

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

SZÖVETTENYÉSZTÉSI ÉS SEJTGNETIKAI MÓDSZEREK ALKAL-
MAZÁSA DOHÁNY ÉS BUZA RENDSZERBEN

G A L I B A G Á B O R

Magyar Tudományos Akadémia
Mezőgazdasági Kutatóintézete
Martonvásár

- 1984 -



B 2367

Tartalom

1. BEVEZETÉS	1
1.1 Általános bevezetés	1
1.2 Célkitűzés	4
1.3 Irodalmi áttekintés	6
1.3.1 Protoplasztfúzió	6
1.3.2 Sejtmag- és organelumszegregáció fúzió után	7
1.3.3 Sztreptomycinrezisztencia	11
1.3.4 Buza szövettenyészetek táptalajai	12
1.3.5 Kalluszindukció néhány egyszikű növényfaj különböző szervéből	17
2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	22
2.1 A kísérletekben felhasznált növények	22
2.2 Protoplasztizolálás	25
2.3 Protoplasztok inaktiválása	25
2.4 Protoplasztfúzió	27
2.5 Protoplaszttenyésztés és a rezisztens kolóniák szelekciója	28
2.6 Növények regeneráltatása és rezisztenciatesztje	31
2.7 Izoenzimvizsgálat	31
2.8 Kromoszómaszám meghatározása	34
2.9 Az F_1 nemzedék rezisztenciatesztje	34
2.10 Kloroplasztisz-DNS analizise	35
2.11 Buzaszem- és kalász sterilizálása	37
2.12 Kalluszindukció buzalevélből és gyökérből	37

2.13 Kalluszindukció érett és éretlen buza-embriókból	38
2.14 Növényregeneráltatás a hormonszint lépésenkénti csökkentésével	39
3. EREDMÉNYEK	40
3.1 <u>Kloroplasztiszátvitel besugárzott protoplasztok fuziójával</u>	40
3.1.1 A protoplasztok inaktivációja és fuziója	40
3.1.2 A rezisztens kolóniák szelekciója	43
3.1.3 A regenerált növények osztályozása	45
3.1.4 A regeneráltatott növények rezisztenciája	47
3.1.5 A <i>N. plumbaginifolia</i> sejtmagszegregánsok kromoszómaszáma	48
3.1.6 A sztreptomycinrezisztencia öröklődésmentete	50
3.2 <u>Jól regeneráló szövettenyészetek létrehozása búzából</u>	53
3.2.1 Különböző koncentrációju 2,4-D és szacharóz hatása a buzakalluszok indukciójára és növekedésére	53
3.2.2 Kalluszindukció gyökérből	57
3.2.3 Kalluszindukció levélből	58
3.2.4 Kalluszindukció érett- és éretlen embrióból	59
3.2.5 Organogenezis gyökérkalluszból	61
3.2.6 Organogenezis levélkalluszból	62
3.2.7 Organogenezis érett- és éretlen embrió eredetű kalluszból	63
3.2.8 Különböző szacharózkoncentrációk hatása a hajtásregenerációra	72

4. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	74
4.1 <u>Kloroplasztiszátvitel besugárzott proto- plasztok fuziójával</u>	74
4.1.1 A besugárzás hatása	74
4.1.2 A regenerált növények kromoszómaszáma	75
4.1.3 Kloroplasztisztranszfer	76
4.1.4 A besugárzással inaktiváló rendszer összehasonlítása más fuziósziszte- mekkel	77
4.2 <u>Jól regeneráló szövettenyészetek létreho- zása buzából</u>	79
4.2.1 Buza kallusztényeszetek és táptalajaik	79
4.2.2 Növényregeneráció	80
5. ÖSSZEFOGLALÁS	83
6. IRODALOMJEGYZÉK	86

ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

In vitro tenyészetek előállítása és fenn-
tartása viszonylag könnyű feladat a kétszikű nö-
vények esetében. Napjainkban már a növénytermesz-
tésben is rutinszerűen használnak néhány eljárást,
mint például a mikroszaporitást, virusmentesítést
stb. Ujabb fordulatot a protoplaszttechnikák /a
protoplasztok sejtfaluktól megfosztott növényi
sejtek/ által nyújtott lehetőségek kiaknázása
hozhat a növényi sejtgenetika és a növénynemesítés
területén egyaránt.

Ilyen új lehetőségeket kínál például a pro-
toplasztok fuzionáltatása. A protoplasztfuzió se-
gítségével kikerülhetjük a hibridizációs gátakat,
melyek az evolúció során alakultak ki az egyes
fajok között. Így lehetőségünk nyílik ivaros uton
létre nem hozható új genomkombinációk előállítására.

A fuzió eredményeként létrejött ugynevezett
heterokarion kevert citoplazmát tartalmaz, melynek
következtében megvizsgálhatók a különböző eredetű
organelumpopulációk kölcsönhatásai. Keresztezéssel
ilyen kevert organelumpopuláció nem hozható létre,

mivel a növények döntő többségében a sejtorganellumok anyai uton öröklődnek /Sears, 1980/. A kevert citoplazmában létrejöhet például a különböző eredetű sejtorganellumok DNS-e közötti rekombináció, mely új tulajdonságokkal rendelkező kloroplasztisz vagy mitokondrium populáció kialakulásához vezethet /Belliard és munkatársai, 1979/.

A heterokarionok osztódásakor az egyik szülőből származó sejtmagok és sejtorganellumok egymástól függetlenül külön-külön utódsejtekbe kerülhetnek, és így az egyes utódsejtek különböző eredetű sejtmagot, és organellumokat tartalmazhatnak. Az új organellum-sejtmag kombinációt tartalmazó növények jelentőségét nagymértékben növeli, hogy a sejtorganellumokban kódolt tulajdonságok egy része, például a himsterilitás /Frankel és Galun, 1977/ egyes herbicidekkel szembeni rezisztencia /Darr és munkatársai, 1981/ stb. fontos a növénytermesztés és a nemesítés számára is. Az organellumokban kódolt tulajdonságok átvitelét /citoplazma-transzfer/ a hagyományos módon, többszörös visszakeresztezéssel is létre lehet hozni,

ez az eljárás azonban nagyon időigényes. A citoplaszmaátvitel protoplasztfúzió segítségével viszont egy lépésben és valószínűleg nem keresztezhető fajok között is megvalósítható.

A növényi sejtgenetika fejlődése nyújtotta lehetőségek csak kevésbé alkalmazhatók a gazdaságilag fontos egyszikűek /például buza, kukorica stb./ nemesítésében és természetében. A laboratóriumok nagy többségében még csak az alapvető szövettenyésztési eljárások kifejlesztésénél tartanak, így például hosszú ideig fenntartható és jól regeneráló szövettenyészetek előállításán dolgoznak /Wernicke és Brettell, 1980; Sears és Deckard, 1982/. Jól regeneráló tenyészetek birtokában sikerrel kísérrelhető meg mutánsok előállítása in vitro tenyészetekben is. Egyszikű szövettenyészetben már izoláltak mutáns növényeket, mint például a *Helminthosporium maydis* toxinjának ellenálló kukorica növényt /Gengenbach és munkatársai, 1977/.

Minőségi ugrást a protoplaszttechnikák alkalmazásával érhetnénk el, ami lehetővé tenné a modern sejtgenetikai eljárások /szomatikus hibridizáció, organelumátvitel, transzformáció stb./ alkalmazását az egyszikűek esetében is. Jelenleg az egyszikű növényekből nyert protoplasztok tenyésztése nehéz probléma. A protoplasztokat osztódásra készíteni és az így nyert kolóniákból növényt regeneráltatni még csak néhány esetben, igen kis gyakorisággal sikerült /Vasil és Vasil, 1980; Vasil és munkatársai, 1983/.

1.2 CÉLKITŰZÉS

Értekezésemben két kísérletsorozatról számolok be, melyek segítségével a két- és az egyszikű növényi sejtgenetikai rendszer egy-egy módszertani problémáját szándékoztunk megoldani.

Az egyik kísérletsorozat elvégzésével az volt a célunk, hogy meghatározzuk azt a ^{60}Co gamma-sugár dózist, amellyel a citoplazma donor protoplasztokat fúzió előtt besugározva optimális határfoku organelum átvitelt lehet létrehozni, dohányfajok között, protoplasztfúzióval. E kísér-

letsorozat folyamán a Nicotiana tabacum SR 1 mutáns sztreptomycin rezisztens kloroplasztiszait Nicotiana plumbaginifoliába /sztreptomycin szenzitív/ vittük át. A rezisztens kloroplasztiszokat tartalmazó N. plumbaginifolia kolóniákat a fuzió után sztreptomycin rezisztenciára történő szelekcióval válogattuk ki. A fuzió előtt a N. tabacum SR 1 protoplasztjait különböző nagyságu, de a letális dózist meghaladó sugárzásnak tettük ki. A besugárzásnak kettős célja volt: az egyik, hogy a heterokarionképzésben részt nem vevő rezisztens szülői protoplasztok osztódását megakadályozzuk, a másik pedig, hogy besugárzással inaktiválva, képtelenné tegyük a sejtmagokat fuzióra, és így a hibridek aránya csökkenjen a N. plumbaginifolia sejtmagszegregánsok javára.

A másik kísérletsorozat célja az volt, hogy buzafajtákból jól regeneráló szövettenyészeteket nyerjünk. Az optimális kalluszindukció, fenntartás és növényregeneráltatás körülményeinek megismerése céljából különböző cukor- és hormonkombinációkat tartalmazó táptalajokat próbáltunk ki.

Különböző koru és eredetű szövetekből /levélbázisból, embrióból és gyökérből/ tenyészeteket hoztunk létre, hogy megtudjuk, melyik növényi részből lehet jól regeneráló kalluszt nyerni. Ebben a kísérletsorozatban hét Triticum aestivum és egy Triticum durum fajtával, valamint Triticum monococcummal dolgoztunk, és megvizsgáltuk, hogy a különböző genetikai háttér milyen eltéréseket okoz a kalluszok képződésében és regeneráló képességében.

