

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BUDAPEST

Kísérletek a *Diplotaxis tenuifolia* és *Eruca sativa* genetikai transzformációjára

Rikk Péter

Kertészmérnök

Készült a Genetika és Növénynevelés Tanszéken

Tanszéki konzulensek: Dr. Zok Anikó

Bírálok: _____

Budapest, 20_____

tanszékvezető/szakirányfelelős

konzulensek

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
1.1 <i>Diplotaxis tenuifolia</i>	3
1.2 <i>Eruca sativa</i>	4
1.3 Termesztés	6
1.4 Jelentőség	6
2. Célkitűzés	8
3. Irodalmi áttekintés	9
3.1. Genetikai transzformáció	9
3.2 A mikroszaporítás	10
3.3. A <i>Brassicaceae</i> család tagjainak transzformációs kísérletei	11
4. Anyag és módszer	15
4.1 Növényanyag indítása	15
4.2 Transzformációs módszerek	16
4.2.1 Virágbemártásos transzformáció (floral dip)	16
4.2.2 Levélkorong transzformáció.....	20
4.3 A transzformált virágokból fejlődő magok szelekciója	21
5. Eredmények és megvitatásuk.....	22
5.1 Növényanyag indítása	22
5.2 Transzformációs módszerek	23
5.2.1 Virágbemártásos transzformáció (floral dip)	23
5.2.2 Levélkorongos transzformáció	23
5.3 A transzformált virágokból fejlődő magok szelekciója	25
6. Következtetések	27
7. Összefoglalás	29
Köszönetnyilvánítás	31
Irodalomjegyzék.....	32



2. ábra: *Diplotaxis tenuifolia* növény (<http://www.eatthatweed.com/>)

1.2 *Eruca sativa*

Az *Eruca* nemzetség szintén a *Brassicaceae* család tagja. Az *Eruca sativa* (3. ábra) magyar nevén borsmustár, a *Diplotaxis tenuifolia*-hoz hasonlóan diploid, viszont attól eltérően egyéves növényfaj. Koratavasszal virágzik, magjai pedig már késő tavasszal gyűjthetőek. Indiában és Pakisztánban az *Eruca sativa* speciális ökotípusait magjuk miatt termesztik, melyből olajat sajtolnak, amit például világítására vagy savanyúságok készítéséhez használnak fel. Amerikában a fiatalabb korosztály fogyasztja előszeretettel fogyókúra diéták során, mint "természetes élelmiszer". Olaja erukasavban gazdag, ipari olajnövényként való felhasználása pedig már megkezdődött (Pignone, 1996). Az utóbbi időben jelentős piaci részesedést szerzett az észak európai országokban is. Széles körben használják vágott saláták összetevőjeként csípős íze miatt, melyet a glikozinolatok és azok bomlástermékei okoznak (Omirou et al., 2012).



3. ábra: *Eruca sativa* növény (en.wikipedia.org)

Nielsen és munkatársai (2008) több mint 70 illékony anyagot azonosítottak friss *Eruca sativa* levelek fejterében, melyekből körülbelül 20 járul hozzá a levelek aromájához. Növényrendszertani csoportból mindkét faj ugyanabba a családba tartozik, külső megjelenésük is több szempontból hasonló, bár az *Eruca sativa* robosztusabb, nagyobb habitusú növény. Mindkettő a mediterrán térségből származik, az *Eruca sativa* azonban szélesebb körben terjedt el. Alapvetően fűszernövények és saláták hozzávalói, de gyógyászati alkalmazásuk is ismert. A két faj összehasonlítását az 1. táblázat tartalmazza.

1. Táblázat: A *Diplotaxis tenuifolia* és az *Eruca sativa* összehasonlítása

		<i>Diplotaxis tenuifolia</i>	<i>Eruca Sativa</i>
Megjelenés	méret	67-70 cm	80 cm
	levél	karéjos vagy épszelű	karéjos vagy épszelű
	gyökérzet	bojtos	bojtos
	csészelevél	zöld	fehéres, sárga, lila, barnán
	virág	sárga	fehér, barnán erezett
	becő mérete	25-50 mm	20-30 mm
Életforma		évelő	egyéves (kétéves)
Virágzás ideje		március-június	február-április
Kromoszómaszám		2n=22	2n=22
Ivarúság		egylaki kétivarú	egylaki kétivarú
Talajigény		bármilyen jó minőségű	bármilyen jó minőségű talaj
Tenyészterület		75-100 cm ²	150-200 cm ²

1.3 Termesztés

Sem a *Diplotaxis tenuifolia*, sem pedig az *Eruca sativa* nem túl igényes növény, így termesztésük könnyen kivitelezhető. Mindkét faj szaporítása magvetéssel történik, évente többször szakaszosan is vethetőek. Betakarításuk több alkalommal végezhető, amikor a levelek elérték a 8-10 cm-es nagyságot. Az *Eruca sativa* esetében 2-3, a *Diplotaxis tenuifolia* esetében pedig 4-5 szedés végezhető. A szedések után egyre szeldeltebb levelek fejlődnek mindkét faj esetében. A *Diplotaxis tenuifolia*-nál ez a szeldeltebbé válás egyre intenzívebb, csípősebb aromával társul, ami a salátakeverékekben való felhasználásakor nem előnyös, ezért a későbbi szedések során betakarított leveleket inkább már csak főtt ételek fűszerezésére használják. Az *Eruca sativa* egyéves növényfaj ellenben a *Diplotaxis tenuifolia*-val, mely évelő és szabadföldön fóliatakarással vagy anélkül is átteleltethető, azonban a kártevők és korokozók elszaporodása miatt célszerű évente új helyre vetni mindkét fajt.

1.4 Jelentőség

Napjainkban egyre több növényfaj kerül be, mint választék bővítő a mindennapi zöldségkereskedelembé, és ezen fajok jelentősége tovább fokozódhat, például funkcionális élelmiszerként. A *Diplotaxis tenuifolia* és az *Eruca sativa* is ebbe a csoportba tartozik, ezért nemesítésük és kutatásuk is nagyobb jelentőséggel bírhat.

A keresztesvirágúak genomikai kutatásokban betöltött szerepe rendkívül nagy, hiszen az *Arabidopsis thaliana* vált a növénybiológiai kutatások modell rendszerévé, amit számos pozitív tulajdonsága mellett a könnyű genetikai transzformálhatósága tett rendkívül sikeressé (Meinke et al., 1998). Az *Arabidopsis thaliana* esetében sikeresen alkalmazott módszereket pedig rendkívül izgalmas lenne olyan keresztesvirágú növényfajokon alkalmazni, amelyek élelmiszerként is felhasználásra kerülnek.

2. Célkitűzés

Kísérletünk célja a Xiuren és munkatársai (2006) által kidolgozott *Arabidopsis tahaliana* esetében sikeresen alkalmazott, úgynevezett "floal dip" azaz virágbemártásos genetikai transzformációs módszer kipróbálása saját magvetésből származó, illetve egyszer megszedett, fiatal *Diplotaxis tenuifolia* és *Eruca sativa* növényeken.

Célunk volt a pTd33 plazmid konstrukciót tartalmazó EHA101 *Agrobacterium tumefaciens* vektor használata a transzformációs eljárás során. A kiválasztott két faj esetében üvegházi körülmények között nevelt növényeket kívántunk felhasználni a "floal dip" transzformációhoz. A transzformált virágokból fejlődött magok szelekciójára kanamicin tartalmú táptalaj alkalmazását terveztük. Terveinkben szerepelt még a szelekciós táptalajon fejlődött növények *in vitro* körülmények között történő felszaporítása és a feltételezett transzformáns növények által termelt specifikus fehérje jelenlétének kimutatása hisztokémiai eljárással (GUS teszt).

További célként tűztük ki a fent említett két faj esetében a levélkorongokra alapozott genetikai transzformációt is, *in vitro* körülmények között nevelt növények leveleinek használatával. A több vágási felületet tartalmazó levéldarabok *Agrobacterium*-os kezelését követően a levélsejtek transzformációjának sikerességét a fentiekben már leírt módon, a *gusA* gén expressziójára alapozva terveztük elvégezni.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Genetikai transzformáció

A genetikai transzformáció során a génátvitel közvetítői a nukleinsavak, melyek a recipiens szervezet genomjába beépülnek és róluk fehérje termék keletkezik (Dudits and Heszy, 2003). A transzformációval átalakított sejtet transzformánsnak nevezzük. A genetikai transzformáció lehetőséget ad korlátozott hosszúságú DNS-szakasz beépítésére a növényi sejt genomjába. Abban az esetben, ha egy ilyen sejtből növényt regenerálunk, az új egyed összes sejtje tartalmazni fogja az új DNS szakaszt és így GM (genetikailag módosított) növény állítható elő (Pedryc et al., 2011).

