

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei



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 MUNKA ELŐZMÉNYEI

A sikeres genetikai transzformációs kísérletek alapja a hatékony növény-sejt-növény regenerációs rendszer, valamint a gyakorlat számára hasznosítható génkonstrukciók. Napjaink irodalmát áttekintve elmondhatjuk, hogy a különböző transzformációs eljárásoknál gyakran használnak embriogén tenyészeteket. A szomatikus embriók indukciójára, valamint a transzgenikus növények regenerációjára többféle eljárás létezik. Az eljárások közötti leglényegesebb különbségek az indukáláshoz felhasznált növényi részekből és a táptalajok eltérő hormontartalmából adódnak. Perrin és mtsai. (2004) embriogén kalluszindukációs kísérleteikben portokokat, Harst és mtsai. (1995) levélkorongokat, Kikkert és mtsai. (2005) ováriumokat, Martinelli és mtsai. (1993) pedig levélnyél darabokat helyeztek táptalajra. Maillot és mtsai. (2006) kísérleteik során megállapították, hogy a szomatikus embriogenezis erősen genotípus függő. Embriogén kallusz fejlődés indukálására körülbelül 10 féle növekedésszabályozó anyagot használnak a gyakorlatban, a szőlőfajták széles körében leggyakrabban a 2,4-D és BA kombinációját alkalmazzák (Pino-Sintra 2007, López-Pérez et al. 2005).

Magyarországon már évtizedekkel ezelőtt megkezdődött az új fagyűrő és betegségekkel szemben ellenálló szőlőfajták keresztezéses nemesítése. A keresztezéses szőlőnemesítés rendkívül idő- és költségigényes feladat, és egy új szőlőfajta piacra kerülését akár húszévnnyi munka is megelőzheti. 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 konzervatívizmus, valamint a világfajták piacmeghatározó szerepe miatt. A molekuláris nemesítési módszerek azonban lehetővé teszik olyan új genotípusok létrehozását, amelyek akár csak egyetlen tulajdonságban különböznek a kiindulási fajtától. A genetikai transzformációs kísérletek Magyarországon Mozsár és mtsai. (1998) munkájával kezdődtek. Kísérleteik során riporter génnel transzformált 'Georgikon 28' növényeket állítottak elő. Oláh és mtsai. (2003a) portok eredetű embriogén kalluszt transzformálva sikeresen állítottak elő *nptII/GUS* génnel transzformált 'Richter 110' és 'St. George' vonalakat.

Az abiotikus és biotikus stressz, mint a legfőbb limitáló tényező játszik szerepet a növények produkciójában. Stresszhatás következtében a reaktív oxigén fajták gyors akkumulációja figyelhető meg a sejtekben. A legkárosabb termelődő reaktív oxigénfajta a hidroxil gyök (OH[°]), melynek képződése a sejten belül előforduló szabad vas ionok

jelenlététől függ (Halliwell and Gutteridge 1986). A hidrogén-peroxid (H_2O_2) a Fenton-reakción keresztül szabad 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 pedig kárt tud tenni a biológiailag fontos makromolekulák minden csoportjában, különösen a nukleinsavakban (Henle and Linn 1997). Mivel az intracelluláris vas katalizálja az oxidatív reakciókat, a szabad vas koncentrációjának szabályozása egy lehetséges módja lehet az oxidatív károk csökkentésének (Deák et al. 1998). Az élő szervezetekben széles körben elterjedt fehérje a ferritin (Theil 1987), amely egy burokba gyűjti a vasnak az élő sejtekben oldott állapotban jelenlévő formáját (Fe^{2+}), oxidálja is azt (Fe^{3+}), ezáltal a hidrogén-peroxid (H_2O_2) nem jut elektronhoz. A növényi ferritin a kloroplasztiszban lokalizálódik. Deák és mtsai. (1998) lucernából származó ferritin génnel transzformált dohány növényeket állítottak elő.

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 et al. 1998).

