok pH-értékét 1M KOH-val 5.7-re állítottuk be. Szilárdító közegnek Phytigel 2.5 g/l dózist használtuk.

A génbelövési kísérlethez Petri-csészénként 50 embriót izoláltunk a tenyésztőedény területének középső kétharmadába. Indukciós táptalajnak, hasonlóan az előkísérletekhez, D₂-t használtunk. A kalluszokat sötét termosztátban 28 °C-on indukáltuk. A belövéshez 1–25 napos kalluszokat használtunk. A DNS-sel belőtt tenyészeteket 2–3 nappal a belövést követően átraktuk 3 mg/l bialaphost tartalmazó (steril szűrlet) D₂ táptalajra. Tenyésztésüket továbbra is sötétben, 28 °C-on folytattuk. A szelektív körülmények között túlnövő kalluszokat a tenyésztés 6–8. hetében továbbpasszáltuk, amit öt hetes ciklusokban négyszer megismételtünk. A szelektációs ciklus végére a táptalaj bialaphos tartalmát a második passzálástól 5 mg/l-re emeltük, és a 2,4-D tartalmát 1 mg/l-re csökkentettük. A szelektációs ciklus végén a kalluszok itt is MS_{zizi} növényregeneráló táptalajra kerültek. A regenerálás során nem alkalmaztunk szelektációs nyomást.

Részecskepreparálás és a transzformáció paraméterei

A génbelövési kísérletekhez a PDS-1000/He DuPont részecskebelövő berendezést, mikrorészecskének a Heraeus cég typ. 200-04 aranypor készítményét használtuk. A mikrorészecskéket tisztítását és a DNS-felvitelt az alábbiak szerint végeztük:

1. Eppendorf csőben 400 µl 70%-os etanolban 12 mg Heraeus aranyport 20 másodpercig kevertünk (vortex), végül tíz percig állni hagytuk.
2. 2000 /min sebességgel fél perc centrifugálás következett, majd a felülúszót eldobtuk.
3. 200 µl steril desztillált vízben mostuk az aranyrészecskéket, majd tíz percig állni hagytuk.
4. A 2. pont szerint centrifugáltunk.
5. A megtisztított aranyrészecskéket 200 µl, jégen hűtött, 50%-os glicerinben vettük fel, és ultrahanggal egyenletesen eloszlattuk. A további lépésig jégen tartottuk az aranyszuszpenziót.

A DNS felvitele az arany szemcsékre:

6. Óvatos keverés közben 20 µg pAHC20 plazmid DNS-t adtunk az előbbieken elkészített és jégen tartott szuszpenzióhoz.
7. Pipettahegygel történő keverés közben 200 µl, jégen tartott 2.5M CaCl₂-ot, majd 80 µl hideg 0.1M spermidint adtunk a szuszpenzióhoz, és tíz percig jégen állni hagytuk.
8. Tíz másodpercig 1000/min fordulattal centrifugáltuk a DNS-sel bevont arany szemcséket, majd a felülúszót eldobtuk.
9. Óvatos rázás közben 200 µl 70%-os etanolt adtunk az arany szemcsékhez.
10. A 3. pont szerint centrifugáltunk, és az arany szemcséket 200 µl, jégen tartott abszolút alkoholba vettük fel, miközben a szuszpenziót óvatosan kevertük.
11. Az egyenletes szuszpenziót 9 µl-es cseppekben helyeztük az alkohollal sterilizett hordozó korongokra (flying disc).

A fenti módon 20–21 db belövésre alkalmas, beszárított korongot kaptunk, melyeket az elkészítést követően azonnal felhasználtunk az éretlen embrió eredetű mikrokalluszok belövésére.

A PDS–1000 héliumgázzal hajtott részecskebelövő berendezés üzemeltetése során a felhasználói utasítást követtük. A munkatérben 27 Hgmm vákuumot alkalmaztunk. A héliumot 1200–1300 psi nyomásnál engedték be az aranyrészecskéket hordozó korong fölötti térbe. A vákuum és a nyomás hatására szétrepedő műanyag korong és a belőtt kalluszok közötti távolságot 12 cm-re állítottuk be, melyet a legkedvezőbb tranzienis expressziós mintázat alapján választottunk meg.