1.3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.3.1 Protoplasztfúzió

A hatvanas években gombák által termelt enzimek alkalmazásával megoldódott a protoplasztok hatékony izolálása /Cocking, 1960; Takebe és munkatársai, 1968/. A 70-es évek elején a protoplasztokból történő növényregeneráció megvalósítása /Takebe és munkatársai, 1971/ és a protoplasztfúziós technikák tökéletesedése lehetővé tette növényi szomatikus hibridek előállítását és a fúzió útján történő organellum átvitelt. A fúzió indukálására kezdetben nitrátsókat használtak /Power és munkatársai, 1970/.

Hatékonyabb módszer volt később a CaCl_2 -os kezelés magas pH alkalmazása mellett /Keller és Melchers, 1973/. A következő lépcsőfokot a polietilén-glikol-kezelés bevezetése jelentette, amivel 5-10 % fuzió gyakoriságot /heterokarionok aránya a túlélő sejtek között/ értek el /Wallin és munkatársai, 1974; Kao és Michayluk, 1974/. A ma leggyakrabban alkalmazott módszert Kao és munkatársai /1974/ dolgozták ki, akik a polietilén-glikol-kezelést kombinálták a Ca^{++} -magas pH-eljárással. Ezzel a módszerrel 10-20 % fuzió gyakoriság érhető el.

1.3.2 Sejtmag- és organelum-szegregáció fuzió után

A fuzió révén létrejött heterokarion a szülői protoplasztok sejtmagját és organelumait tartalmazza. A heterokarion osztódásakor a szülői sejtmagok fuzionálhatnak /hibridképződés/ vagy pedig szegregálhatnak a utódsejtekbe /Medgyesy és munkatársai, 1980/. Eközben a kevert kloroplasztisz populáció sem marad stabil, ugyanis a fuzió termékből származó növények vagy az egyik vagy a másik szülő kloroplasztiszait tartalmazzák /Chen és munkatársai, 1978; Belliard és munkatársai, 1978; Aviv és Galun, 1980; Menczel és munkatársai, 1981/.

A hibridképződés gyakorisága a növényi protoplasztok fuziója után rendkívül magas. Kao /1977/ kísérletében, ahol Nicotiana glauca és szója protoplasztok fuziójából származó heterokarionok klónozással előállított sejtvonalaikat vizsgálta, az összes vonal hibridnek bizonyult. Azonos eredményt kapott Gleba és Hoffman /1978/ is, akik Arabidopsis és Brassica protoplasztokat fuzionáltak és szintén heterokarionokat izoláltak, majd továbbtenyésztés után az ezekből előállított sejtvonalaikat vizsgálták. Medgyesy és munkatársai /1980/ N. tabacum és N. sylvestris protoplasztokat fuzionáltak. Kísérletükben a heterokarion eredetű sejtklónokból regenerált növények 85 %-a volt hibrid, a többi heterokarion eredetű sejtmagszegregáns.

A kloroplasztiszok szegregációját Chen és munkatársai /1978/ N. glauca és N. langsdorffii szomatikus hibridekben vizsgálták. Tizenhat hibrid sejtvonalból regeneráltak növényeket és nyolc vonalból N. langsdorffii, hat vonalból pedig N. glauca kloroplasztiszokat tartalmazó növényeket kaptak. Egy vonalból regenerált növények egyik része N. langsdorffii másik része pedig N. glauca kloroplasztiszokat tartalmazott. Egyetlen növényben

találtak kevert kloroplasztisz állományt, de ennek utódai már tiszta glauca vagy langsdorffii kloroplasztisz populációt hordoztak. Belliard és munkatársai /1978/ N. tabacum cv. Xanthi és N. tabacum cv. Techne protoplasztjait fuzionáltak és azt találták, hogy a regenerált növények vagy az egyik, vagy a másik szülő tiszta kloroplasztisz állományát hordozzák, megerősítve ezzel a kloroplasztisz szegregáció tényét. E növények között voltak olyan nem hibridek /szülői magszegregáns növények/, melyek a másik szülő kloroplasztiszait tartalmazták, ami azt bizonyította, hogy a sejtmagok és a kloroplasztiszok szegregációja független jelenség, tehát a fuzió eredményeként új organelum-sejtmag kombinációju növények is létrejöhetnek. Új organelum-sejtmag kombináció létrejöttét /citoplazma transzfert/ más fuziós kombinációkban is bizonyították /Aviv és Galun, 1980; Poulsen és munkatársai, 1980/.

A hibridképződés nagy gyakorisága, mely a kloroplasztisz átvitel szempontjából hátrányos, a sejtmagfuzió megakadályozásával csökkenthető oly módon, hogy az organelum donor protoplasztok sejtmagját inaktiváljuk.



Zelcer és munkatársai /1978/ kísérletükben citoplazmatikus himsterilitást /cms/ vittek át protoplaszt fuzióval N. tabacumból N. sylvestrisbe. A fuzió előtt a N. tabacum protoplasztokat röntgensugárzással inaktiválták /50 Jkg⁻¹=5 krad/. Hat, fuzióból származó sejt vonalat vizsgáltak meg, és ezekből csak egy volt hibrid, a többianem besugárzott szülőből származó sejtmagszegregáns volt.

Aviv és Galun /1980/ szintén N. sylvestrist és N. tabacumot fuzionáltak abból a célból, hogy a himsteril N. sylvestris citoplazmáját a fertilis N. tabacum citoplazmájával helyettesítsék. A fuzió előtt az N. tabacum protoplasztokat ugyancsak röntgensugárzással /50 Jkg⁻¹/ inaktiválták. Megvizsgáltak 15 sejt vonalat, melyből hibrid csak kettő volt, a többi a nem besugárzott N. sylvestris szülő sejtmagját hordozó szegregáns volt.

Sidorov és munkatársai /1981/ egy N. tabacum albino plasztisz mutáns protoplasztjait fuzionálták N. plumbaginifolia protoplasztjaival a mutáns plasztiszok átvitele céljából. A N. tabacum protoplasztokat ⁶⁰Co sugárforrással /60 Jkg⁻¹=6 krad/ sugározták be a fuzió előtt, a N. plumbaginifolia protoplasztokat pedig jódecetsavval inaktiválták. A jódecetsav a fehérjék SH-csoportjait alkilezi /metabolikus

inaktivátor/, és emiatt megakadályozza a sejtosztódást /Wright, 1978; Medgyesy és munkatársai, 1980/. A fuzióból származó sejtklónoknak a besugárzás után 35 %-át, míg besugárzás nélkül csak 1,4 %-át tették ki a N. plumbaginifolia sejtmagszegregánsok.

1.3.3 Sztreptomicinrezisztencia

A sztreptomicin rezisztencia citoplazma marker /kloroplasztiszban kódolt/. Segítségével a fuzió után kisselektálhatók a rezisztens kloroplasztiszokat tartalmazó sejtvonalak. Ezért felhasználásával növelhető a citoplazma átvitel hatékonysága.

A növények kloroplasztiszai bakteriális típusu 70 S riboszómákat tartalmaznak, és ezért a sztreptomicin meggátolja a kloroplasztiszok fehérje szintézisét. Sztreptomicin jelenlétében tehát a szenzitív növények sejtjeiből származó kolóniák zöldülést indukáló táptalajon is kifehérednek. Ezzel szemben az N. tabacum SR-1 mutáns sztreptomicint tartalmazó táptalajon is zöld kolóniákat ad. Ez a rezisztencia fenotípus az SR-1 mutáns esetében anyai uton öröklő-

dik /Maliga és munkatársai, 1975/, tehát organelleum DNS-ben kódolt. Elektronmikroszkópos vizsgálatok azt mutatták, hogy a mutáns kloroplasztiszok sztreptomycin jelenlétében megőrzik normális strukturájukat /Maliga és munkatársai, 1975/. Két-dimenziós gélelektroforetikus mintázatok szerint a mutáns kloroplasztisz egy riboszómális fehérjéje megváltozott /Yurina és munkatársai, 1978; Capel és munkatársai, 1979/.

N. tabacum SR 1 + N. Knightiana szomatikus hibridekben azt találták, hogy a rezisztencia minden esetben az SR 1 mutánsból származó kloroplasztiszokkal együtt jelent meg /Menczel és munkatársai, 1981/. A sztreptomycin rezisztencia tehát ebben az esetben a kloroplasztisz genomában bekövetkező mutáció eredménye, ezért a kloroplasztisz szegregáció követésére alkalmas.

OK

1.3.4 Buza szövettényészetek táptalajai

Egyszikű növényekből kalluszt indukálni kezdetben csak élesztő kivonattal, kókusztejjel, kazeinnel stb. kiegészített táptalajon sikerült /LaRue, 1949; Carew, 1958/. A természetes kivonatok azonban sok ismeretlen összetevőt tartalmaznak, ezért nem lehet egzakt módon az ilyen táptalajon végzett kísér-

leteket megismételni /Straus, 1960/. Ezért intenzív kutatás indult meg, teljes egészében szintetikus táptalajok kifejlesztése céljából.

