



(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

214 435 B

(21) A bejelentés ügyszáma: 4519/90
(22) A bejelentés napja: 1990. 05. 16.
(30) Elsőbbségi adatok:
89/11295.7 1989. 05. 17. GB
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/GB 90/00753
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 90/14000

(51) Int. Cl.⁶

A 01 H 1/06
C 12 N 15/01

(40) A közzététel napja: 1992. 10. 28.
(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1998. 03. 30.

(72) Feltalálók:

Bright, Simon William Jonathan, Marlow,
Buckinghamshire (GB)
Chang, Ming Tang, Ames, Iowa (US)
Evans, Ian Jeffrey, Reading, Berkshire (GB)
Macdonald, Mairi Jean, Wokingham, Berkshire
(GB)

(73) Szabadalmas:

ZENECA Ltd., London (GB)

(74) Képviselő:

dr. Jalsovszky Györgyné és
dr. Tóth-Urbán László, Budapest

(54)

Eljárás gyomirtó szernek ellenálló kukorica előállítására

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás egy adott herbicid hatóanyag normál körülmények között pusztulást előidéző koncentrációjával szemben rezisztens kukorica (*Zea mays*) mutáns előállítására oly módon, hogy *Zea mays* izolált pollenjét mutagén vegyszer hatásának teszik ki, a mutagenizált pollent elkülönítik, a mutagenizált pollennel nőivarú növényt poroznak be, az érett növény magvait betakarítják, a magvakat a kiválasztott herbicid hatóanyag vagy a kiválasztott herbicid hatóanyagával azonos hatásmechanizmusú más herbicid hatóanyag szelekciós nyomásának kitéve növényekké nevelik, és az alkalmazott szelekciós nyomással szemben rezisztens utódokat elkülönítik.

HU 214 435 B

A találmány tárgya eljárás gyomirtó szernek ellenálló kukorica növények előállítására.

A gyomirtó szereknek ellenálló haszonnövények kialakításának célja az, hogy lehetővé váljék a haszonnövények között élő gyomnövények elpusztítása a teljes termőterület kezelésével olyan gyomirtó szer-koncentráció alkalmazása mellett, amely egyébként a normál állapotú – tehát gyomirtó szerre érzékeny – haszonnövényeket is elpusztítaná. Az ilyen rezisztens haszonnövények további előnyös tulajdonsága az, hogy olyan termőterületeken is termesztethők, amelyeket rövid idővel azelőtt más növényekkel szemben hatásos herbicid hatóanyagokkal kezeltek.

Már ismertek olyan eljárások, amelyekkel nagyszámú véletlenszerű mutációt tartalmazó növénypopulációk alakíthatók ki. Ilyen eljárások például a szövettényésztségi módszerek, ahol mutagén anyag jelenlétében vagy távollétében spontán szomaklónos változások lépnek fel. Ha a tenyészetekre valamilyen szelekciós nyomást gyakorolnak, lehetővé válik olyan sejtek elkülönítése, amelyek az adott nyomásnak ellenállnak. A növény fajtájától függően esetenként teljes növények regenerálhatók a rezisztens sejtekből. A herbicidekre rezisztens növényfajták kiválasztásához már régóta alkalmaznak ilyen szövettényésztségi szelekciós módszereket.

Neuffer és Coe (Maydica XXIII, 21-28 (1978)) eljárást ismertetett kukorica pollen mutagenézis előidézésére könnyű paraffinolajban szuszpendált mutagén anyagok felhasználásával. A recipiens növény beporzására az így kialakított mutagenizált pollent használták. A közlemény adatai szerint semmi jele nincs annak, hogy kereskedelmileg értékes mutánsok azonosítását és elkülönítését megkísérelték volna, és noha a közlemény tartalmaz olyan állítást, hogy a kapott növényeket mutánsok előfordulására is vizsgálták, az esetlegesen (véltetően vizuális vizsgálattal) fellelhető mutánsok sajátosságairól a közlemény semmiféle információt nem ad.

Bird és Neuffer a Plant Breeding Reviews 5, 39–180 közleményben átfogóan ismertetik a mutagén eljárások alkalmazását kukorica variációk kialakítására. A pollen mutagenézist a közlemény 150–151. oldala ismerteti. Az egyéb ismert megoldásokhoz viszonyítva pollen mutagenézissel az M_1 generációban viszonylag nagy gyakorisággal alakíthatók ki variánsok. Nem utal azonban az idézett közlemény arra, hogy pollen mutagenézissel olyan mutánsok is kialakíthatóak lennének, amelyek ellenállnak a gyomirtó szerek hatásának. Az idézett közlemény III. fejezete (149. oldal) a genetikai változások mutagenézissel való előidézésének korlátait ismerteti. A közlemény továbbá eljárást ismertet a hasznos fenotípusok kiszűrésére a vélt mutánsok populációjából.

A találmány tárgya eljárás gyomirtó szernek ellenálló kukorica előállítására.

A találmány tárgya pontosabban eljárás olyan kukorica (*Zea mays*) mutáns előállítására, amely egy adott herbicid hatóanyag normál körülmények között pusztulást előidéző koncentrációjával szemben rezisztens. A találmány értelmében úgy járunk el, hogy *Zea mays* izolált pollenjét mutagén vegyszer hatásának tesszük ki, a mutagenizált pollent elkülönítjük, a mutagenizált pol-

lennel nőivarú növényt porozunk be, az érett növény magvait összegyűjtjük, a magvakat a kiválasztott herbicid vagy a kiválasztott herbicidével azonos hatásmechanizmusú más herbicid hatóanyag szelekciós nyomásának kitéve növényre neveljük, és az alkalmazott szelekciós nyomással szemben rezisztens utódokat elkülönítjük.

Mutagén vegyszerként előnyösen metán-szulfonsav-etil-észtert használunk.

Szelekciós nyomást kiváltó herbicid hatóanyagként előnyösen acetolaktát szintáz-inhibitor hatású herbicid hatóanyagokat, különösen előnyösen imazetapirt használunk.

A szelekciós nyomást előnyösen úgy fejtjük ki a növényekre, hogy a magvakat kikelés előtt kezeljük a herbicid hatóanyaggal.

A szelekciós nyomást kiváltó herbicid hatóanyagot előnyösen olyan koncentrációban alkalmazzuk, ami a magvak csírázását nem akadályozza meg, az érzékeny növények növekedését azonban gátolja.

A találmány szerint előállított, herbicid hatóanyagokra rezisztens kukorica növények egyes képviselőinek magvait a National Collection of Industrial and Marine Bacteria (Aberdeen, Nagy-Britannia) gyűjteményben helyeztük letétbe. A letétbe helyezés adatait az 1. táblázatban közöljük.

Valamennyi letétbe helyezett minta genetikus keverék, amelyben egyaránt található mutáns és nem-mutáns magvak. A mutánsok a herbicid hatóanyaggal szembeni rezisztenciát közvetítő génre nézve heterozigóták. Ezekből a magvakból úgy alakíthatunk ki mutáns növényeket, hogy a magvakból a későbbiekben „szűrés” címszó alatt ismertető körülmények között, imazetapir herbicid hatóanyag jelenlétében növényeket nevelünk.

A találmány szerint előállított kukorica növények az imidazolinon típusú herbicid hatóanyagok egyes képviselőivel szemben rezisztensek. Így például a növények imazetapirral [5-etil-2-(5-izopropil-5-metil-4-oxo-2-imidazolin-2-il)-nikotinsav; PURSUIT védjegynéven forgalomba hozza az American Cyanamid Co., Egyesült Államok] szemben erős rezisztenciát mutatnak. A növé-

1. táblázat

A mutáns sorszáma	A bejelentő által használt kódjel	A letét száma	A letétbe helyezés kelte
1.	ICI/88/01 63-3D	NCIMB 40137	1989. 05. 08.
2.	ICI/88/03 56-3G	NCIMB 40136	1989. 05. 08.
3.	ICI/88/04 82-5H	NCIMB 40138	1989. 05. 08.
4.	lásd a táblázathoz fűzött megjegyzést		
5.	ICI/88/07 97-4L	NCIMB 40167	1989. 07. 18.
6.	ICI/88/07 76-6H	NCIMB 40168	1989. 07. 18.
7.	ICI/88/07 58-5D	NCIMB 40169	1989. 07. 18.
8.	ICI/88/09 77-7W	NCIMB 40170	1989. 07. 18.
9.	ICI/88/10 1-4C	NCIMB 40171	1989. 07. 18.
10.	ICI/88/10 72-4W	NCIMB 40172	1989. 07. 18.

Megjegyzés: A 4. sorszámú mutánt a későbbi vizsgálatok során kiemeltük a kísérleti programból, mert a mutáns nem rendelkezett kellő rezisztenciával. A 4. sorszámú mutánt kizárólag a számozás folyamatosságának fenntartása érdekében tüntettük fel a táblázatban.

nyeknél kereszt-rezisztenciát tapasztaltunk a szulfonil-karbamid típusú herbicid hatóanyagok (például a klórszulfuron) egyes képviselőivel szemben, és a fenoxi-pirimidin és triazolo-pirimidin típusú herbicid hatóanyagokkal szemben is észleltünk rezisztenciát. A növények más – eddig még nem vizsgált – típusokba tartozó herbicid hatóanyagokkal szemben is rezisztensek lehetnek.

Kísérleteink során a növények rezisztenciáját olyan herbicid hatóanyagokkal szemben vizsgáltuk, amelyek az acetolaktát szintáz (ALS) – más néven acetohidroxisav szintáz (AHAS) – enzim gátlása révén fejtik ki hatásukat. A leírásban a herbicid hatóanyagok megjelölésére azok nemzetközi szabad nevét vagy védjegynevét használjuk; az egyes hatóanyagok kémiai szerkezetét a csatolt rajzokon mutatjuk be. Az imazetapir az (I) képletnek, az imazakvin a (II) képletnek, az imazapir a (III) képletnek, a klórszulfuron a (IV) képletnek, a tiakarburon az (V) képletnek, a klorimuron a (VI) képletnek, a triazolo-pirimidin a (VII) képletnek, míg a fenoxi-pirimidin a (VIII) képletnek felel meg.

A szulfonil-karbamid típusú herbicid hatóanyagokkal szembeni rezisztencia molekuláris alapjait a 257 993 sz. európai szabadalmi bejelentés részletesen ismerteti. A 4 761 373 sz. Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás imidazolinon-rezisztens kukorica izolálásáról ismerteti szövettenyésztésből. A szakirodalomban más növényfajták és más herbicid hatóanyagok felhasználását is ismertették rezisztens mutánsok kialakítására szövettenyésztési eljárással.

A találmány értelmében ezzel szemben nem alkalmazunk szövettenyésztést. A rezisztenciát a pollen mutagén vegyszerrel végzett kezelésével, mutagenézis révén alakítjuk ki. A szelekciót közvetlenül a mutagenizált pollennel megtermékenyített növények magvain hajtjuk végre úgy, hogy a magvakat kikelés előtt és/vagy a palántaállapot kialakulásakor kezeljük az adott herbicid hatóanyaggal.

A pollen mutagenézisen alapuló mutánsképzésnek a szélesebb körben alkalmazott szomaklónos variánsképzéssel összehasonlítva több előnye van. Ahhoz, hogy a szomaklónos variáció végbemenjen, a növényi szövettenyésztet stabilizálására van szükség. Ez a követelmény korlátozza a felhasználható genotípusok választékát, mert a tenyésztett szövetekből nem lehet minden esetben regenerálni a teljes növényt. Ezzel szemben a mutagenizált pollen bármely recipiens kukorica genotípus megtermékenyítésére alkalmazható, a gazdaságilag fontos, széles körben termesztett elit tenésvonalakat is beleértve. Előnyt jelent az is, hogy a szomaklónos variánsképzés során előfordulható arányhoz képest csökken a nem kívánt mutációk kialakulásának aránya.

A találmány szerint a szelekciót az M_1 generáción végezzük ennek eredményeként csak a domináns mutációkat szelektáljuk. Tekintettel arra, hogy a szelekciót teljes növényeken és/vagy kikelés előtt magvakon végezzük, a szelekcióhoz alkalmazott herbicid hatóanyag-koncentráció jobban megközelítheti a szabadföldi körülményeket annál, mint ha a herbicid hatóanyaggal szövettenyésztetre gyakorolnánk szelekciós nyomást. A szövettenyésztetben végzett szelekció esetén először a növé-

nyeket regenerálni kell a szövetekből, majd teljes érettségig kell nevelni, mielőtt megállapítható lenne, hogy az utódnövény hogyan tolerálja a szabadföldi körülmények között felvitt herbicid hatóanyag-mennyiséget. Ezzel szemben a találmány szerinti eljárás során a szelekciót közvetlenül a növényeken végezzük olyan herbicid hatóanyag-koncentráció alkalmazásával, amely összemérhető a szabadföldi körülmények között gyomirtásra szokásosan alkalmazott mennyiséggel. Az M_2 generáción végzett szelekció során – így a szövettenyésztetben végzett eljáráskor – recesszív mutációk és domináns jellemzők egyaránt szelektálódnak. Termesztési programokban – elsősorban hibridek termesztésekor – hasznosabbak és könnyebben kezelhetőek azok a mutánsok, amelyekben a kívánt jellemző a domináns.

Feltevésünk szerint a herbicid nyomás alkalmazásával szelektált mutánsok az adott herbicid hatóanyag-típusba tartozó kiválasztott herbicid hatóanyagnak megfelelően változnak. A találmány tárgykörébe tartozó összes mutáns imazetapir nyomás alkalmazásával szelektáltak. Más imidazolinon típusú herbicid hatóanyag felhasználásakor a mutánsok más spektruma szelektálódnak.

Meglepő módon azt tapasztaltuk, hogy a találmány szerinti eljárással izolált mutánsok káros mutációktól mentesek. Ez az eredmény nem volt előre látható, és ennek okát ma még nem ismerjük pontosan. Anélkül, hogy bejelentésünket elméleti fejtegetésekhez kívánánk kötni, megjegyezzük, hogy az általunk elért kedvező eredménynek feltehetőleg az lehet a magyarázata, hogy a szelekciós lépésben igen finoman szabályoztuk a körülményeket, így például a herbicid hatóanyagot igen pontosan szabályozott mennyiségben és módon vittük fel, ennek következtében a növények egyenletes mértékben voltak kitéve a herbicid hatóanyag hatásának.

A továbbiakban a herbicidekkel szemben rezisztens növények előállítását ismertetjük részletesebben. Az ismertetés során a csatolt rajzokra hivatkozunk.

Az 1. ábrán feltüntetett blokkdiagramon azt mutatjuk be, hogyan alakíthatunk ki a találmány szerint előállított növényekből utód-generációkat.

A 2. ábrán a találmány szerinti eljárásban felhasznált herbicid hatóanyagok kémiai szerkezetét tüntetjük fel.

A 3. ábrán grafikusán szemléltetjük az ALS enzim aktivitásának változását imazetapir jelenlétében. Az enzimet a rezisztencia-génre nézve heterozigótás növények leveleiből vontuk ki.

A 4. ábrán grafikusán szemléltetjük az ALS enzim aktivitásának változását imazapir jelenlétében. Az enzimet a rezisztencia-génre nézve heterozigótás növények leveleiből vontuk ki.

Az 5. ábrán grafikusán szemléltetjük az ALS enzim aktivitásának változását imazakvin jelenlétében. Az enzimet a rezisztencia-génre nézve heterozigótás növények leveleiből vontuk ki.

A 6. ábrán grafikusán szemléltetjük az ALS enzim aktivitásának változását klórszulfuron jelenlétében. Az enzimet a rezisztencia-génre nézve heterozigótás növények leveleiből vontuk ki.

A 7. ábrán grafikusán szemléltetjük az ALS enzim aktivitásának változását klorimuron jelenlétében. Az en-

zimet a rezisztencia-génre nézve heterozigótás növények leveleiből vontuk ki.

A 8. ábrán grafikusán szemléltetjük az ALS enzim aktivitásának változását tiakarburon jelenlétében. Az enzimet a rezisztencia-génre nézve heterozigótás növények leveleiből vontuk ki.

A 9. ábrán grafikusán szemléltetjük az ALS enzim aktivitásának változását imazetapir (Pursuit) jelenlétében. Az enzimet a rezisztens allelomorfa nézve homozigótás 1. és 2. mutáns utódainak leveleiből vontuk ki.

A 10. ábrán grafikusán szemléltetjük az ALS enzim aktivitásának változását imazakvin (Scepter) jelenlétében. Az enzimet a rezisztens allelomorfa nézve homozigótás 1. és 2. mutáns leveleiből vontuk ki.

A 11. ábrán grafikusán szemléltetjük az ALS enzim aktivitásának változását imazapir (Arsenal) jelenlétében. Az enzimet a rezisztens allelomorfa nézve homozigótás 1. és 2. mutáns leveleiből vontuk ki.