A foszfinotricin acetiltranszferáz enzim teszt

Szelekciós markerként a *Streptomyces hygroscopicus* mikroorganizmusból izolált foszfinotricin-acetiltranszferáz (PAT) enzimet kódoló *bar* gént használtuk. Az enzim acetilálja és inaktiválja a foszfinotricint (PPT), a totális gyomirtószernek használt hatóanyagot. A bialaphos kommersziális (82% PPT) néven ismert hatóanyagot a japán Meiji Seika Kaisha cég szíves ajándékaiként használtuk kísérleteinkhez, 3–5 mg/l mennyiségben.

A PAT-enzim tesztet kalluszból, ill. zöld levélmintából készítettük az alábbi protokoll szerint (Spencer *et al.* 1990):

1. A 100 mg tömegű friss mintát jégen tartott Eppendorf csőbe gyűjtöttük.
2. A mintafeltárást 200 µl extrakciós pufferben kézi dörzsöléssel végeztük.
3. Centrifugálás: 13 000/min, 5 min.
4. 50 mM AcCoenzimA és radioaktív PTC összekeverését követően mintánként 2 µl-t Eppendorf reakciócsőbe adtunk.
5. A centrifugált mintából 20 µl felülúszót adtunk a reakciócsövekbe.
6. Egyórányi inkubálás következett 30 °C-os hőblokkban, lassú rázás mellett.
7. Kb. egy óra elteltével a reakciót leállítottuk: 10 µl 12% TCA.
8. Centrifugálás következett: 5 min, 13 000/min.
9. A mintafelvitel MERCK cellulózlemezre történt, amit szárítás követett.
10. Futtatás egy éjszakán át 25 ml piridinben, 37.5 ml 1-butanolban, 7.5 ml sósavban és 30 ml H₂O-ban történt.
11. A teszt eredményét Kodak X-OMAT filmre exponáltuk, amelyet hagyományos módon hívtunk elő.

A transzgenikus-jelölt növények felnevelése és vizsgálatuk körülményei

A steril körülmények között jól gyökeresedett növénykéket normál talajba ültettük ki. A növényeket fejlődési fázisuknak megfelelő programmal kizárólagosan erre a célra fenntartott Conviron fitotron kamrában neveltük. Mivel hazánkban a kísérletek ideje alatt nem volt transzgenikus növények nevelését szabályozó törvény, ezért munkánk során a német előírásokat alkalmaztuk.

A növényeket bialaphos 0.5%-os oldatával permeteztük, és a kezelést követő néhány nap múlva már elhalási tünetek jelentkeztek a kontroll növényeken. A növények teljes elszáradása – fitotronos nevelési körülmények között – a permetezést követően két héttel következett be.

Eredmények

Búza genotípusok kiválasztása génbelövéshez

A génbelövéshez jól kalluszosodó búza genotípus éretlen embrióit szándékoztuk izolálni, hogy a transzformációs munkához fiatal, differenciálatlan sejtek álljanak rendelkezésre. Ehhez négy búza genotípus három fontos szövettenyesztési tulajdonságát (izolálás után kihajtott embriók száma, kalluszosodási százalék, növényregenerálás) vizsgáltuk meg, melynek eredményeit az 1. táblázat foglalja össze. A táblázat második oszlopában látható, hogy a vizsgált fajták között jelentős különbséget találtunk a kihajtott embriók százalékában. Kísérleti szempontból a minél kisebb kihajtási százalék volt a kedvező, amelyet a sorban harmadik genotípus mutatott. A táblázat harmadik oszlopa a kalluszosodási százalékokat összegzi, amely tulajdonságban a nagy értéket adó genotípust kerestük. Munkánkhoz – mindkettő eddig említett tulajdonságban – a legjobb alapanyagának a CY-45 tavaszi búzavonal mutatkozott.