A tumorképződésért és az opinszintézisért az *Agrobacterium* sejtekben található Ti-plazmid felelős (Weising and Kahl, 1996; Zupan and Zambryski, 1995). A baktériumfertőzés során a Ti-plazmid egy része, az ún. transzfer vagy T-DNS átkerül a növényi sejtekbe, és stabilan integrálódik a sejt DNS állományába. A folyamatban a Ti plazmidon lévő virulencia (*virA* - *virG*) régióknak van meghatározó szerepe. 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. Szegedi és mtsai. (2001) azt feltételezik, hogy ha a VirE1 fehérjéje már az *Agrobacterium* fertőzés előtt jelen van a növényben, akkor a transzportálódó VirE2 fehérjék megkötése miatt a növényi sejtbe érkező T-DNS hozzáférhető lesz a növényi nukleázok számára. A két fehérje közötti kapcsolat megfelelő hatékonysága esetén pedig a tumorok kialakulása elmarad és az *Agrobacterium* elleni rezisztencia kialakulhat.

A tumorok kialakulásáért három integrálódó onkogén (*iaaH*, *iaaM* és *ipt*) által kiváltott auxin és citokinin túltermelés a felelős (Winans 1992). 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 (citokinint) 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 (Burr et al. 1998).

CÉLKITŰZÉS

1. Embriogén kallusz indukálása és felszaporítása különböző fajták esetében.
2. A regeneráció hatékonyságának növelése.
3. Genetikai transzformációs kísérletek különböző génkonstrukciókkal agrobaktérium és oxidatív stressz rezisztens növények előállítására:
 - Lucerna ferritin génnel transzformált 'Richter 110' növények előállítása az EHA105(pRok2Ferr) vektorkonstrukció felhasználásával.
 - *Agrobacterium* rezisztens transzgenikus 'Richter 110' növények előállítása az EHA101(pTd93virE1) vektorkonstrukció felhasználásával, az *Agrobacterium tumefaciens virE1* génjének expresszáltatásával; valamint az EHA101(pJP17) vektorkonstrukció felhasználásával a géncsendesítés mechanizmusának aktiválása.
4. A különböző génkonstrukciók expressziójának és hatásának tesztelése a transzformált vonalakban.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Embriogén kallusz indukció és felszaporítás

Embriogén kallusz indukciós kísérleteinkhez a virágzás előtt begyűjtött virágzatokból kipreparált portokokat használtuk fel. A virágbimbókat 10%-os NaOCl oldatban (Clorox) 15 percig fertőtlenítettük, majd háromszor 10 percre desztillált vízbe merítettük. A 'Chardonnay' vesszőkről begyűjtött virágzatok sterilizálása során kipróbáltuk a 7%-os Ca(OH)₂ oldatot is. A kipreparált portokokat portoknyéllel együtt helyeztük a táptalajra. Az embriogén kallusz indukálását 12 különböző szőlőfajta portok tenyészetein kíséreltük meg. Az 'Arany sárfehér', '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 (1. táblázat) 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, az (2.) MST táptalaj (Oláh et al. 2003a) 0,05 mg/l TDZ-t és 1,1 mg/l 2,4-D-t tartalmazott. Az (3.) MSE/2 egy módosított MSE táptalaj, amely fele koncentrációban tartalmazta a makroelemeket. Az (4.) NNE táptalaj a Nitsch és Nitsch (1969) által leírt táptalaj, amely a 1,1 mg/l 2,4-D és 0,1 mg/l BA hormonkombinációt tartalmazta.

Az embriogén kallusz indukciós kísérleteket 6 ismétlésben 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.

Oláh és munkatársai (2008) kísérleteikben az 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 CP táptalajt (Chée and Pool 1987) embriogén kallusz felszaporítására (CPE táptalaj, 1. táblázat).

1. táblázat: Felhasznált táptalajok.

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

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 (1. táblázat). 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.

Szólótranszformáció az *MsFerr*, *iaaM* és *virE1* gének felhasználásával

A ‘Richter 110’ portokokon fejlődött és felszaporított embriogén kalluszt használtuk fel a transzformációs kísérletekhez. Az embriogén kallusz tenyészeteket 2 hétre MS/2 táptalajra helyezettük (1. táblázat), hogy szomatikus embriófejlődést indukáljunk.