A géntechnológia tényleges alkalmazhatóságához rekombináns DNS molekulákat kell előállítani. A rekombináns DNS egy hordozó DNS molekulából (vektor) és a vizsgálni kívánt DNS-ből (inszert) álló "hibrid" molekula, amelyet a kísérletekhez szükséges mennyiségben molekuláris klónozással állítunk elő. A molekuláris klónozás nem más, mint egy specifikus inszertet tartalmazó rekombináns DNS felszaporítása megfelelő gazdasejtben (*E. coli*) (Nyitrai, 2013).

A transzformációs folyamat során cél a kívánt nukleinsav bejuttatása a célsejtekbe, illetve az, hogy a DNS integrálódjon a genomba. A genetikai transzformáció történhet direkt (mikroinjektálás, elektroporáció, ultrahangos kezelés stb.) és indirekt (*Agrobacterium spp.* vektorok, virális vektorok) géntranszferrel. Ezek a virális és plazmid vektorok képesek a sejtekbe bejutva információt beépíteni a genomba (pl. *Agrobacterium* plazmidok) (Velich, 2001).

Az agrobaktériumok talajban élő baktériumok, melyek képesek a kétszikű növényeket sebzéseken keresztül fertőzni, mely fertőzések eredményeként tumorok, golyvák fejlődnek a növényen. A virulens *Agrobacterium*-ok nagyméretű plazmidjai (130-250 kb) felelősek a tumor vagy hajszálgökeresedés indukálásáért (Ti és Ri plazmidok). A Ti (tumor indukáló) plazmid felelős a tumoros szövetek különleges aminosavainak szintéziséért, ezen aminosavakat összefoglaló néven opinoknak nevezzük. Az opinok a baktérium számára felhasználható vegyületek, melyeket a fertőzött növényi sejtek termelnek, annak ellenére, hogy a növény sejtjei nem tudják felhasználni őket. Ennek magyarázata, hogy a Ti plazmid többek között opin szintéziséért felelős szakasza beépül a gazdasejt genomjába, ezt a szakaszt T-DNS-nek (transzfer DNS) hívjuk (Velich, 2001).

A T-DNS-en lévő gének a tumoros növekedésért felelősek, ezen gének a növényi növekedési hormonok bioszintéziséért felelős fehérjéket kódolnak, mely fehérjetermékek

túltermelése felborítja a normál növényi sejtosztódást és differenciációt. Az egyik ilyen túltermeltetett hormon típusú növényi fehérje az auxin (indol-3-ecetsav, IAA), melynek bioszintéziséért az *iaaH* és *iaaM* gének által kódolt enzimek, az indol-3-acetamid hidroláz és a triptofán-monooxygenáz felelősek. 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 T-DNS-t mindkét oldalról rövid, direkt módon ismétlődő szakaszok fogják közre (left border: LB, right border: RB). Az ezen határszekvenciák között elhelyezkedő DNS darab, mely akár 50 kb nagyságú is lehet, hatékony átvitel során integrálódik a gazdanövény genomjába. Az T-DNS átvitelét a tumor indukáló plazmid virulencia régiója (*vir*) és a kromoszómális gének (*chrA* és *chrB*) kontrollálják. A kromoszómális gének termékei folyamatosan (konstitutívan) expresszálódnak, termékeik a baktérium sejtfalhoz tapadását okozzák. A virulencia gének kifejeződése azonban szigorúan szabályozott, ezek aktiválódása indítja el az átviteli mechanizmust. Ilyen aktiválódás történik a növények sebzési felületén kiszabaduló fenolvegyületek (pl. acetosziringon) hatására (Dudits and Heszky, 2003).

3.2 A mikroszaporítás

A steril vegetatív mikroszaporítás ivartalan szaporodást jelent, így az utódok nem a zigótából, hanem testi (szomatikus, vegetatív) sejtből alakulnak ki. Ebből következik, hogy az új egyedek genetikailag azonosnak tekinthetők, elvben sem egymástól, sem a kiinduló növénytől nem különböznek (Dudits and Heszky, 2003). A mikroszaporítás alapja, hogy hasznosítjuk a növényben meglévő merisztémaszöveteket (osztódó, differenciálatlan szövetek), melyekből járulékos szerveket, például gyökereket, hajtást, rügyet regenerálunk, ezt a folyamatot organogenezisnek nevezzük (Pedryc et al., 2011).

Loo volt az első, akinek 1945-ben sikerült folyamatosan fejlődő merisztéma tenyészetet indítania. Sikerral nevelt 5 mm-es *Asparagus* hajtáscsúcsokat – kezdetleges – szervetlen sókat és szacharózt tartalmazó táptalajon. 1946-ban Ball a fehér csillagfűt (*Lupinus albus* L.) három levélprimordiumot tartalmazó merisztémáját tenyésztette sikerrel. A merisztémák tényleges tenyésztése azután vált lehetővé, miután a táptalajokban kiegészítőként kókusztejet, majd gibberelinsavat kezdtek alkalmazni. Néhány év múlva a kutatások két irányban folytatódtak. Az egyik irány a merisztématenyésztésen alapuló vírusmentesítés volt. Ennek alapja az a feltételezés, hogy a növények különböző részeiben a víruskoncentráció eltérő és a hajtáscsúcsok merisztémáinak legfiatalabb részei vírusmentesek lehetnek abban az esetben is, ha

a növény fertőzött. A másik irányzat virágfejlődés és a generatív merisztémák *in vitro* indukciójával és fenntartásával foglalkozott (Dudits and Heszy, 2003).

A mikroszaporítás felfedezéséhez 1960-ban Morel kutatásai vezettek. A francia kutató egy orchidea faj a *Cymbidium* vírusmentesítése során protokormok (differenciálatlan sejtekből álló előtelep) kialakulását figyelte meg. Ezek a képződmények a csírázó orchidea magvakra jellemzőek. Morel később azt is bebizonyította, hogy a protokormok feldarabolásával a *Cymbidium* szaporítható, a táptalaj módosításával pedig növény regenerálható belőlük (Dudits and Heszy, 2003).

Morel 1960-as közleménye után egyre több fajra dolgoztak ki vegetatív mikroszaporítási rendszert. A '87-es párizsi biotechnológia kiállítás szakemberei szerint a világon évente majdnem 300 millió palántát állítottak elő ilyen módszerekkel (Dudits and Heszy, 2003).

1965-ben Magyarországon is elkezdődött a nagyüzemi szaporítás ezen módszerének alkalmazása, köszönhetően Maróti professzornak, ő volt ugyanis aki, annak idején Morel módszereit átvette és továbbfejlesztette. A gyakorlatban különböző mikroszaporítási technikákat alkalmaznak, például a hajtástenyésztés során az izolátumok általában az anyanövény merisztémáiból kerülnek ki, majd az *in vitro* fejlődött hajtásokon kialakult hónaljrügyekből fejlődő hajtásokkal végzik a szaporítást. A klasszikus hajtástenyésztéstől eltérő módszer a járulékos hajtástenyésztés, ennél az eljárásnál a hajtásregeneráció nem az eredeti inokulumokból (merisztémát tartalmazó explantátum), hanem a belőlük fejlődött kalluszból történik. Hajtástenyészetekre alapuló technika a járulékos szervtenyésztés, mivel a szervek egy része módosult hajtás, tehát *in vitro* is csak hajtások felhasználásával indukálható a fejlődésük. Az így szaporított legismertebb fajok az orchideák, a burgonya és a fokhagyma. Végül, de nem utolsó sorban a véglegesen differenciálódott szomatikus (testi) sejtekben növényi növekedésszabályozók (PGR, Plant Growth Regulators) segítségével elindítható az embriogenezis programja és szomatikus embriók nevelhetők fel, melyek szintén mikroszaporítási alapanyagként szolgálhatnak, ezt az eljárást szomatikus embriogenezisnek nevezzük (Dudits and Heszy, 2003).