Az előállított kalluszokat hat cikluson keresztül passzáltuk, és ezt követően elvégeztük a növényregenerálási kísérletet. Így modelleztük a génbelövést követő szelektációs szakaszt, majd a transzgenikus növényregenerálást. A CY-45 genotípus ebben a tulajdonságban is a legjobb volt (1. táblázat). Munkánkat ezzel a genotípussal folytattuk tovább.

1. táblázat. Búza genotípusok kiválasztása génbelövési célra: izolált éretlen embriók csírázási, kalluszosodási és a kalluszos növényregenerálási százaléka

Fajta (1 ^{őszi} , 2 ^{tavaszi})	Kihajtott embriók [%]	Kalluszosodás [%]	Növényregeneráló kalluszosok* [%]
(1)	(2)	(3)	(4)
GK Délibáb ⁽¹⁾	18	78	39
GK Góbé ⁽¹⁾	8	85	50
CY-45 ⁽²⁾	2	97	72
GK Kunság ⁽¹⁾	11	88	49

*Öt passzálas után (5)

Table 1. Selection of wheat genotypes for particle gun transformation: embryo germination, callus induction and plant regeneration percentages. (1) Variety (1^{winter}, 2^{spring}), (2) Germinated embryos (%), (3) Callus induction %, (4) Calli producing plantlets (%), (5) After five passages.

A génbelövés és a kallusz korának vizsgálata

Munkánk kezdetén megválaszolatlan kérdés volt, hogy milyen korú kalluszosok belövésétől várható kedvező eredmény. Ehhez a 2. táblázatban összefoglalt kísérletet végeztük el, amelyben a magfogásig végigkövettük a belőtt, szelektált és regenerált kalluszosok sorsát. Mint az adatokból kitűnik, csak a fiatal, egynapos korban belőtt embriók esetében nem kaptunk értékelhető eredményt. A szelektált kalluszosok számában nem volt lényeges eltérés, ha az 5–25 napos kalluszosok transzformációs (PAT-aktivitás) eredményét vizsgáltuk.

2. táblázat. A CY-45 tavaszi búza genotípussal végzett transzformációs kísérlet eredménye a belőtt inokulumok korával összefüggésben

A belőtt embrió/kallusz kora [nap]	Inokulum [db]	Szelektált kalluszok [db]	PAT ⁺ kalluszok [db]	Független transzformánsok [db]	Fertilis transzgenikus növények [db]
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
1	1000	0	0	0	0
5	950	6	5	1	0
10	1000	7	4	3	0
15	1000	6	6	4	4
20	850	4	2	2	2
25	900	6	3	0	0
Összesen	5700	29	20	10	6

Table 2. Result of transforming the spring wheat genotype CY-45 as a function of callus age. (1) Age of embryo/callus, (2) Number of calli, (3) Number of selected calli, (4) Number of PAT⁺ calli, (5) Number of independent transformants, (6) Number of fertile transgenic plants.

Minden bialaphos szelekciónak kitett kallusz foszfinotricin acetiltranszferáz enzimaktivitás vizsgálatát elvégeztük (1. ábra). Az adatokból látható, hogy a kalluszok kb. kétharmada PAT pozitív (PAT⁺) volt (2. táblázat). A belőtt kalluszok kora és a sikeres transzformációs esemény (PAT⁺) összefüggésében megállapítható, hogy a fiatalabb korban (5–15 nap) belőtt kalluszok között kisebb (kb. 20%-kal) a PAT⁻ kalluszok száma. Praktikus megjegyzésünk, hogy technikailag az idősebb korban belőtt kalluszokkal nehezebb volt dolgozni, mert a nagyobb méretű kalluszon a szelektációs hatást (barnulás) nehezebb volt észlelni. Így a passzálások során nagyobb volt az ún. megmenekült kalluszok száma. Ezekben a mintákban a foszfinotricin acetiltranszferáz enzim aktivitása természetesen nem volt mérhető, azaz PAT⁻-ak voltak (1. ábra 2., 4., 5., és 8. minta). A szelektációt követő növényregenerációs munkához csak a PAT⁺ kalluszokat használtuk fel.

