

Búza transzformáció: irodalmi áttekintés

RAKSZEGI MARIANN*-SZŰCS PÉTER*-TAMÁS CECÍLIA*-TAMÁS LÁSZLÓ**

**MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete, Martonvásár*

***ELTE, Növényélettani Tanszék, Budapest*

Összefoglalás

Az elmúlt évtizedben a növényi biotechnológiában bekövetkezett módszertani fejlődés eredményeként lehetővé vált gyökeresen új növénynemesítési programok tervezése és elindítása. A transzgenikus növények előállítása komplex folyamat, ami magában foglalja az idegen DNS molekulák bejuttatását a sejtekbe, ezen nukleotid szekvenciák integrációját a gazdasajt DNS-ébe és a bevitt gén követhető kifejeződését. A transzformáció módszere lehetőséget kínál többek között olyan gazdaságilag fontos gének bevitelére a búzanövénybe, melyekkel növelhető a rezisztencia biotikus és abiotikus stresszel szemben, a felhasználói igényeknek megfelelően változtatható a térszta technológiai minősége, javítható a búzafehérjék táplálkozástani értéke, továbbá amelyekkel növelhető a növényekben a vitaminok, vagy olyan mikroelemek mennyisége is, mint pl. a vas, vagy a cink. A számos módszertani nehézség és a fogyasztói reakciók miatt, a növényi transzformáció módszerében még további jelentős fejlődés várható a közeljövőben. Ez a szemle a szerzők angol nyelven megjelent összefoglalójának (Rakszegi et al. 2001) a legújabb eredményekkel bővített változata.

Wheat transformation: review

MARIANN RAKSZEGI*-PÉTER SZÚCS*-CECÍLIA TAMÁS*-LÁSZLÓ TAMÁS**

**Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Martonvásár*

***Department of Plant Physiology, Eötvös Loránd University, Budapest*

Summary

Plant biotechnology offers many new opportunities for breeders to solve certain breeding problems at the molecular level. The tissue culture methodology and the molecular genetic modification of economically important monocotyledons have undergone a revolution in the last decade. As the production of transgenic plants is a complex procedure including the uptake of DNA molecules into the cells, the integration of these nucleotide sequences into the host DNA and the expression of new genes in a controlled way and as there are still many unsolved questions, further development is necessary. The methodology opens up the possibility of introducing novel genes that may induce resistance to diseases and abiotic stresses, allows the modification of dough quality and the dietetic quality of proteins, and increase the levels of micronutrients such as iron, zinc, and vitamins. The present review is the updated Hungarian version of the English summary of the most important advances in wheat transformation published by the authors (Rakszegi et al. 2001).

1. Bevezetés

A búza (*Triticum aestivum* L.) genetikai változatosságát és a vele könnyen keresztezhető közeli rokon fajokat felhasználva, a nemesítők javítani tudják a búza agronómiai tulajdonságait (Bedő et al. 1998, McIntosh 1998). Napjainkban a versenyképes búzafajták előállítása egyre inkább igényli a klasszikus nemesítési és modern biotechnológiai módszerek kombinációját. A növényi biotechnológia fejlődésével lehetővé vált olyan gének bevitele is a genetikai állományba, melyek búzával nem keresztezhető szervezetekből származnak. A géntechnológiával segített nemesítés célul tűzte ki többek között, hogy megváltoztassa a búza táplálkozási és feldolgozás-technológiai minőségét, csökkentse a gyomok és kártevők következtében fellépő termésvesztést, növelje a környezeti hatásokkal szembeni ellenállóképességet (Lazzeri et al. 1997, Vasil 1998, Pellegrineschi et al. 2000). Az első sikeres búza transzformációs eredményeket Vasil et al. (1992) publikálta. Azóta több csoport számolt be újabb és újabb transzgenikus genotípus előállításáról. A sütőipari minőség javítására HMW (high molecular weight) glutenin alegység fehérjéket kódoló génekkel transzformált búzát Barro et al. (1997), Blechl et al. (1998), He et al. (1999) és Rooke et al. (1999). A búzakeményítőben az amilóz/amilopektin arányt Baga et al. (1999b) változtatta meg géntechnológiai módszerrel. Különböző génekkel sikerült növelni a rezisztenciát gombák (Pellegrineschi et al. 2000), rovarok (Alpeter et al. 1999, Stoger et al. 1999) és vírusok (Karunaratne et al. 1996) ellen, illetve gyomirtó szerekkel szemben (DeBlock et al. 1997). A jelenlegi módszereknél a transzformáció stabilitása erősen függ a módosítandó genotípustól, a növény szövettényésztésbe vont részétől és a szövettényésztés körülményeitől (Potrykus 1991). A búza transzformáció hatékonysága az irodalmi adatok szerint általában kisebb, mint 1 százalék (Alpeter et al. 1996b), bár néhány genotípussal 4-17 százalékot is elértek (Xia et al. 1999, Rasco-Gaunt et al. 2001). A sikeres, bizonyított transzformációknál sokszor komoly probléma a transzgén instabilitása (Cannell et al. 1998, Barro et al. 1998) és a részleges génexpresszió (Blechl et al. 1998, Alvarez et al. 2000). A búza transzformálására a génágyús (biolisztikus) módszer napjainkban a legelterjedtebb. Vasil et al. (1992) első sikeres kísérlete óta számos laboratórium kísérletezik különböző eredetű búzakallusz belövésével (Weeks et al. 1993, Becker et al. 1994, Nehra et al. 1994, Alpeter et al. 1996a, Srivastava et al. 1996). A biolisztikus módszeren kívül más eljárásokkal is lehet gabonaféléket transzformálni. Cheng et al. (1997) számoltak be először *Agrobacterium tumefaciens* közvetítette stabil génátvitelről búzába. A közlemény ellenére ez a módszer nem terjedt el, bár több laboratóriumban is próbáltak megbízható eljárást kifejleszteni, de többnyire csak átmeneti génexpressziót mutattak ki, illetve a transzgenikus kalluszból nem tudtak növényt regenerálni. Az

Agrobacterium közvetítette búza transzformációt befolyásoló paramétereket Amoah et al. (2001) vizsgálták részletesen tranziens expresszióban. Weir et al. (2001) négy független transzgénikus búza növényt kaptak szkutellumból *Agrobacterium* közvetítette transzformálással. Az *Agrobacterium* közvetítette módszer bár több egyszikű növényenél hatékonynak bizonyult, búzánál még további fejlesztésre van szükség. Közvetlen géntranszferről számolt be He és Lazzeri (1998), akik az elektroporáció körülményeit optimalizálták búzára. Serik et al. (1996) szilícium-karbid tűkkel transzformált érett búzaembriót. Pollentömlő eljárással is próbáltak már idegen gént bejuttatni búzába (Chong et al. 1998). Ez az áttekintés a magyar kutatók és laboratóriumok munkáját külön kiemelve foglalja össze a búza transzformációban eddig elért eredményeket.

2. Szövettenyésztés

A géntranszformációhoz jól működő *in vitro* növényi rendszer szükséges. A kiindulási anyag ivarsejt, szomatikus sejt, növényi szövet és szerv lehet. Legtöbbször könnyebb a testi sejtekhez hozzájutni, mint az ivarsejtekhez. Növényi sejttenyészet létrehozható osztódó, még nem differenciálódott merisztéma szövetekből, vagy már differenciálódott sejteket tartalmazó szövetből is. Ez utóbbinál a különböző növényi részek hormonkezeléssel (általában 2,4-diklórfenoxi-ecetsav) dedifferenciációra készíthetők. Legtöbbször az így keletkezett kallusz a géntechnológiai beavatkozás célpontja. Újabb *in vitro* hormonkezelésre a transzformált totipotens sejtől osztódáson és redifferenciáción keresztül (regeneráció) növény fejlődik. A regeneráció alternatív módon, vagy organogenezissel, vagy szomatikus embriogenezissel zajlik. Organogenezisnél a kalluszsövet több sejtje közreműködésével gyökér és/vagy hajtás fejlődik a hormonkeverék citokinin/auxin arányától függően. Szomatikus embriogenezisről akkor beszélünk, amikor egyetlen totipotens sejtől embriószerű képződményen keresztül fejlődik ki az új növény. Ha a transzformált sejt szomatikus embriogenezissel fejlődik tovább, akkor a géntechnológiával módosított növény minden sejtje hordozza az idegen DNS molekulát. A kalluszok jó *in vitro* regenerálódó képessége elsődleges követelmény a búza transzformációban. A búzakallusz regenerálódó képessége mennyiségi jelleg, az ezért felelős gének különböző kromoszómákon helyezkednek el a genomban (Ben Amer et al. 1997, Galiba et al. 1986). A regenerációs kísérletekben gyakran felmerülő probléma a regenerálódóképesség, vagy a termőképesség elvesztése és a rendellenes fenotípusok (albinizmus, mozaikosság) gyakori megjelenése (Gordon-Kamm et al. 1999). A regenerálódóképesség, és így a transzformáció hatékonysága is nagymértékben függ a

genotípustól, a kalluszképzésre felhasznált növényi résztől és a szövettenyésztés körülményeitől.

A **genotípus** elsődleges faktor a gabonafélék sikeres transzformációjában. Intenzíven fejlesztik az agronómiailag fontos nemesítési vonalakra és a kereskedelmi forgalomban levő fajtákra is hatékony regenerációs módszereket (Iser et al. 1999, Zhang et al. 1999). Tesztelték számos kereskedelmi forgalomban levő búzafajta kalluszindukációs képességét és sikerült növelni néhány fajtánál a növény regeneráció hatékonyságát (Fennell et al. 1996, Machii et al. 1998, Barro et al. 1999).