3.3. A *Brassicaceae* család tagjainak transzformációs kísérletei

Transzgénikus növényeket tipikusan komplex módszerekkel állítanak elő, melyek a növényi szövetek vagy sejtek gondos előkészítését igénylik, majd a DNS bejuttatását *Agrobacterium tumefaciens* vagy génpuska használatával. A transzgénikus vonalak szelekciója után pedig következhet a növény regeneráció (Christou, 1996; Hooykaas and Schilperoort,

1992; Siemens and Schieder, 1996; Weising et al., 1988). Ezek a transzformációs eljárások időt és szakképzett munkaerőt igényelnek, valamint viszonylag költséges laboratóriumi felszerelés szükséges a végrehajtásukhoz.

Slater és munkatársai 2010-ben sikeresen transzformáltak *A. tumefaciens*-sel *Eruca sativa* sziklevél és hipokotil sejteket. Kísérletükben megállapították, hogy a transzformációs eljárásban felhasznált hipokotil szegmensek regenerációs képessége szignifikánsan nagyobb a sziklevél darabokénál, továbbá dokumentálták, hogy a magas auxin (0,1 mg/l) és citokinin (5 mg/l) koncentráció a táptalajban kedvezően hat a hajtás regenerációra. Ezüst nitrát (5 mg/l) és NAA (naftilecetsav; 0,1 mg/l) hozzáadásával a hajtásregeneráció mértékét még tovább tudták növelni. Módszerük átlagos transzformációs gyakorisága 1,1% volt, és sikeres genetikai módosítás esetén a transzgén 64%-ban egy példányban épült be az *Eruca sativa* genomjába. Slaterék megállapításai teljesen ellentétesek korábbi tanulmányokéval, melyekben a hipokotil darabot tartalmazó sziklevelek regenerációs képessége nagyobbnak bizonyult a hipokotil darabokénál (Batra and Dhingra, 1991; Parkash et al., 1989). Slater és munkatársai szerint ezek a különbségek a genotípusos eltérések miatt lehetségesek (Slater et al., 2011).

A transzformációs rendszerek egyik alternatív ágát képviselik az úgynevezett *in planta* vagy *in vivo* módszerek (Hansen and Wright, 1999) (floral dip, vákuum infiltráció), melyek a standard szövettenyésztési rendszereknél egy gazdaságosabb alternatívát próbálnak kínálni. Ezek a módszerek elméletileg kevésbé genotípus függőek, mint az összetettebb szövettenyésztési módszereken alapuló technikák, ahol pl. a szomatikus variabilitással is számolni kell (Wang et al., 2003). Az *in planta* módszereknél a transzformáció időpontja általában a virágzás idejére esik, vagy ezen időszak körül végzik.

Claugh és Bent 1998-ban az *Arabidopsis thaliana*-nál akkor már széles körben alkalmazott vákuum infiltrációs technika hatékonyságának mértékét befolyásoló tényezők vizsgálatát tűzték ki célul. Kísérletük során vizsgálták, hogy milyen hatással van a transzformációs gyakoriságra a növény fejlődési stádiuma, az inokulációs közeg összetétele, az alkalmazott felületaktív anyag és a cukor koncentrációja, az alkalmazott technika (virágbemártás, vákuum infiltráció), a kezelés utáni növénytakarás alkalmazása vagy elhagyása, a kezelt növények ökotípusa, valamint az alkalmazott baktérium törzs. Claugh és munkatársai kísérletük értékelésekor a legfontosabbnak azt találták, hogy a vákuum infiltráció használata szükségtelen, mindaddig, amíg megfelelő felületaktív anyagot használnak. A sikeres transzformáció három fő követelményeként pedig a következőket határozták meg: (1) megfelelő növényfejlettségi stádium (maximális számban jelenlévő, nyílás előtt álló virágbimbók), (2) cukor és (3) felületaktív anyag használata (Claugh and Bent, 1998).

A kínai kel (*Brassica rapa* ssp. *chinensis*) egy fontos zöldségnövény Ázsiában. *In vitro* transzformációja nem túl egyszerű, mivel hajtásregenerációs képessége nagyon genotípusfüggő, továbbá az explantátumok érzékenyek az agrobaktériumos kezelésre (Xu et al., 2008). 2000-ben Qing kutatócsoportjával sikeresen transzformált foszfinotricin rezisztens *Brassica rapa* ssp. *chinensis* var. *utilis*, cv. '49 Caixin' növényeket vákuum felszívató módszerrel. Kísérletük hatékonysága igen alacsony volt, körülbelül 20 000 magból mindössze 2 transzformánst kaptak (0,01%), ezzel egyúttal rávilágítottak a Bechtold és munkatársai (1993) által *Arabidopsis thaliana* esetében megállapítottakra: a növény fiziológia állapota, az infiltrációnál felhasznált közeg, az *Agrobacterium* koncentrációja és a vákuum kezelési idő mind befolyásolja a kezelés hatékonyságát (Qing et al., 2000).

2003-ban Wang és munkatársai a *Brassica napus* L. (repce) két tavaszi vetésű fajtájával ('Westar' és 'Sabine') végeztek vákuum infiltrációs módszerrel sikeres genetikai transzformációt, melyet bizonyos esetekben virág bemártással kombináltak. Kísérletük során különböző életkorú növényekkel végeztek transzformációt: felnőtt virágzó növények, hidegkezelés hatására virágzó növények, és csíráztatott palánták. Eredményeik értékelésekor a következő körülmények alkalmazását találták a leghatékonyabbnak: felnőtt virágzó növények vagy hidegkezelés hatására virágzó növények használata 25-27 higanymilliméter nyomáson, 5 percig vagy tovább tartó kétszeri kezeléssel (egymás után vagy egy héten belül). Az így elérhető átlagos transzformációs gyakoriság 0,12% volt (Wang et al., 2003).

2007-ben Xu és munkatársai a *Brassica rapa* ssp. *chinensis* var. *utilis*, cv. '49 Caixin' fajtájával hajtottak végre sikeres vákuum felszívató transzformációt. Célkitűzésük volt, hogy egy hatékonyabb rendszert dolgozzanak ki. Behatóan tanulmányozták a vákuum felszívás után a növényi részekben megjelenő *Agrobacterium* sejtek mennyiségét. A kezeléseket követően több ismétlésben végeztek ilyen vizsgálatot (2; 6; 9; 14 és 19 nap után) és megállapították, hogy a virágszövetekben sokkal nagyobb koncentrációban találhatók meg a baktérium sejtek. Megfigyelték, hogy a *Brassica rapa* ssp. *chinensis* var. *utilis*, cv. '49 Caixin' bibefejlődése eltér az *A. thaliana*-étól, és ez a fejlődési folyamat nem előnyös az *Agrobacterium* bibéhez való hozzáférése szempontjából, tehát ez eredményezi az alacsony transzformációs gyakoriságot a kínai káposztánál (Xu et al., 2008).

Curtis és Nam 2000-ben transzgenikus *Raphanus sativus* var. *longipinnatus* (jégcsapretek/ kínai retek) növényeket állítottak elő virágbemártósos (floral dip) módszerrel. Kísérletükben kulcsfontosságú szerepet játszott a felületaktív anyagok használata, valamint azok különböző koncentrációban történő alkalmazása. Három féle szert alkalmaztak: Silwet L-77; Pluronic F-68; Tween 20, mindegyiket a következő koncentrációkban: 0,01%; 0,05%;

0,1%, valamint kontrollként felületaktív anyagot nem tartalmazó közeggel is végeztek virágbemártást. Korábbi kísérletek a Pluronic F-68 valamint a Tween 20 használatának előnyös hatására hívták fel a figyelmet (Khatun et al., 1993). Curtis-ék eredményeik alapján ezzel szemben a 0,05%-os koncentrációban történő Silwet L-77 alkalmazását találták a leghatékonyabbnak, ugyanis az első virágzáskor transzformált növények esetében így 1,4%-os transzformációs gyakoriságot tapasztaltak. Módszerük értékelése során felhívták a figyelmet a bemártás során alkalmazott közegben a cukor jelenlétének, a felületaktív anyagok használatának, megválasztásának és koncentrációjának fontosságára, valamint az eltérő életkorú növényeknél megfigyelhető a transzformációs gyakoriságban megnyilvánuló különbségekre (Curtis and Nam, 2001).

4. Anyag és módszer

Kísérletünk során saját magvetésből származó, és egyszer megszedett, fiatal növényeket használtunk fel. A *Diplotaxis tenuifolia* vetőmagokat a Rédei Vetőmagkereskedelmi Zrt.-től, az *Eruca sativa* magokat pedig a Faribanks Seeds (Ausztrália) nevű cégtől vásároltuk. Az egyszer megszedett fiatal növények mind a *Diplotaxis tenuifolia* mind az *Eruca sativa* esetében Zok Anikó dunavecsei telephelyéről származtak.