Transzgenikus növények regenerálása

A kb. hat-nyolc hónapos bialaphos szelekciót és a PAT-enzimaktivitás mérését követően elvégeztük a kalluszok növényregenerálását. A húsz PAT⁺ kallusból tíz növénykét sikerült regenerálnunk (2. táblázat). A T₀ növényeket fitotron kamrába ültettük ki. A növények leveléből elvégeztük a PAT-enzimaktivitás-tesztet (2. ábra). Minden PAT⁺ kallusból előállított növényünk PAT⁺-nak bizonyult, azaz a transzformált gén (*bar*) működését a regenerált növényekben is sikerült kimutatnunk.

A kiültetett négy-hat hetes korú növényeket bialaphos 0.1%-os oldatával lepermetztük, hogy elvégezzük az *in vivo* enzimtesztet. A korábbi vizsgálatokban PAT⁺-nak bizonyult növényeink herbicid hatóanyaggal szemben is rezisztenciát mutattak. A T₀ növények kalászait virágzás előtt celofánzacskóval szigeteltük. A felnevelt növényeink között hat egyszeműt kötött, azaz fertilis volt (2. táblázat).

1. ábra. A génelövés után szelektált kalluszok foszfinotricin-acetiltransferáz (PAT) enzim aktivitásának vizsgálata. A nyíl az acetilált foszfinotricint (PPT) jelzi, ezek a PAT⁺ kalluszok.

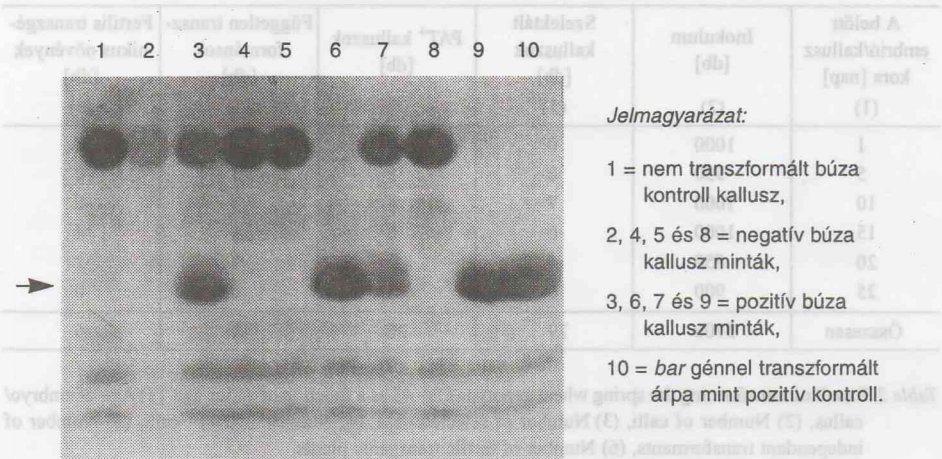


Figure 1. PAT assay of bombarded and selected calli. Arrow shows acetylated phosphinothricin (PPT); these are PAT* calli. Symbols: 1 = non-transformed wheat callus, 2, 4, 5 and 8 = negative wheat callus samples, 3, 6, 7 and 9 = positive wheat callus samples, 10 = *bar* transformed barley as a positive control.

2. ábra. A bialaphos-rezisztens kalluszokból regenerált növények PAT enzim aktivitásának vizsgálata. A nyíl az acetilált foszfinotricint jelzi.