A 12. ábrán grafikusán szemléltetjük az ALS enzim aktivitásának változását klórszulfuron (Glean) jelenlétében. Az enzimet a rezisztens allelomorfa nézve homozigótás 1. és 2. mutáns leveleiből vontuk ki.

A 13. ábrán grafikusán szemléltetjük az ALS enzim aktivitásának változását klorimuron (Classic) jelenlétében. Az enzimet a rezisztens allelomorfa nézve homozigótás 1. és 2. mutáns leveleiből vontuk ki.

A 14. ábrán grafikusán szemléltetjük az ALS enzim aktivitásának változását tiakarburon (Harmony) jelenlétében. Az enzimet a rezisztens allelomorfa nézve homozigótás 1. és 2. mutáns leveleiből vontuk ki.

A 15. ábrán grafikusán szemléltetjük az ALS enzim aktivitásának változását egy triazolo-pirimidin típusú herbicid hatóanyag jelenlétében. Az enzimet a rezisztens allelomorfa nézve homozigótás 1. és 2. mutáns leveleiből vontuk ki.

A 16. ábrán grafikusán szemléltetjük az ALS enzim aktivitásának változását egy fenoxi-pirimidin típusú herbicid hatóanyag jelenlétében. Az enzimet a rezisztens allelomorfa nézve homozigótás 1. és 2. mutáns leveleiből vontuk ki.

A 17. ábrán az imazetapir (Pursuit) dózis-reakció görbét mutatjuk be.

A 18. ábrán az imazakvin (Scepter) dózis-reakció görbét mutatjuk be.

A 19. ábrán a klorimuron (Classic) dózis-reakció görbét mutatjuk be.

A 20. ábrán a klórszulfuron (Glean) dózis-reakció görbét mutatjuk be.

A 21. ábrán egy triazolo-pirimidin típusú herbicid hatóanyag dózis-reakció görbét mutatjuk be.

A 22. ábrán egy fenoxi-pirimidin típusú herbicid hatóanyag dózis-reakció görbét mutatjuk be.

A 23. ábrán az imazetapir (Pursuit) dózis-reakció görbét mutatjuk be, a görbét az 1. és 2. mutáns homozigótás és heterozigótás formáin vettük fel.

1. M_1 magvak termelése

Etil-metán-szulfonáttól (EMS) könnyű paraffinolajban 1 ml/100 ml koncentrációjú törzsoldatot készítettünk. A törzsoldatot hűtőszekrényben tároltuk.

Szabadföldön termesztett beltenyészeti UE95 vonalbeli kukorica-címerekből (20 db) friss pollenszemcséket különítettünk el a portokokkal együtt. A pollenszemcséket Glassline (védjegy) zsák (gyártja: Sanitary Supply CO. Inc., Phoenix, Arizona, USA) felhasználásával választottuk el a portokoktól.

60 ml űrtartalmú palackba 45 ml EMS törzsoldatot és körülbelül 3 mg pollent mértünk be. Az elegyet 30 másodpercig erőlyesen ráztuk, majd a pollenszemcsék kiválásának megakadályozása céljából egy 40 perces időszak alatt 3 percenként 4–5-ször összeráztuk. A kezelt pollenszemcséket ecseteléssel vittük fel a címereiktől megfosztott beltenyészeti UE95 nőivarú szülőnövények bibeszálaira (kukoricahajra).

A növényeket beérleltük, és az M_1 magvakat betakarítottuk.

2. Szűrés

Tálcákra szétterített WCB természetközegbe (kevés szerves anyagot, 45 tömeg% agyagot és 55 tömeg% homokot tartalmazó keverék) tálcánként 100 M_1 magvat tettünk, és a magvakat háti permetező berendezésből 250 g/hektár felviteli aránynak megfelelő koncentrációjú imazetapir (Pursuit) oldattal lecsurgásig bepermeteztük. A magvakat 1,3 cm vastagságban WCB természetközeggel (gyártja: Heatherwood Nurseries, Wimborne, Dorset, Nagy-Britannia) fedtük be, majd a tálcákat 25 °C-ra felfűtött üvegházba helyeztük.

A megválasztott felviteli arány mellett a magvak csírázási aránya közel 100%-os volt, ezt követően azonban az összes érzékeny növény súlyosan károsodott. Körülbelül 2 hét elteltével a herbicid hatóanyag hatása láthatóvá vált: vékony, csíkos levelek fejlődtek ki, és a növények magassága csak körülbelül 20%-a volt a kontrollkének. 3–4 hét elteltével csaknem az összes érzékeny növény teljes mértékben elpusztult. Minden egyes szűrővizsgálatban a kezelt növényekkel párhuzamosan kezeletlen UE95 növényeket is termesztettünk; korábbi vizsgálatokból ismert ugyanis, hogy az UE95 kukorica normál és M_1 magvakból kikelt egyedei csaknem megkülönböztethetetlenek egymástól, ha a növényeket permetezés nélkül csíráztatjuk és termesztjük. Ezek a kezeletlen növények kontrollként szolgáltak.

3. Szelekció és termesztés

A szűrővizsgálatok elvégzése után kezdetben 10 növényt (az összes kezelt növény 0,01%-a) szelektáltunk olyan egyedekként, amelyek képesek a herbicid hatóanyag normál körülmények között pusztuláshoz vezető dózisát tolerálni. A későbbi vizsgálatok során kitűnt, hogy a 4. mutáns az érzékeny fenotípusba tartozik, ezért ezt a mutánst kiemeltük a kutatási programból. A fennmaradt kilenc egyed többsége a szelekció után morfológiailag hasonló volt a kezeletlen kontroll növényekhez, négy növényen azonban károsodásokat észleltünk: a növények alacsonyabbak voltak a kontrolléknál, és a növényeken más, a herbicid hatóanyagnak tulajdonítható sérülések is láthatóak voltak. Az így kapott kilenc növény magvait visszakeresztettük az UE95 szülőnövénybe; a visszakeresztésből származó magvak mintáit a

National Collection of Industrial and Marine Bacteria gyűjteményben helyeztük letétbe (a letétbe helyezés adatait az 1. táblázat tartalmazza).

4. RFLP vizsgálat

Mind a tíz szelektált növény levélszövetéből kivont DNS-t RFLP (restriktív fragmeshossz polimorfia) ujjnyom-analízisnek vetettük alá annak megállapítása céljából, hogy a testvérnövények valóban az UE95 genotípusból származnak, nem pedig valamely rezisztensebb szennyező beltenyészetből vagy hibridből.

4 hetestől érettségig terjedő korú növényekből körülbelül 1–5 g levélszövetet különítettünk el, a DNS-t kivontuk, és diagnosztikus egymásolatos próbával elvégeztük az RFLP analízist.

Az RFLP analízis eredményei azt igazolták, hogy a szelektált növények az UE95 genotípusból származnak.

5. A szegregáció vizsgálata

A rezisztens növényeket reciprok visszakeresztezésben homozigótás, herbicidre érzékeny UE95 növényekkel kereszteztük. A kapott M_1BC_1 vagy M_1BC_2 generációban úgy határoztuk meg a rezisztens utódok gyakoriságát, hogy a növényeket imazetapirral kezeltük, majd megszámláltuk a túlélő növényeket. Az eredményeket – az 1:1 arányra számított χ^2 értékekkel együtt – a 2. táblázatban közöljük.

2. táblázat

A mutáns száma	A vizsgált növények száma	Az érzékeny növények száma	A rezisztens növények száma	χ^2
1.	40	18	22	0,40
2.	228	110	118	0,28
3.*	206	120	86	5,61
5.	168	94	74	2,38
6.	60	36	24	2,40
7.*	168	139	29	72,00
8.	188	88	100	0,77
9.	168	83	85	0,02
10.	134	73	71	0,03

*A 3. és 7. sz. mutáns imazetapirral szembeni rezisztenciája viszonylag csekély, ezért ebben a vizsgálatban nem lehet értékelhető eredményekhez jutni. A más vizsgálatok során szerzett tapasztalatok azonban azt jelzik, hogy a növények szegregációja az 1:1. tartományba esik.

A 2. táblázatban feltüntetett számadatokból megállapítható, hogy a visszakeresztezéssel kapott utódokban az érzékeny és rezisztens növények aránya (a 3. és 7. sz. mutáns kivételével) nem tér el jelentős mértékben az 1:1 értéktől. Ez azt jelzi, hogy a rezisztenciát egyetlen domináns gén hordozza.

6. F_1 magvak képzése rezisztens növényekből

A szűrés során elkülönített mind a 10 növényt reciprok keresztezésekben, a rezisztens növényeket hímivarú és nőivarú donorokként egyaránt alkalmazva, UE95 növényekkel kereszteztük. Így M_1BC_1 magvakhoz jutottunk.

7. Az utódmagvak újraszűrése

A fentiek szerint kapott minden egyes kukoricacsőből magmintát vettünk, és a magvakat az első szűrésnél ismertett körülmények között imazetapir (Pursuit) rezisztenciára újra szűrtük.

Mindegyik rezisztens növény utódaiban a rezisztens és érzékeny fenotípus elvált egymástól.

8. További generációk képzése

Az 1. ábrán bemutatottak szerint az M_1BC_1 növények önbeporzásával $M_1BC_1S_1$ generációt alakítottunk ki; az utóbbiból szintén önbeporzással alakítottuk ki az $M_1BC_1S_2$ generációt. Ebből a generációból – minthogy a rezisztens jellemző nem szegregálódik – az adott jellemzőre nézve homozigótás vonalak képezhetők. Az 1. mutánsból származó homozigótás vonalakat imidazolinon-típusú herbicidekkel szemben rezisztens F_1 hibridek termelésére vagy további termesztési munkákhoz használhatjuk fel.

9. Enzimvizsgálatok

A kilenc tovább vizsgált mutáns M_1BC_1 M_1BC_2 generációjából származó magvakat kikelés előtt 250 g/ha felviteli aránynak megfelelő mennyiségű imazetapirral (Pursuit) permetezzük be, majd üvegházba helyeztük. Az üvegházban 16 órás nappali, és 8 órás éjszakai fotoperiódust tartottunk fenn; a nappali hőmérséklet 27 °C, az éjszakai hőmérséklet 17 °C volt. 11 nap elteltével a növényeket betakarítottuk.

A növényeknek közvetlenül az első levéltengely fölötti részéről 4-4 g levélanyagot választottunk le, és a levélanyagot dörzsmozsárban 20 ml olyan oldattal homogenizáltuk, amely 40 mmól Tricine-t (védjegy), (gyártja: Boehringer Ingelheim Bioproducts, Bio Whittaker, Nagy-Britannia) 10 mmól EDTA-t, 5 mmól piroszőlősav-észtert, 80 μ mól flavin-adenin-dinukleotidot (FAD), 10 mmól ditiotreitet (DTT) és 0,8 g Polyclar AT-t (gyártja: Boehringer Ingelheim Bioproducts, Bio Whittaker, Nagy-Britannia) tartalmazott, és pH-ja 8,0 volt.

A homogenizátumot négy muszlinrétegen préseltük át, majd 20 percig 30 000 g gyorsuláson centrifugáltuk. A felülészót ammónium-szulfáttal 65%-osan telítettük, 30 percig ülepedni hagytuk, majd 20 percig 30 000 g gyorsuláson centrifugáltuk. A kapott pelletet 2,5 ml olyan oldatban szuszpendáltuk, amely 40 mmól Tricine-t, 10 mmól EDTA-t, 5 mmól piroszőlősav-észtert, 80 μ mól FAD-ot, 25 térfogat% glicerint és 1 mmól DTT-t tartalmazott (pH: 8,0), és a szuszpenziót 3,5 ml hasonló összetételű, de piroszőlősav-észtert és FAD-ot nem tartalmazó oldattal szemben dializálva sómentesítettük.

Az egyes vizsgálatokhoz 100-100 μ l enzimkivonatot használtunk. A vizsgálatokhoz 750 μ l tápoldatot használtunk, ami 120 mmól Tricine-t, 50 mmól piroszőlősav-észtert, 10 mmól $MgCl_2$ -t, 66 mmól FAD-ot, 93 μ mól tiamin-pirofoszfátot (TPP) és adott esetben herbicid hatóanyagot tartalmazott; a tápoldat pH-ja 8,0 volt. Az elegyeket 30 percig 37 °C-on inkubáltuk. A reakciót 250 μ l 1,84 mólos kénsavoldat beadagolásával leállítottuk, és az acetolaktátot 75 percig 37 °C-on vagy

3. táblázat

Növény	ID ₅₀ /µmól	A rezisztencianövekedés szorzószáma
Imazetapírral kezelt heterozigótás mutánsok		
Vad típus	1,5	
1. mutáns	>1000	>660
2. mutáns	230	153
3. mutáns	2,5	2
5. mutáns	125	83
6. mutáns	60	40
7. mutáns	4	3
8. mutáns	>1000	>660
9. mutáns	425	283
10. mutáns	15	10
Imazapírral kezelt heterozigótás mutánsok		
Vad típus	3	
1. mutáns	>1000	>333
2. mutáns	540	180
3. mutáns	4	1
5. mutáns	300	100
6. mutáns	5	2
7. mutáns	10	3
8. mutáns	>1000	>333
9. mutáns	>1000	>333
10. mutáns	35	12
Imazakvinnal kezelt heterozigótás mutánsok		
Vad típus	0,6	
1. mutáns	150	250
2. mutáns	20	33
3. mutáns	1,5	2
5. mutáns	25	42
6. mutáns	1,5	2
7. mutáns	1	2
8. mutáns	150	250
9. mutáns	50	83
10. mutáns	7	12
Klorimuronnal kezelt heterozigótás mutánsok*		
Vad típus	3,7	
1. mutáns	5	1
2. mutáns	10	3
3. mutáns	15	4
5. mutáns	17	5
6. mutáns	15	4
7. mutáns	5	1
8. mutáns	10	3
9. mutáns	10	3
10. mutáns	17	5
Klór-szulfuronnal kezelt heterozigótás mutánsok**		
Vad típus	16,5	
1. mutáns	65	4
2. mutáns	65	4
3. mutáns	35	2
5. mutáns	40	2
6. mutáns	65	4
7. mutáns	8	1
8. mutáns	75	4
9. mutáns	50	3
10. mutáns	35	2

3. táblázat folytatása

Növény	ID ₅₀ /µmól	A rezisztencianövekedés szorzószáma
5 Tiakarburonnal kezelt heterozigótás mutánsok**		
Vad típus	42,5	
1. mutáns	55	1
2. mutáns	320	8
3. mutáns	85	2
10 5. mutáns	340	8
6. mutáns	45	1
7. mutáns	25	1
8. mutáns	40	1
9. mutáns	45	1
15 10. mutáns	390	9

*Az ID₅₀ értékek nanomólok (nm)

30 percig 60 °C-on dekarboxileztük. A vakmintákhoz az enzimm kivonat beadagolása előtt kénsavat adtunk. A vizsgálati és vakmintákhoz 650-650 µl, 0,16 tömeg/térfogat% kreatint tartalmazó 2,73 mólos nátrium-hidroxid oldattal készített α-naftol-oldatot adtunk, és a mintákat 30 percig 37 °C-on inkubáltuk. A mintákat 30 000 g gyorsuláson centrifugáltuk, majd a felülúszó optikai sűrűségét 540 nm-en leolvastuk.

A fenti vizsgálatot mind a kilenc mutánsból elkülönített ALS enzimm kivonattal elvégeztük a következő herbicidekre:

30 imazetapir (Pursuit),
imazapir (Scepter),
klór-szulfuron (Glean),
klorimuron (Classic),
tiakarburon (Harmony).

35 Az észlelt enzimaktivitás-értékeket a 3–8. ábrán grafikus szemléltetjük.

Ugyanezt a vizsgálatot elvégeztük az 1. és 2. mutáns M₁BC₁S₂ generációjából származó homozigótás vonalakon is; az enzim aktivitását triazolo-pirimidin és fenoxi-pirimidin típusú herbicid hatóanyagokra is vizsgáltuk. Az eredményeket a 9–16. ábrán grafikus szemléltetjük. A vizsgált herbicid hatóanyagok kémiai szerkezetét a 2. ábrán tüntettük fel. Az imazetapir az (I) képletnek, az imazakvin a (II) képletnek, az imazapir a (III) képletnek, a klór-szulfuron a (IV) képletnek, a tiakarburon az (V) képletnek, a klorimuron a (VI) képletnek, a vizsgált triazolo-pirimidin típusú herbicid hatóanyag a (VII) képletnek, míg a vizsgált fenoxi-pirimidin típusú herbicid hatóanyag a (VIII) képletnek felel meg.