4.1 Növényanyag indítása

A virágzó növényállomány előállítására először *Diplotaxis tanuifolia* magokat vetettünk föld-perlit 50-50%-os keverékébe és azokat üvegházi körülmények közé helyeztük. Ezen kívül steril magvetést végeztünk, melynek során autoklávban sterilizáltuk a csapvízzel nedvesített 50-50%-os föld-perlit keverékkel megtöltött bébiételes üvegeket. A steril magvetést három lépésben végeztük. Először 25 ml 70%-os etil alkoholba helyeztük a magokat rövid időre (max.30 másodperc), majd következett egy tíz percgig tartó sterilizálás 75 ml 15%-os nátrium-hipoklorit oldatban, amihez hozzáadtunk 3 csepp Tween 80-at. Ez egy nem ionos detergens, mely oldhatóvá teszi a membránfehérjéket. Tíz perc letelte után 75 ml steril desztillált vízbe kerültek át a magok, amiben ismét tíz percgig álltak. Ahhoz, hogy a sterilizáló szerek maradéktalanul eltűnjenek, ezt a lépést még kétszer megismételtük. A magokat elektronikus pipettor és steril műanyag hegy segítségével vittük át egyik sterilizáló közegből a következőbe. A bébiételes üvegekbe elvetett magokat három réteg lélegző fóliával fedtük le. A teljes sterilizációs és vetési folyamatot lamináris boxban végeztük a fertőzések elkerülése végett. Amikor a magvetésből származó növények benőtték a rendelkezésükre álló teret, a lélegző fólia fokozatos eltávolításával akklimatizáltuk azokat (4. ábra).



4. ábra: *Diplotaxis tenuifolia* növények a lélegző fólia eltávolítása során
(Fotó: Rikk Péter)

A folyamat során azonban gombásodás lépett fel (szürkepenész), amit a thiram hatóanyag tartalmú, kontakt hatású Tiuram granuflow (Taminco BVBA, Belgium) gombaölő szerrel próbáltunk kiküszöbölni. A Tiuram granuflow-t 5 g/l-es koncentrációban alkalmaztuk 3 ismétlésben, melyek között 7 napot vártunk.

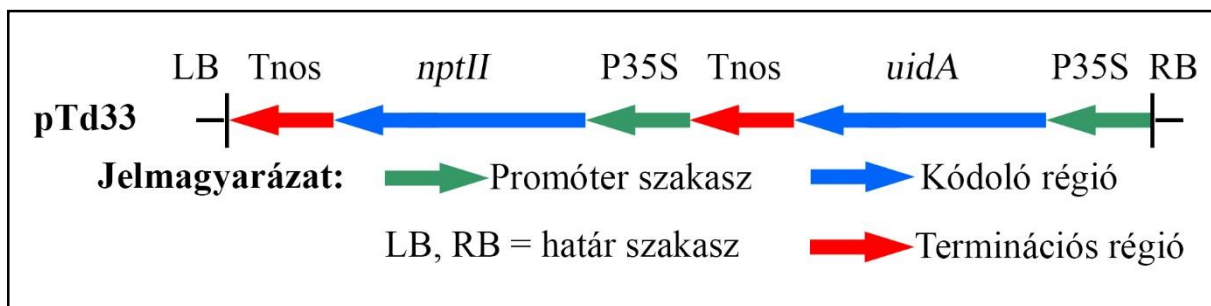
A magvetéssel előállított növények felnevelésére irányuló sikertelen próbálkozások után egyszer megszedett fiatal növények felnevelése mellett döntöttünk, mind a *Diplotaxis tenuifolia*, mind az *Eruca sativa* esetében. Mindkét faj egyedeit szabályozott abiotikus körülmények közé (24°C léghőmérséklet és 16 óra megvilágítás) fitotronba helyeztük a minél egységesebb növényállomány biztosítása és a betegségek elkerülése érdekében. A fitotronban fejlődő növényeket 4 naponta öntöztük és a kifejtett leveleiket folyamatosan eltávolítottuk. *Diplotaxis tenuifolia* esetében 3 hét elteltével, *Eruca sativa*-nál 4 hét után megkezdődött a virágok fejlődése.

4.2 Transzformációs módszerek

4.2.1 Virágbemártásos transzformáció (floral dip)

Az első transzformációs eljáráshoz az *Arabidopsis thaliana*-nál már sikeresen alkalmazott protokollt vettük alapul melyet Xiuren és munkatársai írtak le és publikáltak a nature.com oldalon 2006-ban.

Kísérletünk során az EHA101(pTd33) *Agrobacterium* vektort használtuk fel. Az EHA101(pTd33) vektor konstrukcióban a T-DNS (5. ábra) megfelelő szakasza a *gusA*



5. ábra: A pTd33 plazmid felépítése [nos= nopalín-szintáz gén, 35S= karfiol mozaikvírus promóter, *nptII*= neomicin-foszfo-transzferáz gén, *uidA*= β-glükuronidáz gén] (Bravo-Angel et al., 1999)

riportergén mellett kanamicin rezisztenciát biztosít a növény számára. A *gusA* gén valamint az *nptII* (neomycin-foszfo-transzferáz) szelekciós markergén működését a CaMV (cauliflower mosaic virus) 35S promóter irányítja (Szegedi et al., 2001).

A baktériumot antibiotikumot tartalmazó (50 mg/l kanamicin) szilárd AB (Lichtenstein and Draper, 1986) minimal táptalajra kentük ki és 28 °C-on 2 napra sötétre helyeztük. Az AB minimal táptalaj összetevőit az 2. táblázat tartalmazza.

2. Táblázat: Az AB minimal táptalaj összetevői

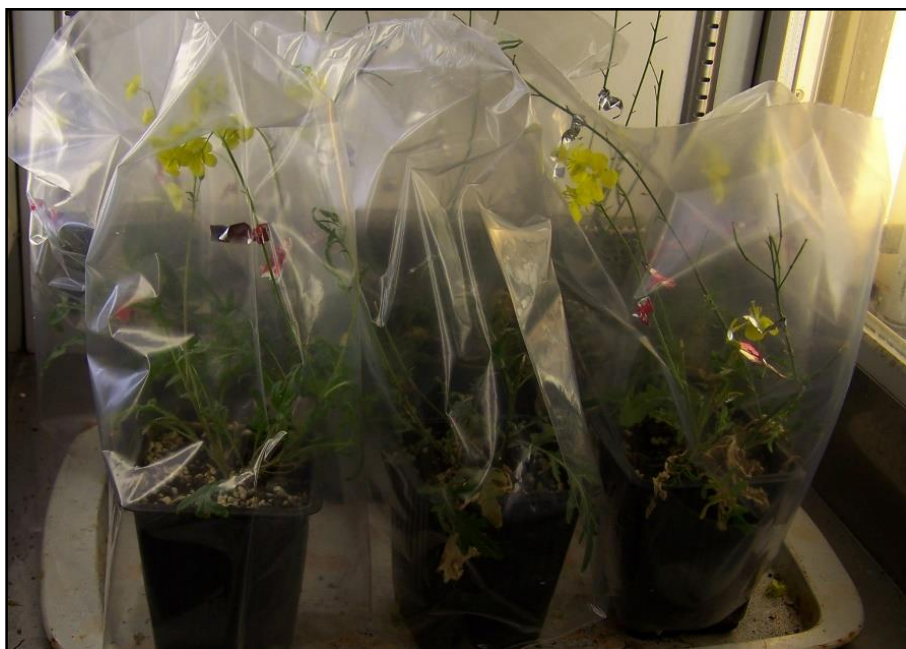
Komponensek	Koncentráció (mg/l)
K ₂ HPO ₄	3000
NaH ₂ PO ₄	1000
MgSO ₄ x 7H ₂ O	300
KCL	150
Fe-EDTA	70
Vitaminok	
Glicin	2
Myo-Inozitol	100
Nikotinsav	0,5
Piridoxin HCL	0,5
Tiamin HCL	0,1

A virágbemártás előtt a szilárd táptalajon felszaporított baktériumokból 1 oltókacsnyit 50 ml folyékony AB táptáptalajba helyeztünk, mely szintén 50 mg/l kanamicint tartalmazott. Ezt a folyadékkultúrát 2 napig 28°C-on ráztattuk, majd a transzformáció előtt 1 nappal 50 ml folyékony AB táptalajhoz 1 ml-t adtunk pipetta segítségével a 2 napig rázatott folyadékkultúrából és 1 napig ráztattuk szintén 28°C hőmérsékleten. 24 óra elteltével az 50 ml folyékony táptalajt 4000g-n 10 percig centrifugáltuk, és az így kapott baktériumtömeget 50 ml steril 5%-os cukoroldatban újrasszuszpendáltuk, majd Silwet L-77 tapadásfokozót adtunk hozzá 100 µl/l koncentrációban.