Viszonylag kevés azoknak a szintetikus táptalajoknak a száma, amelyen sikerült egyszikű növények *in vitro* tenyészetét létrehozni. A legszélesebb körben használt táptalaj a Murashige és Skoog által kifejlesztett MS /Murashige és Skoog, 1962/ táptalaj, mely hatásosnak bizonyult sok faj esetében például buza /Sears és Deckard, 1982/, cirok /Wernicke és Brettel, 1980/, kukorica /Green és Phillips, 1975/, köles /Haydu és Vasil, 1981/ stb. a kallusz indukcióra, fenntartásra és a növényregenerálásra is. Néhány fajnál más táptalajt jobbnak találtak az MS-nél, így például zab esetében az SH /Schenk és Hildebrant, 1972/ és a B5 /Gamborg és munkatársai, 1968/ táptalajt /Cummings és munkatársai, 1976; Lörz és munkatársai, 1976/. A legnagyobb mérvű különbségeket, összehasonlítva az MS táptalaj szerves alkotóit /a makroelemek tekintetében/ a B5 és az SH táptalajokéval, a nitrogén és a kalcium esetében találjuk. Az MS táptalaj a nitrogént a nitrát só mellett redukált

/ammónium/ formában is tetemes mennyiségben tartalmazza / KNO_3 1900 mg l^{-1} , NH_4NO_3 1650 mg l^{-1} /, míg a B5 és az SH főleg nitrátsó formájában és lényegesen alacsonyabb koncentrációkban tartalmazza /B5: KNO_3 2500 mg l^{-1} , $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ 134 mg l^{-1} ; SH: KNO_3 2500 mg l^{-1} , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 300 mg l^{-1} /. Az MS kalcium tartalma / $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 440 mg l^{-1} / több mint kétszerese a B5 / $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 150 mg l^{-1} / és az SH / $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 200 mg l^{-1} / táptalajokénak. A szerves alkotórészeket a változatlan szervetlen só összetétel mellett a legkülönbözőbb módon variálva használják. Az egyikük esetében az auxinok azok a hormonok, melyek nélkülözhetetlenek kallusz indukcióhoz és fenntartáshoz. A leghatásosabb közülük a mesterségesen előállított 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav /2,4-D/ melyből általában 1-2 mg l^{-1} koncentrációt használnak /Green, 1978/.

Buza kallusz inditáshoz és fenntartáshoz 2,4-D önmagában is elegendő /Shimada és munkatársai, 1969; Gosch-Wackerle és munkatársai, 1978; Ozias-Akins és Vasil, 1982; Sears és Deckard, 1982/. Próbálkoztak más auxinokkal is, de a 2,4-D-hez hasonlóan gyors, vagy más intenzivebb kalluszképződést ismé-

telten csak a 2,4,5-triklór-fenoxi-ecetsavval /2,4,5-T/ érték el /Dudits és munkatársai, 1975; Lazar és munkatársai, 1983/. Citokininek általában nem szükségesek a tenyészetek növekedéséhez. Lazar és munkatársai /1983/ kísérlete szerint a kinetin $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ koncentrációban, $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ 2,4,5-T alkalmazása mellett, azonban meggyorsította a kalluszok növekedését. Magasabb citokinin koncentráció már kifejezetten gátló hatásnak bizonyult. A citokininek gátló hatását már Dudits és munkatársai is publikálták 1975-ben. A kalluszok szinben, nagyságban és alakban eltérő sejtcsoportok tömegéből állnak. A hajtásregeneráció szempontjából "két féle" kalluszt különböztethetünk meg, regenerálót, illetve nem regenerálót. Egy-egy kalluszon belül a regeneráló sejttömeg aránya megnövelhető a nem regeneráló rovására, ha a kalluszok növekedéséhez szükséges 2,4 D és 2,4,5-T hormonokat kiegészítjük IES-val vagy triptofánnal /auxin prekursor/ és kinetinnel /Nabors és munkatársai, 1983/. A táptalaj auxin szintjének csökkentése vagy megvonása a kalluszok organizálódását /gyökér és hajtásképződés/ váltja ki. A kutatások olyan regenerációs rendszer létrehozására törekednek, mely segítségével az organizáció elsősorban hajtásképződést eredményez. A kalluszok hormonmentes táptalajra való átoltása regeneráltatás céljából

0/0

nem volt célravezető, ugyanis ezzel a módszerrel csak alacsony hajtásregenerációs gyakoriság /a hajtásregenerációs gyakoriság %-ban adja meg a kiindulási explantumokon képződött hajtásokat regeneráló kallusok arányát/ volt elérhető /Shimada és munkatársai, 1969/. Magasabb hajtásregenerációs gyakoriságot értek el a későbbiek folyamán, amikor a 2,4-D-t vagy a 2,4,5-T-t gyengébb hatású auxinokkal helyettesítették a regeneráltatási fázisban, így 3-indol-ecetsavval /IES/ vagy 1-naftil-ecetsavval /NES/, és egyidejűleg citokininekkal /kinetin, 6-benzil-amino-purin, zeatin stb./ egészítették ki a táptalajt /Dudits és munkatársai, 1975; Gosch-Wackerle és munkatársai, 1978; Ahuja és munkatársai, 1982; Zamora és Scott, 1983/.

Magas hajtásregenerációs gyakoriságot ért el Sears és Deckard /1982/ a kallusok egyre alacsonyabb 2,4-D koncentrációkat tartalmazó táptalajra való átoltásával. Az alacsony auxin koncentrációjú /0,3-0,5 mg l⁻¹ 2,4-D/ táptalajon növesztett kallusokon sok esetben erőteljes gyökérvégképződés indult meg, ami a továbbiakban megakadályozta a hajtáskezdemények kialakulását /Gosch-Wackerle és munkatársai, 1979/. Az optimális hormonkoncentráció és kombináció kialakítása tehát igen lényeges az egyes szövettenyészeteknél.

A hormonokon kívül a táptalajban lévő szacharóz mennyisége is befolyásolja az in vitro tenyészetek növekedését és hajtásregeneráló képességét. A szacharóz a sejtek alapvető szénforrása, másrésztől, mint ozmotikus stabilizátor is nélkülözhetetlen a táptalajban. Kétsziküeknél 3 % szacharóz van általában a táptalajban, míg egysziküeknél 2 % a legelterjedtebben használt szacharóz koncentráció /Yamada, 1977/. A szomatikus embriogenezis indukálása érdekében a kölesnél 3-6 % /Hajdu és Vasil, 1981/, a kukoricánál 13 % /Lu és munkatársai, 1982/ szacharóz koncentrációt használtak eredményesen. Buza szövettenyészetben viszont a magas szacharóztartalom nem segíti elő a szomatikus embriogenezist és a kallusz növekedése magas /15 %/ szacharóz koncentrációt tartalmazó táptalajon meg is áll /Ozias és Vasil, 1982/.

1.3.5 Kallusz indukció néhány egyszikü növényfaj különböző szervéből

Az egyszikü növények legkülönbözőbb részeiből próbáltak in vitro tenyészeteket indítani, így hajtáscsucs merisztémából, mezokotilból, hipokotilból, szárból, gyökérből, levélből, vi-

rágzati tengelyből, érett és éretlen embrióból stb. /Green, 1978/. A legtöbb esetben fiatal, a differenciálódás alacsony szintjén álló szövetekből sikerült a szövettenyészetek indítása. Ekkor a kallusok létrejötte többnyire csak az osztódó merisztémát alkotó sejtek továbbosztódásának eredménye /Potrykus és munkatársai, 1976/, ellentétben a kétszikűekkel, ahol differenciált szövetekből, például levél mezofillumából is lehet kalluszt nyerni a sejtek dedifferenciációja által. Kivételt jelent az egyszikű érett embriók szkutelláris /csirapajzs/ szövetéből indított kallusok kialakulása, de ezek regenerációs képessége csekély /Schaeffer és munkatársai, 1979/.

Számos kísérletet végeztek egyszikű mezofillum eredetű protoplasztokkal, de ezeket osztódásra készíteni nem, vagy csak kis gyakorisággal sikerült. Így felmerült a kérdés, valyon totipotensek-e az egyszikű differenciált szövetek sejtjei /Thomas és munkatársai, 1979/. A választ a levélből történő kalluszindukciós kísérletek adták meg.

A gabonafélék közül árpa csiranövény levélbázisából nyert szegmenteket kalluszosítottak el először /Saalbach és Koblitz, 1978/. Mikroszkópos

vizsgálattal is megerősítették, hogy a kallusz a mezofillumot alkotó sejtek osztódásából származott. A gabonafélék levélszövetének totipotenciáját cirok esetében is bizonyították, mivel sikerült levéleredetű kalluszból szomatikus embriogenezisen keresztül hajtásokat regeneráltatni /Wernicke és Brettell, 1980; Wernicke és munkatársai, 1982/. Köles és Panicum maximum Jacq esetében is levélkalluszból, szomatikus embriogenezis útján sikerült növényt regeneráltatni /Lu és Vasul, 1981; Haydu és Vasil, 1981/. Ahuja és munkatársai /1982/ buza levélbázisból nyert kalluszból szuszpenziós kulturát hoztak létre. A kalluszokból és a szuszpenziós eredetű sejtkolóniákból egyaránt sikerült növényt regeneráltatniuk. A buza levélkalluszból történő hajtásregenerációt Zamora és Scott /1983/ kísérlete is alátámasztja. A fent említett gabonafélék esetében a merisztéma a levélalagnál helyezkedik el, ezért a levél csúcsa felé egyre idősebbek a szövetek, és magasabb a differenciáltságuk foka is. E kísérletek szerint, a kalluszképződés a levelek bázisától a csúcs felé csökken, majd megszűnik /Wernicke és Brettell, 1982/.

A gabonafélék közül először zab gyökeréből indított kalluszból sikerült növényt regeneráltatni. A kallusz a gyökércsucs merisztémájából származott.

zott. Buza gyökérkalluszból 1969-ben /Shimada és munkatársai/ sikerült néhány növényt regeneráltatni. A gyökéreredetű kalluszok hajtásregeneráló képessége azonban alacsony. A megfelelő regenerációs rendszer kidolgozása több gabonafélére /például buza, köles, rizs stb./ napjainkban még folyamatban van /Tissue Culture for Crops, 1982; Nabors és munkatársai, 1983/.

Az éretlen embrió szkutellumából indukált kalluszokkal végzett kísérletek adták a legbiztosabb hajtásregenerációs eredményeket. Buzával és kukoricával végzett kísérletek szerint csak bizonyos koru embriókból lehet jól regeneráló tenyészeteket nyerni. Néhány kukoricafajtánál a megporzás után 18 nappal a körülbelül 3 mm-es embriók voltak a legalakalmasabbak /Green és Phillips, 1975/. Számos buzafajtánál viszont, a virágzás után 12-13 nappal, a körülbelül 1 mm átmérőjű embriók voltak a legjobbak /Ozias-Akins és Vasil, 1982; Sears és Deckard, 1982/. A kisebb méretű /fiatalabb/ embriókból nem sikerült kalluszt indukálni, míg a nagyobbak /idősebbek/ gyakran kicsiráztak, vagy a képződött kalluszból nem lehetett hajtást regeneráltatni.