Az oxidatív stressztűrő képesség növelésére irányuló kísérleteinkben az EHA105(pRok2Ferr) vektorkonstrukciót használtuk fel. Az EHA105(pRok2Ferr) plazmid konstrukció tartalmazza a neomicin-foszfo-transzferáz (*nptII*) szelekciós markergént és a lucerna ferritin gént. A ferritin gén működését az elé beépített karfiol mozaikvírus CaMV 35S

promóter szekvenciája irányítja. Deák és munkatársai (1998) bizonyították, hogy a gén kezdő szakasza felelős a fehérjetermék kloroplasztisban történő megnyilvánulásáért.

Az EHA101(pTd93virE1) konstrukció hordozza az *nptII* szelekciós marker gént és a CaMV 35S promóter irányítása alatt álló *A. tumefaciens virE1* gént (Szegedi et al. 2001). A géncsendesítés mechanizmusának indukálásához felhasznált EHA101(pJP17) konstrukció a *A. tumefaciens* A348 *iaaM* génnek az első 1797 bázispár hosszú kódoló részét, az *ipt* génnek pedig a teljes kódoló szekvenciáját tartalmazza a CaMV 35S ill. FMV promóterek után (Lee et al. 2003, Viss et al. 2003).

Az agrobaktériumos kezelés során a különböző baktérium törzsekből szuszpenziót készítettünk (kb. 10^8 sejt/ml), amelyet pipettával juttattunk rá a hormonmentes szilárd táptalajon indukált 1-2 mm-es embriókból álló tenyészetek felületére, majd két nap kokultiváció következett. A baktérium elölése érdekében a kokultiváció után az embriogén tenyészeteket 300 mg/l Carbenicillint (carbenicillin disodium) és 300 mg/l Claforánt (cefotaxim) tartalmazó szilárd hormonmentes MS/2 táptalajra helyeztük át (Oláh et al. 2003b). Kísérleteink során szelekciós ágensként 20 mg/l kanamicint használtunk. Antioxidánsnak 4 g/l vízben oldhatatlan polivinylpyrrolidont (Polyclar AT) és 0,1 g/l dithioerythritolt (DTE) használtunk (Oláh et al. 2003b). A tenyészeteket havonta friss táptalajra helyeztük át.

Növényregeneráció és akklimatizáció

A torpedó és korai szikleveles stádiumú embriókat folyamatosan leválasztottuk, és antioxidánsokat már nem tartalmazó szilárd MS/2 táptalajjal töltött tenyészedeényekbe helyeztük át, majd 24°C-on 16 óra megvilágítás mellett neveltük tovább.

Kísérleteink során többféle módszert is kipróbáltunk a növényregeneráció nehézségeinek leküzdése érdekében. Az EHA105(pRok2Ferr) vektorral transzformált abnormális fejlődést mutató embriók pusztuló gyökérnyaki részének eltávolításával megpróbáltunk gyökérfejlődést indukálni, amely a későbbiekben kiválthatja a szabályos hajtásfejlődést; valamint (1.) két év szelekciót követően antibiotikummentes MS/2, illetve (2.) citokinin (0,22 mg/l BA) és kanamicin tartalmú MS/2 táptalajra helyeztük a rendellenes fejlődésű embriókat.

A regenerálódott növényeket felszaporítottuk úgy, hogy a hajtáscsúcsot és az alatta található kétrügyes hajtásrészt helyeztük friss MS/2 táptalajra. Az akklimatizáció során kétrügyes mikrodugványokat helyeztünk négy különböző gyökereztető közegbe. A kísérlet során a tenyészedeényekbe 50 ml perlitet, kőzetgyapotot (4x4x4 cm-es, Grodan;

www.grodan.com) és előnedvesített tőzegkockát (3x3x4 cm-es, pit-pot; www.pit-pot.com) helyeztünk, kontrollként pedig 6 g/l agarral szilárdított csapvizes agart használtunk. A közegeket csapvízzel nedvesítettük. A tenyészedények tetejét fokozatosan eltávolítottuk, majd 4-5 hét után az edzett és begyökeresedett növényeket tőzeg-homok-perlit 1:1:1 arányú keverékébe ültettük ki.