10. Az enzimgátló hatás értékelése

A fenti vizsgálatban kapott értékekből minden egyes mutánsra és minden egyes herbicidre kiszámítottuk az ID₅₀ értéket, ami azt a herbicid hatóanyag-koncentrációt jelenti, ami az adott növényben észlelhető ALS aktivitást 50%-ban gátolja a vad típusú kontrollhoz viszonyítva. Kiszámítottuk továbbá a rezisztencianövekedés szorzóját. A számított értékeket a 3. táblázatban foglaljuk össze.

4. táblázat

A mutáns sorsszáma	Herbicid hatóanyag	Vad	ID ₅₀ Mutáns	A rezisztencia-növekedés számszám
1.	imazapir	3 µmól	>1 nmól	>333
1.	imazetapir	1,5 µmól	750 µmól	500
1.	imazakvin	0,6 µmól	175 µmól	292
1.	klorimuron	3,7 nmól	10 nmól	2,7
1.	klórszulfuron	18,5 nmól	60 nmól	3,2
1.	tiakarburon	42,5 nmól	40 nmól	1
2.	imazapir	3 µmól	675 µmól	225
2.	imazetapir	1,5 µmól	400 µmól	267
2.	imazakvin	0,6 µmól	40 µmól	66
2.	klorimuron	3,7 nmól	20 nmól	5,4
2.	klórszulfuron	18,5 nmól	40 nmól	2,2
2.	tiakarburon	42,5 nmól	360 nmól	8,5
2.	triaszolo-pirimidin típus	0,07 µmól	0,12 µmól	1,7
2.	fenoxi-pirimidin típus	0,03 µmól	0,45 µmól	22,5

Hasonló számításokat végeztünk a vizsgált homozigótás mutánsokkal kapcsolatban is. Az eredményeket a 4. táblázatban közöljük.

11. Keresztrezisztencia-vizsgálatok

Az egyedi heterozigótás toleráns mutánsokat homozigótás érzékeny UE95 növényekkel kereszteztük, és az így kapott, a toleráns és érzékeny magvakat 1:1 arányban tartalmazó vegyes populációkat vetettük alá keresztrezisztencia-vizsgálatoknak. Valamennyi toleráns utód a toleranciára nézve heterozigótás volt. Kontrollként UE95 növények önbeporzásából származó magvakat használtunk; a kontroll növények és a toleráns vonalak beporzását ugyanabban az évben végeztük.

19 cm×11 cm×5 cm méretű tálcákba 1–1 liter komposztot töltöttünk. Az egyes tálcákba töltött komposztba két, egyenként 1 cm mélységű barázdát vágunk, és minden egyes barázdába 6 magvat (tálcánként tehát 12 magvat) vetettünk. Egyes esetekben a tálcákba 24 magvat vetettünk, ekkor a magvakat nyolcasával vetettük három barázdába.

Az egyes tálcákba vagy csak egy mutáns magvait, vagy csak a kontroll növény magvait vetettük.

A mutánsokon öt különböző típusba tartozó ALS-inhibitor hatású herbicid hatását vizsgáltuk, összehasonlításként az imazetapir (Pursuit) hatását is meghatároztuk. Minden egyes herbicid hatóanyagot négy különböző dózisban használtunk, a felhasznált dózisok a becsült szabadföldi mennyiség egytizedének, felének, egyszerezésének, illetve négyszerezésének feleltek meg. A 3–10. mutáns esetén az egyes herbicideket azonos dózisokban használtuk, míg az 1. és 2. mutáns az előzőeknél nagyobb mennyiségű klorimuronnal (Classic) és kisebb mennyiségű klórszulfuronnal (Glean) kezeltük.

A vizsgálatokhoz a következő herbicid hatóanyagokat használtuk (a hatóanyagok neve mellett azok becsült szabadföldi dózisát is feltüntettük):

klorimuron (Classic) (8–13 g/hektár)

klórszulfuron (Glean) (4–26 g/hektár)

imazakvin (Scepter) (100–150 g/hektár)
triaszolo-pirimidin típusú hatóanyag (10–30 g/hektár)
fenoxi-pirimidin típusú hatóanyag (100–200 g/hektár)
imazetapir (Pursuit) (70–140 g/hektár)

5 Az egyes vizsgálatokban a herbicid hatóanyagokat a következő dózisokban használtuk:

Klorimuron (Classic): 4, 20, 40 és 160 g/hektár (az 1. és 2. mutáns kezelésére), illetve 8, 4, 80 és 320 g/hektár (a 3–10. mutáns kezelésére)

10 *Klórszulfuron* (Glean): 5, 25, 50 és 200 g/hektár (az 1. és 2. mutáns kezelésére), illetve 1, 5, 10 és 40 g/hektár (a 3–10. mutáns kezelésére)

Imazakvin (Scepter): 30, 150, 300 és 1200 g/hektár

15 *Triaszolo-pirimidin típusú hatóanyag*: 5, 25, 50 és 200 g/hektár

Fenoxi-pirimidin típusú hatóanyag: 10, 50, 100 és 400 g/hektár

Imazetapir (Pursuit): 30, 150, 300 és 1200 g/hektár

20 A triaszolo-pirimidin és fenoxi-pirimidin típusú hatóanyagot JF5969 jelű adjuváns nedvesítőszerrel formáltuk, és a kapott koncentrátumot vízzel 10 tömeg% végső JF5969 tartalomra hígítottuk. A további herbicid hatóanyagokat csak vízzel hígítottuk.

25 A növények bepermetezését a szűrésnél ismert permetező berendezéssel és körülmények között végeztük. Bepermetezés után a magvakat 0,5 liter komposztal fedtük be, a felvitt komposztot elsimitottuk és tömörítettük (ekkor a magvakat 2,5 cm magas komposztréteg fedte be), majd a tálcákat a szűrésnél ismert körülmények között üvegházban tartottuk.

30 4 hetes növekedés után a növényeket vizuálisan vizsgáltuk, és a károsodást 0 és 5 közötti számskálával jellemeztük. Az egyes szám adatok jelentése a következő:

35 0: 0–10%-os károsodás (herbicid hatás nem észlelhető vagy csekély)

1: 11–25%-os károsodás

2: 26–50%-os károsodás

3: 51–85%-os károsodás

4: 81–95%-os károsodás

40 5: 96–100%-os károsodás (a növény teljes pusztulása)

A növények magasságát a talajfelülettől a leg-hosszabb levélcúsig mértük.

45 Az értékelésből kihagytuk a nyilvánvalóan az érzékeny fenotípushoz tartozó növényeket (a növények körülbelül 50%-át).

Azokat a növényeket, amelyek károsodásának foka 0,1 vagy 2 volt nagyobb cserepekbe ültettük át, és érésig termesztettük.

50 A vizsgálatok eredményeit a 17–22. ábrán grafikus szemléltetjük. A 23. ábrán a heterozigótás és homozigótás növényeken észlelt eredményeket hasonlítjuk össze.

12. Az eredmények értékelése és magyarázata

55 A heterozigótás növények enzimvizsgálatára kapott eredmények nincsenek pontos korrelációban az élő növények dózis-reakció görbéinek adataival. Szakember számára ez nem különösebben váratlan. Általános korrelációt tapasztaltunk azonban abban az értelemben, hogy az enzimvizsgálatokban kimutatott általános re-

zisztencia-szintek tükröződnek az üvegházi vizsgálatok során kapott eredményekben. Nyilvánvaló, hogy csak több körülmény együttes vizsgálatával dönthető el, hogy melyik mutáns tekinthető értékesnek; figyelembe kell venni például a herbicid típusát, illetve a felhasznált herbicidek spektrumát, valamint az általában alkalmazott hatóanyag-dózisokat. Az a tény, hogy a vizsgált mutánsok keresztrezisztencia-spektrumaiban viszonylag nagy eltérések tapasztalhatók, inkább jelent előnyt mint hátrányt, mert így szélesebb körből választhatók ki az adott körülményeket legjobban toleráló mutánsok. Így például az a tény, hogy egy adott mutáns egy adott herbiciddel szemben más mutánsokhoz viszonyítva csak kevésbé rezisztens, igen fontos előny lehet akkor, ha csak

5. táblázat

Herbicid hatóanyag	A rezisztencia foka	A mutánsok száma	
		Enzimvizsgálat alapján	Üvegházi vizsgálat alapján
Imazetapir	erős	1., 8., 9.	1., 5., 8., 9.
	közepes	2., 5., 10.	2., 6., 10.
	gyenge	3., 6., 7.	7., 3.
	nulla	-	-
Imazapir	erős	1., 2., 5., 8., 9., 10.	nincs adat
	közepes	6., 7.	nincs adat
	gyenge	3.	nincs adat
	nulla	-	nincs adat
Imazakvin	erős	1., 8., 9.	1., 2., 8., 9.
	közepes	2., 5.	5.
	gyenge	3., 6., 7., 10.	3., 6., 10.
	nulla	-	7.
Klórsulfuron	erős	-	-
	közepes	-	3 _w
	gyenge	1., 2., 3., 5., 6., 8., 9., 10.	5., 7., 9., 10.
	nulla	7.	1., 2., 6., 8., 9., 10.
Klorimuron	erős	-	-
	közepes	10.	-
	gyenge	1., 2., 3., 5., 6., 7., 9.	3., 10.
	nulla	8.	1., 2., 5., 6., 7., 8., 9.
Tiakarburon	erős	-	nincs adat
	közepes	2., 5., 10.	nincs adat
	gyenge	1., 3., 6., 8., 9.	nincs adat
	nulla	7.	nincs adat
Triazolo-pirimidin típusú hatóanyag	erős	nincs adat	3.
	közepes	nincs adat	1., 2.
	gyenge	nincs adat	7., 8., 9.
	nulla	nincs adat	5., 6., 10.
Fenoxi-pirimidin típusú hatóanyag	erős	nincs adat	-
	közepes	nincs adat	2., 5., 7.
	gyenge	nincs adat	3., 8., 9., 10.
	nulla	nincs adat	1., 6.

kis herbicid hatóanyag-mennyiségekkel szemben toleráns növényre van szükség (például ha arra van szükség, hogy a növény ellenálljon egy átvitt herbicid hatásának).

A fentiek figyelembevételével az enzimvizsgálatok és az üvegházi vizsgálatok eredményei alapján a mutánsok egyedi herbicidekkel szemben mutatott rezisztenciájuk szempontjából az „erős”, „közepes”, „gyenge” és „nulla” ellenállóképességű csoportokba sorolhatók. A csoportosítást az 5. táblázatban foglaljuk össze.

13. Növénytermesztés

A találmány szerinti mutánsokból kialakított vonalakat különféle második szülőnövény-vonalakkal együtt herbicidek hatásának ellenálló hibridek termelésére használhatjuk fel.

A homozigótás vonalokból származó szaporítóanyagokat termesztési programokban további műveleteknek (például keresztezés, egyediesítés, vizuális szelekció és herbicidekre szűrés) vethetjük alá új, herbicideket toleráló hibridmagvak termelése céljából.

A herbicidre rezisztens sajátságot az ismertett mutációk természetével vagy szokásos természeti műveletekkel, herbicidekkel szembeni rezisztenciára végzett szelektálást alkalmazva új vonalakra vihetjük át. Ezekben az eljárásokban ismert biológiai, biokémiai és molekuláris szűrővizsgálatokat is alkalmazhatunk. A rezisztencia-gén elkülönítésére és átültetésére genetikai módszereket alkalmazhatunk.

A termesztési program célja esetenként csak a herbicidekkel szembeni rezisztencia továbbvittele lehet, más esetekben a program a növények egyidejű továbbkezelésére is kiterjedhet az agronómiai sajátságok javítása céljából.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás egy adott herbicid hatóanyag normál körülmények között pusztulást előidéző koncentrációjával szemben rezisztens kukorica (*Zea mays*) mutáns előállítására, *azzal jellemezve*, hogy *Zea mays* izolált pollenjét mutagén vegyszer hatásának tesszük ki, a mutagenizált pollent elkülönítjük, a mutagenizált pollennel nőivarú növényt porozunk be, az érett növény magvait betakarítjuk, a magvakat a kiválasztott herbicid hatóanyag vagy a kiválasztott herbicid hatóanyagával azonos hatásmechanizmusú más herbicid hatóanyag szelekciós nyomásának kitéve növényekké neveljük, és az alkalmazott szelekciós nyomással szemben rezisztens utódokat elkülönítjük. (Elsőbbség: 1989. 05. 17.)

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy mutagén vegyszerként metán-szulfonsav-etil-észtert használunk. (Elsőbbség: 1989. 05. 17.)

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szelekciós nyomást kiváltó herbicid hatóanyagként acetolaktát szintáz-inhibitor hatású herbicid hatóanyagot használunk. (Elsőbbség: 1989. 05. 17.)

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy herbicid hatóanyagként imazetapirt használunk. (Elsőbbség: 1989. 05. 17.)

5. Az 1–4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a szelekciós nyomás kifejtéséhez a herbicid hatóanyagot kikelés előtt visszük fel a növényre. (Elsőbbség: 1989. 05. 17.)

6. Az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan herbicidekre rezisztens *Zea mays* növényeket állítunk elő, amelyek magvait a Budapesti Megállapodás értelmében 1989. május 8-án NCIMB 40136, NCIMB 40137 és NCIMB 40138 számon helyeztük letétbe a National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd. (Aberdeen, Nagy-Britannia) intézetben. (Elsőbbség: 1989. 05. 17.)

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan imazetapirral szemben rezisztens *Zea mays* növényeket állítunk elő, amelyek magvait a Budapesti Megállapodás értelmében 1989. május 8-án NCIMB 40137 számon helyeztük letétbe a National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd. (Aberdeen, Nagy-Britannia) intézetben. (Elsőbbség: 1989. 05. 17.)

8. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan imazakvinnel szemben rezisztens *Zea mays* növényeket állítunk elő, amelyek magvait a Budapesti Megállapodás értelmében 1989. május 8-án NCIMB 40136 és NCIMB 40137 számon helyeztük letétbe a National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd. (Aberdeen, Nagy-Britannia) intézetben. (Elsőbbség: 1989. 05. 17.)

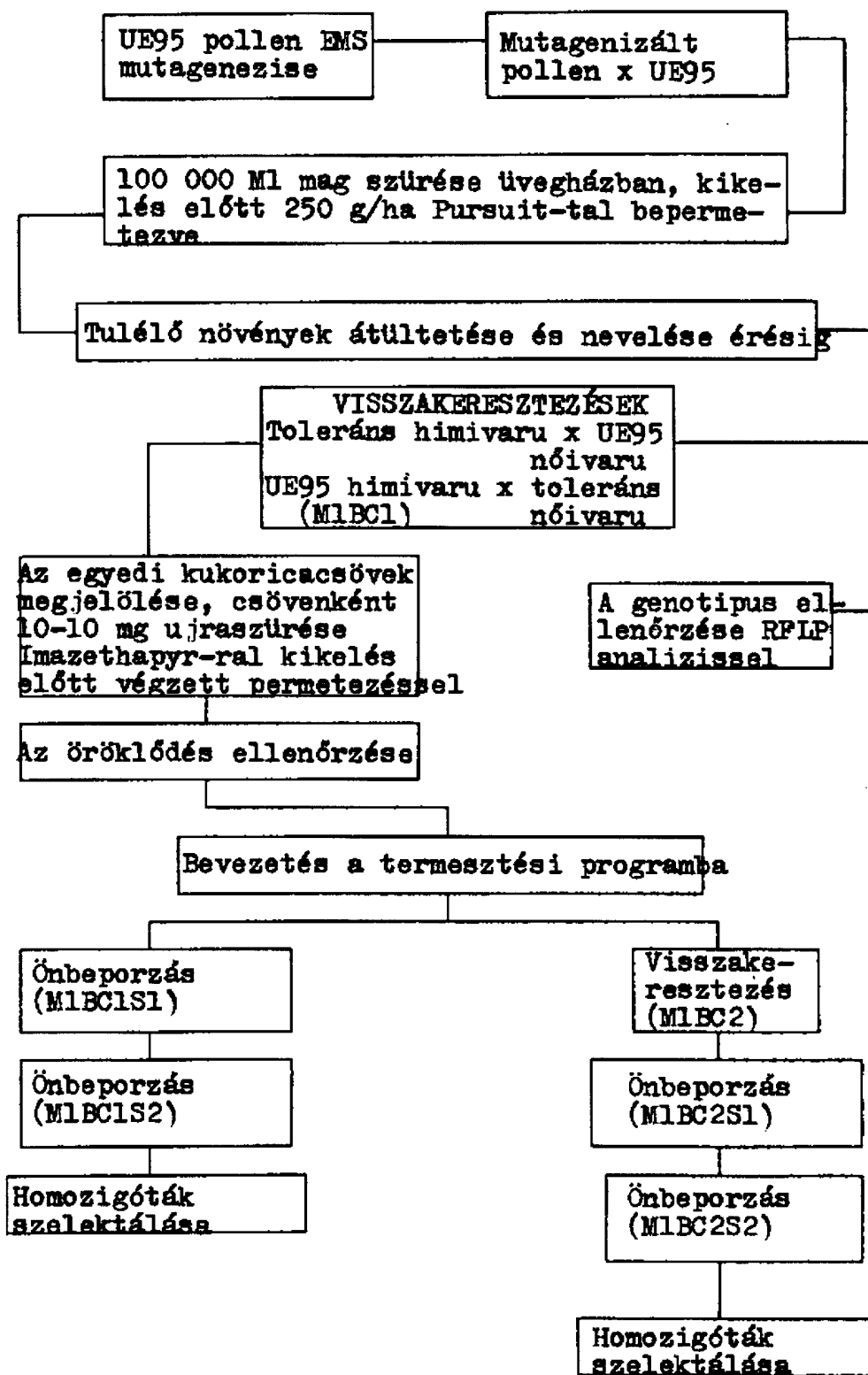
9. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan imazapirral szemben rezisztens *Zea mays* növényeket állítunk elő, amelyek magvait a Budapesti Megállapodás értelmében 1989. május 8-án NCIMB 40136 és NCIMB 40137 számon helyeztük letétbe a National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd. (Aberdeen, Nagy-Britannia) intézetben. (Elsőbbség: 1989. 05. 17.)