A hosszú időn át fenntartott tenyészetek regeneráló képessége lecsökken /Sears és De-
kard, 1982/.

Az éretlen embriókkal végzett kísérle-
tekben párhuzamosan több fajjal vagy fajtával
dolgoztak azonos kísérleti feltételek mellett
és nagyszámu növényt regeneráltattak. Lehetőség
nyílt, hogy összehasonlítsák a különböző fajokat
vagy fajtákat a *k*állusz indukció és a kalluszból *a*
történő növényregeneráció szempontjából. Green
és Phillips /1975/ kukorica éretlen embrióiból
indukáltak kalluszt, és ezekből körülbelül 300
növényt regeneráltak. Öt beltenyésztett vona-
lat hasonlítottak össze a kallusz indukció szem-
pontjából. A tenyészeteket különböző koru embri-
ókból indították. Mintánként 60-60 embriót al-
kalmaztak. Egy vonalból /A632/ nem sikerült egy-
általán kalluszt nyerni. Három vonalból a tizen-
hat-tizennyolc napos embriók átlag 8 %-a adott
kalluszt. Az A188-as vonal minden korosztálya, a
huszonnégy napos embriók kivételével, adott kalluszt.
Ez esetben a hajtásindukciós gyakoriság átlagosan
17 % volt.

Cummings és munkatársainak /1976/ huszonöt beltenyésztett zab vonal közül huszonháromból sikerült kalluszt indítani, tizenhat kalluszából pedig növényt regeneráltatni /130 növényt neveltek fel/. Egy vonal /Lodi/ kallusza másfél évig /tizenhárom passzálás/ megtartotta hajtásregeneráló képességét.

Sears és Deckard-nak /1982/ 39 őszibuza fajta közül 35-ből sikerült kalluszt indítani. Néhány fajta primer kalluszának hajtásregenerációs gyakorisága 100 % volt. Tizennyolc genotípus in vitro tenyésztésből sikerült négy passzálás után is /90-120 napos tenyészetek/ növényt regeneráltatni. Öt genotípus regenerációs képessége változatlan volt 240 nap tenyészetben tartás után is. Az ND7532-es fajta kalluszából 420 nap után is tudtak hajtást regeneráltatni.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1 Kísérletekben felhasznált növények

Nicotiana tabacum L. cv. Petit Havana SR 1

/2n=4X=48/ laboratóriumunkban előállított

sztreptomycin rezisztens mutáns /Maliga és munkatársai, 1973/.

Nicotiana plumbaginifolia / $2n=2X=20$ /

A dohánynövényeket steril körülmények között, P táptalajon /Sidorov és munkatársai, 1981; 1. táblázat/ neveltük napi 16 óra megvilágítás /1500 lx/ mellett, 26 °C-on.

Faj	Fajta
<u>Triticum aestivum</u> / $2n=6X=42$ /	GK Maraton
	GK Tiszatáj
	GK T-5
	GK Tarján
	GK Kincső
	Jubilejnaja 50
	GK Csongor
<u>Triticum durum</u> / $2n=4X=28$ /	GK Minaret
<u>Triticum monococcum</u> / $2n=2X=14$ /	

A csiráztatott vagy szövettenyészetből regenerált buzanövényeket jarovizálás /2 °C, 5 hét/ után klimakamrában neveltük fel, napi 16 óra megvilágítás /15000 lx/ mellett. A nappali hőmérséklet 21 °C, az éjszakai 16 °C volt. A növényeket tőzeges talajba ültettük.

A buza fajokat és fajtákat egyaránt a Szegedi Gabona-termesztési Kutatóintézet bocsátotta rendelkezésünkre.

1. táblázat

A P-táptalaj összetétele

Anyag	Koncentráció /mg l ⁻¹ /
NH ₄ NO ₃	330
KNO ₃	380
CaCl ₂	440
MgSO ₄	180
KH ₂ PO ₄	170
FeSO ₄ ·7H ₂ O	28
H ₃ BO ₃	6,2
etilén-diamin-tetraacetát x 2H ₂ O	37
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10,6
KJ	0,8
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
Szacharóz	30000,0

Tridesztillált vízben, pH = 5,6 /0,1 N KOH/

Irodalom: Sidorov és munkatársai, 1981.

2.2 Protoplasztizolálás

Steril körülmények között P táptalajon /1. táblázat/ nevelt N. tabacum és N. plumbaginifolia növények leveleit használtuk. A leveleket feldarabolás után 0,45 um pórusátmérőjű membránfilterrel sterilizált 0,5 % driselase enzimmel /0,4 M szacharóz tartalmu K3 tápoldatban /Nagy és Maliga, 1976; 2. táblázat feloldva, pH 5,6/ emésztettük 16 órán át 28 C^o-on. A protoplaszt szuszpenziót 60 um pórusátmérőjű nylon szűrőn átszűrtük és a szűrletet 300 g-vel centrifugáltuk 2 percig. A meniszkuszban összegyűlt protoplasztokat W5 oldattal /Menczel és munkatársai, 1981; 155 mM NaCl, 5 mM kCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM glükóz, pH 5,6/ kétszer mostuk /50 g, 2 perc/.

2.3 Protoplasztok inaktiválása

A W5 oldatban felszuszpendált kb. 10⁵ dbml⁻¹ sűrűségű N. tabacum protoplaszt szuszpenziót polikarbonát centrifuga csövekben 20 C^o-on sugároztuk be ⁶⁰Co sugárforrással. A következő dózisokat alkalmaztuk: 50 Jkg⁻¹, 120 Jkg⁻¹, 210 Jkg⁻¹ és 300 Jkg⁻¹. A dózisteljesítmények a megfelelő sorrendben: 0,042 Jkg⁻¹ s⁻¹, 0,042 Jkg⁻¹ s⁻¹, 0,07 Jkg⁻¹ s⁻¹ és 0,11 Jkg⁻¹ s⁻¹. Az adott ⁶⁰Co sugárzás LD₅₀ értéke /N. tabacum

2. táblázat

A K3 tápoldat összetétele

Anyag	Koncentráció /mg ^l ⁻¹ /
KNO ₃	2400
CaCl ₂ x2H ₂ O	880
NH ₄ NO ₃	250
MgSO ₄ x7H ₂ O	250
NaH ₂ PO ₄ x2H ₂ O	156
/NH ₄ / ₂ SO ₄	130
FeSO ₄ x7H ₂ O	27,8
etilen-diamin-tetraacetát x2H ₂ O	37,3
MnSO ₄ x4H ₂ O	10
H ₃ BO ₃	3
ZnSO ₄ x7H ₂ O	2,3
Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	0,24
CuSO ₄ x5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ x6H ₂ O	0,025
KI	0,75
Piridin-3-karbonsav	1
m-inozitol	100
piridoxin-HCl	1
tiamin-2HCl /B ₁ /	10
2,4-diklór-fenoxi-ecetsav	0,1
6-benzil-amino-purin /BA/	0,2
1-naftil-ecetsav /NES/	1
D-xilóz	250
glükóz	79200

tridesztillált vízben, pH = 5,6 /0,1N KOH/

Irodalom: Nagy és Maliga, 1976.



protoplasztokra vonatkozik/ körülbelül 20 Jkg^{-1}
/0,042 $\text{Jkg}^{-1} \text{ s}^{-1}$ dózisteljesítmény mellett/ /V.A.
Sidorov személyes közlése/.

A jódecetsav inaktiváláshoz a N. tabacum
protoplasztokat / 10^5 dbml^{-1} sűrűség/ 10mM jódecet-
savat tartalmazó, membránfilterrel sterilizált W5
oldattal /pH 5,6/ szuszpendáltuk fel, és szobahő-
mérsékleten 30 percig inaktiváltuk /Medgyesy és
munkatársai, 1980/ A kezelés után a protoplasztokat
W5 oldattal kétszer mostuk.

2.4 Protoplasztfúzió

N. tabacum SR1 és N. plumbaginifolia proto-
plasztokból 1:1 arányu sűrű keveréket készítettünk
/ 10^6 dbml^{-1} /, melyből 3 cm átmérőjű műanyag petri-
csészébe két cseppet tettünk. Tizenöt perc után
1 csepp PEG 40 oldatot /40 % polietilén glikol
Ms=6000, 0,3 M glükóz, 66 mM CaCl_2 , pH=6; Kao és
Michayluk, 1974; Maliga és munkatársai, 1977/ ad-
tunk a protoplasztokhoz óvatosan. Husz perc mulva az
oldatot eltávolítottuk és a protoplasztokhoz 2 csepp
W10 oldatot tettünk. A W10 oldatot 9 rész A /0,4 M glü-
kóz, 66 mM CaCl_2 , 10 % dimetilszulfoxid/ és 1 rész B

/0,3 M glicin-NaOH puffer, pH 10,5/, filtersterilizált törzsoldatok összekeverésével frissen készítettük /Keller és Melchers, 1973; Menczel és munkatársai, 1981/. Husz perc múlva a W10 oldatot kb. 1 ml 0,4 M glükózt tartalmazó K3 tápoldattal higitottuk. Ujabb tíz perc után ezt lecseréltük friss K3 tápoldatra.