A beépített DNS jelenlétének ellenőrzése PCR analízissel

A DNS izoláláshoz a fényen nevelt növények hajtásairól 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 PCR reakció során az *nptIIIR* (5'-AGGCGAGGCGGCTATGACTG-3') és *nptIIF* (5'-ATCGGGAGCGGCGATACCGTA-3') primereket használtuk a szelekciós markergén 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 a FerrFw1 (5'-GTCACGGTGTGTGGCACTTTGA-3') és FerrRev2 (5'-AGACAGAGCCAATTCATGGCA-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 *virE1* gén jelenlétét pedig az (5'-CCATCATCAAGCCGCA-3') és (5'-CTCCTTCTGACCAGCAAGA-3') primerekkel ellenőriztük (Szegedi et al. 2001).

A transzformánsok oxidatív stressztűrő képességének vizsgálata

A paraquat hatására fényen oxigén szabadgyökök képződnek a kloroplasztiszokban, ezért az pRok2Ferr transzformánsok oxidatív stressztűrő képességének vizsgálatához 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 3 µM, 4 µM koncentrációjú paraquat-diklorid (1,1-dimetil-4,4-bipiridilium-

diklorid) oldatot használtunk. A kezelés során a transzformáns és kontroll növények leveleit 3 órán keresztül, sötétben úsztattuk a különböző koncentrációjú paraquat oldatokban. Ezután a mintákat 1 órán keresztül $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotoszintetikusan aktív fénnel világítottuk meg. A kezelés előtti és utáni klorofillfluoreszcencia-méréseket pulzus amplitúdó-modulált fluoriméter, Imaging PAM (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany) segítségével végeztük a Schreiber és mtsai. (1986) által leírt protokoll szerint.

***Agrobacterium* rezisztencia vizsgálatok**

Az EHA101(pTd93virE1) vektorral transzformált *in vitro* 'Richter 110' növényeket az *A. vitis* Tm4 törzssel fertőztük steril körülmények között. 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. A kísérletekben pozitív kontrollként nem-transzformált 'Richter 110' növényeket használtunk. A fertőzéshez a különböző törzsekből steril desztillált víz felhasználásával baktérium szuszpenziót készítettünk ($\text{OD}_{600} = 0,5-1,0$), majd a növények hajtásain a náduszkok közelében lándzsátű segítségével ejtett sebzésekre pipettával vittük fel az 1 μl baktérium szuszpenziót, és azt a lándzsátűvel be is dolgoztuk a sebbe. Növényenként három fertőzést végeztünk. A növényeken az eredményeket 6 hét elteltével értékeltük.

Kísérleteinkben a tanszéki nemesítésű fajták *Agrobacterium* ellenállóságát is teszteltük. A tesztelés során az *A. tumefaciens* C58, az *A. vitis* Tm4, AB3, AT1 és S4 törzsekkel fertőztük a 'Pegazus', 'Csépi muskotály', 'Borostyán', 'Odysseus', 'Orpheus', 'Taurus', 'Korai bíbor' és 'Pannon frankos' fajtákat. Pozitív kontrollként a fogékony 'Kékfrankos' és 'Szőrkebarát', negatív kontrollként pedig a rezisztens 'Kunbarát' fajtát használtuk (Szegedi 1981).

EREDMÉNYEK

Embriogén kallusz indukció és felszaporítás

A szőlő embriogén kapacitása erősen genotípus-függő, ezért az embriogén kallusz indukciós 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. Az 'Arany sárféher' 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. Kísérleteinkben többféle típusú kallusz jelent meg, ezek közül csak a világossárga, keményebb állagú, proembrionális szerkezetet mutató, gömbszerű képletekből felépülő kalluszcsomók 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.

2. táblázat: Az embriogén kallusz indukációs kísérletek eredményei MSE ill. MST táptalajon.

| Fajták | Az embriogén kallusz indukáció 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

3. táblázat: Az embriogén kallusz indukációs 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

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 Ca(OH)₂ oldat is, melynek létjogosultsága a szőlő klórérzékenységevel indokolható.

Az MSE és CPE táptalajokon felszaporított 'Richter 110' embriogén tenyészetek vizsgálatokor minőségbeli eltéréseket figyeltünk meg. A CPE táptalajon fenntartott kallusz morfológiailag eltért az MSE táptalajon fenntartott kallusztól, ami valószínűsíthetően az embriogén jellegű struktúrák szelektálódásából és felszaporodásából, valamint a nem-embriogén struktúrák nekrozisából adódott.