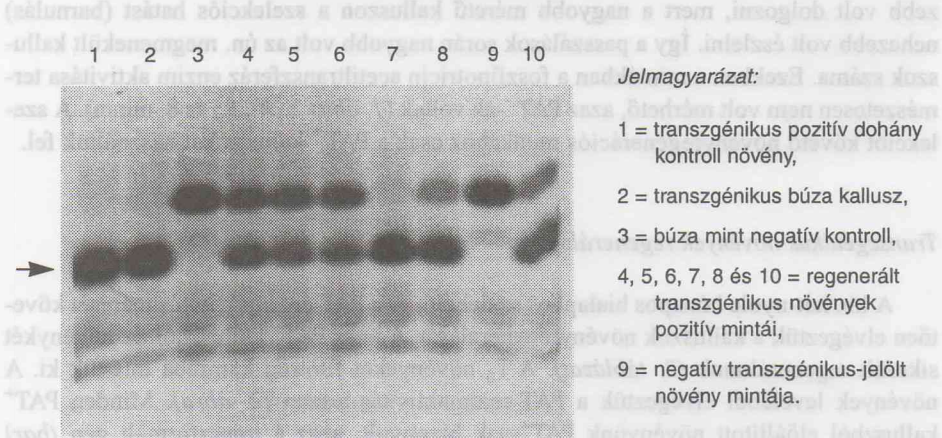


Figure 2. PAT assay of plants regenerated from bialaphos-resistant calli. Arrow shows the acetylated phosphinothricin (PPT). Symbols: 1 = transgenic tobacco as positive control, 2 = transgenic wheat callus, 3 = non-transformed wheat as negative control, 4, 5, 6, 7, 8 and 10 = positive regenerated transgenic wheat samples, 9 = negative putative transgenic wheat sample.

Következtetések

Transzformációs munkánk kezdetén fontosnak ítéltük, hogy kiválasszuk azt a genotípust, amellyel a legjobb hatékonysággal dolgozhatunk. Előző búza sejt- és szövettenyésztési kísérleteinkből (Purnhauser és Gyulai 1993) összegyűjtöttük azokat a genotípusokat, amelyektől az eddigi tapasztalatok alapján a legjobb eredményt vártuk. Az 1. táblázatban összefoglalt eredményekből kitűnt, hogy a korábban szomatikus szövettenyésztési célra szelektált genotípus szerepelt mindhárom értékmérő tulajdonságra nézve a legjobb eredménnyel. Vizsgálatainkkal sikerült – génbelövési célra – magyar körülmények között jól használható tavaszi búza-genotípust találnunk. A tavaszi jelleg a vernalizáció elkerülésével felgyorsította a transzgenikus kísérleteket.

A géntranszformációs kísérletek döntő mozzanata az *in vitro* szelekció. A bialaphosra alapozott szelekciós rendszert búzában Weeks et al. (1993) alkalmazták először. Munkánk kezdetén, az ismert közlemények alapján mi is kis, 1 mg/l bialaphos adagot használtunk a szelekció során, ami a kezdeti kísérletekben nagyon hátrányos volt. A kis dózis miatt nagy számban dolgoztunk olyan kalluszokkal, amelyek ún. megmenekült kalluszok voltak. Későbbi kísérleteinkből kiderült, hogy a jelen munkában használt 3–5 mg/l dózis elengedhetetlen a sikeres munkához. Búzában (Takumi és Shimada 1996) és árpában (Wan és Lemaux 1994) egyaránt az 5 mg/l adag bizonyult jó szelekciós nyomásnak, az irodalomban ezt mások is megerősítették.

A génbelövésen alapuló első sikeres kísérleti eredmények (Vasil et al. 1992, Weeks et al. 1993, Becker et al. 1994, Nehra et al. 1994) a néhány napos, fiatal embrió eredetű kallusz belövését javasolták. Kísérletünkben (1. táblázat) választ szerettünk volna kapni arra, hogy az idősebb korban belőtt kalluszokkal elérhető-e hasonló eredmény? Mint eredményünkben látható, az öt-, tíz- és tizenöt napos korban belőtt kalluszok között nem állapítható meg a szelektált kalluszok száma alapján lényeges különbség. Az idősebb kalluszok esetében már nehezebb volt a szelekciós hatás regisztrálása, és így nagyobb számban kaptunk PAT⁻ kalluszokat. Ezért a kísérleti munka hatékonysága csökkent. Ennek alapján a két hétnél idősebb kalluszok belövését célszerű elkerülni.