10. Az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan herbicidekre rezisztens *Zea mays* növényeket állítunk elő, amelyek magvait a Budapesti Megállapodás értelmében 1989. július 18-án NCIMB 40167, NCIMB 40168, NCIMB 40169, NCIMB 40170, NCIMB 40171 és NCIMB 40172 számon helyeztük letétbe a National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd. (Aberdeen, Nagy-Britannia) intézetben. (Elsőbbség: 1990. 05. 16.)

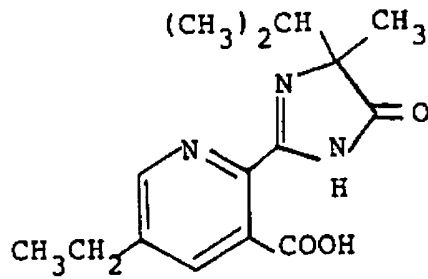
11. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan imazetapirral szemben rezisztens *Zea mays* növényeket állítunk elő, amelyek magvait a Budapesti Megállapodás értelmében 1989. július 18-án NCIMB 40167, NCIMB 40170 és NCIMB 40171 számon helyeztük letétbe a National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd. (Aberdeen, Nagy-Britannia) intézetben. (Elsőbbség: 1990. 05. 16.)

12. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan imazakvinnel szemben rezisztens *Zea mays* növényeket állítunk elő, amelyek magvait a Budapesti Megállapodás értelmében 1989. július 18-án NCIMB 40170 és NCIMB 40171 számon helyeztük letétbe a National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd. (Aberdeen, Nagy-Britannia) intézetben. (Elsőbbség: 1990. 05. 16.)

13. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan imazapirral szemben rezisztens *Zea mays* növényeket állítunk elő, amelyek magvait a Budapesti Megállapodás értelmében 1989. július 18-án NCIMB 40167, NCIMB 40170 és NCIMB 40171 számon helyeztük letétbe a National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd. (Aberdeen, Nagy-Britannia) intézetben. (Elsőbbség: 1990. 05. 16.)

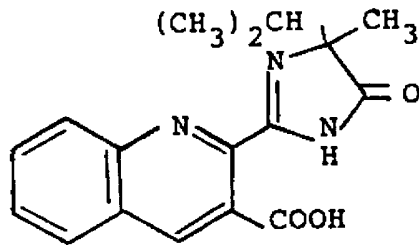


1. ábra



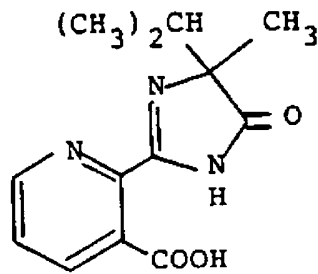
IMAZETAPIR

(I)



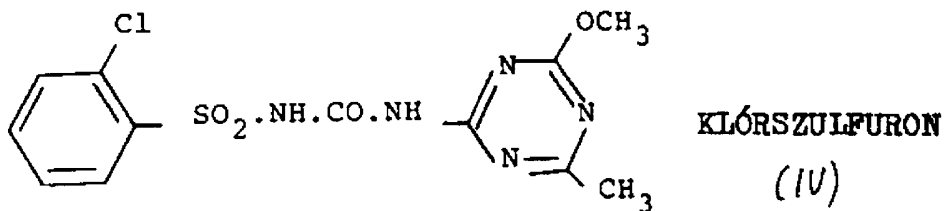
IMAZAKVIN

(II)



IMAZAPIR

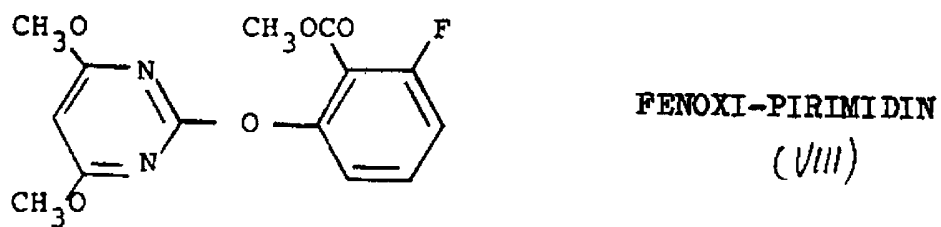
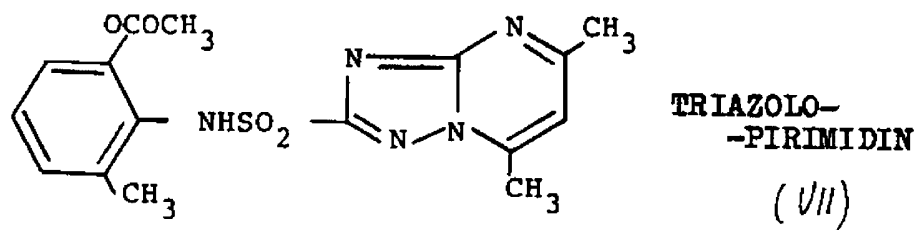
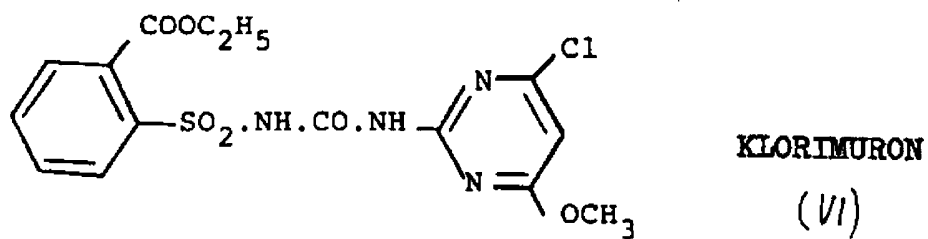
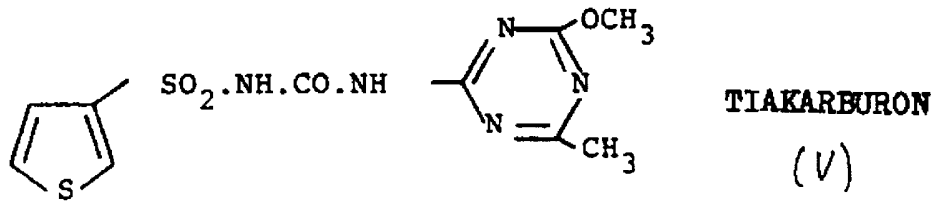
(III)



KLÓRSZULFURON

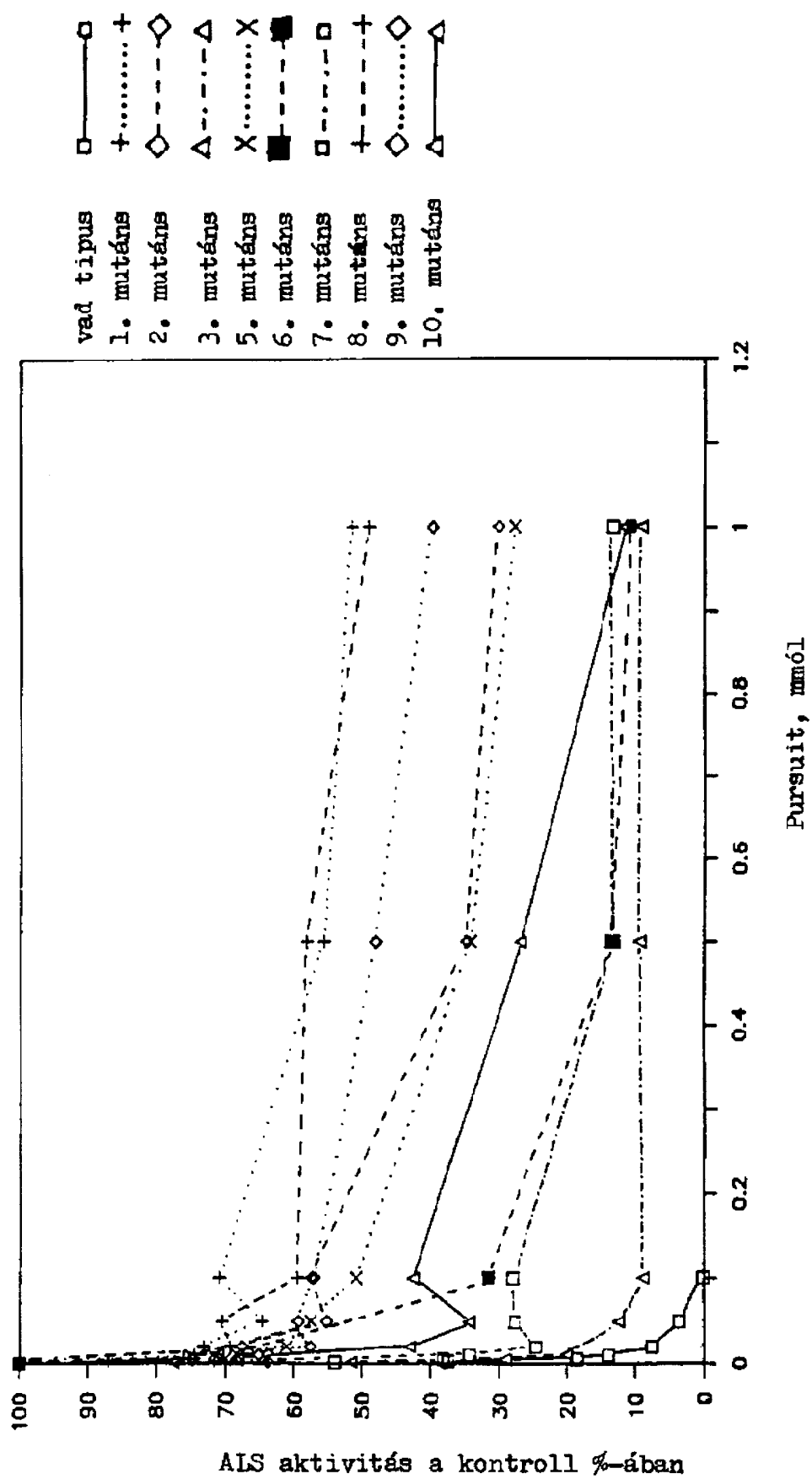
(IV)