Regenerálható búza szövetkultúra többféle **növényi rész** felhasználásával is létrehozható. Ilyen növényi rész a teljes szem, érett és éretlen embrió, izolált szkutellum, éretlen virágzat (Rasco-Gaunt és Barcelo 1999), éretlen levél, mezokotil, hajtáscsúcs merisztéma (Zhang et al. 1999), koleoptilsomó és gyökér. Jelenleg éretlen embrióból kiindulva érik el a legjobb eredményeket. Sikeresen regeneráltak növényeket búza és rizs sejtszuspenziós kultúrákból előállított protoplastokból is (Ahmed és Sági 1993, Pauk és Szarka 1991).

Számos tanulmány foglalkozik az *in vitro* **szövettenyésztés körülményei** közül a kallusz- és embrióindukcióra, valamint a növény regenerációra használt táptalajok összetételével (Perl et al 1992, Rasco-Gaunt et al 1999a, Zhang et al. 1999). Az MS (Murashige és Skoog 1962) és ennek változatai a leggyakrabban használt táptalajok a *Triticeae* nemzetségbe tartozó fajok szövettenyésztésében. A kallusz képződés indukálására rendszerint az auxin hatású 2,4-diklórfenoxi-ecetsavat (2,4-D) használják, esetenként kiegészítve kis mennyiségű citokininnel. Fiatal hajtás regenerációjához nagyobb citokinin koncentráció szükséges auxinnal, vagy a nélkül (Barro et al. 1998). A táptalajban 5-10 mg/l zeatin szintén pozitív hatással lehet a regenerációra (Barro et al. 1999), míg a gyökér regenerálás hormonmentes táptalajon történik. A cukrok illetve cukoralkoholok nagy koncentrációja (Chen et al. 1998a), vagy a különböző fémion kiegészítők (pl. ezüst) jelenléte a táptalajban (Cho et al. 1999, Zhang et al. 1999) növelik a kenyérbúza növény regenerációs hatékonyságát, mely azt bizonyítja, hogy ezek a komponensek megvédik a növényi részt a transzformációnál bekövetkező sérülésektől (Rasco-Gaunt et al. 1999a). Más tanulmányok a különböző szénforrások (Zhang et al. 1999) és a szövettenyésztés időtartamának (Takumi és Shimada 1996) szerepéről számoltak be. Fontos hatása van még a regeneráció hatékonyságára a hőmérsékletnek és a fényintenzitásnak is. A szövettenyésztés hőmérsékleti tartománya

általában 20 és 30°C között van. A búzanövény hőmérséklet- és fényigénye is változik mind *in vivo*, mind *in vitro* fejlődése közben. Míg a kalluszok sötétben fejlődnek jobban, addig az alacsony fényintenzitás (1000 lx) a redifferenciációnak kedvez (Tamás et al. 2000).

3. Transzformánsok szelekciója

A génbevitel után a transzformált sejteket nem transzformált sejtek veszik körül. A transzformáció döntő lépése azon sejtek szelektálása és felszaporítása, melyekben a transzgén nemcsak integrálódott a nukleáris genomba, de expresszáldik is. Az ilyen sejtek azonosítása markergénekkel lehetséges. Ezek legtöbbször rezisztenciagének, melyek ellenállóvá teszik a növényt antibiotikumokkal vagy herbicidekkel szemben. Ezen toxinok a vad típusú sejtek növekedését gátolják, vagy elpusztítják azokat, míg a transzgénikus sejtek életképessége megmarad. A rezisztenciagének mellett léteznek egyéb szelekciós gének is.

A **rezisztencia szelekciós** markergének egyik csoportja az aminoglikozid alapú antibiotikumokkal szemben biztosít rezisztenciát. Ide tartozik többek között a kanamicin, gentamicin, geneticin (G418), neomicin, paromomicin és sztreptomycin (Jelenska et al. 2000, Shaw et al. 1993). Az aminoglikozidok baktériumölő hatása elsősorban úgy valósul meg, hogy irreverzibilisen hozzákötődnek a riboszómákhoz. Különböző enzimek, pl. az aminoglikozid adeniltranszferáz (*AadA*) és a neomicin foszfortranszferáz (*NptII*) képesek inaktiválni az aminoglikozidokat. A növényvédőszer-komponensekkel szemben kialakított rezisztencia jó alternatívája az antibiotikum rezisztencián alapuló szelekciónak. A legtöbbször használt herbicid rezisztencia gén a *bar* (Basta/bialaphos resistance) ami a PAT (foszfinotricin acetiltranszferáz) enzimet kódolja (De Block et al. 1995). Ez az enzim a foszfinotricin (PPT) alapú gyomirtószerekkel (Basta, Finale, Ignite, Herbiace) szemben ad toleranciát, hatástalanítva azok toxikus komponenseit (bialaphos, glufozinát). A PPT alapú szelekciót az összes gabonaféle transzformációjánál felhasználták már transzgénikus növények azonosítására (Barro et al. 1998, Dennehey et al. 1994, Iser et al. 1999, Kohli et al. 1999, Pauk et al. 1998, Rasco-Gaunt et al. 1999b). Széles körben elterjedtek ezek a szelekciós markergének, bár negatív mellékhatásaik lehetnek, mivel gátolhatják a sejtosztódást és a differenciációt, valamint a környezetre gyakorolt hatásuk sem kellően ismert (Bregitzer et al. 1998). A gabonafélék transzformációjánál ritkábban használt herbicid rezisztencián alapuló szelekciós rendszer a glifozáttal és a szulfonilureával szemben kialakított tolerancia. Ezekkel a herbicidekkel szemben rezisztencia mutáns enzimeket kódoló génekkel érhető el (Wan és Lemaux 1994, Zhang et al. 2000). Egy cianobaktériumból (*Synechococcus sp.*) származó

glutamát-1-szemialdehid-aminotranszferáz (GSA-AT) mutáns enzim génje a gabaculin nevű fitotoxin ellen nyújt rezisztenciát transzgenikus növényekben (Gough et al. 2001). Weeks (1998) cianamid alapú herbicidet használt transzformáns búzanövények szelekciójára.

Az antibiotikum és a herbicid rezisztencia markergének mellett megjelentek az úgynevezett **funkcionális szelekciós** gének, melyeket már gabonafélék transzformációjánál is sikeresen használtak. A pozitív funkcionális szelekció (Haldrup et al. 1998) olyan stratégia, amely a transzgenikus sejteknek metabolikus előnyt ad a nem transzformált sejtekkel szemben. Ezt az új marker rendszert úgy tervezték, hogy ártalmatlan legyen mind a fogyasztókra, mind a környezetre. A búza transzformációnál is használt egyik pozitív szelekciós rendszerben az *E. coli* baktériumból származó foszfomannóz izomeráz (*pmi*) gén a markergén (Reed et al. 1999, Wright et al. 2001). Az enzim átalakítja a növények számára nem hasznosítható mannóz-6-foszfátot a metabolizálható fruktóz-6-foszfáttá, így a markergént tartalmazó sejtek mannóz-6-foszfát tartalmú táptalajon is képesek osztódni, ellentétben a nem transzgenikus sejtekkel. A *pmi* gén használatával a transzformáció hatékonysága nagyobb, mint a *bar* herbicid rezisztencia génnel, és csökken a nem transzgenikus sejtek túlélési aránya a szelekciós táptalajon. A pozitív funkcionális markerek közé tartozik még az izopentenil-transzferáz (*ipt*) és a *rol* gén is (Kunkel et al. 1999). Az *ipt* gén egyike az *Agrobacterium tumefaciens* sejtburjánzást indukáló génjeinek, mely a citokinin bioszintézis egyik enzimét kódolja. A bevitt gén hatására a transzgenikus növényi szövet citokinin szintje megnövekszik, így a növény elveszíti apikális dominanciáját és gátlódik a gyökérbérbéződés is. Az *Agrobacterium rhizogenes* eredetű *rol* gén az úgynevezett „hairy roots” kialakulásáért felelős, valamint a gén hatására a növény levele ráncossá válik, megrövidülnek az internódiumok és csökken az apikális dominancia is. Az *ipt*, vagy a *rol* génekkel a transzgenikus növények fenotípusa megváltozik, így vizuálisan megkülönböztethetők a nem transzgenikus növényektől. Normál fenotípust csak úgy lehet előállítani, ha az *ipt*, vagy a *rol* gént kikapcsolják, vagy rekombinációval a növény elveszíti azt. A pozitív funkcionális szelekció mellett léteznek negatív szelekciós markerek is. Ilyen gén a bakteriális citozin deamináz (*codA*) gén, mely a nem toxikus 5-fluorcitozint az eukarióta sejtek számára mérgező 5-fluoruracillá alakítja át. A gén hatását és további alkalmazhatóságát transzgenikus rizsben tanulmányozták (Dai et al. 2001).

Mivel a szelekciós marker szekvenciák jelenléte gyakran nem kívánatos a transzgenikus növényekben, napjainkban a figyelem azon technikák fejlesztésére irányul, melyekkel a

szelekciós markergének eltávolíthatók a transzgenikus növényekből. Ez elérhető normál szegregációval (Komari et al. 1996), de sokkal ígéretesebb a homológ rekombináció közvetítette gén kiütés (gene knockout) módszere. Ez utóbbi megvalósítására dolgozták ki a MAT (multi-auto-transformation) vektor rendszert. A MAT rendszer egyik változatában a kukorica transzpozábilis elemét (AC) használják (Ebinuma et al. 1997), míg a másik módszerben az élesztő (*Zygosaccharomyces rouxii*) hely-specifikus rekombinációs rendszerével (R/R_S) távolítják el a genomból az *ipt* gént (Sugita et al. 1999). Az utóbbi MAT vektorral sikeresen állítottak elő transzgenikus rizst szkutellumból (Ebinuma és Komamine 2001). A MAT rendszer használatával lehetőség van szelekciós markergén mentes transzgenikus növények előállítására egy lépésben (Ebinuma et al. 2001). Növényi transzformációnál gyakran előfordul, hogy az idegen gén több példányban épül be a genomba. Többek között a stabil expresszió miatt, a transzgént egy kópiában hordozó növények előállítása célszerű. Az extra szekvenciákat pl. a Cre-*lox* helyspecifikus rekombináción alapuló rendszerrel lehet kiiktatni a genomból. Ezzel a módszerrel sikeresen alakítottak át négy transzgenkópiát hordozó búza növényeket egy példányt tartalmazó transzformánsokká (Srivastava et al. 1999).