Az irodalmi adatoktól eltérően (Vasil et al. 1992, Weeks et al. 1993, Wan és Lemaux 1994) munkánk során viszonylag hosszú (hat-nyolc hónapos) szelekciós szakaszt alkalmaztunk. Ebből jelentős előny származott, hiszen nagyobb volt a kalluszok száma és egyetlen növényünk sem volt PAT⁻. A viszonylag hosszú szelekciós ciklus fontosságát bizonyítottuk. Az első tudományos közlemények (Vasil et al. 1992, Weeks et al. 1993, Becker et al. 1994) esetében az időfaktor volt a fontos, ezért a szerzők megítélésünk szerint nem fordítottak elegendő időt a szelekcióra. Ebből adódhat, hogy kísérleteinkben lényegesen kisebb volt a szelektált kallusz és a transzgenikus növény előállítás gyakorisága, mint a mi esetünkben.

Szakirodalmi és saját adatainkból látható, hogy búzába fajidegen gén bejuttatható és működtethető. A *bar* gén esetében ez totális gyomirtószerrel szembeni rezisztenciát jelent. Ezzel bizonyított az is, hogy pl. növényvédelmi szempontból fontos gén is transzformálható búzába, nemcsak alapkutatói szempontból jelentős markergének, mint pl. *npt-II* vagy *gus*. További kutatások fognak majd választ adni arra, hogy a transzgenikus technika a növénygenetikának, ill. növénynemesítésnek mely területét fogja segíteni.

Eredményünkkel megnyílt annak a lehetősége, hogy a kukorica (*Omirulleh et al.* 1993, *Golovkin et al.* 1993) és rizs (*Jenes et al.* 1996, *Pauk et al.* 1996) után búzában is elkezdődjenek azok az elsősorban elméleti kutatások, amelyek a génbelövésre alapozott transzformációs technikát módszerként használják. A magyarországi transzformációs kísérletekben jelentős segítséget nyújthat, hogy hazánkban *Jenes et al.* (1996) szabadalmaztattak és forgalmazznak egy hazai fejlesztésű részecskebelövő berendezést (GENE-BOOSTER). Hazánkban már öt, ún. növényes kutatóhelyen (MBK–Gödöllő, MTA–Martonvásár, ELTE–Budapest, GATE–Gödöllő, GK Kht–Szeged) működik génbelövő berendezés, amely remélhetőleg kutatási és oktatási téren jelentős eredményekhez segíti a hazai genetikai kutatást.

Köszönetnyilvánítás

A kutatási eredmény a D–6/96 nyilvántartási számú Tét német-magyar bilaterális kutatási együttműködés keretében született, melynek magyarországi kísérleteit az OTKA T017256 és FM.K–348 nyilvántartási számú kutatási szerződések is támogatnak. A szerzők köszönetüket fejezik ki a németországi BMF-nek, Bonn; a magyarországi OMFB-nek és FM-nek támogatásukért, hiszen az eredmények megszületésében alapvető részük volt. Köszönetünket fejezzük ki a japán Meiji Seika Kaisha cégnek a bialaphos herbicid hatóanyagért és dr. Purnhauser Lászlónak a CY–45 búza genotípus rendelkezésünkre bocsátásáért.