A növényregeneráció hatékonysága nagymértékben függ a kiindulási anyag minőségétől. A 'Richter 110', 'Teleki 5C' és 'Chardonnay' fajták esetében a folyékony MSNOA táptalajt használtunk a számunkra kedvezőbb állapotú, kis vakuolumokkal rendelkező, gyorsan osztódó sejtek felszaporítására. A folyékony MSNOA táptalajban 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.

Szőlőtranszformáció

Genetikai transzformációs kísérleteink során sikeresen állítottunk elő lucerna ferritin génnel transzformált 'Richter 110' növényeket az EHA105(pRok2Ferr) vektorkonstrukció felhasználásával. *Agrobacterium* rezisztens növények előállítását célzó transzformációs kísérleteink során az EHA101(pTd93virE1), valamint az EHA101(pJP17) vektorkonstrukciók felhasználásával állítottunk elő transzformált 'Richter 110' növényeket. A transzformáció sikerességét PCR analízissel ellenőriztük. A vizsgált növényi mintákban sikeresen amplifikáltuk az *nptII* szelektációs markergént és a hasznos géneket. A *virC* specifikus primerek alkalmazásával pedig bizonyítottuk a növényi minták agrobaktérium mentességét.

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. 2009). 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 fómában történő felhalmozódását feltételezték, ahogy az a pRok2Ferr konstrukció alapján várható is volt.

Növényregeneráció és akklimatizáció

A növényregenerációt addig végeztük, amíg megfelelő számú növényt kaptunk a további vizsgálatokhoz. A 0,22 mg/l BA használata a szelekciós táptalajban (4. táblázat), illetve az abnormális fejlődésű embriók pusztuló gyökérszaki részének eltávolítása alkalmasnak bizonyult a transzformációs eljárásnak köszönhetően nagy mennyiségben előforduló abnormális fejlődésű pRok2Ferr transzformált embriók hajtásfejlődésének helyreállítására.

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

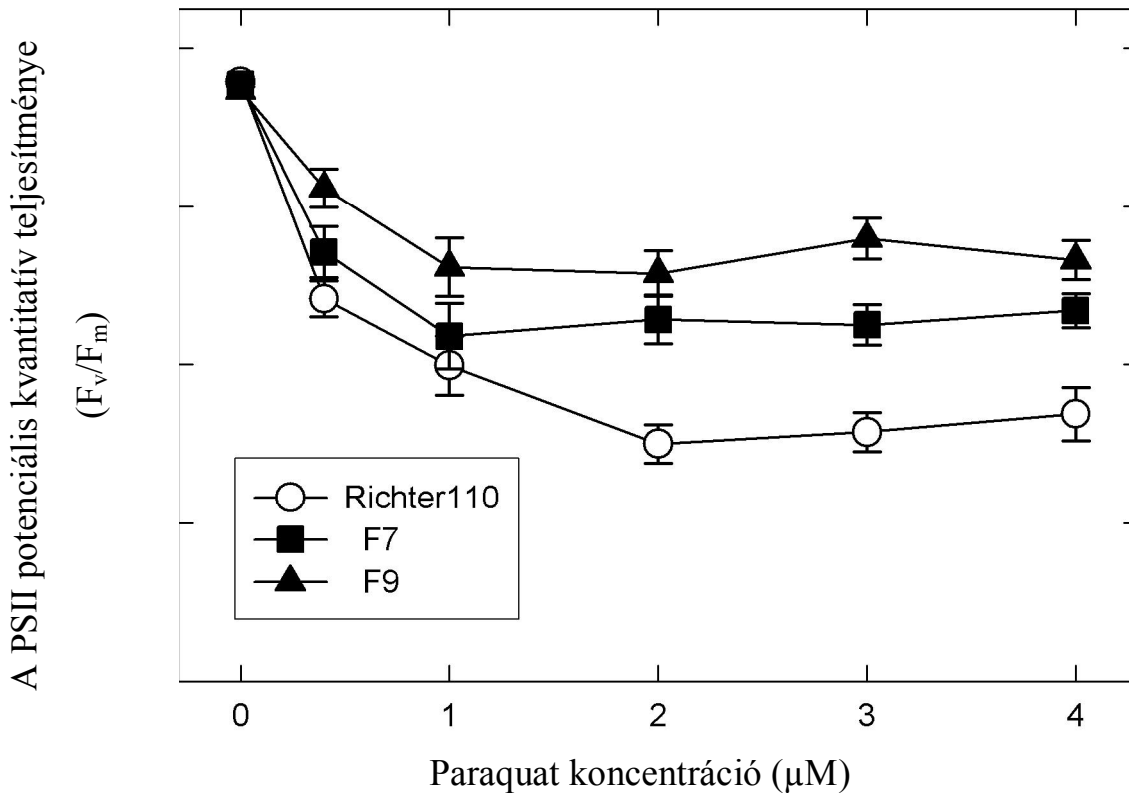
| Petri-csésze | MS/2 | MS/2+0,22 mg/l BA |
|----------------|--------------|-------------------|
| 1 | 0/38 (0) | 5/26 (19,2%) |
| 2 | 0/30 (0) | 2/23 (8,7%) |
| 3 | 3/33 (9%) | 9/25 (36%) |
| 4 | 0/32 (0) | 2/15 (13,3%) |
| 5 | 1/17 (5,8%) | 6/17 (35,3%) |
| 6 | 0/28 (0) | 7/22 (31,8%) |
| Átlag (szórás)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