2.5 Protoplaszttenyésztés és a rezisztens kolóniák szelekciója

A fuzióhoz fel nem használt protoplasztkeveréket 5 cm átmérőjű üveg petricsészékben kontrollként tenyésztettük. A protoplaszttenyészetek kezdeti sűrűsége 1×10^5 dbml⁻¹ volt. A fuzió és a kontroll tenyészeteket gyenge megvilágítás mellett, termosztátszobában /26 C⁰, 50-150 lx/16h, 60-70 % relatív páratartalom/ tenyésztettük. A fuziót követő napon a fuzió petricsészék tápoldatát kicseréltük ugyancsak 0,4 M glükózt K3 téptalajjal /0,4 M G/K₃/. Egy hét múlva a már osztódó fuzió tenyészeteket átpipettáztuk üveg petricsészékbe /átmérő 5 cm/ és háromszorosára higitottuk 0,4 M G/K₃ oldattal. Három hét múlva az összes kolóniát /fuzióból és kevert kontrollból eredőt

egyaránt/ átszélesztettük 10 cm átmérőjű petri-
csészékbe zöldülést indukáló 0,4 M G/K3-tápol-
datba mely 1 mg l^{-1} 6-benzil-amino-purint /BA/,
 $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ 1-naftil-ecetsavat /NES/, 0,8 % Bacta-
-agart és a sztreptomicinrezisztenciára való
szelekció céljából 1 mg ml^{-1} sztreptomicin-szul-
fátot /filterrel sterilizált törzsoldatból be-
mérve/ tartalmazott. A kolóniákat ebben a lépés-
ben ötszörösére higitottuk és a tenyésztést a
továbbiakban 1500 lx megvilágítás mellett foly-
tattuk. Egy hónap múlva ötszörösére higitottuk
a kolóniákat 0,2 M glükózt tartalmazó RMOP táp-
talajjal, /Murashige és Skoog, 1962, Maliga és
munkatársai, 1977 ; 3. táblázat/ amely szintén
 1 mg ml^{-1} koncentrációban tartalmazott sztrep-
tomicint. E szélesztés után a petricsészékbe
25 ml táptalaj és átlagosan 1300 db kolónia
került. A fuziótól számított két-két és fél
hónap múlva elkülöníthetők voltak a zöld
/rezisztens/ és fehér /szenzitív/ kolóniák.

3. táblázat

Az RMOP táptalaj összetétele

Anyag	Koncentráció /mg ^l ⁻¹ /
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ x2H ₂ O	440
MgSO ₄	180
KH ₂ PO ₄	170
FeSO ₄ x7H ₂ O	28
etilen-diamin-tetraacetát x 2H ₂ O	37,2
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ x4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ x7H ₂ O	10,6
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	0,24
CuSO ₄ x5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ x6H ₂ O	0,025
Szacharóz	30000,0
mezo-inozit	100
tiamin-2 HCl /B ₁ /	1,0
6-benzil-amino-purin /B ₁ /	1,0
l-naftil-ecetsav	0,1

tridesztillált vízben, pH=5,6 /1N KOH/

Irodalom: Murashige és Skoog, 1962; Maliga és munkatársai, 1977.

2.6 Növények regeneráltatása és rezisztenciatesztje

A zöld kolóniákat kiemeltük és azonos /RMOP/ táptalajon, amely szacharózt csak 3 %-ot /0,084 M/ tartalmazott, havonta átoltva növesztettük. Hajtások a kalluszokon egy-két hónap múlva jelentek meg, melyeket hormonmentes P táptalajon /1. táblázat/ gyökeresztettünk. Klónonként 3-4 db növényt regeneráltattunk. Az egyes növények rezisztenciáját levéldarabkáikkal teszteltük, melyeket 1 mg ml^{-1} sztreptomycin-szulfátot, 0,8 % Bacto-agart és 3 % szacharózt tartalmazó RMOP táptalajra helyeztünk. Kontrollként a szülői növényeket használtuk.

2.7 Izoenzimvizsgálat

A vizsgálathoz steril körülmények között nevelt, fiatal növényeket használtunk, melyeket a kivonás előtt 24 óráig sötétben tartottunk. A levélkivonatok készítése, és a festés kezdetéig minden további lépés $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történt. A nyers kivonatot 0,2 g levél 1 ml kivonó pufferben /Menczel és munkatársai, 1981; 15 mM 2-merkaptoethanol, 2 mM cisztein, 2 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 0,1 M Tris-HCl puffer, pH 8,0/ történő elhomogenizálásával kaptuk.

A homogenizátumot 15000 g-vel 15 percig centrifugáltuk és a tiszta felülusztót használtuk a továbbiakban. A futtatáshoz 7,5 cm hosszú, 0,6 cm átmérőjű poliakrilamidgéleket használtunk /Maurer, 1971; Menczel és munkatársai, 1981; 4., 5. táblázat/. Az alsó /2ml/, majd a felső /0,2 ml/ gélek tetejére megszilárdulásig desztillált vizet rétegeztünk. A felső gél polimerizációja erős megvilágítás mellett /10000 lx/ történt. Mintánként 200 μ l kivonatot rétegeztünk a gélekre, majd 4 mA csövenkénti áramerősséggel futtatunk, 1,5 óráig. A futtató puffer 30,0 mM 5,5¹-dietil-barbitursavat /veronál/ és 8,25 mM trisz-/hidrotimetil/-amino-metánt tartalmazott /pH 7,0/. Az észterzáz csikokat Brewbaker és munkatársai /1968/ eljárásával festettük meg. A gélek festése 37 C^o-on történt 0,1 M foszfát pufferban /pH 6/ mely 1,4 mM Fast Blue RR söt /4-benzoil-amino-3,5-dimetoxi-anilin-ZnCl₂/ és 1,1 mM α -naftil-acetátot /1 ml metil-celloszolvbán feloldva/ tartalmazott. A festődés után a csikokat 1 %-os ecetsavoldatban 15 percig fixáltuk, ezt követően a géleket desztillált vízben 4 C^o-on tároltuk.

4. táblázat

Az alsó gél összetétele

akrilamid	1,0 M
N,N'-metilén-biszakrilamid	13,0 mM
N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamin	3,8 mM
$/(NH_4)_2S_2O_8$	1,5 mM
trisz-HCl puffer /pH=7,5/ /tridesztillált vízben/	70,6 mM

5. táblázat

A felső gél összetétele

akrilamid	0,84 M
N,N'-metilén-biszakrilamid	3,9 mM
TMED	3,8 mM
riboflavin	13,2 uM
trisz- H_3PO_4 puffer /pH = 5,5/ /tridesztillált vízben/	51,0 mM

2.8 Kromoszómaszám meghatározása

Egy hete átoltott steril körülmények között nevelt növények reggel gyűjtött gyökereit kolchicin 0,05 %-os oldatában 3 óráig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd Carnoy oldatban /3 rész abszolút alkohol + 1 rész cc. ecetsav/ 4 C^o-on 24 óráig fixáltuk. Desztillált vizes mosás után 96, 70 és végül 40 %-os etanolban 5-5 percig áztattuk. A gyökereket /desztillált vizes öblítés után/ 1N HCl-ban 60 C^o-on 10 percig hidrolizáltuk, majd 5 %-os kárminecetsavban szobahőmérsékleten festettük. A megfestett gyökércsucsok préselt preparátumait Zeiss NU2 mikroszkóppal vizsgáltuk.

2.9 Az F₁ nemzedék rezisztenciatesztje

Az üvegházba kiültetett N. plumbaginifolia sejtmagszegregáns növények önbeporzását és reciprok keresztezését végeztük el vad típusu N. plumbaginifoliaval. A keresztezésekből származó magokat sterilizáltuk /áztatás 1 percig 70 %-os alkoholban, áztatás 3 percig 0,5 %-os nátrium-hipokloritos oldatban, mosás háromszor steril vízben/, majd a csirázás elősegítése érdekében egy ~~h~~óra hosszat áztattuk filterrel sterilizált, 2 % KNO₃-ot és 0,5 mgml⁻¹ GA₃-at tartal-

mazó oldatban. A csiráztatást petricsészében végeztük, sztreptomycin oldattal /0,5 mgml⁻¹/ nedvesített szűrőpapíron, kontrollként vad típusu /sztreptomycin szenzitív/ N.plumbaginifolia magokat használtunk. A csiráztatás 1500 lx megvilágítás mellett történt. A rezisztens csiranövények zöldek maradtak, míg a szenzitivek kifehéredtek a sztreptomycin hatására.

2.10 Kloroplasztisz-DNS analízise

A 48 órán át sötétben tartott növények leveleit összevágtuk és dörzsmozsárban kloroplasztiszt izoláló pufferban /0,3 M szorbitol, 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 4 mM 2-merkaptoetanol, 0,1 % BSA; pH 8,0/ homogenizáltuk. Az intakt levélrészeket, sejteket négy rétegű gézen és 3 µm pórusátmérőjű nylon hálóval kiszűrtük, majd a sejtmagokat centrifugálással eltávolítottuk /100 g x 1 perc/. A felüluszból ismételt centrifugálással kiülepítettük a kloroplasztiszokat /1200 g x 5 perc/, és izoláló pufferban felszuszpendáltuk. A kloroplasztiszok szeparálása 30, 45 és 60 %-os szacharóz oldatok egymásra rétegzésével készített gradiensen történt /Bottomley és munkatársai, 1974/, szorbitolt nem tartalmazó izoláló pufferban 100000 g/30 perces centrifugálással /Sorwall OTO-50 SW-27 rotor/.

A kloroplasztiszok a felső két réteg határán helyezkedtek el. Az összegyűjtött kloroplasztiszokat kétszer mostuk az izoláló pufferben. A kloroplasztisz DNS restrikcióját Atchison és munkatársai /1976/ módszere alapján végeztük el. Az Eco R1 pufferban /0,2 M NaCl, 0,05 M Tris-HCl, pH 7,8, 10 mM MgCl₂/ fel-szuszpendált 0,5 ml, körülbelül 800 µg klorofillnek megfelelő mennyiségű kloroplasztiszt kezeltünk 40 egységnyi Eco R1 restrikciós endonuklázzal 25 C°-on 6 órán keresztül. Az emésztés befejezése után 60 µl 20 %-os Na-dodecilszulfáttal a kloroplasztiszokat lizáltuk, majd 0,7 g CsCl hozzáadása után 2 percig 50 C°-on hőkezeltük. A CsCl precipitálta fehérje-klorofill komplexet centrifugálással eltávolítottuk /1500 g x 3 perc/. A felüluszból a fragmentált kloroplasztisz-DNS-t 96 % alkohollal /24 óra, -20 C°/ kicsaptuk. A vákumban szárított csapadékot 25 µl 10 % glicerintartalmú elektroforézis pufferben /0,06 M Tris-HCl pH 8,05, 0,02 M Na-acetát, 0,002 M EDTA/ szuszpendáltuk és 2 µl /1 mgml⁻¹ hőkezelt/ RN-ázzal 5 percig 37 C°-on inkubáltuk. Az RN-áz reakciót stopp-pufferrel /2 % SDS, 50 mM szacharóz, 0,2 M EDTA, 0,1 % brómfenolkék/ állítottuk le. Az Eco R1 preparátum aktivitását λ DNS-en teszteltük. Az aktivitás 3 unit µl⁻¹ volt. 1 U egyenlő azzal az enzimmennyiséggel, amely egy óra lalt 37 C°-on 1 γ λ DNS-t tökéletesen megemészt.