A nyílás előtt álló és az éppen csak kinyílt virágokat 10 másodpercre mártottuk az oldatba (6. ábra), majd 3-5 perc száradási idő elteltével műanyag fóliával fedtük le a növényeket és gyenge megvilágítású helyre tettük őket egy napra (7. ábra).



6. ábra: *Eruca sativa* virág közvetlenül az *Agrobacterium* szuszpenzióba mártás után (Fotó: Rikk Péter)

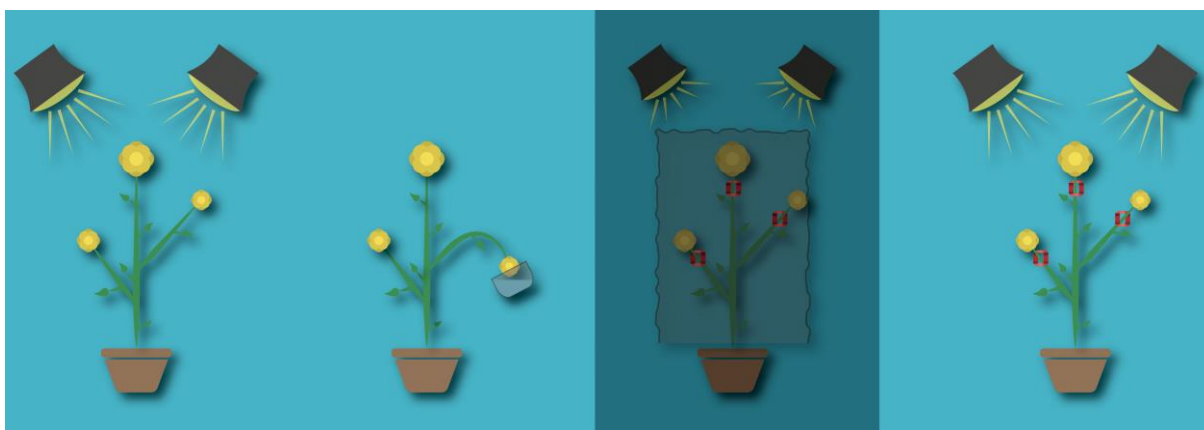


7. ábra: *Diplotaxis tenuifolia* növények fóliatakarása (Fotó: Rikk Péter)

Egy nap elteltével a fóliát eltávolítottuk és a növények visszakerültek a fitotronba. A folyamatosan virágzó növényeken 3 alkalommal végeztünk virágbemártásos (floral dip) transzformációt mindkét faj esetében és a bemártott virágokat egyéni jelöléssel láttuk el (8. ábra). A virágbemártásos transzformáció folyamata a 9. ábrán látható.



8. ábra: Egyéni jelölések az *Agrobacterium* szuszpenzióba mártott virágokon
(Fotó: Rikk Péter)



9. ábra: A virágbemártásos transzformáció folyamata

A növényeken fejlődött terméseket leszedtük, majd a 4.1 fejezetben leírtak szerint sterilizáltuk a magokat és lamináris boxban elvetettük azokat alacsony sótartalmú NN (Nitsch és Nitsch, 1969) táptalajt tartalmazó petricsészékbe. Az NN táptalaj használatát az indokolja, hogy Szepesi Kinga (2013) a Genetika és Növénytermesztés Tanszéken végzett kísérleteiben ezt a táptalajt találta alkalmasnak mindkét faj esetében a táptalajon nevelt növények esetében jelentkező klorotikus tünetek elkerülésére. A NN táptalaj összetevőit a 3. táblázat tartalmazza.

3. Táblázat: NN táptalaj összetevői

Mikroelemek (mg/l)		Makroelemek (mg/l)		Vitaminok (mg/l)	
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,025	CaCl ₂	166	Biotin	0,05
FeNaEDTA	36,7	KH ₂ PO ₄	68	Folsav	0,5
H ₃ BO ₃	10	KNO ₃	950	Glicin	2
MnSO ₄ H ₂ O	11,94	MgSO ₄	90,27	Mio-inozitol	100
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,25	NH ₄ NO ₃	720	Nikotinsav	5
ZnSO ₄ 7H ₂ O	10			Piridoxin HCL	0,5
				Tiamin HCL	0,5

Nem transzformált kontroll magokkal is végeztünk steril magvetést szintén NN táptalajra. Az ezekből fejlődött csíranövényeket vetés után tíz nappal lamináris fülke alatt NN táptalajjal töltött bébiételes üvegekbe helyeztük át, amelyeket a sterilitás megőrzése érdekében három réteg lélegző fóliával zártunk le. A kifejlett növényeket mikroszaporítottuk a felső 2 cm hosszúságú, levelet is tartalmazó hajtáscsúcsi részek friss táptalajra helyezésével.

4.2.2 Levélkorong transzformáció

A transzformáció során szintén az EHA101(pTd33) vektorkonstrukciót tartalmazó *Agrobacterium*-ot használtuk. Ennél a módszernél steril magvetésből származó *in vitro* körülmények között felnevelt és mikroszaporított növények leveleit használtuk fel. A transzformációhoz mind a *Diplotaxis tenuifolia* mind az *Eruca sativa* esetében kb. 0,5 centiméter nagyságú levéldarabokat használtunk fel, melyeken 4 vágási felület ejtettünk. Az 50 mg/l kanamicin-t tartalmazó szilárd AB táptalajon felszaporított *Agrobacterium*-ból 1 oltókacsnyit 1,5 ml desztillált vízben elszuszpendáltunk és ezt a szuszpenziót pipettáztuk a fonáki oldalukkal lefelé NN táptalajra helyezett levéldarabokra, majd fényszobába helyeztük

azokat. 24 óra kokultiváció után az *Agrobacterium*-ot antibiotikumokat (20 mg/l kanamycin, 300 mg/l claforan, 300 mg/l carbenicillin) tartalmazó steril desztillált vízzel lemostuk a levéldarabokról és a transzformáció sikerességét GUS teszttel ellenőriztük. Ezzel a transzformáció során a növény genomjába beépült és ott expresszáldott *gusA* gén működését mutatjuk ki hisztokémiai reakció segítségével. A β -glükuronidáz enzim (GUS) aktivitás hisztokémiai eljárással történő nyomonkövetésére az *in vitro* növényanyagból származó levélkorongokat X-gluc (5-króm,4-bróm,3-indol β -D glükuronsav) szubsztrátumot tartalmazó foszfát-pufferben (X-GLUC:25 μ l/ml; K-ferricianid: 5 mM; K-ferrocianid: 5 mM; Na-foszfát puffer: 100 mM; Triton: 0,005%; Na-EDTA: 50 mM) (pH 7,0), egy éjszakán át 37 °C-on inkubáltuk (Jefferson 1987, Jefferson et al. 1987).

4.3 A transzformált virágokból fejlődő magok szelekciója

A transzformált virágokból fejlődő magok szelekcióját az EHA101(pTd33) vektorkonstrukcióban megtalálható kanamicin rezisztenciát biztosító génre építettük. Először egy kisebb *Diplotaxis tenuifolia* magmennyiséggel (20 darab mag) próbavetést hajtottunk végre 20 mg/l kanamicin koncentrációjú NN táptalajra, azonban nem tapasztaltunk szelekciós hatást, ezért egy kísérletet kellett beállítanunk, hogy megállapítsuk a szelekciós ágensként felhasznált antibiotikum optimális koncentrációját.

A nem-transzformált kontroll növényekre alapozva *Diplotaxis tenuifolia* esetében 40-500 mg/l tartományban egy koncentrációsort vizsgáltunk a szelekció optimális szintjének kiválasztásához (40; 60; 80; 100; 120; 140; 160; 180; 200; 300; 400; 500 mg/l kanamicin).