2. ábra



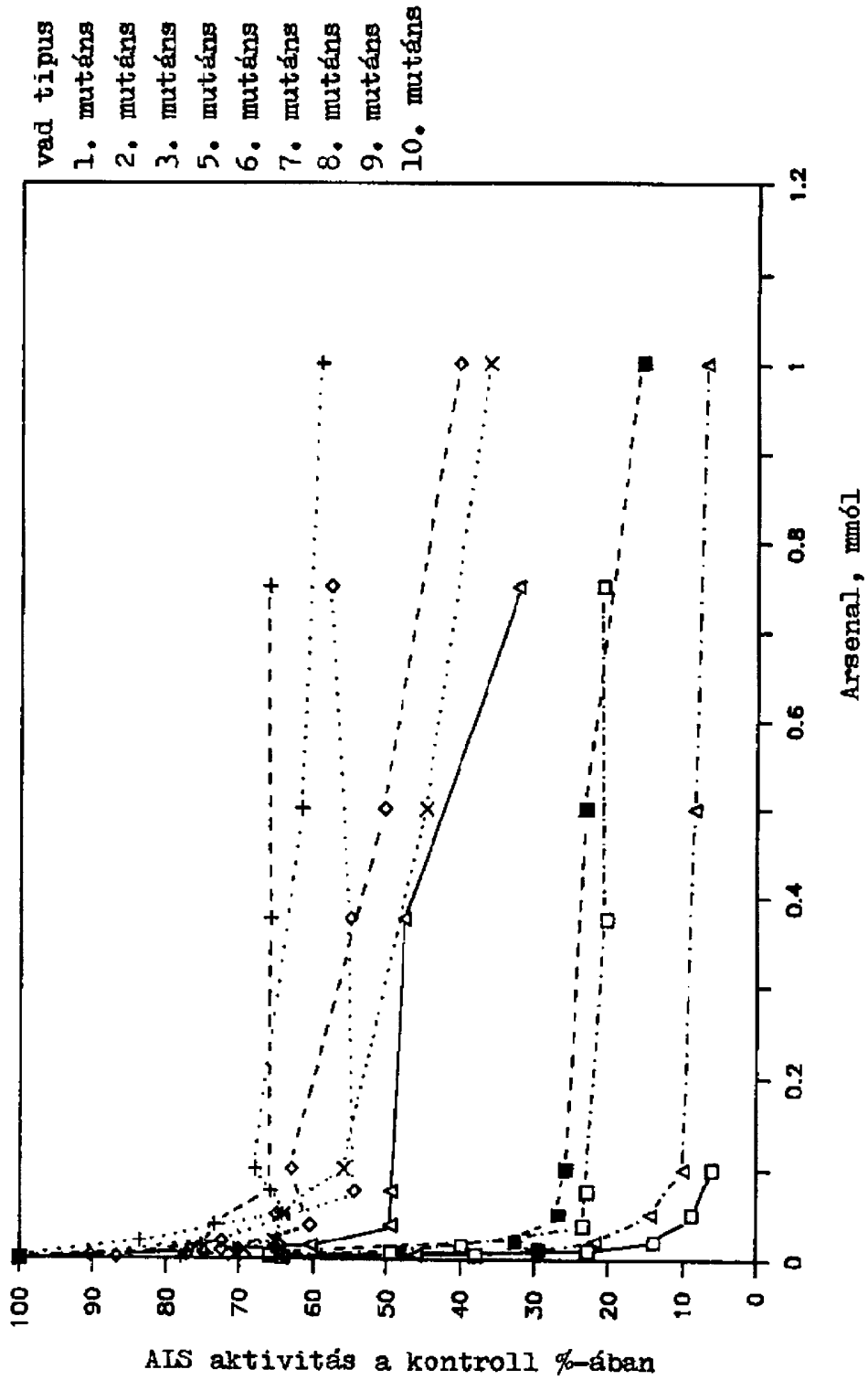
2. ábra folytatása

A levél ALS enzimjének reakciója Pursuit-ra
 /heterozigóták/



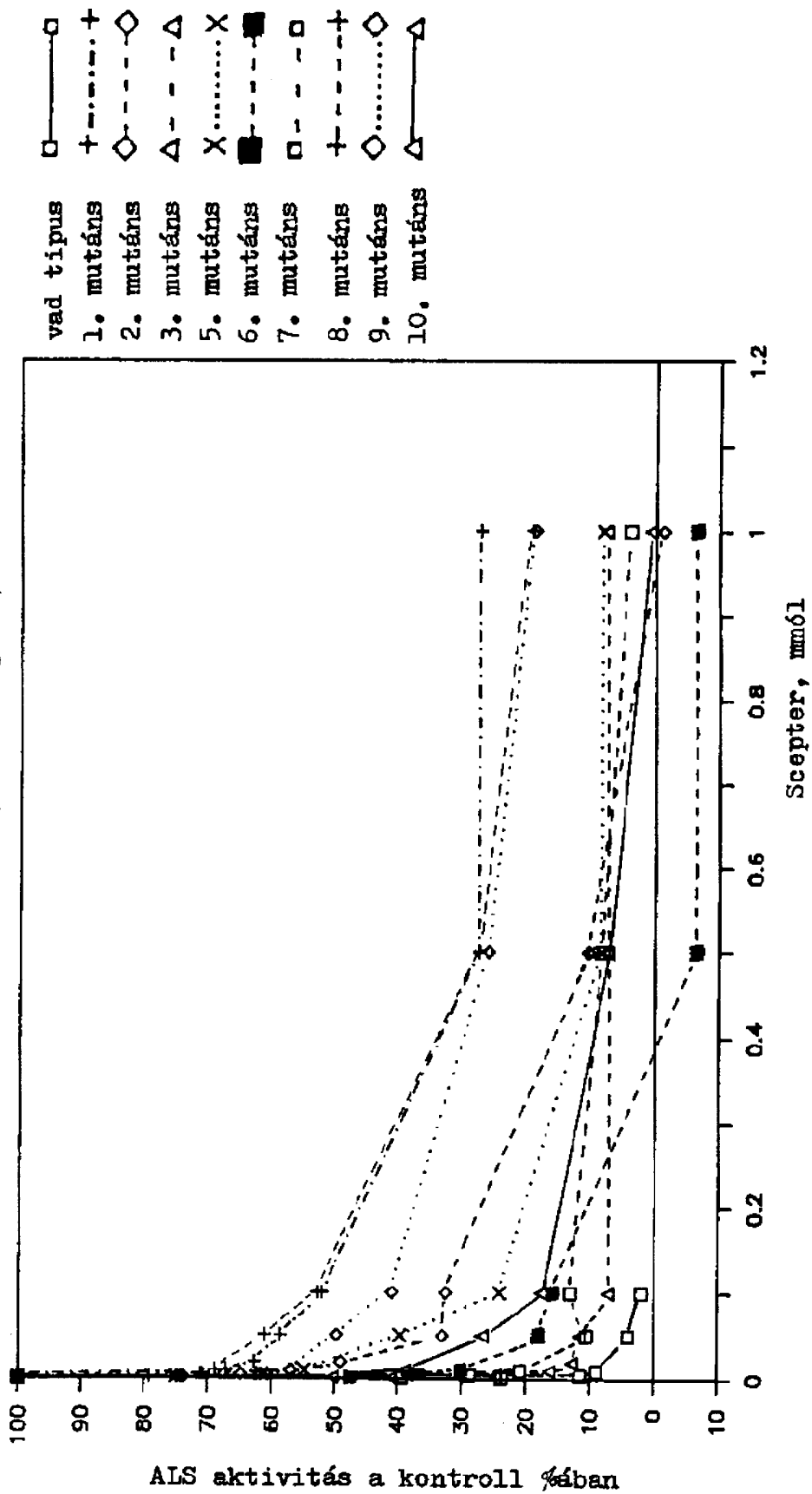
3. ábra

A levél AIS enzimjének reakciója Arsenal-ra
 /heterozigóták/



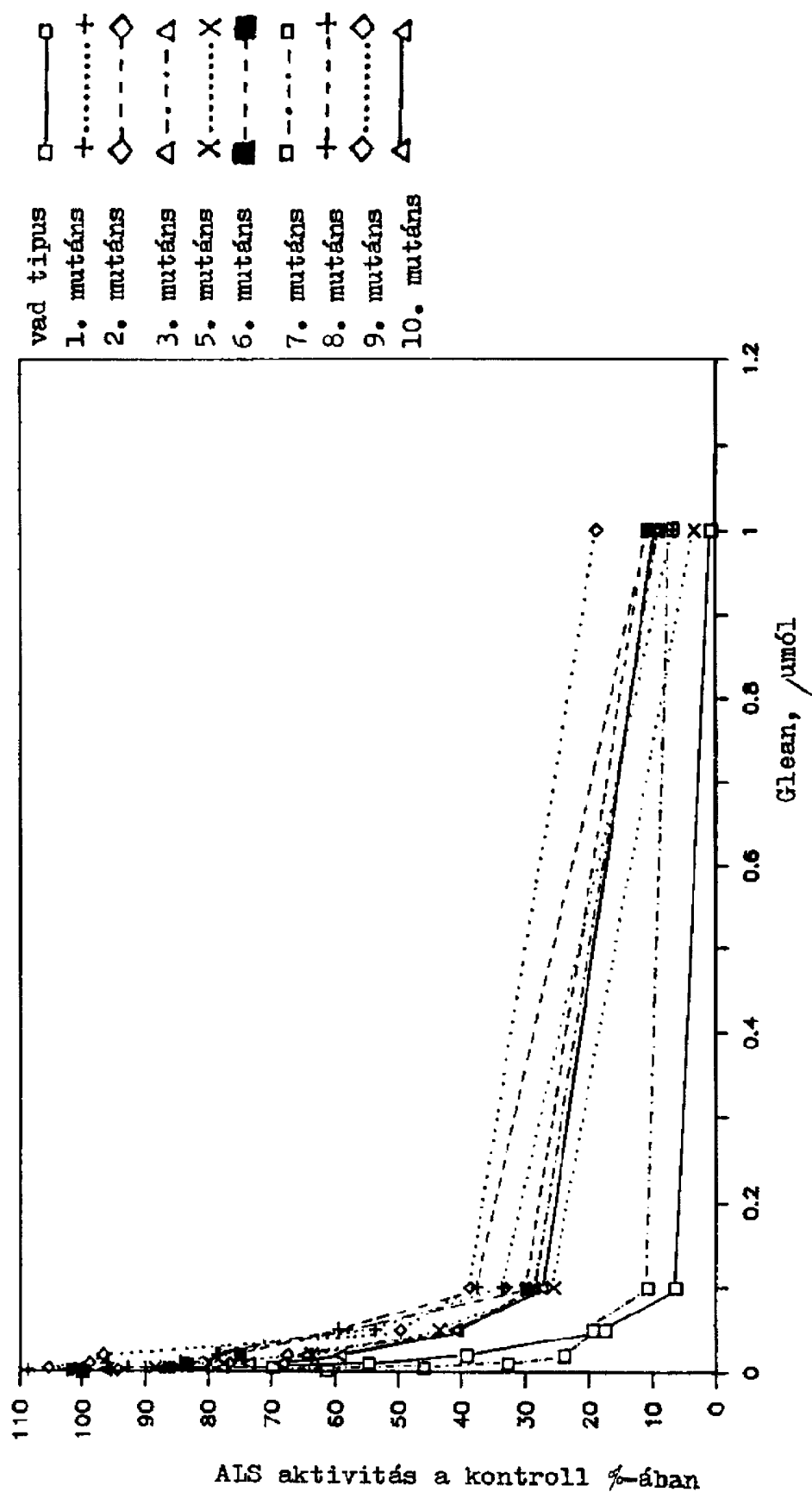
4. ábra

A levél AIS enzimjének reakciója Scepter-re
 /heterozigóták/



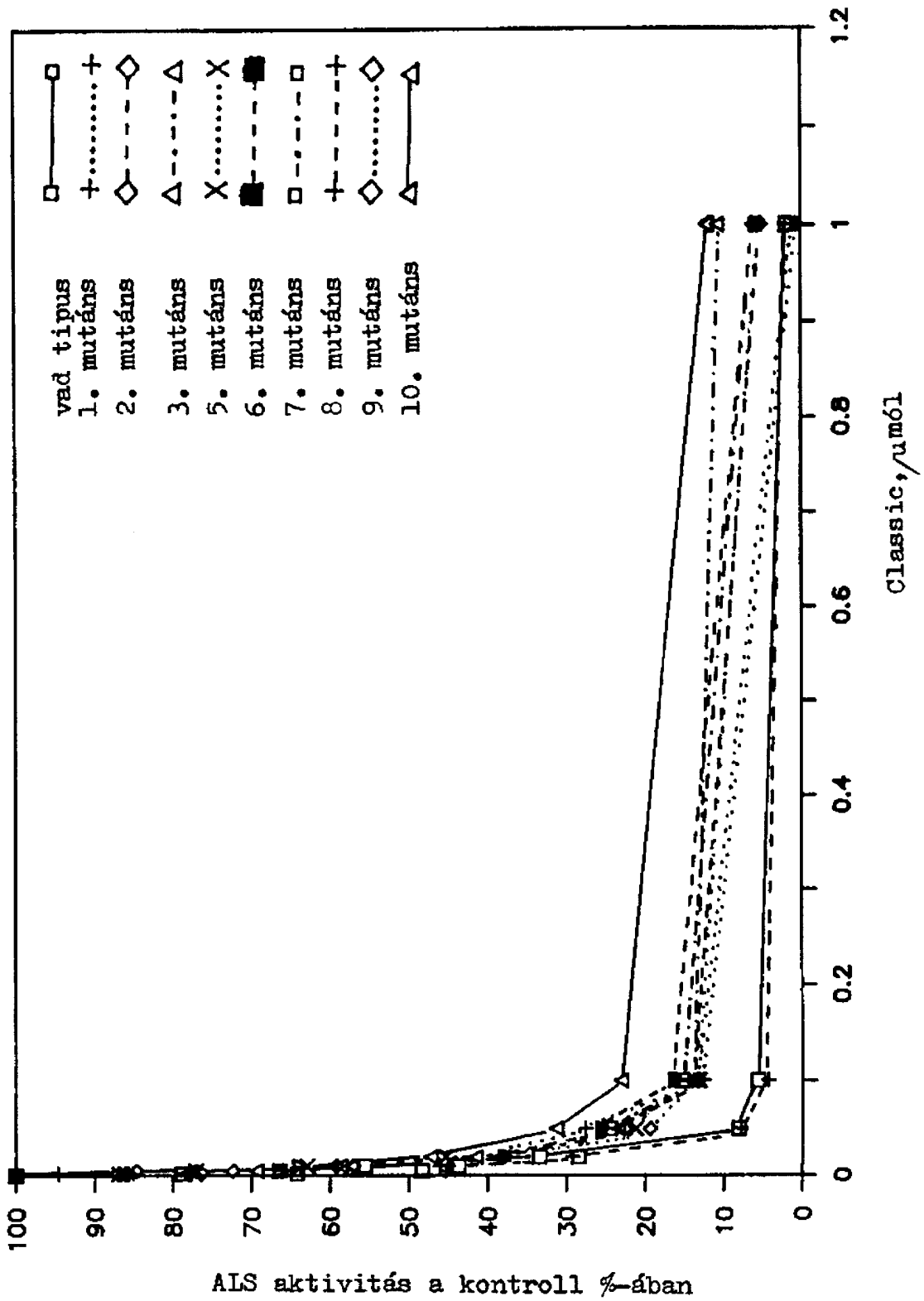
5. ábra

A levél ALS enzimjének reakciója Glean-ra
 /heterozigóták/



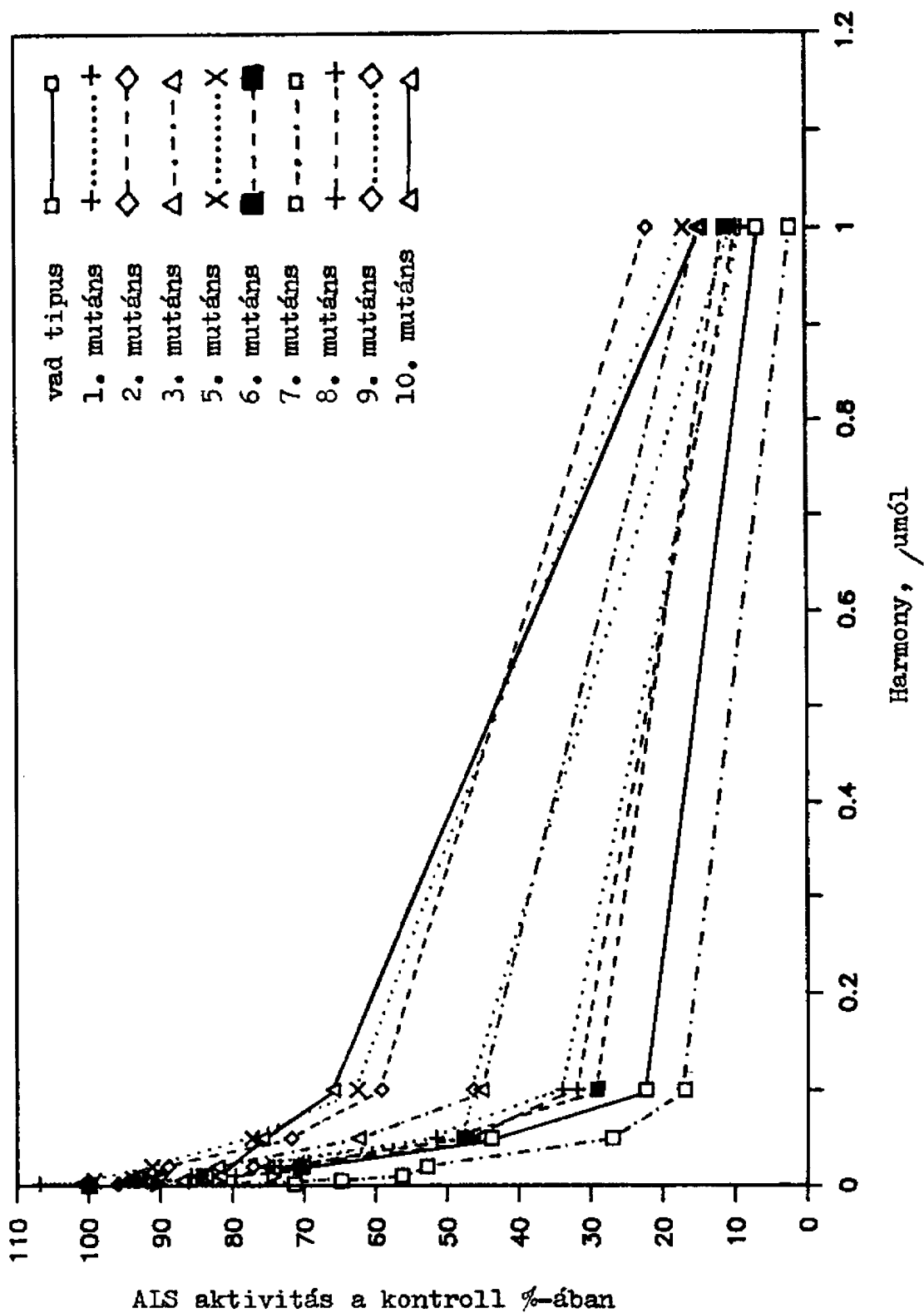
6. ábra