A **látható markergének**, vagy más néven riportergének alkalmasak az átmeneti génexpresszió tanulmányozására, szelekciós markerként többnyire nem használják őket. Ezek a riportergének vizuálisan detektálható enzimaktivással rendelkező fehérjéket, vagy színes pigmentet, illetve fluoreszcens fehérjét kódoló gének. Az enzimaktivitásnak olyan kicsinek kell lennie (rövid felezési idővel), hogy ne befolyásolja a növény fejlődését. Fontos, hogy az enzim a növényi proteázokkal, valamint a hőmérséklet és pH ingadozással szemben ellenálló legyen. Ha a detektálás alsó határa elég alacsony, a mennyiségi értékelés rendszerint már 48 órával a transzformáció után elvégezhető. Ezeknek a kritériumoknak csak néhány riportergén felel meg. A növényi transzformáció első éveiben a glukuronidáz (*uidA/GUS*) (Jefferson 1987) és a CAT (kloramphenicol acetiltranszferáz) (Bruce et al. 1989, Chibbar et al. 1991) enzimeket kódoló gének voltak az idegen DNS növényi sejtbe jutásának indikátorai. Később gabona transzformációnál is sikerrel használták a luciferáz enzim génjét. A luciferáz enzim katalizálja a luciferin ATP függő oxidációját és nincs toxikus hatása a gabonasejtekre (Baruah-Wolff et al. 1999). Az antocián akkumulációja a növényi szövetekben jól látható, és így a pigment termeléséért felelős gén eredményesen használható a transzformált növény azonosítására, bár a festéknek káros hatása lehet a transzformált sejtekre (Chawla et al. 1999). A medúzaeredetű GFP (green fluorescent protein) egyre gyakrabban használt marker a

növényi transzformációban. Ez a fehérje roncsolásmentesen teszi lehetővé a transzgenikus sejtek vizuális azonosítását fluoreszcens mikroszkóppal. A rendszer kis toxicitású, szövettől és genotípustól független, és széles körűen használt a gabona transzformációban (Vain et al. 1998, Tamás et al. 1999, Stewart 2001). A korallból származó vörösen fluoreszkáló fehérje génjét (pDsRed, Clontech) először baktériumokban használták riporterként, de sikeresen azonosítottak vele transzgenikus dohány növényeket is (Jach et al. 2001).

4. Promóterek

Az eukarióta sejtekből származó promóterek teszik lehetővé a többnyire bakteriális eredetű markergének és a különböző élőlényekből származó hasznos gének átíródását a transzgenikus növényben. A különböző promótereken keresztül térben és időben is szabályozható a transzgenek megnyilvánulása.

A **konstitutív promóterek** biztosítják a folyamatos átíródását a transzgenikus sejtek *in vitro* azonosítására használt szelekciós és vizuális markergéneknek. A bevinni kívánt hasznos gén szabályozására is használható konstitutív promóter, ha a növény minden szövetében, illetve valamennyi fejlődési állapotában magas szintű génexpresszió elérése a cél. Gabonafélék transzformációjánál a leggyakrabban használt konstitutív promóterek a dohányt fertőző karfiol-mozaikvírus (CaMV) 35S rRNS promótere (*CaMV 35S*) (Odell et al. 1985), a rizs *Act1* promótere (Barro et al. 1998, Mc Elroy et al. 1991), a kukorica ubiquitin (*Ubi1*) promótere (Barro et al. 1998, Christensen et al. 1992, Stoger et al. 1999, Weeks et al. 1993) valamint a kukorica *Adh1* promóteréből készült kiméra promóter, az *Emu* (Chamberlain et al. 1994, Last et al. 1991). A génexpresszió fokozható különböző intronokkal is, mint pl. a rizs *Act1* (Mc Elroy et al. 1991), vagy *Adh1* (Barro et al. 1998, Chibbar et al. 1993) intronjai. A cukornádból izolált *ScBV* promóter szintén ígéretes konstitutív promóter (Tzafir et al. 1998).

A **szövetspecifikus promóterek** a transzgen kifejeződését csak specifikus szövetekben, illetve meghatározott fejlettségi állapotban engedélyezik. Endospermium-specifikus expressziót eredményeznek a HMW glutenin alegységének (1Ax1, 1Dx5) promóterei a transzgenikus kenyérbúzában (Alpeter et al. 1996a, Barro et al. 1997) és durum búzában is (He et al. 1999). A GBSS (granule-bound starch synthase) promóterekkel az endospermiumban és a pollenben is transzgen expresszió figyelhető meg (Russell et al. 1997). A rizs szacharóz-szintetáz (RSS) génje és a rizs tungro bacilliform vírus (RTBV) promótere a háncsszövetben aktívak (Bhattacharyya-Pakrasi et al. 1993). A fény által szabályozott

promóterek, mint pl. a klorofill-a/b kötő fehérje (LHCP), a foszfoenol-piruvát-karboxikináz (PEP-CK), piruvát-ortofoszfát-dikináz (PPDK) és a ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz-oxigenáz (RUBISCO) enzimeket kódoló gének promóterei, a merisztéma sejtekben és a klorofillt tartalmazó szövetekben aktívak (Baga et al. 1999a, Kyojuka et al. 1993, Matsuoka et al. 1994).

Az **indukciós promóterek** speciális külső változás hatására indítják el a génextpressziót. Így léteznek patogének által, sérüléssel, valamint kémiaailag indukált promóterek. A szőlőből származó *VstI* promóter (Leckband és Loerz 1998) gombafertőzés hatására génextpressziót idéz elő. A rizs egyik kitináza (RC24) és az egyik glicin gazdag sejtfa fehérjéje (OSGRP1) sérülésre indukálódó promóterekkel szabályozott (Xu et al. 1995, 1996). Kémiai indukciót idézhetnek elő növényvédőszer, vagy etanol is (Greenland et al. 1997, Caddick et al. 1998). A különböző stresszindukált promóterek hőmérséklet-sokkal, anaerob környezettel, valamint patogénekkal kapcsolhatók be (Kyojuka et al. 1991, Lyznik et al. 1995, Molina et al. 1996, Vasil et al. 1992). Ezek a promóterek szabályozzák a növényben azoknak a fehérjéknek a génjeit, melyek részt vesznek a stressz káros hatását csökkentő élettani folyamatokban.

5. Transzformációs módszerek és nemzetközi eredmények

A génbeviteli módszerek közvetlen és közvetett eljárásokra csoportosíthatók. A közvetett génátvitelnél az idegen DNS bejuttatása közvetítő organizmussal (pl. *Agrobacterium sp.*) érhető el.

Az első **közvetlen** génbeviteli technika a **polietilén-glikolos (PEG)** módszer volt, mellyel számos hátránya ellenére sikerrel transzformáltak gabonaféléket világszerte (Lörz et al. 1985). A módszer gyenge pontja, hogy a protoplaszt regenerálódó képessége nagyon alacsony, így csak néhány genotípusnál használható. A sejtuszpenziós kultúrák könnyen elveszítik csírázókéességüket (DiMaio és Shillito 1989) és idővel akkumulálják a genetikai rendellenességeket (Karp 1991). Ezen limitáló körülmények miatt jelentősebb eredményeket a gabonafélék közül csak rizzsel és kukoricával értek el (Barcelo et al. 1998, Golovkin et al. 1993).

Sejt és szövet **elektroporációnál** a DNS a puffer oldatból a sejtmembránon át nagyfeszültségű elektromos impulzusok hatására jut be a sejtekbe. A módszer valamennyi gabonafélére működik, de a transzformáció hatékonysága csak kukoricánál és rizsnél

elfogadható mértékű (Laursen et al. 1994, Xu és Li 1994). Az elektroporációban a célobjektum rendszerint a megtermékenyített petesejt, kalluszszövet, éretlen embrió, vagy éretlen virágzat. He et al. (2001) transzformált növényeket állítottak elő tritordium (búza-árpa hibrid) éretlen virágzatának elektroporációjával. A módszer kritikus pontja a növényi részek előkészítése. Az átvihető DNS mennyisége kisebb, mint génagyúval, de a módszer a PEG protoplaszt transzformációhoz képest előnyösebb.

Egy kevésbé jelentős közvetlen génbeviteli eljárásban **szilícium-karbid (SiC)** tűket használnak transzformáláshoz. A módszert először szuszpenziós kultúrákon tanulmányozták (Frame et al. 1994), majd később embriót és embrióból származó kalluszt is sikeresen transzformáltak vele (Petolino et al. 2000, Serik et al. 1996). A módszer egyszerűsége ellenére sem terjedt el. Az embriogén szuszpenzió előállítása nehéz és időigényes feladat, a mikroszkópikus méretű SiC tűk pedig károsak az emberi egészségre. A szintén kevésbé ismert **pollentómló eljárással** Chong et al. (1998) próbáltak búzát transzformálni, ez idáig nem sok sikerrel.