Az *Eruca sativa*-nál 20-160 mg/l koncentrációig terjedő kísérletet végeztünk a következő felbontásban 20; 40; 60; 80; 100; 120; 140; 160 mg/l. A kísérlet során mindkét faj magjait a 4.1 fejezetben ismertetett protokoll szerint sterilizáltuk, majd steril körülmények között elvetettük azokat a különböző kanamycin koncentrációjú NN táptalajokra.

Miután mindkét fajnál kiválasztottuk azt a kanamycin koncentrációt a transzformált virágokból fejlődött magok szelekciójára ahol a nem-transzformált kontroll növények magjai még kicsíráznak, de két szikleveles állapot után kifehérednek és elhalnak, a 4.1 fejezetben bemutatottak szerint steril körülmények között antibiotikumos táptalajt tartalmazó petricsészékbe elvetettük a begyűjtött magokat és inkubátorba sötétre helyeztük őket. A csírázás után 3 nappal áthelyeztük a csíranövényeket az előző kísérletben megállapított, adott fajnak megfelelő kanamicin koncentrációjú táptalajt tartalmazó bébiételes üvegekbe, melyeket 3 réteg lélegző fóliával takartunk le és fényszobában neveltünk tovább.

5. Eredmények és megvitatásuk

5.1 Növényanyag indítása

A föld-perlit 50-50%-os keverékébe vetett majd üvegházi körülmények közé helyezett növények esetében a magok csírázása után a palántadőlés tüneteit tapasztaltuk, a kórokozó gombák sugárirányú terjedésének megfelelően először foltokban, majd néhány nap elteltével a teljes állományban a palánták talajjal érintkező gyökérnyaki része megbarnulva elvékonyodott és a növények elszáradás nélkül kidőltek.

A bébiételes üvegekbe vetett növényeknél az akklimatizálás során megjelent szürkepenészt a Thiuram granuflow háromszori alkalmazása ellenére sem sikerült kiküszöbölnünk, ezért a továbbiakban egyszer megszedett fiatal növényekkel dolgoztunk mindkét faj esetében. Ezek az egyedek a fitotronban lévő szabályozott körülmények hatására egészséges, élénkzöld színű kompakt növényekké fejlődtek (10. ábra).



10. ábra: Egészséges, élénkzöld színű, kompakt növények
(Fotó: Rikk Péter)

5.2 Transzformációs módszerek

5.2.1 Virágbemártásos transzformáció (floral dip)

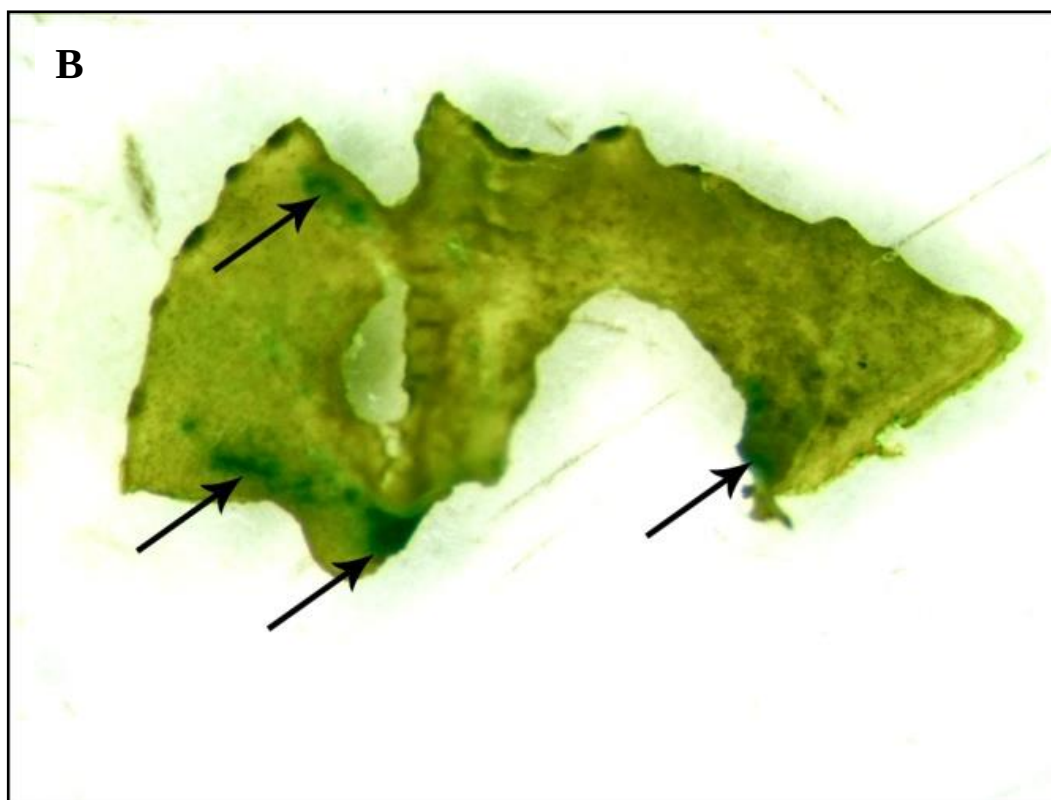
A fitotronba helyezett növényeken *Diplotaxis tenuifolia* esetében 3 hét elteltével körülbelül 21%-ban, míg az *Eruca sativa* esetében 4 héttel a virágbemártás után 14%-ban fejlődött termés a bemártott virágokból. A teljesen kifejlett, de még fel nem nyílt terméseket begyűjtöttük és szobahőmérsékleten kiszárítottunk (11. ábra).



11. ábra: Érett, teljesen kifejlett, de még fel nem nyílt *Eruca sativa* termések
(Fotó: Rikk Péter)

5.2.2 Levélkorongos transzformáció

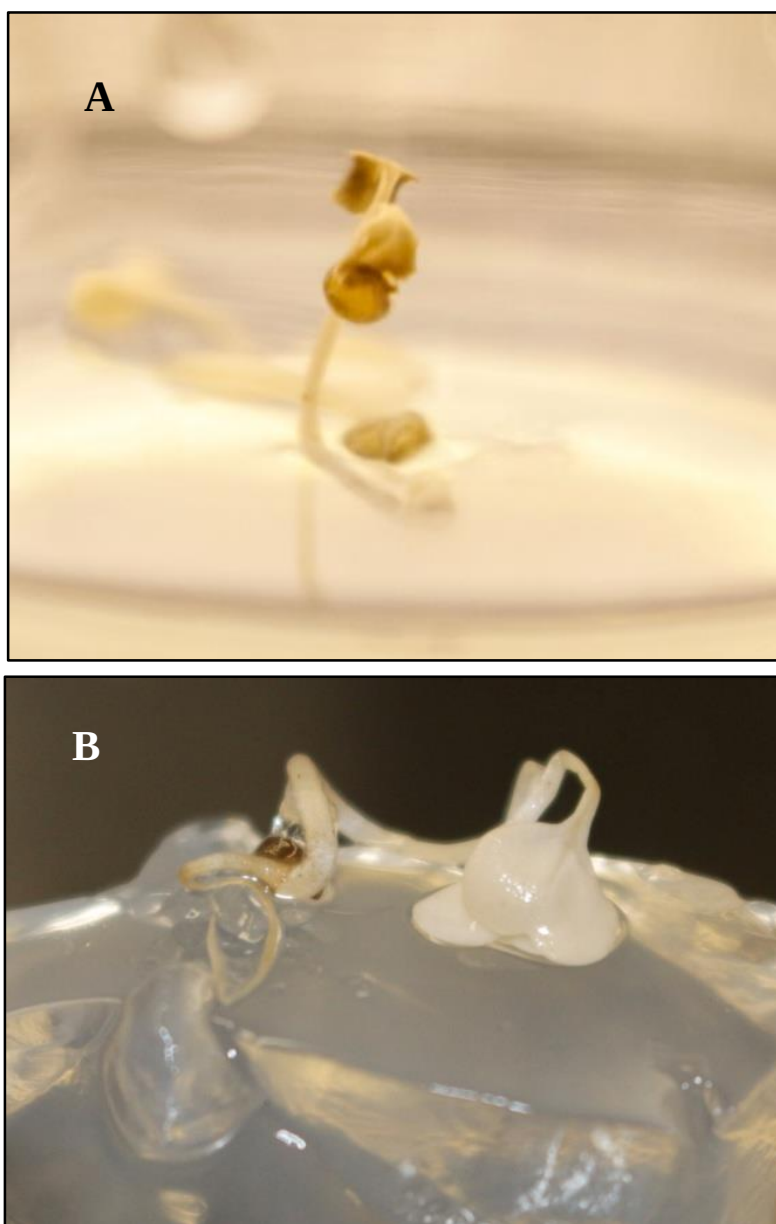
Az enzimaktivitás következtében megjelenő kék színreakciót sztereómikroszkóp alatt, vizuálisan értékeltük és fényképeztük. Mint ahogy az a 12. ábrán is látszik, a vágási felületek mellett vizuálisan is érzékelhető kék színreakció megjelenése alapján feltételezzük, hogy a gén beépült a genomba és ott expresszáldott. Mivel EHA101 *Agrobacterium* törzs sikeresen transzformálta mindkét faj sejtjeit, így az további kísérletekben felhasználható.