A levél ALS enzimjének reakciója Classic-ra
/heterozigóták/

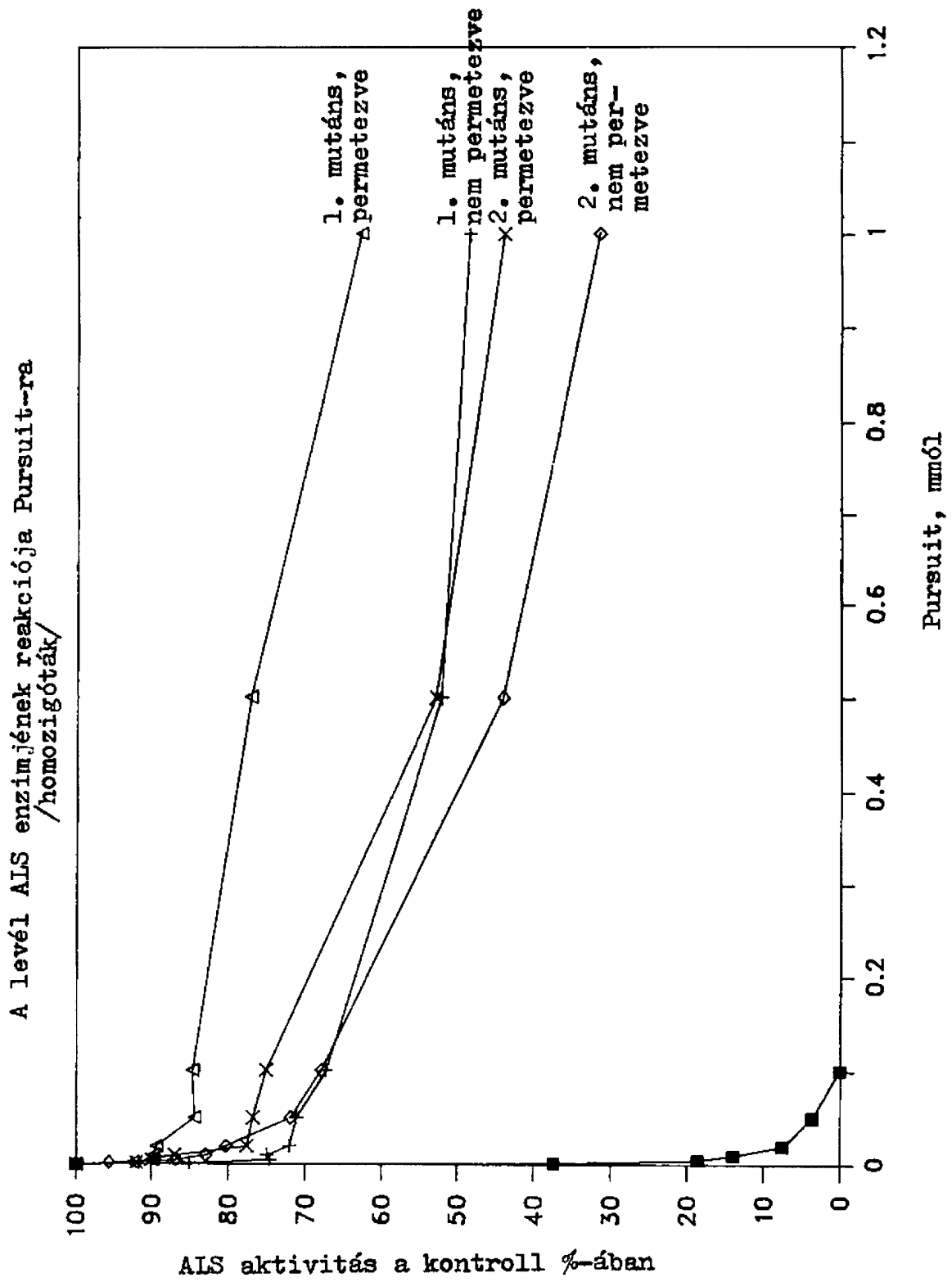


7. ábra

A levél ALS enzimjének reakciója Harmony-ra
 /heterozigóták/

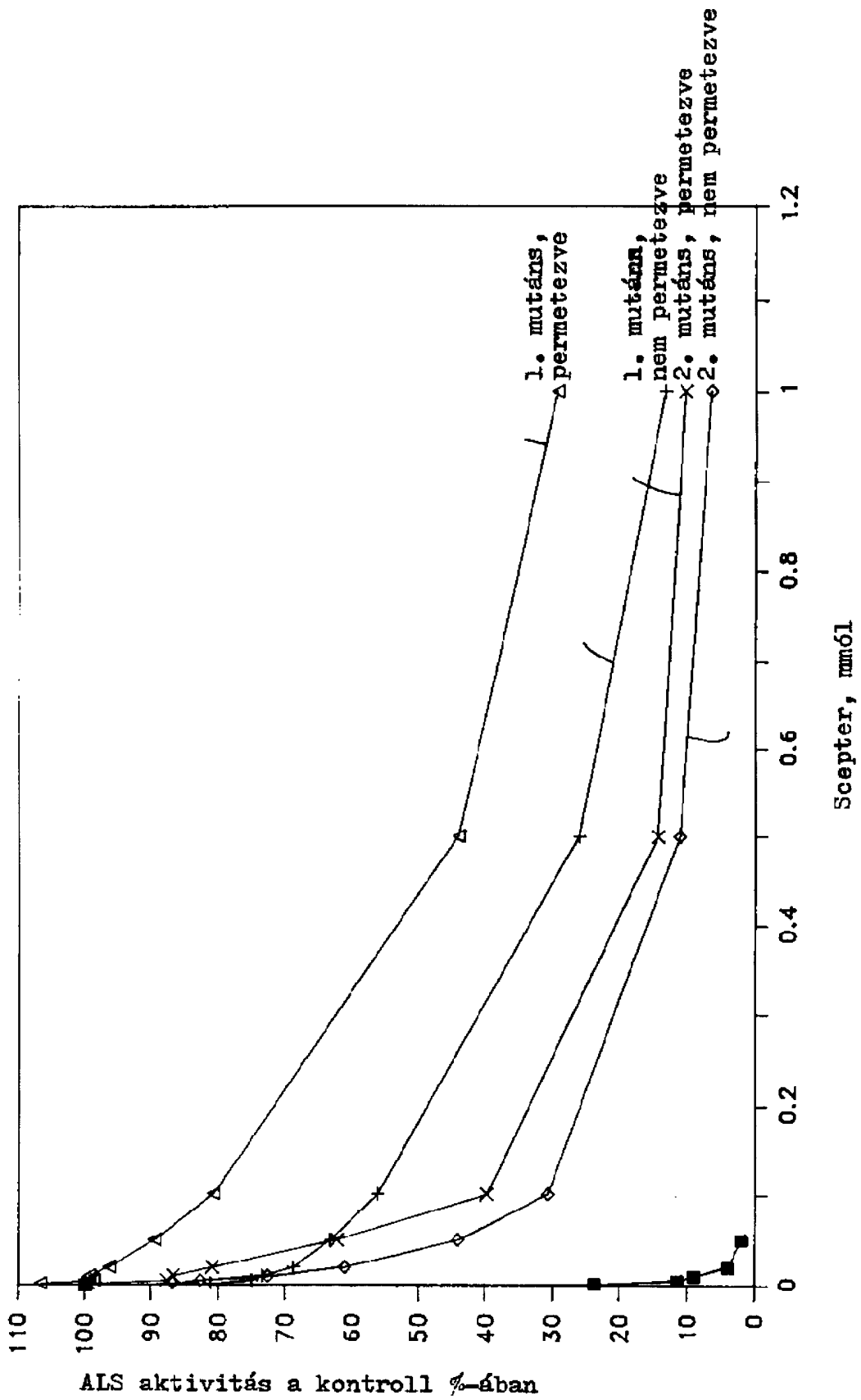


8. ábra

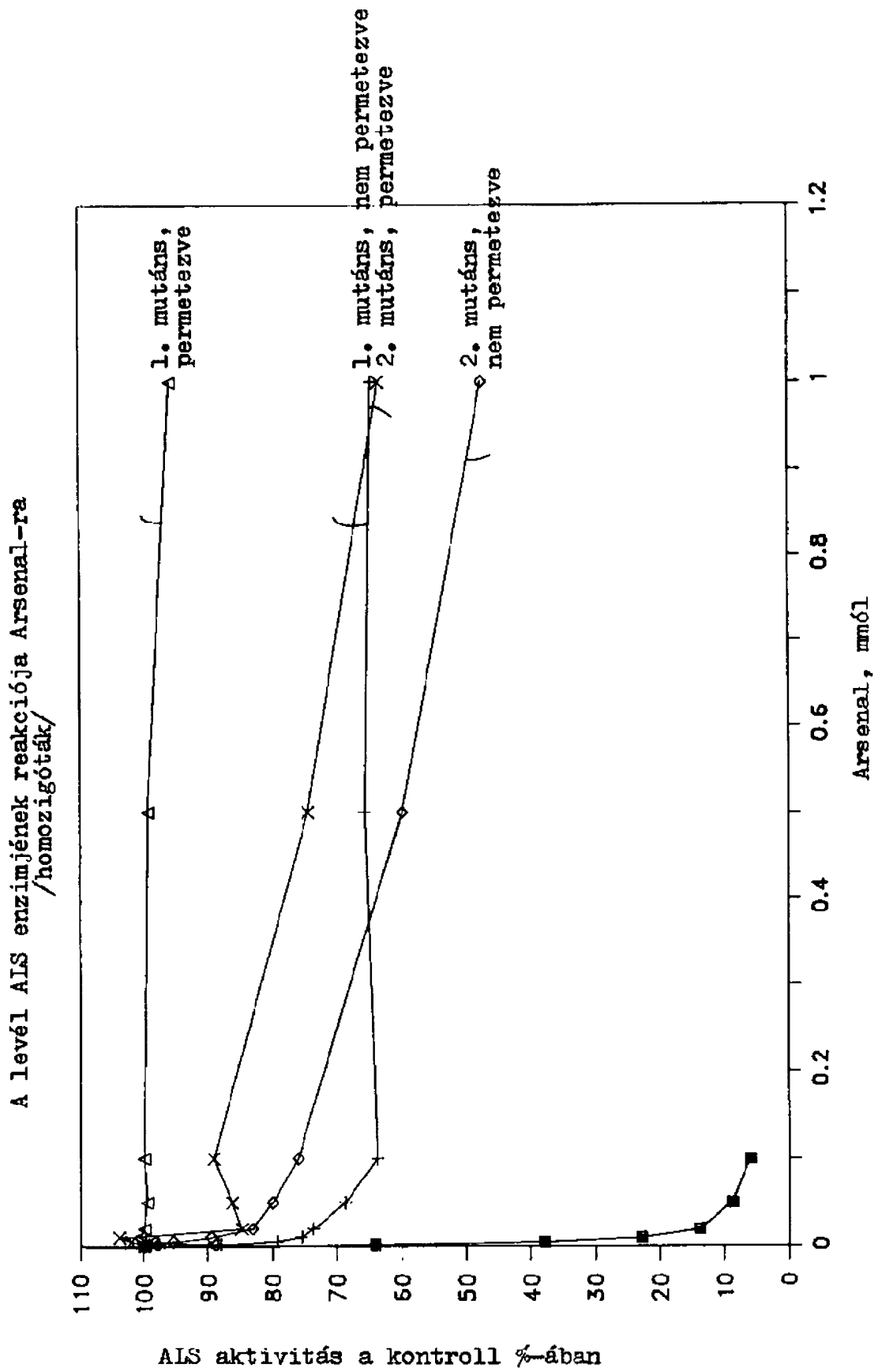


9. ábra

A levél ALS enzimjének reakciója Scepter-re
/homozigóták/

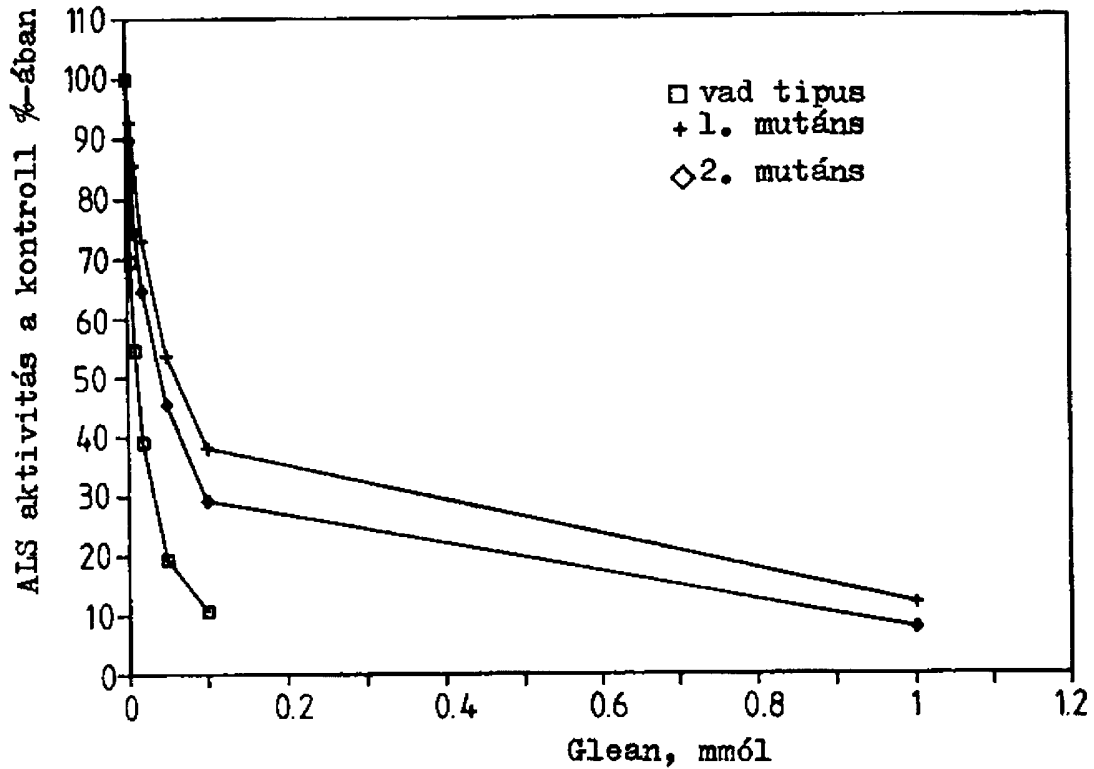


10. ábra

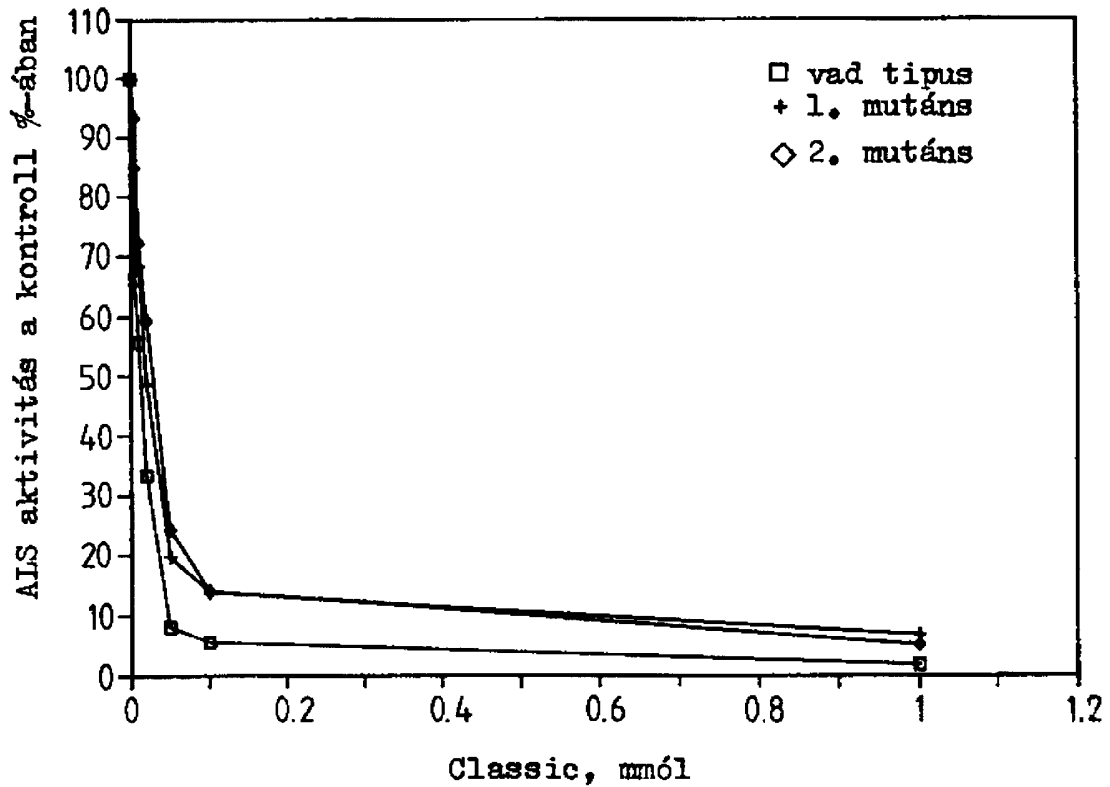


11. ábra

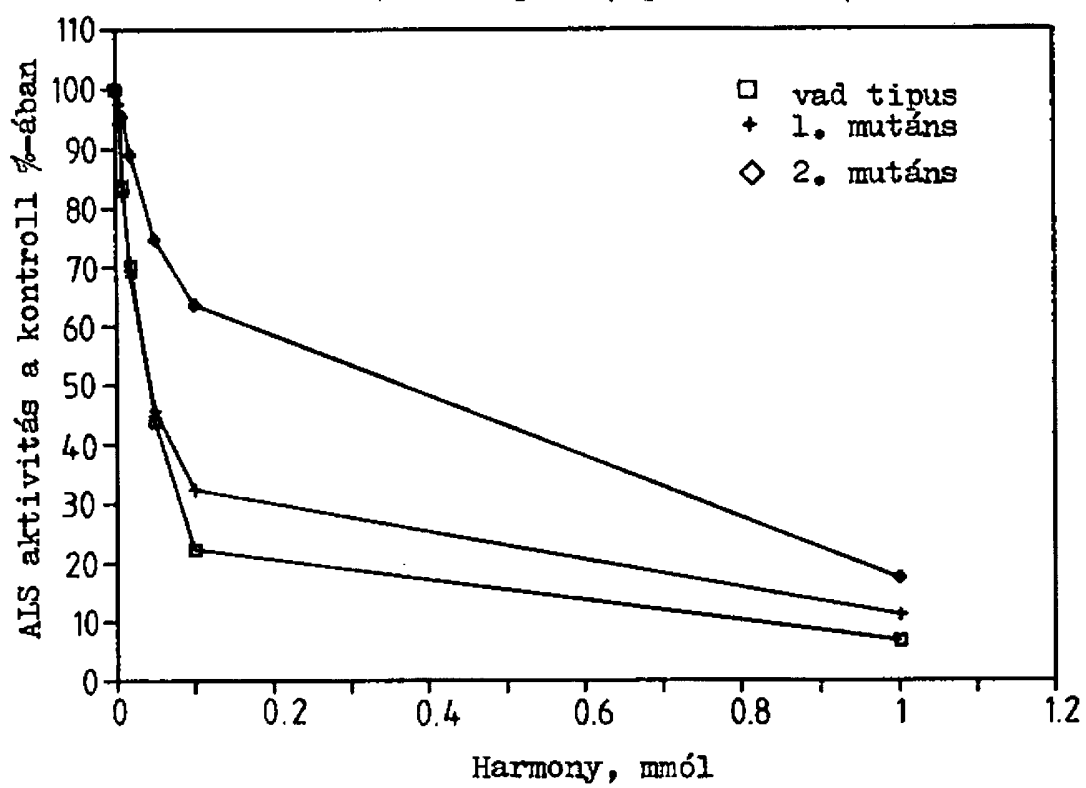
12. ábra A levél ALS enzimjének reakciója Glean-ra
/homozigótás, permetezetlen/