A **biolisztikus** transzformációt, mely jelenleg is a legelterjedtebb közvetlen génbeviteli módszer, Sanford (1988) fejlesztette ki. A módszer alapja, hogy nagynyomású gáz (eredetileg puskaporrobbanás) juttatja a mikrohordozókra felvitt DNS-t az intakt sejtekbe, szövetekbe, illetve szervekbe. Különösen előnyös ez a módszer olyankor, amikor biológiai gátak akadályozzák más hatékony módszerek, mint például az *Agrobacterium* közvetítette Ti plazmid, vagy a protoplaszt transzformáció használatát. Jó lehetőséget kínál a rendszer a hosszadalmas szövettenyésztési folyamatok lerövidítésére is. A hélium gázzal működő ágyú (Kikkert 1993) széles körben elterjedt standard készülék. Újabb fejlesztésű (Chaure et al. 2000) a kézi részecskeágyú, mely lehetővé teszi a transzgén átvitelét az intakt növény szöveteibe is. A biolisztikus technika jelenleg a legmegbízhatóbb és a leghatékonyabb módszer termékeny, transzgénikus egyszikű növények előállítására (Alpeter et al. 1996b, Barro et al. 1997, Blechl és Anderson 1996, De Block et al. 1997, Rasco-Gaunt et al. 2001). Ezzel a módszerrel állították elő az első kereskedelmi forgalomba került genetikailag módosított (GM) gabonafajtákat (Reppelin et al. 2001). Gabonaféléknél vagy rögtön izolálás után juttatják be a DNS-t a növényi részekbe (Barro et al. 1997), vagy a kalluszokat transzformálják (Vasil et al. 1992). A transzgén expresszióját erősen befolyásolják a biolisztikus eljárás fizikai és kémiai paraméterei. Lényeges az aranyzemcse mérete (0,4-1,2 μm) és mennyisége (29-235 $\mu\text{g/lövés}$), valamint a mikrohordozóra felvitt oldat összetétele. Az

oldat általában 2,5-20 µg plazmidot vagy lineáris DNS-t, 8-16 mM spermidint és 0,2-1,9 M Ca(II) iont tartalmaz. A génagyú működési paraméterei közül fontos a He gáz nyomása [4,5-7,6 MPa (650-1100 psi)], a vákuum a kamrában [68-71 Hgmm (27-28 inchesHg)] és a lövés távolság (2,5-5,5 cm). Az említett paraméterek optimalizálásáról több tanulmány is beszámolt (Rasco-Gaunt et al. 1999a, Harwood et al. 2000).

A talajlakó *Agrobacterium tumefaciens* és *A. rhizogenes* prokarióta mikroorganizmusok képesek genetikailag transzformálni növényi sejteket. Az *A. tumefaciens* tumor-indukáló plazmidjának (Ti plazmid), illetve az *A. rhizogenes* gyökér-indukáló plazmidjának (Ri plazmid) egy darabja (transzfer DNS, vagy T-DNS) be tud épülni a növény genetikai állományába. Más transzformációs módszerrel összevetve az *Agrobacterium* **közvetítette génbevitel** előnye az egyszerűség, hatékonyság és gazdaságosság. Az eljárással nagy méretű, meghatározott végű DNS fragmentumokat lehet kis kópiaszámban a növény kromoszómájába integrálni. Az így transzformált egy- és kétszikű növények általában jó termőképességgel rendelkeznek. A technika kezdetben csak kétszikűeknél volt sikeres, de a 90-es években már rizs (Hiei et al. 1994), kukorica (Ishida et al. 1996), árpa (Tingay et al. 1997) és búza (Cheng et al. 1997) stabil transzformációjáról is beszámoltak. Az *Agrobacterium* közvetítette búza transzformációt befolyásoló paramétereket Amoah et al. (2001) vizsgálták tranziens expresszióban és Xia et al. (1999), valamint Weir et al. (2001) is leírtak *Agrobacteriummal* végzett sikeres búza transzformálási módszert. Az *Agrobacterium* fajok ígéretes géneközvetítőnek számítanak, de további módszerfejlesztésre van szükség, hogy búzánál is elterjedten használják őket. Rizsnél és kukoricánál a transzformáció hatékonysága 5-25% (Cheng et al. 1998, Ishida et al. 1996, Toki 1997), míg árpánál és búzánál 2-6% (Tingay et al. 1997, Xia et al. 1999) volt ezzel a módszerrel. Fontos azonban megjegyezni, hogy az egyes genotípusok több faktor befolyásolta regenerálódó képessége erősen meghatározza a transzformáció hatékonyságát (Hiei et al. 1997, Gheysen et al. 1998, Hansen et al. 1999). A transzformáció megkezdése előtt ezen faktorok hatását célszerű optimalizálni a módosítandó genotípusra, különösen a termesztett fajtáknál. Jelenleg az *Agrobacterium* közvetítette búza transzformáció hatékony alkalmazása (>1%) csak néhány kivételesen jól regenerálódó genotípusra korlátozódik. Modell genotípus a Bob White, melyet az *Agrobacterium* a búzafajták közül talán a legnagyobb mértékben képes fertőzni. A sikeresen transzformált gabonafélék célszövege legtöbbször az éretlen embrió szkutelluma (Ishida et al. 1996, Cheng et al. 1997, Tingay et al. 1997), illetve a belőle származó kallusz volt (Hiei et al. 1994).

6. Gabona transzformáció Magyarországon

A növénynemesítési célokat szolgáló géntechnológiai módosítások elengedhetetlen feltétele a jól működő növény-sejt-növény rendszer, így a transzformációs kutatások hazánkban is a **szövettenyésztés** körülményeinek vizsgálatával kezdődtek. Felföldi és Purnhauser (1992) vizsgálták a szövettenyésztés hatékonyságát a genotípus függvényében. Karsai et al. (1993) megállapították, hogy a növény regeneráció erősen függ a környezeti körülményektől, valamint a genotípus és a környezet kölcsönhatásától. Puolimatka és Pauk (1999) kísérleteikben tanulmányozták a búza különböző részeinek (magház, toklász, virág, portok, illetve a belőlük képzett társ kultúrák) hatását a növény regenerációra. A társ kultúrák embriószerű képződményeket (embrioidokat) hoztak létre, valamint pozitív társ kultúra hatást figyeltek meg a mikroszpóra embriogenezisekor. Karsai et al. (1994a) őszi búzafajták *in vitro* androgenezisének optimalizálták az indukciós táptalaj összetételét, és így 9,1% regenerációs hatékonyságot értek el. Puolimatka és Pauk (2000) vizsgálták a búza androgeneziséhez szükséges optimális inkubációs időt is. A legnagyobb mértékű zöldnövény regenerációt akkor kapták, amikor a portok izolálása után 7 héttel rakták át az embrioidokat az indukciós táptalajról a regenerációsra. A búza *in vitro* szövettenyésztésében a portok kultúráknak kiemelkedő szerepük van (Barnabás et al. 2001), de sikeresen regeneráltak növényeket búza és rizs sejtszuszpenziós kultúrákból előállított protoplastokból is (Pauk és Szarka 1991, Ahmed és Sági 1993, Pauk és Purnhauser 1993). Bizonyos mikroelemek, elsősorban a biológiailag aktív nehézfém ionok, szignifikánsan növelik a növények regenerációját. Az etilén inhibitor ezüst(I), vagy a réz(II) ionok, különösen az eredeti MS táptalaj összetételéhez képest nagyobb koncentrációban, hatékonyan növelik a nehezen regenerálódó búza kallusz tenyészetek és más gabonafélék regenerációját is (Purnhauser et al. 1987, Purnhauser 1991, Purnhauser és Gyulai 1993). Alumínium(III) ionokkal kezelt búza x tritikálé csíranövényekből származó *in vitro* portok kultúrák szignifikánsan nagyobb számú embrioidot adtak és kissé nagyobb növény regenerációs arányt mutattak a kontroll populációval összehasonlítva (Karsai et al. 1994b). Barnabás et al. (2000) megállapították, hogy az *in vitro* búza szövettenyésztésben használt alumínium-szelekció jelentősen növelte az alumínium toleráns dihaploid vonalak gyakoriságát. Fekete és Pauk (1989) vizsgálatában a növényi hormonok közül a 2,4-D (1-1,5 mg/l) és a kinetin (0,5-4 mg/l) kombinációja növelte a kalluszképződést a GK Öthalom búzafajtánál. A hajtást regeneráló táptalajban 4 mg/l kinetin szignifikánsan javította a növény regenerációt, így a kalluszok 86 százalékából kaptak búza növényt. Tamás et al. (2000) kísérleteikben az auxin típusú molekulák közül az indolecetsavat előnyösebbnek találták termesztett őszi búzafajták éretlen embrió eredetű kalluszainak hajtás

regenerációjára, mint a naftilecetsavat. Az eredeti MS táptalajhoz képest felére csökkentett makroelem koncentráció szintén növelte a regenerációs képességet. Növény regenerációs vizsgálataikban az optimális inkubációs hőmérséklet 23/22°C, a fényintenzitás pedig 1000 lx volt. Az alacsony fényintenzitás lassította a sejtosztódást, de elősegítette a kallusz sejtek redifferenciációját.

A hazai gabona **transzformációs** kísérletek protoplasztok **PEG** közvetítette génbevitelével kezdődtek, melyekben legtöbbször a GUS volt a riporter gén. Omirulleh et al. (1993) fertilis kukorica növényeket neveltek fel transzformált protoplaszt eredetű embriogén kalluszokból. Jenes et al. (1994) árpa protoplasztok izolálására és transzformálására dolgoztak ki hatékony módszert. Bittencourt et al. (1995) rizs, Ahmed et al. (1997) kenyérbúza protoplasztokat transzformáltak PEG közvetítésével, és vizsgálták a módszer különböző kémiai és fizikai paramétereinek hatását a GUS gén tranziens expressziójára.

Gyors és hatékony **mikroinjektálásos** technikát fejlesztettek ki Pónya et al. (1999) exogén DNS búzasejtmagba és zigótába juttatására. Az új technika egy mechanikus feltárást és egy magas frekvenciájú váltakozó árammal végzett protoplaszt rögzítést foglal magába. A módszer óránként 15 injektálást tesz lehetővé, és a bejuttatott gének szignifikánsan magasabb tranziens expressziót mutattak (46-52% petesejtre és zigótára külön-külön), mint amit eddig növényi protoplasztoknál megfigyeltek.