Non
1/10
DNS
1/10
1/10

A DNS fragmentumok molekulasuly szerinti elválasztása 2 %-os, 40x20x0,3 cm-es agaróz slab gélen történt, 4 C^o-on, 3V/cm feszültséggel, 17 órán keresztül. A molekulasuly standard a Hind III restrikciós enzimmel emésztett λ DNS volt. A gélek festése 0,5 μgml^{-1} ethidium-bromid tartalmu gélelektroforézis pufferben történt 30 percig. A nem specifikusan adszorbálódott festéket 30 perces gélelektroforézis pufferben való áztatással távolítottuk el, s végül UV lámpa alatt fényképeztük le a géleket.

2.11 Buzaszem és -kalász sterilizálása

A kísérleti anyagot 10 percig 95 %-os alkoholban áztattuk. Az alkoholt steril desztilláltvizzel, leöblítettük, majd további 5 percig 5 %-os nátriumhipoklorit oldatban áztattuk. Kétszeri steril desztilláltvizes öblítés után 0,1 % higanyklorid oldatban 3 perces áztatás következett. Befejezésül háromszori steril desztilláltvizes öblítéssel távolítottuk el a higanykloridot.

2.12 Kalluszindukció buzalevélből és -gyökérből

A fenti módszerrel sterilizált szemeket felére higitott RM sókat /3. táblázat tartalmazó 0,6 %

agarral szilárdított táptalajon csiráztattuk. A csiranövényeket 1000 lx/16h napi megvilágításnak tettük ki. A levélkallusz indukcióhoz 8-15 napos növénykéket használtunk Ahuja és munkatársai /1982/ által leirt módon. A növénykékeknek eltávolítottuk a gyökerét, és a koleoptilt lehúztuk a szárról. A leveleket 3-4 mm vastag szeletekre vágtuk a levél alaptól felfelé kb. 2,5 cm magasságig. Az összeborult levéldarabokat szétszedtük, és az eredetüknek megfelelő pozíciókban RM sókat és vitaminokat tartalmazó táptalajra helyeztük, melyet 2 % szacharózzal, 1 vagy 2 mg l^{-1} 2,4-D-vel és 150 mg l^{-1} L-aszparaginnal egészítettük ki /Sears és Deckard, 1982/, /RMD 1 és RMD 2 táptalaj a továbbiakban/. A kallusz-indukció 26 C^o-on, 1500 lx/16h napi megvilágítás mellett történt.

A kalluszindukciót gyökérből a fentiekkel megegyező körülmények között végeztük. A fertőtlenített szemeket úgy helyeztük el a táptalajra, hogy a gyököcske a táptalaj felé nézzen.

2.13 Kalluszindukció érett-és éretlen buzaembriókból

Érett embrió esetén a szemeket fertőtlenítés után steril körülmények között, vízzel átitatott szü-

rőpapíron csiráztattuk 15 órán keresztül. Ezután a kipreparált embriókat RMD 1 és RMD 2 táptalajokra helyeztük szkutellummal felfelé /Green és Phillips, 1975/.

Az éretlen embriók esetében a kalászokat virágzás után 11-15 nappal begyűjtöttük, sterilizáltuk és a szemeket steril körülmények között kiszedtük. Ezután kipreparáltuk az embriókat, és az előzőekben leírt módon RMD 1 vagy RMD 2 táptalajra helyeztük.

2.14 Növényregeneráltatás a hormonszint lépésenkénti csökkentésével

A növényregeneráltatást Sears és Deckard /1982/ szerint végeztük. A tenyészeteket egy hónapig RMD 1 és RMD 2 kalluszindukciós táptalajon növesztettük. Ezt követően havonként egyre kevesebb hormont tartalmazó táptalajra oltottuk. A hormonszint csökkentése átoltásonként a következő volt: 2 mg l^{-1} , 1 mg l^{-1} , $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ és végül $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ 2,4-D. E kísérletek során a tenyészeteket 1500 lx/16h napi megvilágítás mellett, 26 C° -on növesztettük. A regenerált hajtásokat felére hígított RM sókat

ellenőrizhessük. Az eredményeink azt mutatják, hogy rezisztens kolóniák csak a fuzionáltatott protoplaszttenyészetekben jelentek meg /6. táblázat/, tehát már a legkisebb sugárdózis /50 Jkg^{-1} / is letálisnak bizonyult. Annak érdekében, hogy összehasonlítható adatokat kapjunk a besugárzás hatásáról, jód-ecetsavval inaktivált N. tabacum SR 1 protoplasztokat is fuzionáltattunk N. plumbaginifolia protoplasztokkal, ugyanis ez a kezelés nem befolyásolja a hibridképzési gyakoriságot. Az általunk használt 10 mM jód-ecetsav koncentráció is letálisnak bizonyult, mivel a kevert kontrollban ebben az esetben sem jelentek meg rezisztens kolóniák /6. táblázat/.

OK

6. táblázat

A sztreptomycin rezisztens kolóniák gyakorisága
a fuzió után

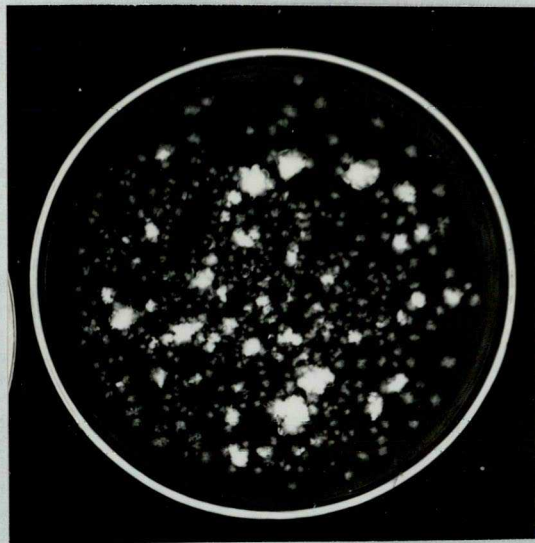
Dózis /Jkg ⁻¹ /	A rezisztens kolóniák gyakorisága /%/ [*]	
	fuzió kezelés	kevert kontroll
0 ^{**}	18,3 /12300/	0 /68400/
50	22,0 /14900/	0 /36500/
120	6,9 / 7140/	0 / 5280/
210	4,0 / 7050/	0 / 9280/
300	5,7 / 1850/	0 / 1400/

* = A zárójelekben a kolóniák számát adtuk meg

** = Jód-ecetsavas kezeléssel inaktivált SR 1
protoplasztok

3.1.2 A rezisztens kolóniák szelekciója

A zöldülést indukáló RMOP táptalajban, a sztreptomycin gátló hatása miatt, csak a rezisztens kolóniák zöldültek meg. Az öt független futási tenyészetben összesen $4,3 \times 10^5$ kolónia nőtt ki, melyek közül 6400 zöldet /rezisztens/ találtunk /1. ábra/. A rezisztens kolóniák gyakorisága a kontrollban és a legkisebb sugárdózissal kezelt mintában volt a legmagasabb /18-22 %/.



1. ábra A rezisztens kolóniák megjelenése sztreptomycin tartalmazó táptalajon.

A rezisztens kolóniák egy részét /247 db/ vizsgáltuk továbbiakban /7. táblázat/. A kevert tenyészetekből $1,2 \times 10^6$ kolónia nőtt ki, ezek egyike sem volt sztreptomycinrezisztens /6. táblázat/

7. táblázat

A rezisztens klónokból regenerált hibrid és szegregáns
növények megoszlása klónonként

Dózis Jkg ⁻¹	Vizsgált klónok száma	A különböző növénytipusok klónonkénti megoszlás [*]				A kloroplasztisz transzfer gyakorisága ^{**} /%/
		H	H és Nt	H és Np	Np	
0 ^{***}	100	69/5/	3/0/	1/1/	1/1/	0
50	38	10/0/	0	6/0/	11/5/	44
120	41	15/0/	0	0	20/0/	57
210	33	5/0/	0	0	26/0/	84
300	35	9/0/	0	0	21/1/	69

* = H = hibrid; Nt = N. tabacum; Np = N. plumbaginifolia;

A zárójelben azoknak a klónoknak a számát irtuk le, melyekből csak szenzitív, vagy a rezisztensek mellett szenzitív növényeket is kaptunk.

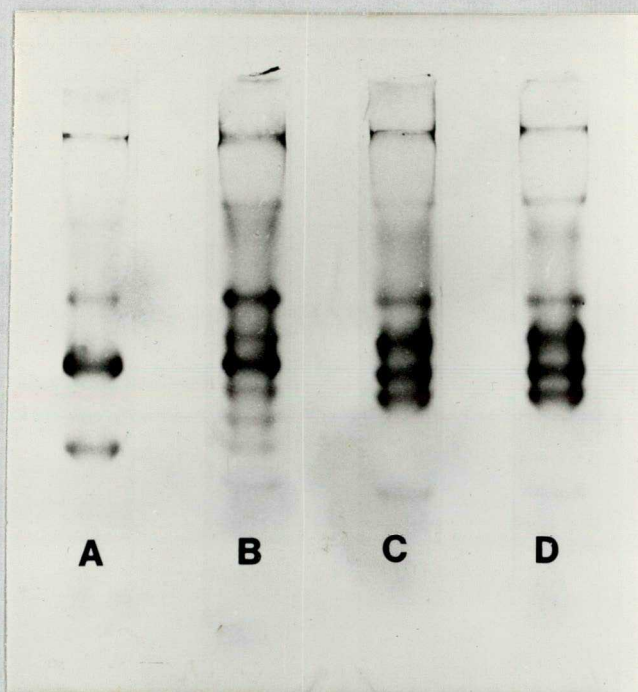
** = Azoknak a klónoknak a gyakorisága, amelyekből N. tabacum kloroplasztiszokat tartalmazó N. plumbaginifolia növényeket kaptunk.