IRODALOM

- Becker, D.–Bretschneider, R.–Lörz, H.*: 1994. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. *The Plant Journal*, 5(2): 299–307.
- Golovkin, M. V.–Ábrahám, M.–Mórocz, S.–Botka, S.–Fehér, A.–Dudits, D.*: 1993. Production of transgenic maize plants by direct DNA uptake into embryogenic protoplasts. *Plant Science*, 90: 41–52.
- Jenes, B.–Bittencourt, P. A. L.–Csányi, Á.–Pauk, J.–Nagy, I.–Toldi, O.–Balázs, E.*: 1996. The GENEBOOSTER – a new microparticle bombardment device – for genetic transformation of plants. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 2: 42–51.
- Marsan, P. A.–Lupotto, E.–Locatelli, F.–Qiao, Y. M.–Cattaneo, M.*: 1993. Analysis of stable events of transformation in wheat via PEG-mediated DNA uptake into protoplasts. *Plant Science*, 93: 85–94.
- Mendel, R. R.*: 1990. Microprojectile-mediated gene transfer to plants. *AgBiotechn News and Information*, 2: 643–645.
- Mórocz, S.–Donn, G.–Németh, J.–Dudits, D.*: 1990. An improved system to obtain fertile regenerants via maize protoplasts isolated from a highly embryogenic suspension culture. *Theor Appl Genet.*, 80: 721–726.
- Murashige, T.–Skoog, F.*: 1962. A revised media for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473–479.
- Nehra, N. S.–Chibar, R. N.–Leung, N.–Caswell, K.–Mailard, L.–Steinhauser, L.–Baga, M.–Kartha, K. K.*: 1994. Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissue following microprojectile bombardment with distinct gene constructs. *Plant J.*, 5: 285–297.
- Omirulleh, S.–Ábrahám, M.–Golovkin, M.–Stefanov, I.–Karabaev, M. K.–Mustrády, L.–Mórocz, S.–Dudits, D.*: 1993. Activity of a chimeric promoter with the doubled CaMV 35S enhancer element in protoplast-derived cells and transgenic plants in maize. *Plant Mol. Biol.*, 21: 415–428.
- Pauk, J.–Kertész, Z.–Jenes, B.–Purnhauser, L.–Manninen, O.–Pulli, S.–Dudits, D.*: 1994. Fertile wheat (*Triticum aestivum* L.) regenerants from protoplasts of embryogenic suspension culture. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 38: 1–10.

- Purnhauser, L.–Gyulai, G.*: 1993. Effect of copper on shoot and root regeneration in wheat, triticale, rape and tobacco tissue cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 35: 131–139.
- Sanford, J. C.*: 1988. The biolistic process – a new concept in gene transfer and biological delivery. – *Trends Biotechnol.*, 6: 229–302.
- Sears, R. G.–Deckard, E. L.*: 1982. Tissue culture variability in wheat callus: induction and plant regeneration. *Crop Sci.*, 22: 546–550.
- Spencer, T. M.–Gordon-Kamm, W. J.–Daines, R. J.–Start, W. G.–Lemaux, P. G.*: 1990. Bialaphos selection of stable transformants from maize cell cultures. *Theor. Appl. Genet.*, 79: 625–631.
- Takumi, A.–Shimada T.*: 1996. Production of transgenic wheat through particle bombardment of scutellar tissues: frequency is influenced by culture duration. *J. Plant Physiol.*, 149: 418–423.
- Vasil, V.–Brown, S. M.–Re, D.–Fromm, M. E.–Vasil, I. K.*: 1991. Stably transformed callus lines from micro-projectile bombardment of cell suspension cultures of wheat. *Bio/Technology* 9: 743–747.
- Vasil, V.–Castillo, A.–Fromm, M.–Vasil, I.*: 1992. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by micro-proprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio/Technology*, 10: 667–674.
- Wan, Y.–Lemaux, P. G.*: 1994. Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiol.*, 104: 37–48.
- Weeks, J. T.–Anderson, O. D.–Blechl, A. E.*: 1993. Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Physiol.*, 102: 1077–1084.

Érkezett: 1998.03.20.

A szerzők levélcíme – Address of the authors:

Dr. Pauk János–Dr. Kertész Zoltán–Dr. Matuz János
Gabonatermesztési Kutató, Közhasznú Társaság
Szeged,
Pf. 391.
H–6701

Dr. Robert Hänsch–Dr. Günter Schwarz–Andrea Nerlich–Dr. Jutta Schulze–Dr. Ralf R. Mendel
Botanisches Institut, Technische Universität
Braunschweig
Humboldtstraße 2.
Germany
D–38023

Monostori Tamás–Mészáros Attila
DATE MFK
Hódmezővásárhely
Pf. 79.
H–6801

Dr. Jenes Barnabás
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont
Gödöllő
Pf. 411.
H–2100