Jelenleg a **biolisztikus módszer** a leghatékonyabb gabona transzformációs eljárás, de alkalmazását megnehezíti eszközigénye. Jenes et al. (1996) egy olcsó és hatékony génagyút (Genebooster) fejlesztettek ki és szabadalmaztattak. A magyar kutatók és laboratóriumok eredményei a banán (Sági et al. 1995), a kukorica (Golovkin et al. 1993, Omirulleh et al. 1993) és a rizs (Jenes et al. 1996, Pauk et al. 1996) sikeres transzformálásában lehetővé tették, hogy az egyszikűek közül a búza legyen a következő célpont a hazai transzformációs kísérletekben. Pauk et al. (1998) számoltak be az első magyar *in vitro* módszerrel herbicid-rezisztenssé alakított búza genotípusról. Kísérletükben a *bar* gént génagyúval juttatták be éretlen embrió eredetű kalluszokba, majd rezisztens növényeket szelektáltak. A *bar* gén expresszióját PAT próbával mutatták ki, így a szelekciót követően hat független transzformánst kaptak. A 0,1 százalékos bialaphos permetezéssel szemben rezisztens növények termőképes szemeket képeztek. A herbicid rezisztens növények előállításával mellett egyre fontosabbak a búza minőségének javítását célzó transzformációs kutatások. A HMW

glutenin alegységfehérjék szignifikánsan befolyásolják a búzaliszt funkcionális és technológiai tulajdonságait, így számos nemzetközi és hazai laboratórium célozta meg a tészta funkcionális tulajdonságainak módosítását glutenin-transzformáns búza létrehozásával (D'Ovidio et al. 2000, He et al. 1999, Popineau et al. 2001, Shewry 2000). Angliában biolisztikus módszerrel sikeresen transzformáltak egy ausztrál búzavonalat HMW glutenin génnel (Barro et al. 1997). Az így létrehozott B73-6-1 jelű transzgénikus tavaszi búzavonal extra kópiákat tartalmaz az 1Dx5 HMW glutenin génből. Ennek a búzavonalnak a lisztje nagyobb százalékos arányban tartalmaz HMW glutenin alegység fehérjéket a kontrollhoz képest, de az összes fehérjetartalom nem nőtt szignifikánsan. Az eredeti és a transzformált búzavonal technológiai és reológiai tulajdonságait Rakszegi et al. (2000) martonvásári szántóföldi és laboratóriumi kísérletekben tanulmányozták. A kísérletek eredményei alátámasztották a korábbi megfigyeléseket (Rooke et al. 1999), melyek szerint az 1Dx5 HMW glutenin alegységfehérje megnövekedett expressziója extraerős tésztát eredményezett. A B73-6-1 jelű transzformált búza lisztje önmagában nem alkalmas kenyérsütésre, de keveréssel felhasználható gyengébb minőségű lisztek funkcionális tulajdonságainak javítására, vagy a búzaliszt végfelhasználásának fejlesztésére. A tartalékfehérjék funkcionális vizsgálata mellett nagyon fontos a gének expresszióját befolyásoló promóterek tanulmányozása is. Vibók et al. (1999) transzgénikus rizsben vizsgálták a búza γ -gliadin génjének szövetspecifikus kifejeződését. A rizs *actin1* promóterből és a búza γ -gliadin génből hibrid konstrukciót készítettek, és ehhez kapcsolták a β -glukuronidáz riporter gént (*gusA*). A hibrid konstrukciót génágyús módszerrel juttatták a rizsbe, majd tanulmányozták a GUS gén expresszióját a növény különböző szöveteiben.

Ez a vázlatos irodalmi áttekintés is bizonyítja, hogy a gabonafélék hazai géntechnológiai kutatása nemzetközi színvonalú.

Irodalom

- Ahmed, K.Z.-Omirulleh, S.-Sági, F.-Dudits, D.: 1997. Factors affecting transient expression of vector construct in wheat protoplasts. *Acta Biologica Hungarica*, 48: 209-220.
- Ahmed, K.Z.-Sági, F.: 1993. Culture of and fertile plant regeneration from regenerable embryogenic cell-derived protoplasts of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*, 12: 175-179.
- Alpeter, F.,-Vasil, V.,-Srirastava, V.,-Vasil, I.K.: 1996a. Integration and expression of the high-molecular-weight glutenin subunit 1Ax1 gene into wheat. *Nature Biotechnology*, 14: 1155-1159.
- Alpeter, F.-Diaz, I.-McAuslane, H.-Gaddour, K.-Carbonero, P.-Vasil, I.K.: 1999. Increased insect resistance in transgenic wheat stably expressing trypsin inhibitor CMe. *Molecular Breeding*, 5: 53-63.
- Alpeter, F.-Vasil, V.-Srivastava, V.-Stöger, E.-Vasil, I.K.: 1996b. Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. *Plant Cell Reports*, 16: 12-17.
- Alvarez, M.L.-Guelman, S.-Halford, N.G.-Lustig, S.-Reggiardo, M.I.-Ryabushkina, N.-Shewry, P.-Stein, J.-Vallejos, R.H.: 2000. Silencing of HMW glutenins in transgenic wheat expressing extra HMW subunits. *Theoretical Applied Genetics*, 100: 319-327.
- Baga, M.-Chibbar, R.N.-Kartha, K.K.: 1999a. Expression and regulation of transgenes for selection of transformants and modification of traits in cereals. *Molecular Improvement of Cereal Crops*. In Vasil IK (eds), *Advances in Cellular and Molecular Biology of Plants*, 5: 83-131. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Baga, M.-Repellin, A.-Demeke, T.-Caswell, K.-Leung, N.-Abdel-Aal, E.S.-Hucl, P.-Chibbar, R.N.: 1999b. Wheat starch modification through biotechnology. *Starch*, 51: 111-116.
- Barcelo, P.-Lazzeri, P.A.: 1998. Direct gene transfer: Chemical, electrical and physical methods. In Lindsey K (eds), *Transgenic Plant Research*, pp. 35-55. Harwood Academic Publishers, The Netherlands.
- Barnabás, B.-Kovács, G.-Hegedűs, A.-Erdei, S.-Horváth, G.: 2000. Regeneration of doubled haploid plants from in vitro selected microspores to improve aluminium tolerance in wheat. *Journal of Plant Physiology*, 156: 217-222.
- Barnabás, B.-Szakács, É.-Karsai, I.-Bedő, Z.: 2001. *In vitro* androgenesis of wheat: from fundamentals to practical application. *Euphytica*, 119: 211-216.
- Barro, F.-Cannell, M.E.-Lazzeri, P.-Barcelo, P.: 1998. Influence of auxins on transformation of wheat and tritordeum and analysis of transgene integration patterns in transformants. *Theoretical Applied Genetics*, 97: 684-695.

- Barro, F.-Martin, A.-Lazzeri, P.A.-Barcelo, P.:* 1999. Medium optimisation for efficient somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences and immature scutella of elite cultivars of wheat, barley and tritordeum. *Euphytica*, 108: 161-167.
- Barro, F.-Rooke, L.-Békés, F.-Gras, P.-Tatham, A.S.-Fido, R.-Lazzeri, P.A.-Shewry, P.R.-Barcelo, P.:* 1997. Transformation of wheat HMW subunit genes results in improved functional properties. *Nature Biotechnology*, 15: 1295-1299.
- Baruah-Wolff, J.-Harwood, W.A.-Lonsdale, D.A.-Harvey, A.-Hull, R.-Snape, J.W.:* (1999) Luciferase as a reporter gene for transformation studies in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Reports*, 18: 715-720.
- Becker, D.-Brettschneider, R.-Lörz, H.:* 1994. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. *Plant Journal*, 5: 299-307.
- Bedő Z.-Vida Gy.-Láng L.-Karsai I.:* 1998. Breeding for breadmaking quality using old Hungarian wheat varieties. *Euphytica*, 100: 179-182.
- Ben Amer, I.M.-Korzun, V.-Worland, A.J.-Börner, A.:* 1997. Genetic mapping of QTL controlling tissue-culture response on chromosome 2B of wheat (*Triticum aestivum* L.) in relation to major genes and RFLP markers. *Theoretical Applied Genetics*, 94: 1047-1052.
- Bhattacharyya-Pakrasi, H.-Peng, J.-Elmer, J.S.-Laco, G.-Shen, P.-Kaniewska, M.B.-Kononowicz, H.-Wen, F.-Hodges, T.K.-Beachy, R.N.:* 1993. Specificity of a promoter from the rice tungro bacilliform virus for expression in phloem tissues. *Plant Journal*, 4: 71-79.
- Bittencourt, P.A.L.-Csányi, Á.-Jenes, B.:* 1995. Evaluation of different parameters and their influence on the PEG (polyethylene glycol) mediated gene transfer into rice (*Oryza sativa* L.) protoplasts. *Cereal Research Communications*, 23: 359-365.
- Blechl, A.E.-Anderson O.D.:* 1996. Expression of a novel high-molecular-weight glutenin subunit in transgenic wheat. *Nature Biotechnology*, 14: 875-879.
- Blechl, A.E.-Le, H.Q.-Anderson, O.D.:* 1998. Engineering changes in wheat flour by genetic transformation. *Journal of Plant Physiology*, 152: 703-707.
- Bregitzer, P.-Halbert, S.E.-Lemaux, P.G.:* 1998. Somaclonal variation in the progeny of transgenic barley. *Theoretical Applied Genetics*. 96: 421-425.
- Bruce, W.B.-Christensen, A.H.-Klein, T.-Fromm, M.-Quail, P.H.:* 1989. Photoregulation of a phytochrome gene promoter from oat transferred into rice by particle bombardment. *Proceedings of the National Academy of Science*, 86: 4395-4405.