A gyökérrel és hajtással rendelkező növényeket felszaporítottuk, gyökerezettük, akklimatizáltuk, majd üvegházban neveltük tovább. A gyökerezető közegek közül a perlit és a tőzegkocka is megfelelőnek bizonyult az agar kiváltására. A perlit előnye, hogy a benne gyökeresített növények elágazó gyökérzetet fejlesztettek.

A transzformánsok oxidatív stressztűrő képességének tesztelése

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, 1. ábra) esetében tapasztaltunk szignifikáns 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 μ 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 transzgenikus vonalak leveleiben a PSII

potenciális kvantitatív teljesítménye még a 4 μM paraquat koncentráció mellett sem esett vissza a felére.



1. 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.

***Agrobacterium* rezisztencia vizsgálatok**

Az EHA101(pJP17) vektorral transzformált, bizonyítottan transzgénikus ‘Richter 110’ növények *Agrobacterium* rezisztencia vizsgálata során 21 független vonalból 8 bizonyult egyértelműen rezisztensnek az A348 törzssel szemben, 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 törzssel való fertőzés során kapott negatív eredmények valószínűleg azzal magyarázhatóak, hogy a pJP17 konstrukció elkészítésénél ennek a törzsnek az *iaaM* és *ipt*

szekvenciáit használták fel. 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 szekvenciát tartalmazó, minden törzsnek ellenálló transzgenikus növényt létrehozni.

Az EHA101(pTd93virE1) vektorral transzformált növények *Agrobacterium* rezisztencia vizsgálata során 17 vonalból 9 rezisztensnek bizonyult az *A. vitis* Tm4 törzssel szemben. A kontroll növényekkel szemben, a rezisztens növényeken még 6 hét elteltével sem tudtunk tumor fejlődést megfigyelni. Ezen eredmények valószínűsítik, hogy a *virE1* gén alkalmas lehet a szőlőben *Agrobacterium* rezisztencia kialakítására.

A *V. amurensis* eredetű, tanszéki nemesítésű fajták *Agrobacterium* rezisztencia vizsgálatai során 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.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Elsőként sikerült embriogén kallusz fejlődést indukálnunk a 'Korai bíbor', 'Odysseus', 'Orpheus' és 'Pannon frankos' fajták tenyészetében.
2. Eredményesen alkalmaztuk a klór-mentes $\text{Ca}(\text{OH})_2$ oldatot az embriogén kallusz indukációs kísérletek céljára begyűjtött 'Chardonnay' virágzatok sterilizációjára.
3. 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.
4. 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.
5. Megállapítottuk, hogy a 'Richter 110' fajta számára a perlitben történő gyökereztetés a legmegfelelőbb eljárás az akklimatizáció hatékonyságának növelése érdekében.
6. Transzgenikus 'Richter 110' növényeket állítottunk elő az EHA105(pRok2Ferr) és EHA105(pRok2FerrFLAG) vektorkonstrukciók felhasználásával a szőlő oxidatív stressztűrő képességének növelésére irányuló kísérleteinkben.