12. ábra: A GUS teszt során kapott kék színreakció *Eruca sativa* (A) és *Diplotaxis tenuifolia* (B) levéldarabokon
(Fotó: Oláh Róbert)

5.3 A transzformált virágokból fejlődő magok szelekciója

A 20 mg/l kanamicin koncentrációjú NN táptalajra vetett magok 100%-ban kicsíráztak és továbbfejlődtek. A beállított kontrollkísérletünk eredményeként megállapítottuk, hogy a *Diplotaxis tenuifolia* esetén a 160 mg/l az a koncentráció melyen a nem transzformált kontroll növények magjai még kicsíráznak, de a két szikleveles állapot után kifehérednek és elhalnak. *Eruca sativa*-nál ez a kritikus koncentráció a 60 mg/l volt (13. ábra).



13. ábra: Két szikleveles állapot után kifehéredett és elpusztult *Diplotaxis tenuifolia* (A) és *Eruca sativa* (B) növények (Fotó: Rikk Péter)

A továbbiakban kísérletünk eredményeit felhasználva a transzformált virágokról származó magok szelekciójára ezen koncentrációkat alkalmaztuk. A 20 mg/l kanamicin koncentrációjú táptalajon fejlődő *Diplotaxis tenuifolia* növényekről a felső 2 cm hosszúságú, levelet is tartalmazó hajtáscsúcsi részeket lamináris fülke alatt áthelyeztük az előbbieken megállapított magasabb koncentrációra, ahol körülbelül két hét után 70%-os pusztulást tapasztaltunk. Az életben maradt növényeket GUS tesztnek vetettük alá, a vizsgált levéldarabokon azonban nem tapasztaltunk kék színreakciót.

A transzformált növényekről származó magokat mindkét faj esetében két részletben vetettük el a szelekciós táptalajra, az állomány esetlegesen felmerülő teljes befertőződéséből következő sikertelen kísérlet elkerülése végett. Minden vetés esetében a magok 100%-ban kicsíráztak, azonban csíranövények a szelekciós táptalajt tartalmazó bébiételes üvegbe való áthelyezésük után néhány nappal elpusztultak mindkét faj esetében.

6. Következtetések

Szelekciós kísérleteink során megállapítottuk, hogy mind a *Diplotaxis tenuifolia* mind az *Eruca sativa* rendelkezik bizonyos fokú kanamicin toleranciával.

Az a tény, hogy azok a *Diplotaxis tenuifolia* hajtásdarabok, melyek az alacsonyabb 20 mg/l kanamicin koncentrációjú táptalajról lettek a 160 mg/l antibiotikum koncentrációjú szelekciós táptalajra áthelyezve és életben maradásuk ellenére a GUS test során negatív eredményt mutattak, valószínűleg annak tudható be, hogy csírázáskor magasabb a faj antibiotikum érzékenysége, mint kifejlett növény állapotában.

Xiuren és munkatársai (2006) leírták, hogy a virágbemártásos transzformáció sikerességének gyakorisága 1%-körüli *Arabidopsis thaliana* esetében. Kísérleteink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy *Diplotaxis tenuifolia* és *Eruca sativa* esetében valószínűleg még ekkora hatékonyságról sem beszélhetünk; bár megfelelő nagyságú növényállomány és elegendő mennyiségű transzformált virág hiányában elhamarkodott bármilyen következtetés levonása a sikeres transzformációk gyakoriságával kapcsolatban. Messzemenőbb konklúziók levonásához további kísérletek szükségesek, melyekben, mint ahogy az a *Brassicaceae* család más képviselőinél látszik, kitüntetett figyelmet kell fordítani több, a transzformációs gyakoriságot befolyásoló tényezőre. Ezek a tényezők: (1) a növény fenológiai állapota; (2) a felületaktív anyagok kiválasztása (3) valamint ezek koncentrációja; (4) hozzáadott cukor vagy fruktóz használata (5) továbbá ezek koncentrációja a bemártásos közegben; (6) a virágbimbók inokulációs közegbe történő bemártásának ideje; (7) végül pedig a floral dip utáni növénytakarás alkalmazása.

Továbbiakban a transzformációs kísérleteket magasabb növény számmal szeretnénk megismételni és a szelekció során életben maradt feltételezett transzformáns növényeket a GUS teszten kívül PCR (Polymerase Chain Reaction) vizsgálatoknak kívánjuk alávetni. A PCR analízis során célunk a bevitt gének jelenlétének kimutatása.

Szepesi Kinga (2013) a *Diplotaxis tenuifolia* növények vizsgálata során két vágási felülettel rendelkező levéldarabok hormonmentes táptalajra helyezésekor organogenezist tapasztalt, majd ezekből teljes növényeket regenerált. A mi kísérleteink pedig azt mutatták, hogy a levélkorongok transzformációja során az EHA101 *Agrobacterium* törzs sikeresen transzformálta mindkét faj sejtjeit. Ezekből a megállapításokból a következő következtetéseket vontuk le: (1) Első lépésként érdemes megvizsgálni, hogy az *Eruca sativa* növényeknél is tapasztalható-e organogenezis levéldarabokon. (2) A virágbemártásos transzformáció mellett a

levéldarabok transzformálásával majd ezek regenerálásával is érdemes megpróbálni transzgenikus növények előállítását mindkét faj esetében.

7. Összefoglalás

Kísérletünk során a *Diplotaxis tenuifolia* és az *Eruca sativa* genetikai transzformációját tűztük ki célul a Xiuren és munkatársai (2006) által *Arabidopsis thaliana*-nál sikeresen alkalmazott floral dip (virágbemártásos) módszerrel, hogy megvizsgáljuk a tapasztalt (1% körüli) hatékonyság mellett alkalmazható-e a módszer a fent említett két növényfaj esetében. Továbbá célként tűztük ki mindkét faj levélkorongokra alapozott transzformációját is.

A transzformációs kísérletekhez szükséges növényanyag előállításához mindkét faj esetében magokat vetettünk. A magokat elsőként üvegházban virágföld és perlit keverékébe vetettük, azonban a csírázás után nem sokkal 100%-os palántadőlést tapasztaltunk, így a föld-perlit keverék sterilizálásával és steril magvetéssel próbálkoztunk, ami eleinte ígéretesnek tűnt, de az akklimatizáció során a föld-perlit keverék gombásodásával szembesültünk. Próbálkoztunk gombaölő szer használatával, ami sikertelennek bizonyult, így a továbbiakban előnevelt növények virágoztatásával folytattuk a kísérletet. A növények virágoztatása fitotronban történt. Mindkét fajnál háromszor végeztünk virágbemártásos agrobaktériumos kezelést az *Arabidopsis*-nál leírtak szerint. *Diplotaxis tenuifolia* esetében a bemártott virágok körülbelül 21%-nál, *Eruca sativa*-nál pedig 14%-nál tapasztaltunk termésfejlődést. Elsőként a *Diplotaxis*-ról begyűjtött magok egy részét vetettük el 20 mg/l kanamicin koncentrációjú NN táptalajra. Ennél a koncentrációnál nem tapasztaltunk szelekciós hatást. Az irodalmi tapasztalatok alapján 20-500 mg/l koncentrációig vizsgáltuk a kanamicin hatását, hogy megállapíthassuk melyik optimális a nem-transzformált növények szelekciójára. A kísérletben a 160 mg/l kanamicint tartalmazó táptalaj bizonyult optimálisnak. Ezek után a *Diplotaxis* magoknál a továbbiakban ezt a koncentrációt alkalmaztuk és a korábban 20 mg/l kanamycin koncentrációjú táptalajon csíráztatott növények hajtásait is áthelyeztük erre a táptalajra. A szelekció során a növények nagy részénél klorotikus tünetek jelentkeztek, és a növények elpusztultak. A szelekció során életben maradt növények leveleit GUS teszttel vizsgáltuk. A kísérletben a GUS teszt során vizsgált növényi minták GUS aktivitást vizuálisan nem mutattak.