- Caddick, M.X.-Greenland, A.J.-Jepson, I.-Krause, K.P.-Qu, N.-Riddell, K.V.-Salter, M.G.-Schuch, W.-Sonnewald, U.-Tomsett, A.B.: 1998. An ethanol inducible gene switch for plants used to manipulate carbon metabolism. *Nature Biotechnology*, 16: 177-180.
- Cannell, M.E.-Barcelo, P.-Lazzeri, P.A.: 1998. Stability and heritability of marker genes in transgenic wheat and Triticum. In Slinkard AE (eds), *Proceedings of the 9th International Wheat Genetic Symposium*, 3: 92-94. University Extension Press, University of Saskatoon, Canada.
- Chamberlain, D.A.-Brettel, R.I.S.-Last, D.I.-Witizens, B.-McElroy, D.-Dolferus, R.-Dennis, E.S.: 1994. The use of the Emu promoter with antibiotic and herbicide resistance genes for the selection of transgenic wheat callus and rice plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, 21: 95-112.
- Chaure, P.-Gurr, S.J.-Spanu, P.: 2000. Stable transformation of *Erysiphe graminis*, an obligate biotrophic pathogen of barley. *Nature Biotechnology*, 18: 205-207.
- Chawla, H.S.-Cass, L.A.-Simmonds, J.A.: 1999. Developmental and environmental regulation of anthocyanin pigmentation in wheat tissues transformed with anthocyanin regulatory genes. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 35: 403-408.
- Chen, L.-Zhang, S.-Beachy, R.N.-Fauquet, C.M.: 1998. A protocol for consistent, large-scale production of fertile transgenic rice plants. *Plant Cell Reports*, 18: 25-31.
- Cheng, M.-Fry, J.E.-Pang, S.-Zhou, H.-Hironaka, C.M.-Duncan, D.R.-Conner, T.W.-Wan, Y.: 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology*, 115: 971-980.
- Cheng, X.-Sardana, R.-Kaplan, H.-Altosaar, I.: 1998. *Agrobacterium*-transformed rice plants expressing synthetic *cryIA(b)* and *cryIA(c)* genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proceedings of the National Academy of Science*, 95: 2767-2772.
- Chibbar, R.N.-Kantha, K.K.-Datla, R.S.S.-Leung, N.-Caswell, K.-Mallard, C.S.-Steinhauer, L.: 1993. The effect of different promoter-sequences on transient expression of *gus* reporter gene in cultured barley (*Hordeum vulgare* L.) cells. *Plant Cell Reports*, 12: 506-509.
- Chibbar, R.N.-Kantha, K.K.-Leung, N.-Qureshi, J.-Caswell, K.: 1991. Transient expression of marker genes in immature zygotic embryos of spring wheat (*Triticum aestivum*) through microprojectile bombardment. *Genome*, 34: 453-460.
- Cho, M.J.-Jiang, W.-Lemaux, P.G.: 1999. High-frequency transformation of oat via microprojectile bombardment of seed-derived highly regenerative cultures. *Plant Science*, 148: 9-17.

- Chong, K.-Bao, S.-Xu, T.-Tan, K.-Liang, T.-Zeng, J.-Huang, H.-Xu, J.-Xu, Z.: 1998. Functional analysis of the *ver* gene using antisense transgenic wheat. *Physiologia Plantarum*, 102: 87-92.
- Christensen, A.H.-Sherrock, R.A.-Quail, P.: 1992. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology*, 18: 675-689.
- D'Ovidio, R.-Fabbri, R.-Patacchini, C.-Maschi, S.-Lafiandra, D.-Porceddu, E.-Blechl, A.E.-Anderson, O.D.: 2000. Production of transgenic bread wheat lines over-expressing an LMW glutenin subunit. In: *Wheat Gluten*, ed. Shewry PR, Tatham AS, University of Bristol, UK.
- Dai, S.-Carcamo, R.-Zhang, Z.-Chen, S.-Beachy, R. N.: 2001. The bacterial cytosine deaminase gene used as a conditional negative selection marker in transgenic rice plants. *Plant Cell Reports*, 20: 738-743.
- De Block, M.-De Sonville, A.-Debrouwer, D.: 1995. The selection mechanism of phosphinotricin is influenced by the metabolic status of the tissue. *Planta*, 197: 619-626.
- De Block, M.-Debrouwer, D.-Moens, T.: 1997. The development of a nuclear male sterility system in wheat. Expression of the barnase gene under the control of tapetum specific promoters. *Theoretical Applied Genetics*, 95: 125-131.
- Dennehey, B.K.-Petersen, W.L.-Ford-Santino, C.-Pajeau, M.-Armstrong, C.L.: 1994. Comparison of selective agents for use with the selectable marker gene *bar* in maize transformation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 36: 1-7.
- DiMaio, J.J.-Shillito, R.D.: 1989. Cryopreservation technology for plant cell cultures. *Journal of Tissue Culture Methods*, 12: 163-169.
- Ebinuma, H.-Komamine, A.: 2001. MAT (Multi-Auto-Transformation) vector system. The oncogenes of *Agrobacterium* as positive markers for regeneration and selection of marker-free transgenic plants. *Cell. Dev. Biol.-Plant*, 37: 103-113.
- Ebinuma, H.-Sugita, K.-Matsunaga, E.-Endo, S.-Yamada, K.-Komamine, A.: 2001. Systems for the removal of a selection marker and their combination with a positive marker. *Plant Cell. Reports*, 20: 383-392.
- Ebinuma, H.-Sugita, K.-Matsunaga, E.-Yamakado, M.: 1997. Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene as a selectable marker. *Proceedings of the National Academy of Science*, 94: 2117-2121.
- Fekete S.-Pauk J.: 1989. Study of the effect of 2,4-D and kinetin on plant regeneration in wheat: two-step efficient plant regeneration. *Cereal Research Communications*, 17: 3-4.

- Felföldi K.-Purnhauser L.:* 1992. Induction of regenerating callus cultures from immature embryos of 44 wheat and 3 triticale cultivars. *Cereal Research Communications*, 20: 273-277.
- Fennell, S.-Bohorova, N.-van Ginkel, M.-Crossa, J.-Hoisington, D.:* 1996. Plant regeneration from immature embryos of 48 elite CIMMYT bread wheats. *Theoretical Applied Genetics*, 92: 163-169.
- Frame, B.R.-Drayton, P.R.-Bagnall, S.V.-Lewnau, C.J.-Bullock, W.P.-Wilson, H.M.-Dunwell, J.M.-Thompson, J.A.-Wang, K.:* 1994. Production of fertile transgenic maize plants by silicon carbide fiber-mediated transformation. *The Plant Journal*, 6: 941-948.
- Galiba G.-Kovács G.-Sutka J.:* 1986. Substitution analysis of plant regeneration from callus culture in wheat. *Plant Breeding*, 97: 261-263.
- Gheysen, G.-Angenon, G.-Van Montagu, M.:* 1998. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: A scientifically intriguing story with significant application. In Lindsey K (eds), *Transgenic Plant Research*, pp. 1-33. Harwood Academic Publishers, The Netherlands.
- Golovkin M.V.-Ábrahám M.-Mórocz S.-Bottka S.-Fehér A.-Dudits D.:* 1993. Production of transgenic maize plants by direct DNA uptake into embryogenic protoplasts. *Plant Science Limerick*, 90: 41-52.
- Gordon-Kamm, W.J.-Baszczynski, C.L.-Bruce, W.B.-Tomes, D.T.:* 1999. Transgenic cereals: *Zea mays* (maize). *Molecular Improvement of Cereal Crops*. In Vasil IK (eds), *Advances in Cellular and Molecular Biology of Plants*, V: 189-253. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Gough, K.C.-Hawes, W.S.-Kilpatrick, J.-Whitelam, G.C.:* 2001. Cyanobacterial GR6 glutamate-1-semialdehyde aminotransferase: a novel enzyme-based selectable marker for plant transformation. *Plant Cell Reports*, 20: 296–300.
- Greenland, A.J.-Bell, P.-Hart, C.-Jepson, I.-Nevshemal, T.-Register, III J.-Wright, S.:* 1997. Reversible male sterility: a novel system for the production of hybrid corn. *The Society of Experimental Biology SEB 1044*: 141-147.
- Haldrup, A.-Petersen, SG.-Okkels, FT.:* 1998. Positive selection: a plant selection principle based on xylose isomerase, an enzyme used in the food industry. *Plant Cell Reports*, 18: 76-81.
- Hansen, G.-Chilton, M.D.:* 1999. Lessons in gene transfer to plants by a gifted microbe. *Plant Biotechnology*, 240: 21-57.

- Harwood, W.A.-Ross, S.M.-Cilento, P.-Snape, J.W.: 2000. The effect of DNA/gold particle preparation technique, and particle bombardment device, on the transformation of barley (*Hordeum vulgare*). *Euphytica*, 111: 67-76.
- He, G.Y.-Lazzeri, P.A.: 1998. Analysis and optimisation of direct DNA delivery into wheat scutellum and Tritordeum inflorescence explants by tissue electroporation (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*, 18: 64-70.
- He, G.Y.-Lazzeri, P.A.-Cannell M.E.: 2001. Fertile transgenic plants obtained from tritordeum inflorescences by tissue electroporation. *Plant Cell Reports*, 20: 67-72.
- He, G.Y.-Rooke, L.-Steele, S.-Békés, F.-Gras, P.-Tatham, A.S.-Fido, R.-Barcelo, P.-Shewry, P.R.-Lazzeri, P.A.: 1999. Transformation of pasta wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) with high-molecular-weight glutenin subunit genes and modification of dough functionality. *Molecular Breeding*, 5: 377-386.
- Hiei, Y.-Komari, T.-Kubo, T.: 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology*, 35: 205-218.
- Hiei, Y.-Ohta, S.-Komari, T.-Kumashiro, T.: 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*, 6: 271-282.
- Iser, M.-Fetting, S.-Scheyhing, F.-Viertel, K.-Hess, D.: 1999. Genotype-dependent stable genetic transformation in German spring wheat varieties selected for high regeneration potential. *Journal of Plant Physiology*, 154: 509-516.
- Ishida, Y.-Saito, H.-Ohta, S.-Hiei, Y.-Komari, T.-Kumashiro, T.: 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology*, 14: 745-750.
- Jach, G.-Binot, E.-Frings, S.-Luxa K.-Schell, J.: 2001. Use of red fluorescent protein from *Discosoma sp.* (dsRED) as a reporter for plant gene expression. *The Plant Journal*, 28: 483-491.
- Jefferson, R.: 1987. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, 5: 387-405.
- Jelenska J.-Tietze, E.-Tempe, J.-Brevet, J.: 2000. Streptothricin resistance as a novel selectable marker for transgenic plant cells. *Plant Cell Reports*, 19: 298-303.
- Jenes B.-Bittencourt, P.A.L.-Csányi Á.-Pauk J.-Nagy I.-Toldi O.-Balázs E.: 1996. The GENEBOOSTER - a new microprojectile bombardment device - for genetic transformation of plants. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 2: 42-51.