7. Két transzgénikus vonalról bebizonyítottuk, hogy a nem-transzformált 'Richter 110' kontroll vonalhoz képest nagyobb oxidatív stressz toleranciával rendelkeznek.
8. 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.
9. Megállapítottuk, hogy a pJP17 konstrukció csak azon törzzsel szemben biztosít rezisztenciát, amelynek *iaaM* és *ipt* szekvenciáit a konstrukció elkészítésénél felhasználták.
10. 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.

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.

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

IRODALOMJEGYZÉK

1. 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.
2. Cheé, R. and Pool, R. M. 1987. Improved inorganic media constituents for *in vitro* shoot multiplication of *Vitis*. *Sci. Hortic.* 32: 85-89.
3. 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.
4. Deng, W., Chen, L., Peng, W.-T., Liang, X., Sekiguchi, S., Gordon, M. P., Comai, L. and 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.
5. 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.
6. Harst, M. 1995. Development of a regeneration protocol for high frequency somatic embryogenesis from explants of grapevines. *Vitis* 34 (1): 27-29.
7. Henle, E. S. and Linn, S. 1997. Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 272: 19095-19098.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Maillot, P., Kieffer, F. and Walter, B. 2006. Somatic embryogenesis from stem nodal sections of grapevine. *Vitis* 45: 185-189.
14. Martinelli, L. and Mandolino, G. 1994. Genetic transformation and regeneration of transgenic plants in grapevine (*Vitis rupestris* S.). *Theor. Appl. Genet.* 88: 621-628.

15. 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.
16. Mozsár, J. and Süle, S. 1994. Rapid method for induction of somatic embryogenesis from *Vitis riparia*. *Vitis* 33: 245-246.
17. Mozsár, J., Viczián, O., Süle, S. 1998. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of an interspecific grapevine. *Vitis* 37: 127-130.
18. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 155: 473-497.
19. Nitsch, J. P. and Nitsch, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 169: 85-87.
20. Oláh, R. 2005. A szőlő genetikai transzformációjának módszertani lehetőségei. BCE Kertészettudományi Kar, Genetika és Növénynevelés Tanszék, Doktori (PhD) értekezés. pp. 54-78.
21. Oláh, R., Szegedi, E., Ruthner, S. and Korbuly, J. 2003a. Thidiazuron-induced regeneration and genetic transformation of grapevine rootstock varieties. *Vitis* 42: 133-136.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. Szegedi, E. 1981. Szőlőfajták *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn-el szembeni fogékonysága. *Növényvédelem* 17: 442-450.
29. 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.
30. Theil, E. C. 1987. Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants and microorganisms. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 289-315.
31. 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.

32. 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.
33. Winans, S. C. 1992. Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. *Microbiol. Rev.* 56: 12-31.
34. Zok, A., Oláh, R., Hideg, É., Horváth, V. G., Kós, B. P., Majer, P., Váradi, G. and Szegedi E. 2009. Effect of *Medicago sativa* ferritin gene on stress tolerance in transgenic grapevine. *PCTOC* 100: 339-344.
35. Zupan, J. R. and Zambryski, P. 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol.* 107: 1041-1047.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ FŐBB PUBLIKÁCIÓK

Impaktfaktoros folyóiratcikkek:

Oláh R., **Zok A.**, Pedryc A., Howard S. and Kovács L.G. 2009. Somatic embryogenesis in a broad spectrum of grape genotypes. *Scientia Horticulturae* 120: 134-137. (IF 1,197)

Zok A., Oláh R., Hideg É., Horváth V. G., Kós B. P., Majer P., Váradi Gy. and Szegedi E. 2010. Effect of *Medicago sativa* ferritin gene on stress tolerance in transgenic grapevine. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 100: 339-344. (IF 1,243)