*** = Jód-ecetsavval inaktivált N. tabacum SR 1 protoplasztok.



3.1.3 A regenerált növények osztályozása

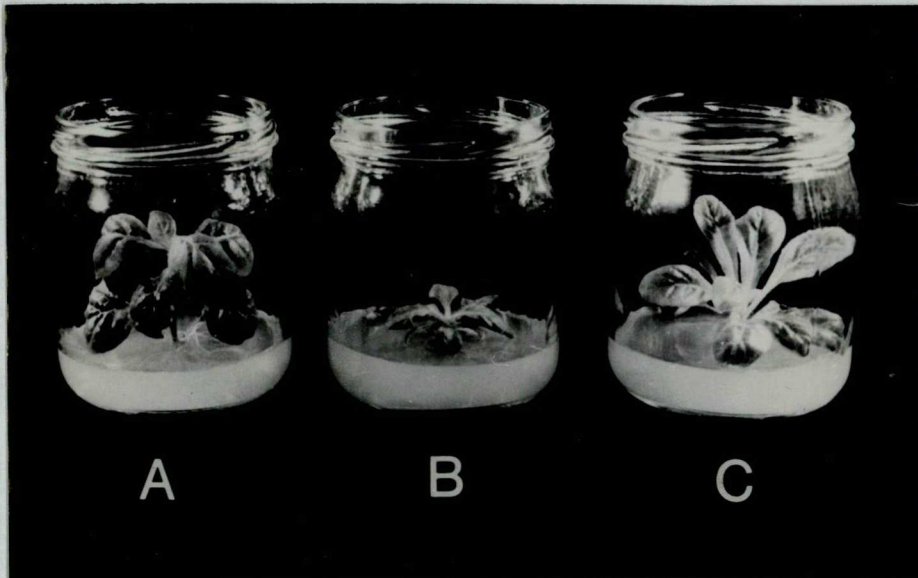
A vizsgált rezisztens kolóniák 70-90 %-ából sikerült növényt regeneráltatnunk. A regenerált növények morfológiájának és észteráz izoenzimek vizsgálatával eldöntöttük, hogy a növények szülői típusu sejtmagszegregánsok vagy pedig hibridek-e /2. ábra; 7. táblázat/.



2. ábra A szülői és a regenerált növények észteráz izoenzimeinek poliakrilamid gélelektroforézise A=N. tabacum; B=szomatikus hibrid; C=N. plumbaginifolia sejtmagszegregáns; D=N. plumbaginifolia

A szülői izoenzim mintázatok fajra jellemzőek, és így alkalmasak a regenerált növények osztályozására. A vizsgálat eredményét a 7. táblázatban foglaltuk össze. Adataink szerint a sugárkezelés nélküli fuzióból származó rezisztens növények nagy többsége hibrid lett. A besugárzás viszont egyértelműen csökkentette a hibridek gyakoriságát a N. plumbaginifolia sejtmagszegregánsok javára. Optimális dózisként rendszerünkben a 210 Jkg^{-1} bizonyult, mely segítségével 84 %-os kloroplasztisz transzfer hatékonyságot értünk el.

A hibrid és a szegregáns növényeket morfológiai tulajdonságaik alapján is jól elkülöníthetőek voltak /3. ábra/

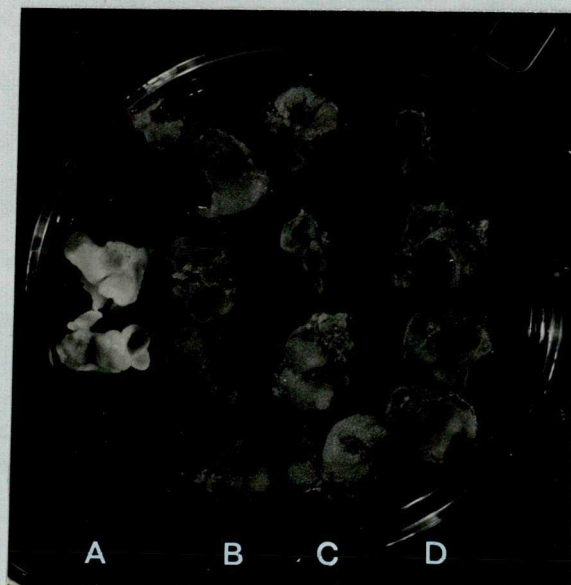


3. ábra A rezisztens kolóniákból származó regenerált növények. A=N. tabadum; B=hibrid; C=N. plumbaginifolia szegregáns

A morfológia alapján történt besorolás az izoenzim vizsgálatokkal megegyező eredményre vezetett. Az abnormális morfológiájú növények /3. ábra/B/ az izoenzim vizsgálat alapján mind hibridek voltak.

3.1.4 A regeneráltatott növények rezisztenciája

A szelekciós táptalajon a vadtipusu /sztreptomicinre szenzitív/ N. plumbaginifolia levélszeletei fehér kalluszt képeznek, a N. tabacum SR 1 levélszegmentjei pedig zöldet. A rezisztens klónokból regeneráltatott N. plumbaginifolia sejtmagszegregánsok döntő többsége a N. tabacum SR 1-gyel megegyező rezisztens fenotípust mutatta /4. ábra/.



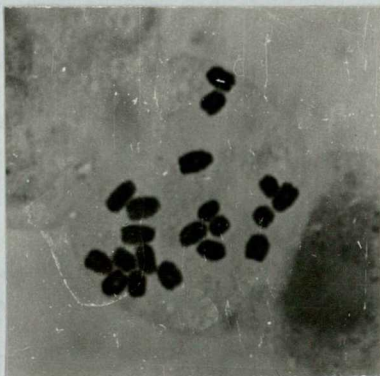
4. ábra Sztreptomicin rezisztencia teszt a regenerált növények levélszegmentjeivel A=vadtipusu /szenzitív/ N. plumbaginifolia; B,C,D=rezisztens N. plumbaginifolia sejtmagszegregánsok

A 197 sztreptomycinrezisztens kolónia közül, amelyekből sikerült növényt regeneráltatni, 184 klónból származó minden egyes növény szintén sztreptomycin rezisztens volt /7. táblázat/.

3.1.5 A *N. plumbaginifolia* sejtmagszegregánsok kromoszómaszáma

A regenerált *N. plumbaginifolia* magszegregáns növények tartalmazhattak néhány, a besugárzott *N. tabacum* SR 1-ből származó kromoszómát /Dudits és munkatársai, 1980/.

Ennek tisztázására elvégeztük a szegregáns növények kromoszóma számának meghatározását. A *N. plumbaginifolia* diploid kromoszómaszáma $2n=2X=20$ /5. ábra/, míg a *N. tabacum*é $2n=4X=48$.



5. ábra *N. plumbaginifolia* szegregáns növény diploid kromoszóma szerelvénye

A megvizsgált növények kizárólag csak
20 diploid vagy 40 tetraploid kromoszóma készletet
tartalmaztak /8. táblázat/

8. táblázat *ben vizsgált*

Kromoszómaszámok a *N. plumbaginifolia* sejtmag-
szegregáns növényekben

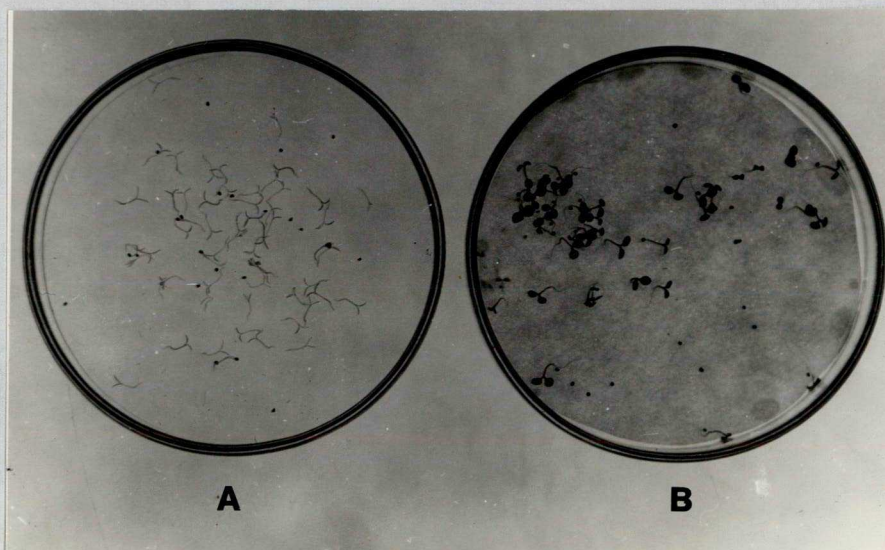
Dózis Jkg ⁻¹	Vizsgált klónok száma	
	Diploid	Tetraploid
120	5	3
210	13	10
300	7	5
Összesen:	25	18

A diploid szegregáns növények morfológiai-
lag azonosak voltak a recipiens *N. plumbaginifolia*
növényekkel. A tetraploidok is nagyon hasonlóak,
csak sokkal robusztusabbak voltak. Gyorsabban nőt-
tek és leveleik szélesebbek voltak a diploidokénál.