- Jenes, B.-Poulimatka, M.-Bittencourt, P.-Pulli, S.: 1994. Time saving method for protoplast isolation, transformation and transient gene expression assay in barley. *Agricultural Science in Finland*, 3: 199-205.
- Karp A.: 1991. On the current understanding of somaclonal variation. *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, 7: 1-58.
- Karsai I.-Bedő Z.-Balla L.: 1993. Effect of donor plant growth environment on in vitro androgenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Acta Agronomica Hungarica*, 42: 3-9.
- Karsai I.-Bedő Z.-Hayes P.M.: 1994a. Effect of induction medium pH and maltose concentration on in vitro androgenesis of hexaploid winter triticale and wheat. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 39: 49-53.
- Karsai I.-Bedő Z.-Kovács G.-Barnabás B.: 1994b. The effect of in vivo and in vitro aluminum treatment on anther culture response of triticale x wheat hybrids. *Journal of Genetics and Breeding*, 48: 353-357.
- Karunaratne, S.-Sohn, A.-A, Scott, J.-Steinbiss, H.-H.-Scott, K.J.: 1996. Transformation of wheat with the gene encoding the coat protein of barley yellow mosaic virus. *Australian Journal of Plant Physiology*, 23: 429-435.
- Kikkert, J.R.: 1993. The Biolistic PDS-1000/He device. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 33: 221-226.
- Kohli, A.-Gahakwa, D.-Vain, P.-Laurie, D.A.-Christou, P.: 1999. Transgene expression in rice engineered through particle bombardment: Molecular factors controlling stable expression and transgene silencing. *Planta*, 208: 88-97.
- Komari, T.-Hiei, Y.-Saito, Y.-Murai, N.-Kumashiro, T.: 1996. Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant Journal*, 10: 165-174.
- Kunkel, T.-Niu, Q.W.-Chan, Y.S.-Chua, N.H.: 1999. Inducible isopentenyl transferase as a high-efficiency marker for plant transformation. *Nature Biotechnology*. 17: 916-919.
- Kyozuka, J.-Fujimoto, H.-Izawa, T.-Shimamoto, K.: 1991. Anaerobic induction and tissue-specific expression of maize *Adh1* promoter in transgenic rice plants and their progeny. *Molecular and General Genetics*, 228: 40-48.
- Kyozuka, J.-McElroy, D.-Hayakawa, T.-Xie, Y.-Wu, Y.-Shimamoto, K.: 1993. Light-regulated and cell-specific expression of tomato *rbcS-gusA* fusion genes in transgenic rice. *Plant Physiology*, 102: 991-1000.

- Last, D.I.-Brettell, R.I.S.-Chamberlain, D.A.-Chaudhury, A.M.-Larkin, P.J.-Marsh, E.L.-Peacock, W.J.-Dennis, E.S.:* 1991. PEmu: an improved promoter for gene expression in cereal cells. *Theoretical Applied Genetics*, 81: 581-588.
- Laursen, C.M.-Krzyzek, R.A.-Flick, C.E.-Anderson, P.C.-Spencer, T.M.:* 1994. Production of fertile transgenic maize by electroporation of suspension culture cells. *Plant Molecular Biology*, 24: 51-61.
- Lazzeri, PA.-Barcelo, P.-Barro, F.-Rooke, L.-Cannell, M.E.-Rasco-Gaunt, S.-Tatham, A.S.-Fido, R.-Shewry, P.R.:* 1997. Biotechnology of cereals: genetic manipulation techniques and their use for the improvement of quality, resistance and input use efficiency traits. In *Optimising cereal inputs: its scientific basis. Part 1.* Cirencester, UK. *Aspects of Applied Biology*, 50: 1-8.
- Leckband, G.-Loerz, H.:* 1998. Transformation and expression of a stilbene synthase gene of *Vitis vinifera* L. in barley and wheat for increased fungal resistance. *Theoretical Applied Genetics*, 96: 1004-1012.
- Lörz, H.-Baker, B.-Schell, J.:* 1985. Gene transfer to cereal cells mediated by protoplast transformation. *Molecular and General Genetics*, 199: 178-182.
- Lyznik, L.A.-Hirayama, L.-Rao, K.V.-Abad, A.-Hodges, T.K.:* 1995. Heat-inducible expression of FLP gene in maize cells. *The Plant Journal*. 8: 177-186.
- Machii, H.-Mizuno, H.-Hirabayashi, T.-Li, H.-Hagio, T.:* 1998. Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from anther and immature embryo cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 53: 67-74.
- Matsuoka, M.-Kyojuka, J.-Shimamoto, K.-Kano-Murakami, Y.:* 1994. The promoters of two carboxylases in a C₄ plant (maize) direct cell-specific, light-regulated expression in a C₃ plant (rice). *Plant Journal*, 6: 311-319.
- Mc Elroy, D.-Blowers, A.D.-Jenes B.-Wu, R.:* 1991. Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (*Act1*) 5' region for use in monocot transformation. *Molecular and General Genetics*, 231: 150-160.
- McIntosh, R.A.:* 1998. Breeding for resistance to biotic stresses. *Euphytica*, 100: 19-34.
- Molina, A.-Diaz, I.-Vasil, I.K.-Carbonero, P.-Garcia-Olmedo, F.:* 1996. Two cold-inducible genes encoding lipid transfer protein LTP4 from barley show differential responses to bacterial pathogens. *Molecular and General Genetics*, 252: 162-168.
- Murashige, T.-Skoog, F.:* 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15: 473-497.

- Nehra, N.S.-Chibbar, R.N.-Leung, N.-Caswell, K.-Mallard, C.-Steinhauer, L.-Baga, M.-Kantha, K.K.: 1994. Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissues following microprojectile bombardment with two distinct gene constructs. *Plant Journal*, 5: 285-297.
- Odell, J.T.-Nagy, F.-Chua, N.: 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 313: 810-812.
- Omirulleh, S.-Ábrahám, M.-Golovkin, M.-Stefanov, I.-Karabaev, M.K.-Mustardy, L.-Morocz, 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 Molecular Biology*, 21: 415-428.
- Omirulleh, S.-Ábrahám, M.-Golovkin, M.-Stefanov, I.-Karabaev, M.K.-Mustardy, 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 Molecular Biology*, 21: 415-428.
- Pauk, J.-Hänsch, R.-Schwarz, G.-Nerlich, A.-Monostori, T.-Mészáros, A.-Jenes, B.-Kertész, Z.-Matuz, J.-Schulze, J.-Mendel, R.R.: 1998. Genetic transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) in Hungary. *Növénytermelés*, 47: 241-251.
- Pauk, J.-Nerlich, H.-Pawelczyk, K.-Schledzewski, J.-Matuz, I.K.-Simon, R.R.-Mendel, T.: 1996. Transgenic fertile rice plants obtained through biolistic transformation using reporter genes and TR promoter, In Kush GS (eds), *Rice Genetics III*, pp. 719-722. The Philippines.
- Pauk, J.-Purnhauser, L.: 1993. Advances in tissue culture of wheat with special regard to plant regeneration and applications in breeding. *Hungarian Agricultural Research*, 2: 22-25.
- Pauk, J.-Szarka, B.: 1991. Protoplast isolation and investigations in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Physiologia Plantarum*, 82: 1.
- Pellegrineschi, A.-McLean, S.-Salgado, M.-Velazquez, L.-Hernandez, R.-Brito, R.M.-Noguera, M.-Medhurst, A.-Hoisington, D.: 2000. Transgenic wheat plants: A powerful breeding source. In Bedő Z, Láng L (eds), *Wheat in a Global Environment*, pp. 325-330.
- Perl, A.-Kless, H.-Blumenthal, A.-Galili, G.-Galun, E.: 1992. Improvement of plant regeneration and GUS expression in scutellar wheat calli by optimisation of culture conditions and DNA-microprojectile delivery procedures. *Molecular and General Genetics*, 235: 279-284.