Novák E, **Zok A.**, Forgács I., Pedryc A. and Oláh R. 2011. Evaluation of regeneration capacity in grape towards the improvement of new cultivars with enhanced berry and wine quality. *Acta alimentaria* 40: 139-149. (IF 0,444)

Zok A., Forgács I., Pedryc A., Oláh R. and Szegedi E. 2012. *Agrobacterium tumefaciens virE1* inhibits crown gall development in transgenic grapevine. *Acta alimentaria* 41: 214-218. (IF 0,444)

Lektorált folyóiratban megjelent cikkek:

Zok A., Zielinska A., Oláh R. and Szegedi E. 2007. *In vitro* multiplication and hardening of grapevine plants in aeriated media. *International Journal of Horticultural Science* 13: 41-45.

Novák E., **Zok A.**, Oláh R. and Pedryc A. 2008. Genetic transformation: tool for genetically improving grapevines. *Hungarian Agricultural Research* 17: 18-22.

Novák E., **Zok A.**, Pedryc A. and Oláh R. 2008. Study of different factors of grapevine regeneration systems and genetic transformation. *International Journal of Horticultural Science* 14: 33-36.

Zok A., Bara K., Novák E., Ferenczy A., Pedryc A. és Oláh R. 2009. A mikroszaporított szőlő gyökeresedésének vizsgálata különböző közegekben. *Kertgazdaság* 41: 41-47.

Konferencia kiadványok (abstract):

Tóth A., Oláh R., Szegedi E. és Korbuly J. 2003. Genetikai transzformációs kísérlet *Agrobacterium* rezisztens szőlő növények előállítására. Lippay János – Ormos Imre - Vas Károly Tudományos Ülésszak, Budapest. 108-109.

Tóth A. 2005. Oxidatív stresszel szemben ellenálló transzgenikus szőlő előállítása. XXVII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Szarvas. 264.

Zok A., Pedryc A. és Oláh R. 2007. Kísérletek különböző szőlő genotípusok regenerációjának optimalizálására. XIII. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest. 114.

Zok A., Bara K., Szöriné Z. A., Oláh R. és Szegedi E. 2007. Újszerű módszer a mikroszaporított szőlőnövények edzésére. Lippay János – Ormos Imre - Vas Károly Tudományos Ülésszak, Budapest. 276-277.

Oláh R., Horváth V. G., Szegedi E., Kós P., Báló B., Haydu Zs., Váradi Gy., **Zok A.** és Hideg É. 2008. A szőlő stressztűrő képességének fokozása ferritinnel. XIV. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest. 47.

Galambos A., **Zok A.**, Kuczmog A., Putnoky P., Oláh R. és Szegedi E. 2011. Mesterséges *Agrobacterium* rezisztencia kialakítása szőlőben. Összefoglalók IX. Magyar Genetikai Kongresszus, XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok. 181.

Konferencia kiadványok (full paper):

Oláh R., **Tóth A.**, Ruthner S., Korbuly J. and Szegedi E. 2004. Genetic transformation of rootstock cultivar Richter 110 with the gene encoding the ironbinding protein, Ferritin. Acta Horticulturae (ISHS) 652: 471-473.

Zok A., Pedryc A. and Olah R. 2007. Resistance breeding of grapevine by different gene constructions through genetic engineering. International Scientific Conference: Quality of Horticultural Production. Lednice, Czech Republic. 565-578.

Kós B. P., Olah R., **Zok A.**, Horváth V. G., Szegedi E., Váradi Gy., Balo B. and Hideg E. 2008. The role of ferritin in enhancing the stress tolerance of grapevine. Szeged, Hungary. Acta Biologica 52(1): 41-43.

Novák E., **Zok A.**, Pedryc A. and Oláh R. 2008. Development and optimization of genetic transformation system for grape. MendelNet'08Agro Conference. Section – Plant Biology. Brno, Czech Republic. ISBN: 978-80-7375-239-2. 1-6.

Zok A., Kós B.P., Hideg É., Váradi Gy., Báló B., Szegedi E., Horváth V.G. and Oláh R. 2009. Towards the Production of Stress Tolerant Grapevine Cultivars. Acta Horticulturae (ISHS) 839: 651-657.