E. sativa esetében a magvetést a megfelelő kanamicin koncentráció meghatározásával kezdtük. A kísérletben a 60 mg/l koncentráció bizonyult optimálisnak a szelekcióhoz. Az *Eruca* magok esetében azonban 100%-os növénypusztulást tapasztaltunk.

A továbbiakban a GUS teszt mellett tervezzük még a növények DNS amplifikáción alapuló PCR vizsgálatát is a transzformáció sikerességének bizonyítása érdekében.

Levélszövet transzformációs kísérletünk során mindkét faj esetében *in vitro* körülmények között nevelt növények leveleit használtuk. A növényekről körülbelül 0,5 cm nagyságú levéldarabokat választottunk le melyeken 4 vágási felületet ejtettünk, ezeket fonáki oldalukkal lefelé NN táptalajt tartalmazó petricsészékbe helyeztük és az EHA101(pTd33) *Agrobacterium tumefaciens* törzset tartalmazó szuszpenzióval kezeltük. 24 óra kokultivációt követően a levéldarabokat antibiotikumokat tartalmazó (20 mg/l kanamycin, 300 mg/l claforan, 300 mg/l carbenicillin) steril desztillált vízzel lemostuk és GUS tesztnek vetettük alá. A GUS teszt vizuális értékelése során megállapítottuk, hogy az EHA101(pTd33) *Agrobacterium tumefaciens* törzs sikeresen transzformálta mindkét faj sejtjeit.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik e dolgozat elkészülését lehetővé tették. Dr. Pedryc Andrzej tanszékvezető úrnak, aki lehetőséget biztosított a kutatásra. Köszönöm konzulensemnek Dr. Zok Anikónak, Dr. Oláh Róbertnek valamint Szepesi Kingának, hogy segítettek munkám és jó tanácsokkal láttak el. Végül köszönöm a Genetika és Növénynevelés Tanszék minden munkatársának támogatását.

Irodalomjegyzék

1. Ball, E., 1946. Development in sterile culture of stem tips and subjacent regions of *Tropaeolum majus* L. and *Lupinus albus* L. Amer. J. Bot. 33: 301-318.
2. Batra, A., Dhingra, M. 1991. Production of plantlets of *Eruca sativa* in vitro. In: J Phytol Res. 4: 73.
3. Bechtold, N., Ellis, J. Pelletier, G. 1993. In plant *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sci. 316: 1194–1199.
4. Bravo-Angel, A. M., Gloeckler, V., Hohn, B. and Tinland, B. 1999. Bacterial conjugation protein MobA mediates integration of complex DNA structures into plant cells. J. Bacteriol. 181: 5758-5765.
5. Christou, P. 1996. Transformation technology. Trends Plant Sci. 1: 423–431.
6. Clough, S. J., Bent, A. F. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal. 16(6): 735–743.
7. Curtis, I. S., Nam, H. G., 2001. Transgenic radish (*Raphanus sativus* L. *longipinnatus* Bailey) by floral-dip method – plant development and surfactant are important in optimizing transformation efficiency. Transgenic Research. 10: 363-371.
8. Dudits D., Heszky L. 2003. Növényi biotechnológia és géntechnológia. 2. átd. bőv. kiad. Budapest. Agroinform kiadó. p. 98-128.
9. Hansen, G., Wright, M. S. 1999. Recent advances in the transformation of plants. Trends In Plant Science. 4: 226-231.
10. Hooykaas, P.J.J. and Schilperoort, R.A. 1992. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. Plant Mol. Biol. 19: 15–38.
11. Ibarra, F., La Porte, J. 1947. Las Crucíferas del género *Diploaxis* adventicias en la Argentina. Rev. Argent. Agron. 14:261-272.

12. Jefferson, R. A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5: 387-405.
13. Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. and Bevan, M. W. 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.
14. Khatun, A., Davey, M. R., Power, J. B., Lowe, K. C. 1993. Stimulation of shoot regeneration from jute cotyledons cultured with nonionic surfactants and relationship to physio-chemical properties. *Plant Cell Reports.* 13: 49–53.
15. 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.
16. Loo SW (1945) Cultivation of excised stem tips of asparagus *in vitro*. *Amer. J. Bot.* 32: 13–17.
17. Martínez-Laborde, J. B. 1996. A brief account of the genus *Diplotaxis*. Rocket: a Mediterranean crop of the World. 1996. december 13-14. Legnaro (Padova). p: 13-23.
18. Martínez-Sánchez, A., Marín, A., Llorach, R., Ferreres, F., Gil, M. I. 2006. Controlled atmosphere preserves quality and phytonutrients in wild rocket (*Diplotaxis tenuifolia*). *Postharvest Biology and Technology.* 40: 26–33.
19. Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., Koornneef M. 1998. *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science.* 282: 662-681.
20. Morel, G., 1960. Producing virus-free cymbidiums. *American Orchid Society.* 29: 495–497.
21. Nielsen, T., Bergström B., Borch, E. 2008. The origin of off-odours in packaged rucola (*Eruca sativa*). *Food Chemistry.* 110: 96-105.
22. Nitsch, J. P. and Nitsch, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 169: 85–87.

23. Nyitrai L. (szerk.) 2013. Géntechnológia és fehérjemérnökség. Budapest. TÁMOP-4.1.2.A/1-11/1-2011-0073.
24. Omirou, M., Papastefanou, C., Katsarou, D., Papastylianou, I., Passam, H.C., Ehaliotis, C., Papadopoulou, K.K. 2012. Relationships between nitrogen, dry matter accumulation and glucosinolates in *Eruca sativa* Mills. The applicability of the critical NO₃-N levels approach. Plant and Soil. 354:347–358.
25. Parkash, S., Chowdhury, JB., Jain, RK. 1989. Callus initiation and regeneration potential in different genotypes of *Eruca sativa*. Curr Sci. 58: 979–980.
26. Pedryc, A., György, Zs., Halász, J., Hegedüs, A., Oláh, R. 2011. A genetika és növénynemesítés alapjai. Budapesti Corvinus Egyetem Kertészettudományi Kar. p. 132-146.
27. Pignone, D. 1996. Present status of rocket genetic resources and conservation activities. Rocket: a Mediterranean crop of the World. 1996. december 13-14. Legnaro (Padova). p: 2-12.
28. Qing, C. M., Fan, L., Lei, Y., Bouchez, D., Tourneur, C., Yan, L., Robaglia, C. 2000. Transformation of Pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*) by *Agrobacterium* infiltration. Molecular breeding. 6: 67-72.
29. Siemens, J., Schieder, O. 1996. Transgenic plants: genetic transformation – recent developments and state of the art. Plant Tissue Culture and Biotech. 2: 66–75.
30. Slater, S. M. H., Keller, W. A., Scoles, G. 2011. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Eruca sativa*. In: Plant Cell Tiss Organ Cult. 106: 253–260.
31. Szegedi, E., Oberschall, A., Bottka, S., Oláh, R., 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.
32. Szepesi, K. 2013. Rukkola mikroszaporítása és regenerációja. Szakdolgozat. Budapesti Corvinus Egyetem, Genetika és Növénynemesítés Tanszék.
33. Velich, I. (szerk) 2001. Növénygenetika. Budapest. Mezőgazda Kiadó. p. 397-402.

34. Wang, W. C., Menon, G., Hansan, G. 2003. Development of a novel *Agrobacterium*-mediated transformation method to recover transgenic *Brassica napus* plants. Plant Cell Reports. 22: 274-281.
35. Weising, K., Schell, J., Kahl, G. 1988. Foreign genes in plants: transfer, structure, expression and applications. Annu. Rev. Genet. 22: 421–477.
36. Xiuren, Z., Rossana, H., Shih-Shun, I., Qi-Wen, N., Nam-Hai, C. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. Nature Protocols.
<http://www.nature.com/nprot/journal/v1/n2/full/nprot.2006.97.html>
37. Xu, H., Wang, X., Zhao, H., Fan, L. 2008. An intensive understanding of vacuum infiltration transformation of pakchoi (*Brassica rapa ssp. chinensis*). Plant Cell Reports. 27: 1369-1376.