13. ábra A levél ALS enzimjének reakciója Classic-ra
/homozigótás, permetezett/

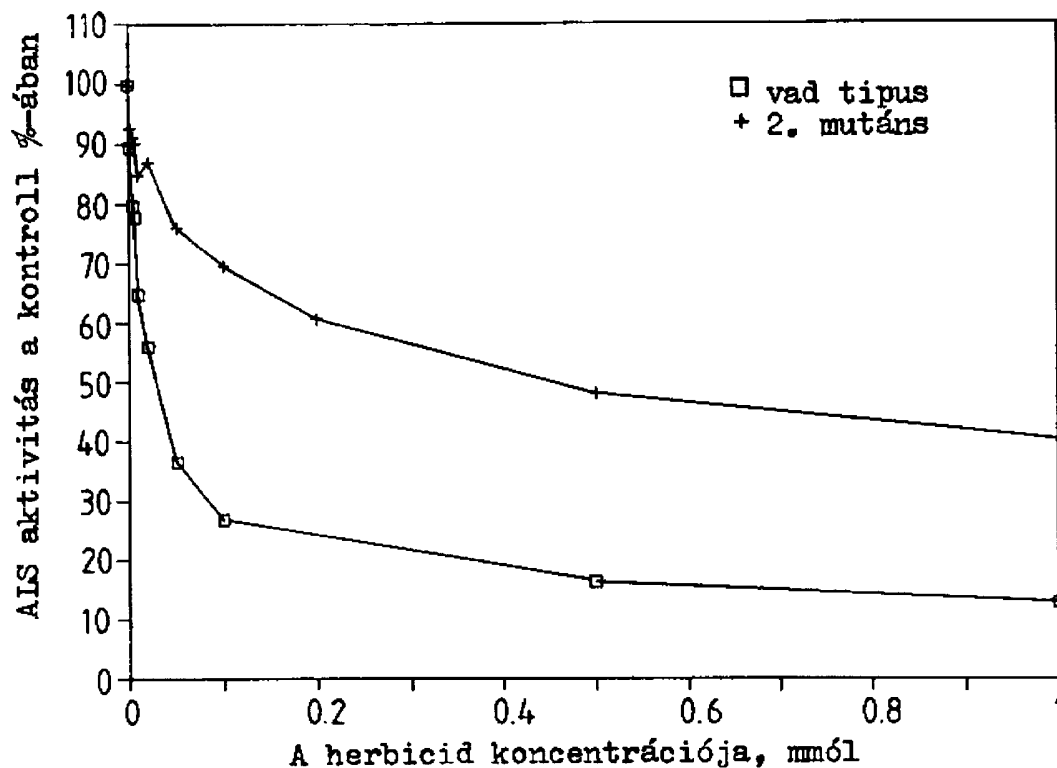


A levél ALS enzimjének reakciója Harmony-ra
/homozigótás, permetezett/

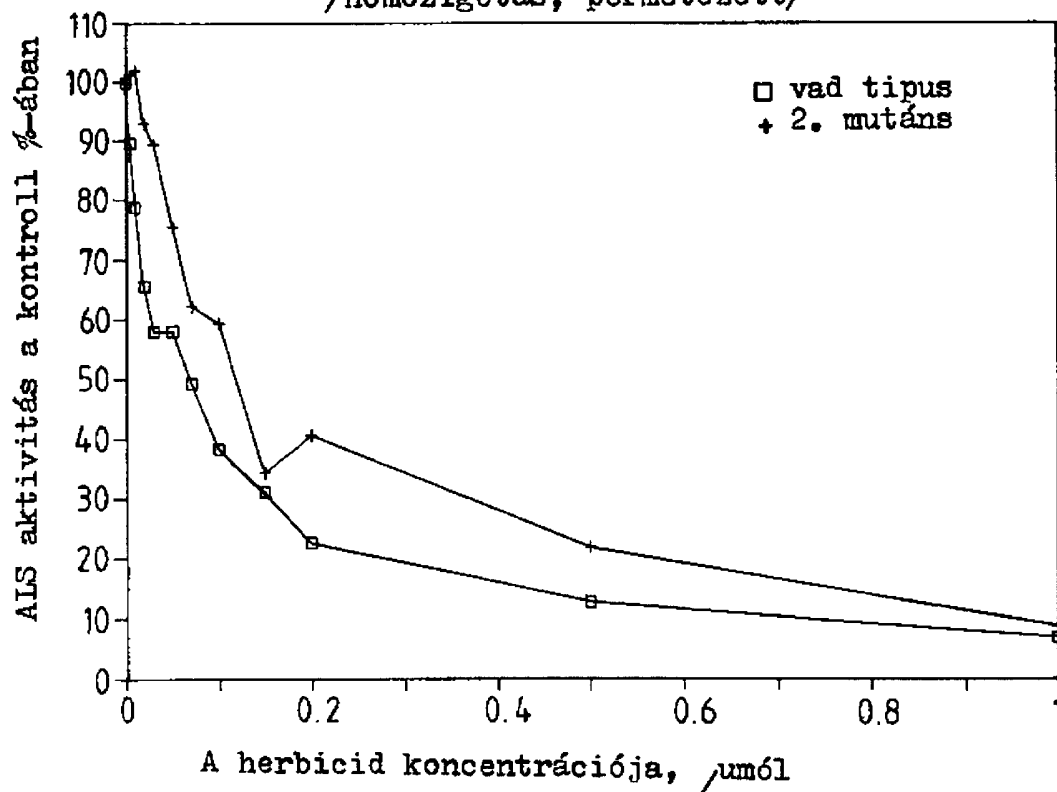


14. ábra

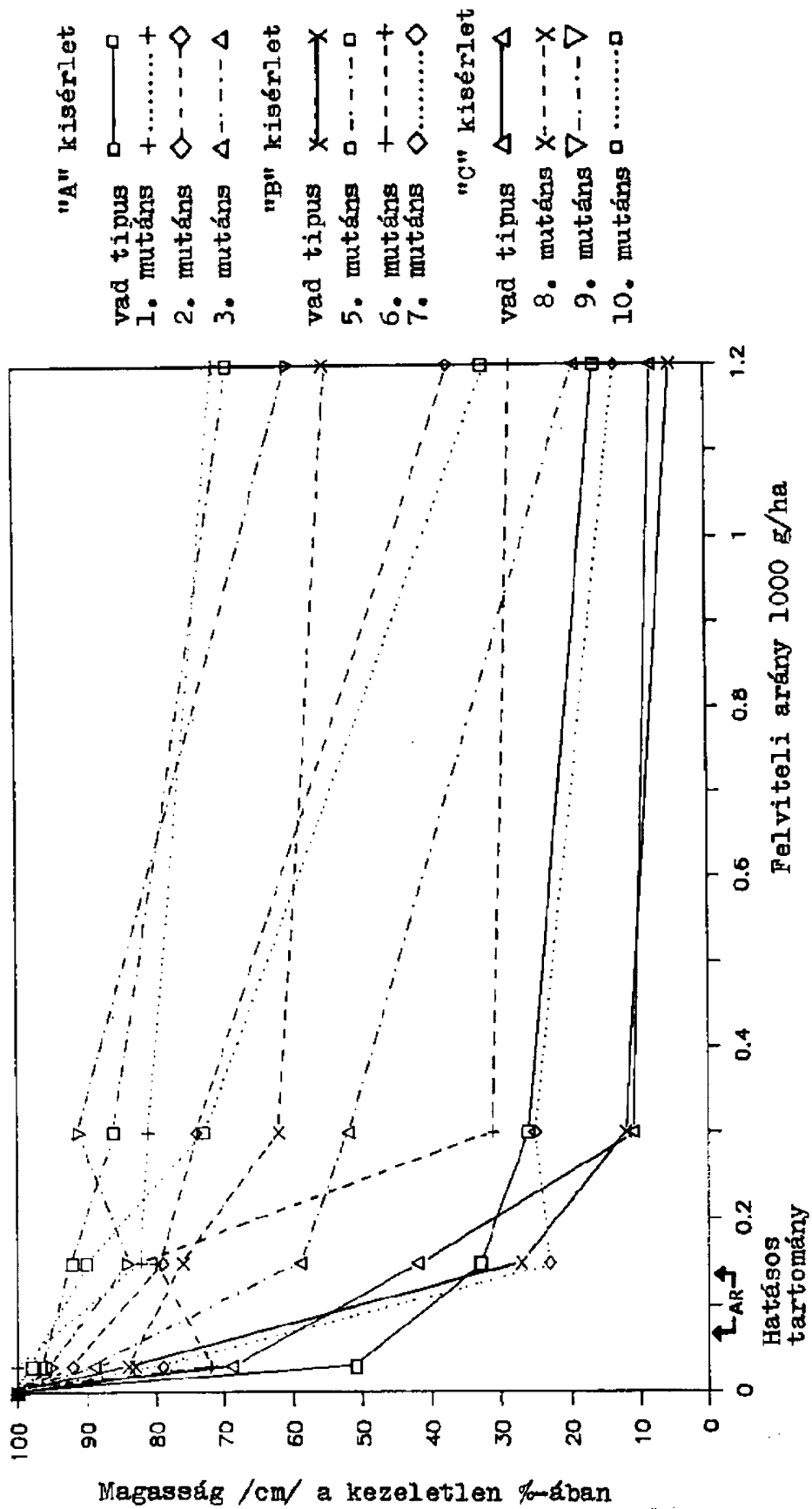
15. ábra A levél ALS enzimjének reakciója fenoxi-pirimidin típusu herbicidekre /homozigótás, permetezetlen/



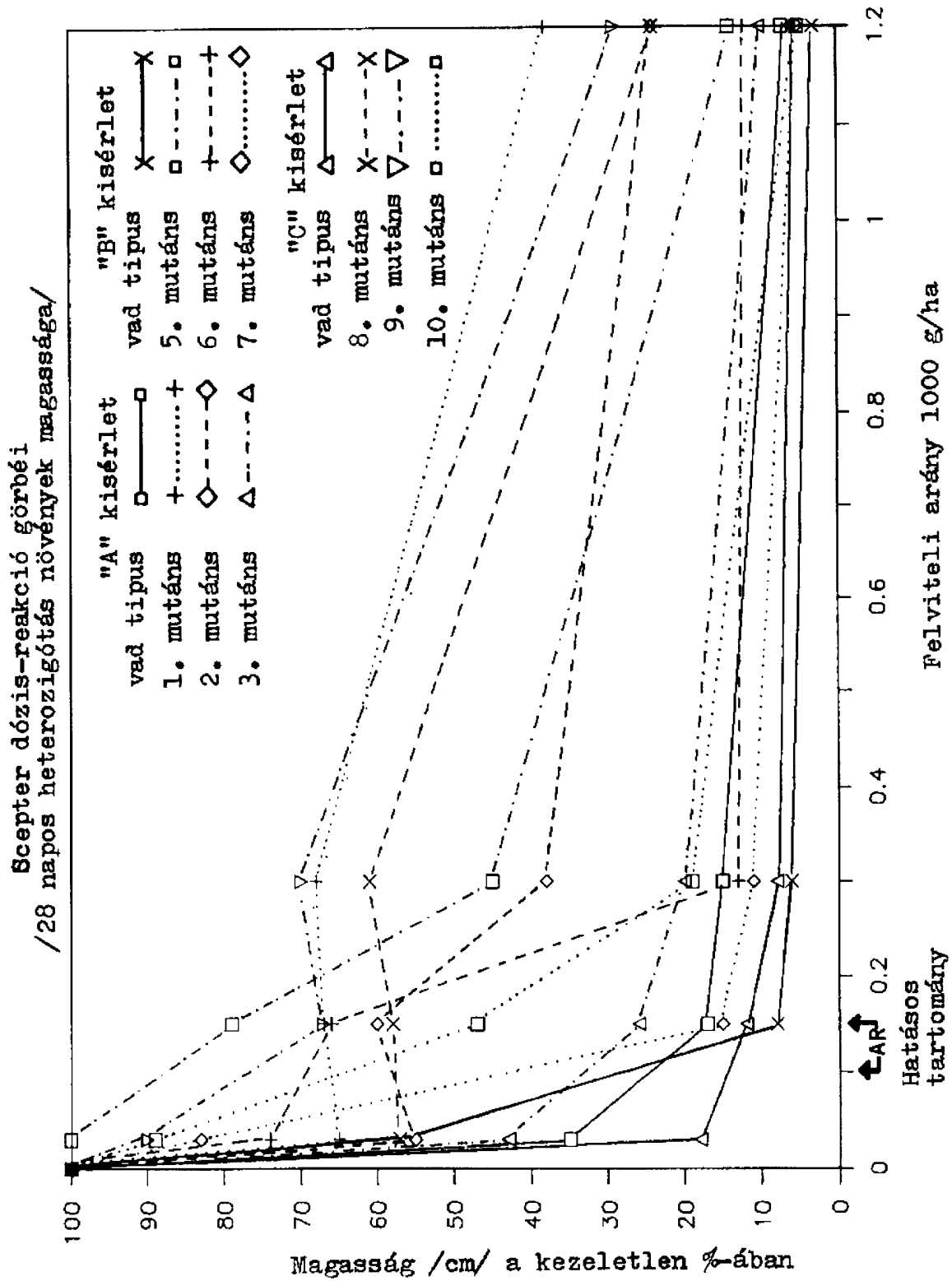
16. ábra A levél ALS enzimjének reakciója a triazolo-pirimidin-típusu herbicidekre /homozigótás, permetezett/



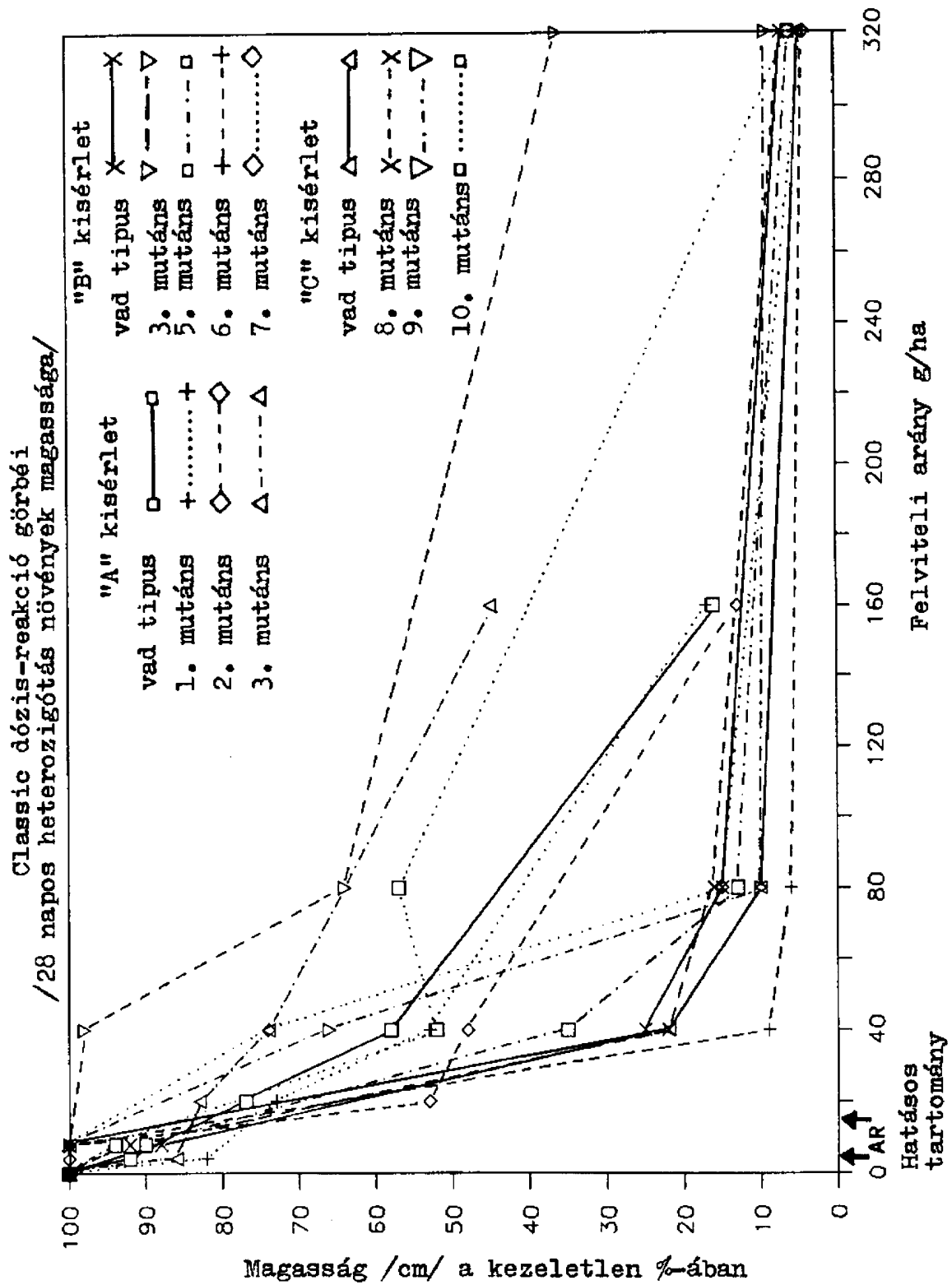
Pursuit dózis-reakció görbéi
 /28 napos heterozigótás növények magassága/