- Petolino, J.F.-Hopkins, N.L.-Kosegi, B.D.-Skokut, M.:* 2000. Whisker-mediated transformation of embryogenic callus of maize. *Plant Cell Reports*, 19: 781-786.
- Pónya Z.-Finy P.-Fehér A.-Mityko J.-Dudits D.-Barnabás B.:* 1999. Optimisation of introducing foreign genes into egg cells and zygotes of wheat (*Triticum aestivum* L.) via microinjection. *Protoplasma*, 208: 163-172.
- Popineau, Y.-Deshayes, G.-Lefebvre, J.-Fido, R.-Tatham, A.S.-Shewry, P.R.:* 2001. Prolamin aggregation, gluten viscoelasticity, and mixing properties of transgenic wheat lines expressing 1Ax and 1Dx high molecular weight glutenin subunit transgenes. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49: 395-401.
- Potrykus I.:* 1991. Gene transfer to plants: Assessment of published approaches and results. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 205-225.
- Puolimatka M.-Pauk J.:* 2000. Effect of incubation duration and medium composition on plant regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Journal of Plant Physiology*, 156: 197-203.
- Puolimatka, M.-Pauk, J.:* 1999. Impact of explant type, duration and initiation time on the co-culture effect in isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Plant Physiology*, 154: 367-373.
- Purnhauser L.:* 1991. Stimulation of shoot and root regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) callus cultures by copper. *Cereal Research Communications*, 19: 419-423.
- 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.
- Purnhauser L.-Medgyesi P.-Czakó M.-Dix, P.J.-Márton L.:* 1987. Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. tissue culture using the ethylene inhibitor AgNO₃. *Plant Cell Reports*, 6: 1-4.
- Rakszegi M.-Békés F.-Juhász A.-Szűcs P.-Láng L.-Tamás L.-Bedő Z.-Shewry, P.R.:* 2000. Technological quality of a transgenic Australian spring wheat variety under central European conditions. *Cereals 2000, Proceedings of the 11th ICC Cereal and Bread Congress and of the 50th Australian Cereal Chemistry Conference* (M. Wootton, I.L. Batey, C.W. Wrigley eds.) Melbourne, Australia pp. 261-264.
- Rakszegi M.-Tamás C.-Szűcs P.-Tamás L.-Bedő Z.:* 2001. Current status of wheat transformation. *Journal of Plant Biotechnology* 3:67-81.
- Rasco-Gaunt, S.-Barcelo, P.:* 1999. Immature inflorescence culture of cereals: a highly responsive system for regeneration and transformation. In Hall RD (eds), *Methods in*

- Molecular Biology: Plant Cell Culture Protocols, pp. 71-81. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Rasco-Gaunt, S.-Riley, A.-Barcelo, P.-Lazzeri, P.A.: 1999a. Analysis of particle bombardment parameters to optimize DNA delivery into wheat tissues. *Plant Cell Reports*, 19: 118-127.
- Rasco-Gaunt, S.-Riley, A.-Lazzeri, P.-Barcelo, P.-De Block, M.-Block, M. de.: 1999b. A facile method for screening for phosphinothricin (PPT)-resistant transgenic wheats. *Molecular Breeding*, 5: 255-262.
- Rasco-Gaunt, S.-Riley, A.-Cannell, M.-Barcelo, P.-Lazzeri, P.A.: 2001. Procedures allowing the transformation of a range of European elite wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties via particle bombardment. *Journal of Experimental Botany*, 52: 865-874.
- Reed, J.N.-Chang, Y.F.-McNamara, D.D.-Beer, S.-Miles, P.J.: 1999. High frequency transformation of wheat with the selectable marker mannose-6-phosphate isomerase (PMI). *In Vitro* 35, 57A.
- Repellin, A.-Baga, M.-Jauhar, P.P.-Chibbar, R.N.: 2001. Genetic enrichment of cereal crops via alien gene transfer: new challenges. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 64: 159-183.
- Rooke, L.-Békés, F.-Fido, R.-Barro, F.-Gras, P.-Tatham, A.S.-Barcelo, P.-Lazzeri, P.-Shewry, P.R.: 1999. Overexpression of a gluten protein in transgenic wheat results in greatly increased dough strength. *Journal of Cereal Science*, 30: 115-120.
- Russell, D.A.-Fromm, M.E.: 1997. Tissue-specific expression in transgenic maize of four endosperm promoters from maize and rice. *Transgenic Research*, 6: 157-168.
- Sági L.-Pains, B.-Remy, S.-Schoofs, H.-De Smet, K.-Swennen, R.-Cammue, B.P.A.: 1995. Genetic transformation of banana and plantain (*Musa spp.*) via particle bombardment. *BioTechnology*, 13: 481-485.
- Sanford, J.C.: 1988. The biolistic process - a new concept in gene transfer and biological delivery. *Trends Biotechnology*, 6: 229-302.
- Serik, O.-Ainur, I.-Murat, K.-Tetsuo, M.-Masaki, I.: 1996. Silicon carbide fiber-mediated DNA delivery into cells of wheat (*Triticum aestivum* L.) mature embryos. *Plant Cell Reports*, 16: 133-136.
- Shaw, K.J.-Rather, P.N.-Hare, R.S.-Miller, G.H.: 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.*, 57: 138-163.
- Shewry, P.R.: 2000. Improvement of the wheat processing quality by genetic engineering. *Gluten 2000*, Bristol, UK, 2-6 April 2000.

- Srivastava, V.-Anderson, O.D.-Ow, D.W.:* 1999. Single-copy transgenic wheat generated through the resolution of complex integration patterns. *Proceeding of the National Academy of Science*, 96: 11117-11121.
- Srivastava, V.-Vasil, V.-Vasil, I.K.:* 1996. Molecular characterization of the fate of transgenes in transformed wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical Applied Genetics*, 92: 1031-1037.
- Stewart Jr C.N.:* 2001. The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. *Plant Cell Reports*, 20: 376–382.
- Stoger, E.-Williams, S.-Christou, P.-Down, R.E.-Gatehouse, J.A.:* 1999. Expression of the insecticidal lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) in transgenic wheat plants: effect on predation by the grain aphid *Sitobion avenae*. *Molecular Breeding*, 5: 65-73.
- Sugita, K.-Matsunaga, E.-Ebinuma, H.:* 1999. Effective selection system for generating marker-free transgenic plants independent of sexual crossing. *Plant Cell Reports*, 18: 941-947.
- Takumi, S.-Shimada, T.:* 1996. Production of transgenic wheat through particle bombardment of scutellar tissues: frequency is influenced by culture duration. *Journal of Plant Physiology*, 149: 418-423.
- Tamás C.-Rakszegi M.-Szűcs P.-Tamás L.-Bedő Z.:* 2000. Temperature, light and medium optimisation for plant regeneration of winter wheat varieties. 6th International Wheat Conference, p. 308. Budapest, Hungary, 5-9 June 2000.
- Tamás L.-Tamás C.-Morell, K.M.-Appels, R.:* 1999. The use of GFP gene as a reporter gene in wheat transformation. 4th Congress of the Hungarian Genetical Society, p. 166.
- Tingay, S.-McElroy, D.-Kalla, R.-Fieg, S.-Wang, M.-Thornton, S.-Brettell, R.:* 1997. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *The Plant Journal*, 11: 1369-1376.
- Toki, S.:* 1997. Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15: 16-21.
- Tzafrir, I.-Torbert, K.A.-Lockhart, B.E.L.-Somers, D.A.-Olszewski, N.E.:* 1998. The sugarcane bacilliform badnavirus promoter is active in both monocots and dicots. *Plant Molecular Biology*, 38: 347-356.
- Vain, P.-Worland, A.-Kohli, A.-Snape, J.W.-Christou, P.:* 1998. The green fluorescent protein (GFP) as a vital screenable marker in rice transformation. *Theoretical Applied Genetics*, 96: 164-169.

- Vasil, I.K.: 1998. Biotechnology and food security for the 21st century: a real-world perspective. *Nature Biotechnology*, 16: 399-400.
- Vasil, V.-Castillo, A.M.-Fromm, M.E.-Vasil, I.K.: 1992. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *BioTechnology*, 10: 667-674.
- Vibók I.-Nagy T.-Bittencourt P.-Jenes B.-Dallmann G.: 1999. Endosperm specific expression of a gliadin-actin hybrid promoter in transgenic rice (*Oryza sativa* L.). *Cereal Research Communications*, 27: 241-249.
- Wan, Y.-Lemaux, P.G.: 1994. Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiology*, 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 Physiology*. 102: 1077-1084.
- Weeks, T.: 1998. USDA Agricultural Research Report.
- Weir, B.-Gu, X.-Wang, M.B.-Upadhyaya, N.-Elliot, A.R.-Brettell, R.I.S.: 2001. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of wheat using suspension cells as a model system and green fluorescent protein as a visual marker. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28: 807-818.
- Wright, M.-Dawson, J.-Dunder, E.- Suttie, J.- Reed, J.-Kramer, C.-Chang, Y.- Novitzky, R.- Wang, H.-Artim-Moore, L.: 2001. Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as the selectable marker. *Plant Cell Reports*, 20: 429–436.
- Xia, G.M.-Li, Z.Y.-He, C.X.-Chen, H.M.-Brettell, R.: 1999. Transgenic plant regeneration from wheat (*Triticum aestivum* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Phytophysiological Sinica*, 25: 22-28.
- Xu, D.-Lei, M.-Wu, R.: 1995. Expression of the rice *Osgrp1* promoter-Gus reporter gene is specifically associated with cell elongation/expansion and differentiation. *Plant Molecular Biology*, 28: 455-471.
- Xu, X.-Li, B.: 1994. Fertile transgenic Indica rice plants obtained by electroporation of seed embryo cells. *Plant Cell Reports*, 13: 237-242.
- Xu, Y.-Zhu, Q.-Panbangreb, W.-Shirasu, K.-Lamb, C.: 1996. Regulation, expression and function of a new basic chitinase gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Molecular Biology*, 30: 387-401.

- Zhang, L.-Rybczynski, J.J.-Langenberg, W.G.-Mitra, A.-French, R.: 2000. An efficient wheat transformation procedure: transformed calli with long-term morphogenic potential for plant regeneration. *Plant Cell Reports*, 19: 241-250.
- Zhang, S.-Cho, M.J.-Koprek, T.-Yun, R.-Bregitzer, P.-Lemaux, P.G.: 1999. Genetic transformation of commercial cultivars of oat (*Avena sativa* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) using in vitro shoot meristematic cultures derived from germinated seedlings. *Plant Cell Reports*, 18: 959-966.
- Amoah, B.K.-Wu, H.-Sparks, C.-Jones, H.D.: 2001. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of uidA in wheat inflorescence tissue. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1135-1141.

A szerzők levélcíme – Address of the authors:

Rakszegi Mariann-Szűcs Péter-Tamás Cecília

MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete

Martonvásár, Pf. 19, H-2462

Dr. Tamás László

Eötvös Lóránd Tudományegyetem, Növényélettani Tanszék

Budapest, Pf. 330, H-1445