17. ábra

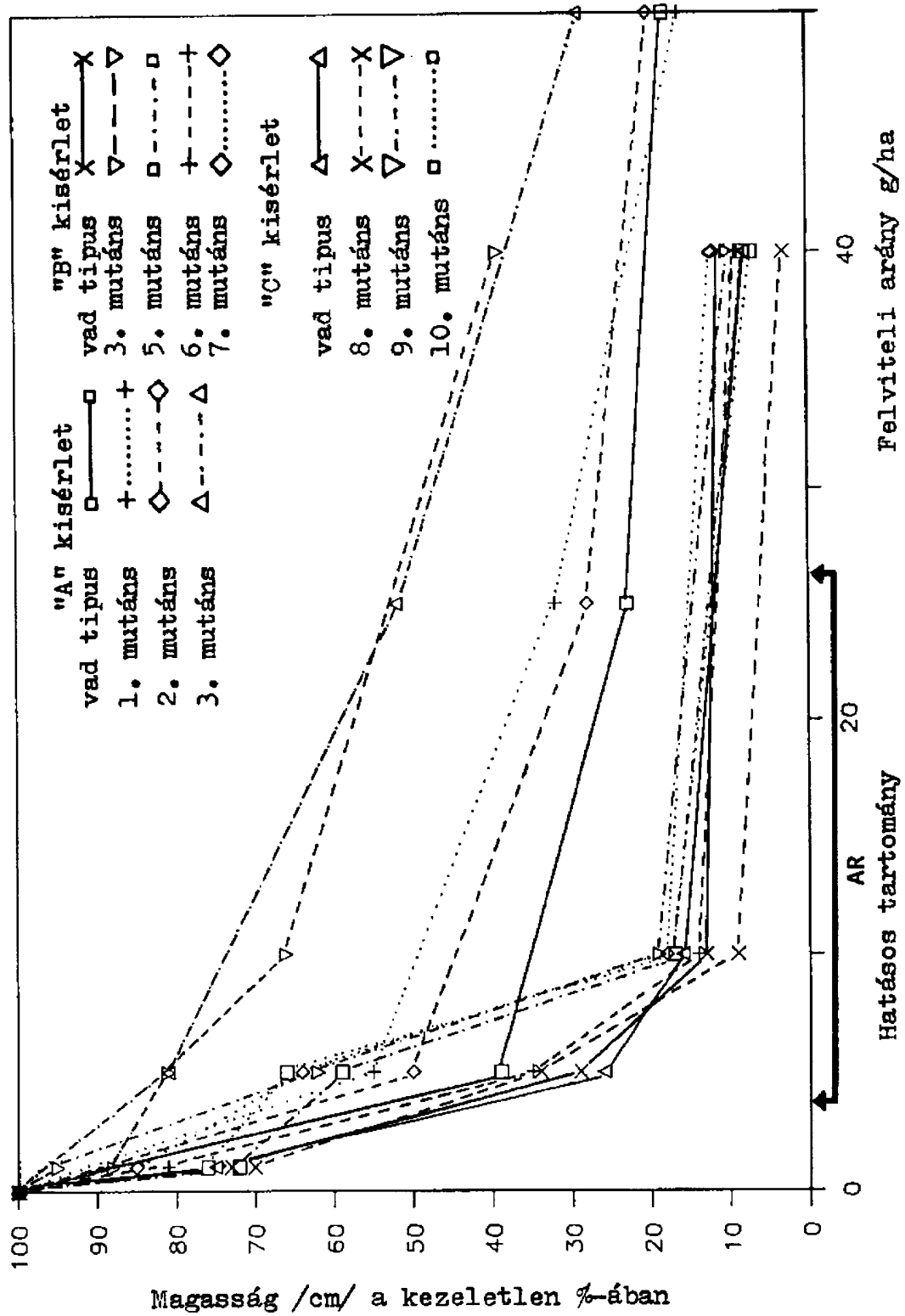


18. ábra

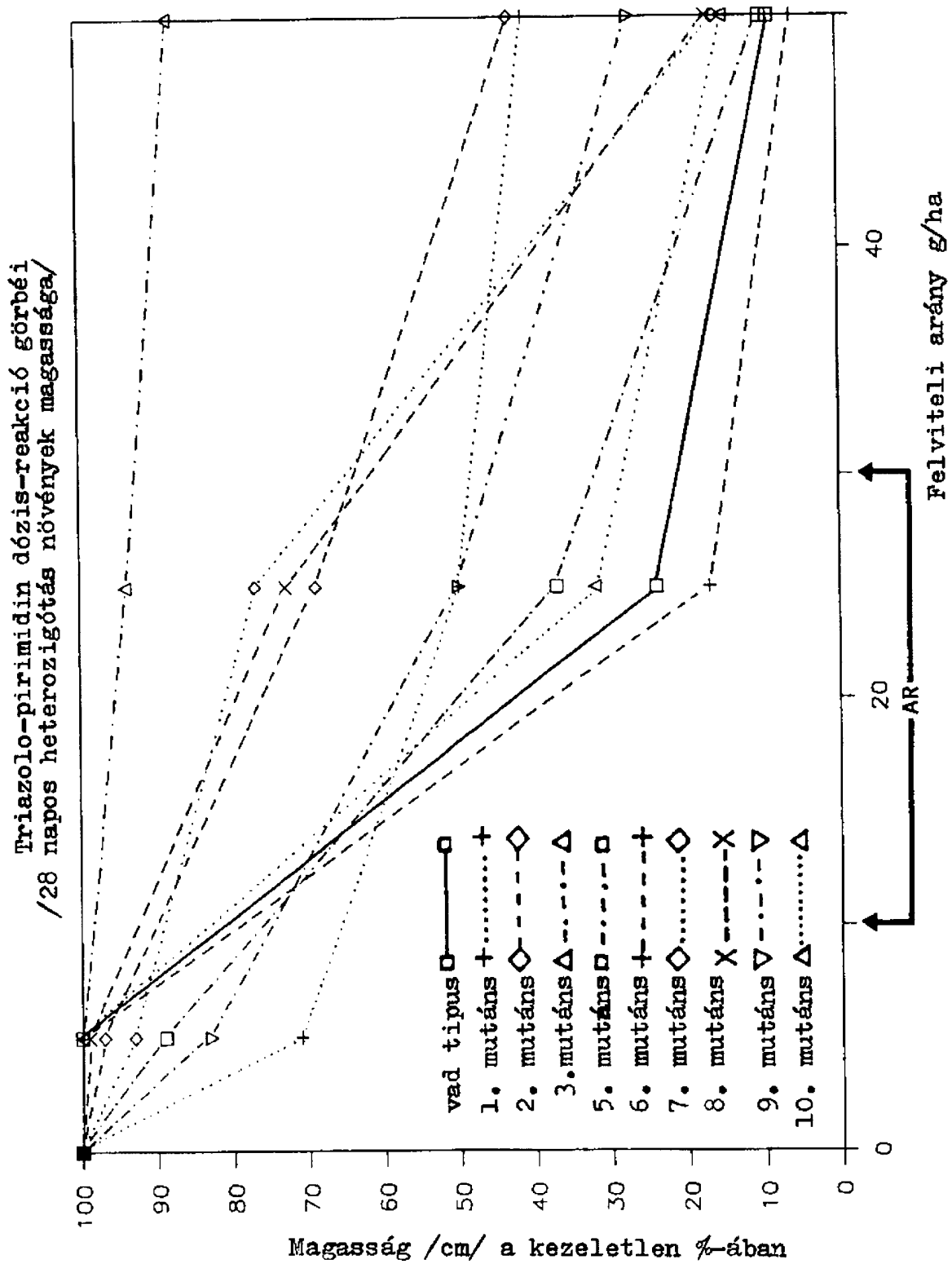


19. ábra

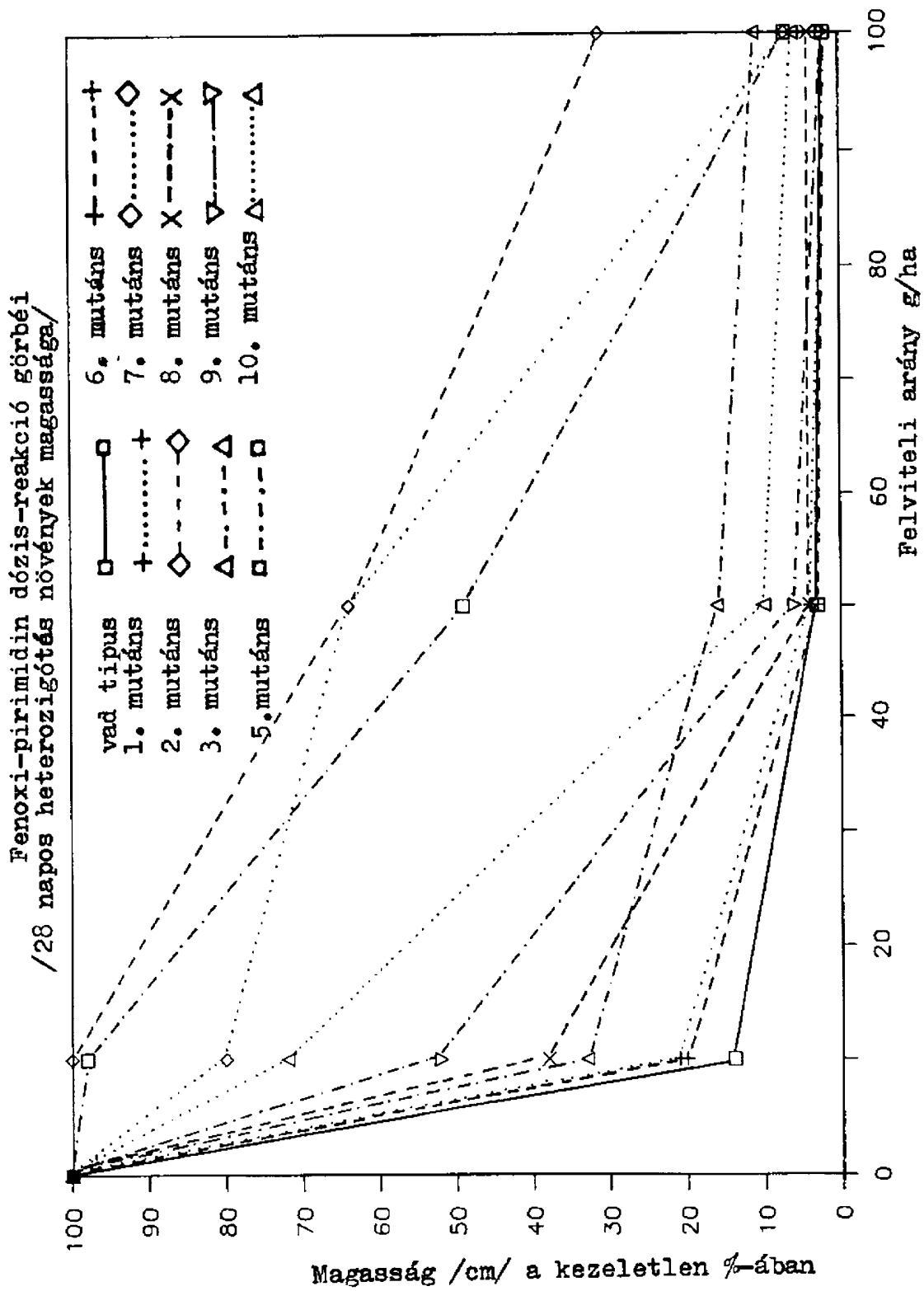
Glean dózis-reakció görbéi
 /28 napos heterozigótás növények magassága/



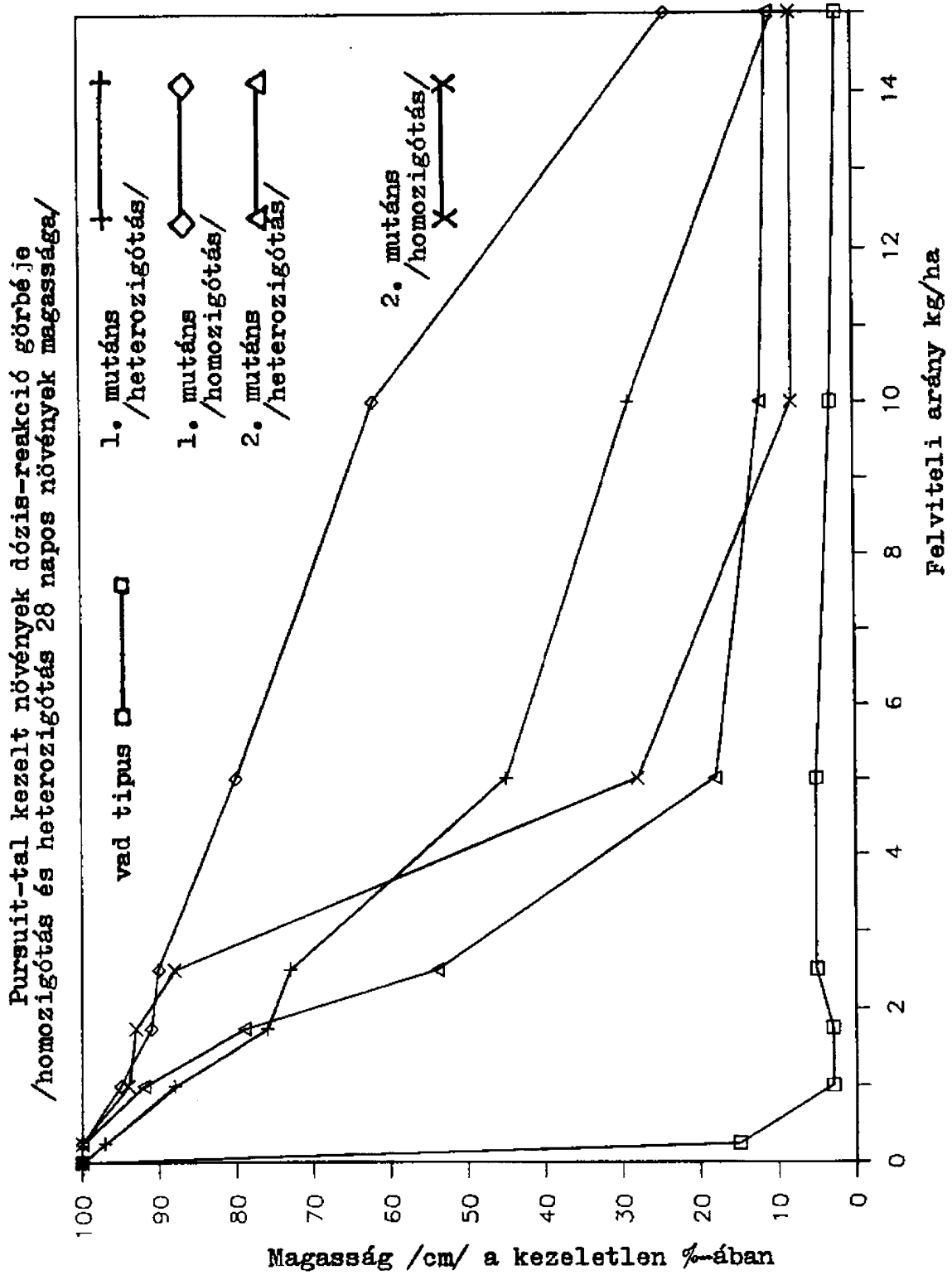
20. ábra



21. ábra



22. ábra



23. ábra