3.1.6 A sztreptomycinrezisztencia öröklődésmenete

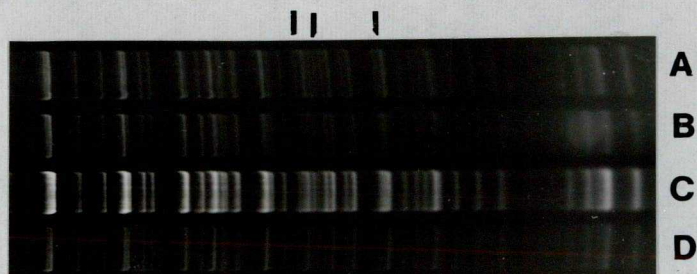
A N. plumbaginifolia szegregáns növények sztreptomycin rezisztenciájukat várhatóan a kloroplasztisz transzfer révén szerezték. Ennek alátámasztására megvizsgáltuk a rezisztencia öröklődésmenetét. Az üvegházban felnevelt növények fertilitások voltak. Öt különböző klónból származó növényen önmegporzást végeztünk és reciprok is kereszteztük őket vad típusu /sztreptomycin szenzitív/ N. plumbaginifoliaival /Anyag és módszer 2.9/. Esetenként kb. 500 magot kaptunk és ezeket teszteltük sztreptomycin jelenlétében. A szenzitív növénykéek kifehéredtek a sztreptomycin hatására, a rezisztensek pedig zöldek maradtak /6. ábra/. A sztreptomycin rezisztencia anyai uton öröklődött a vizsgált növények esetében, ugyanis ha vad típusu növényvel poroztuk meg a rezisztens növényt az utódok rezisztensek lettek, ha viszont a rezisztens növényvel poroztuk meg a vad típusu növényt az utódok szenzitivek lettek. Az önmegporzásból és az anyai keresztezésekből származó csiranövények között szenzitív nem jelent meg.

Nem jelent meg



6. ábra Csiranövénykék sztreptomycin tesztje
A, szenzitiv N. plumbaginifolia szülő
B, rezisztens N. plumbaginifolia szegregáns

Tizenkét klónból származó növény esetében a kloroplasztiszokat restrikciós analízissel azonosítottuk. Azonosításunk alapja az volt, hogy a N. tabacum és a N. plumbaginifolia kloroplasztisz DNS-ét Eco RI endonukleázzal emésztve, és a kapott fragmentumokat agaróz gélelektroforézissel elválasztva fajra jellemző mintázatokat kaptunk /Frankel és munkatársai, 1979; Sidorov és munkatársai, 1981; 7.ábra/.



7. ábra A kloroplasztiszok azonosítása DNS-ük restrikciós mintázata alapján. A=N. tabacum; B=N. plumbaginifolia; C=keverék; D=N. plumbaginifolia szegregáns

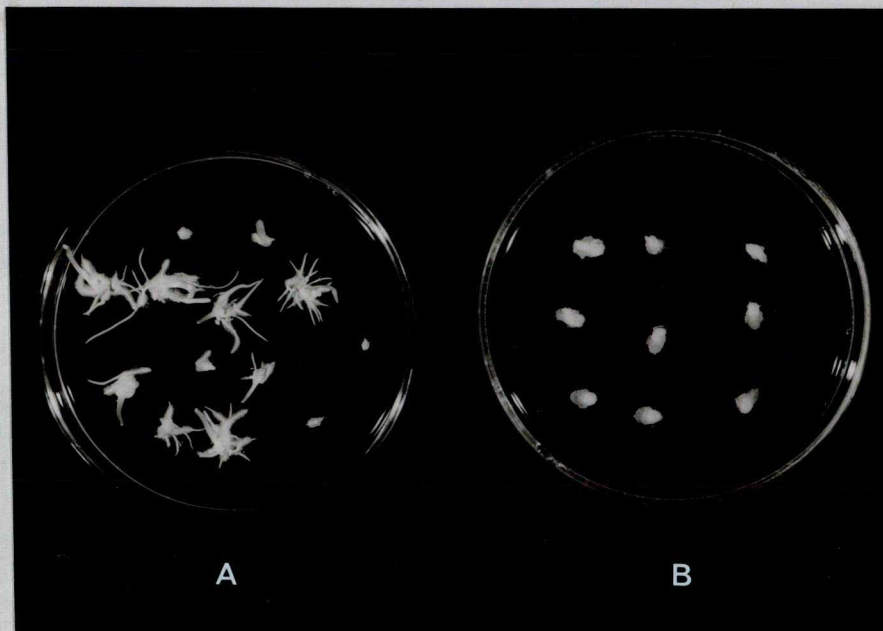
Az ábrán látható, hogy a két szülői mintázat legalább 2 helyen különbözik egymástól. Az összes, ilyen módon megvizsgált N. plumbaginifolia szegregáns növény N. tabacumból származó kloroplasztiszt tartalmazott.

Az anyai öröklésment és a restrikciós vizsgálat azt bizonyítja, hogy a kloroplasztisz transzfer sikeres volt.

3.2 Jól regeneráló szövettenyészetek létrehozása buzából

3.2.1 Különböző koncentrációju 2,4-D és szacharóz hatása buzakalluszok indukciójára és növe- kedésére

Az első kísérlet folyamán 0,5, 2 és 5 mg l⁻¹ 2,4 D koncentrációk hatását teszteltük konstans /2 %/ szacharóz koncentráció mellett. A fenti koncentrációkat tartalmazó PM táptalajra /3. táblázat hormonok és vitaminok nélkül/ GK Tisztatáj és GK Kincső éretlen embriókat /10-10 darabot koncentrációként/ helyeztünk. Az embriók egy-másfél hét múlva kezdtek elkalluszosodni. Öt hét múlva összehasonlítottuk a különböző táptalajon növekvő kalluszokat és megállapítottuk, hogy az 5 mg l⁻¹ 2,4-D koncentráció gátolja a kalluszok növekedését. A 0,5 mg l⁻¹ 2,4-D jelenlétében a kalluszok - bár erőteljesen nőttek - sok gyökeret fejlesztettek /8. ábra/, ami a kalluszosodás megszűnését eredményezte. Későbbiek folyamán a gyökeres tenyészetekből hajtást regeneráltatni nem lehetett. A 2 mg l⁻¹ 2,4-D koncentrációt találtuk optimálisnak a kalluszindukcióhoz és a kallusznövekedéséhez egyaránt.



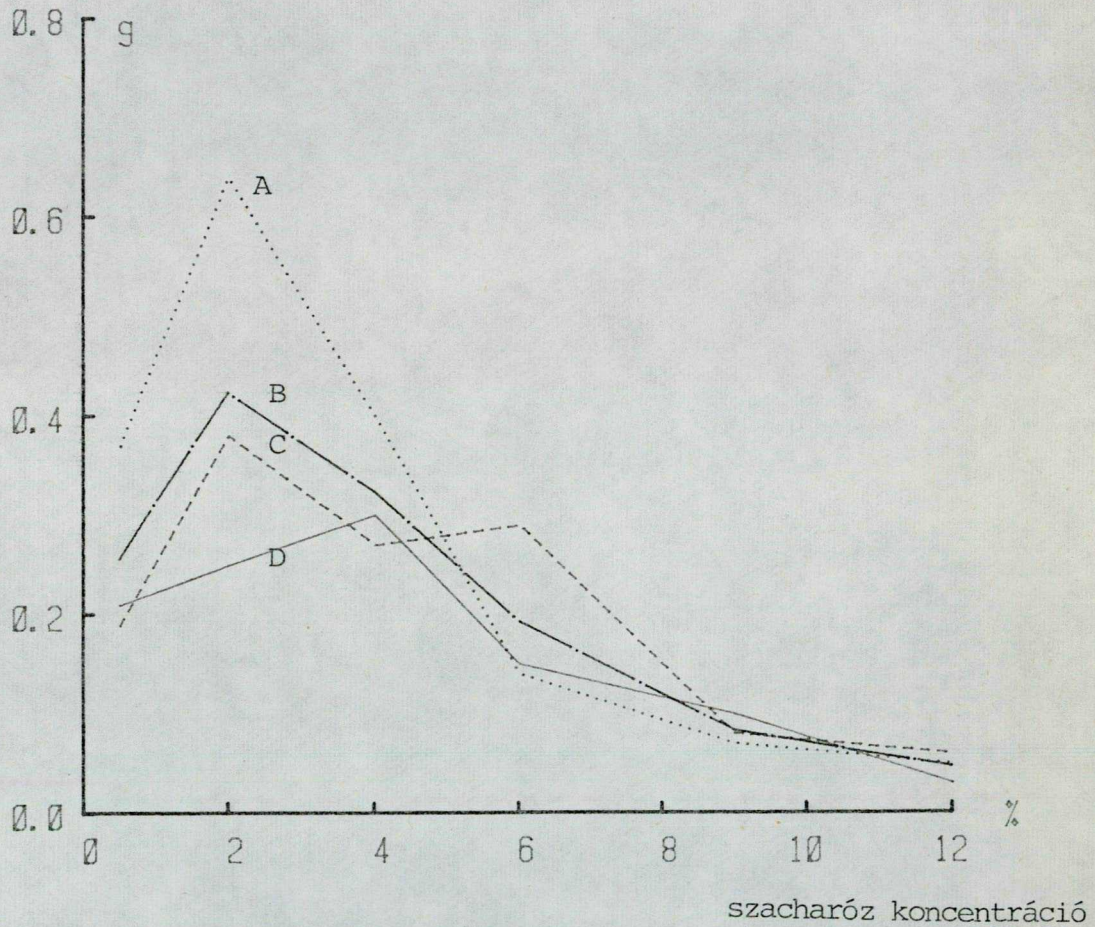
8. ábra Kalluszképződés Triticum aestivum embriók-
ból A=0,5 mg l^{-1} 2,4-D; B= 2 mg l^{-1} 2,4-D
hormon tartalmu táptalajokon.

GK Kincső éretlen-és érett embrióiból és leveléből indított kalluszok növekedését vizsgáltuk 0,5, 2, 4, 6, 9 és 12 % szacharózt tartalmazó RM táptalajon. Az összes táptalaj 2 mg/l 2,4-D-t tartalmazott. A különböző eredetű kalluszokból tiz-tizenöt darabot teszteltünk koncentrációnként. Eredményeinket a 9. ábra grafikonján foglaltuk össze.

9. ábra

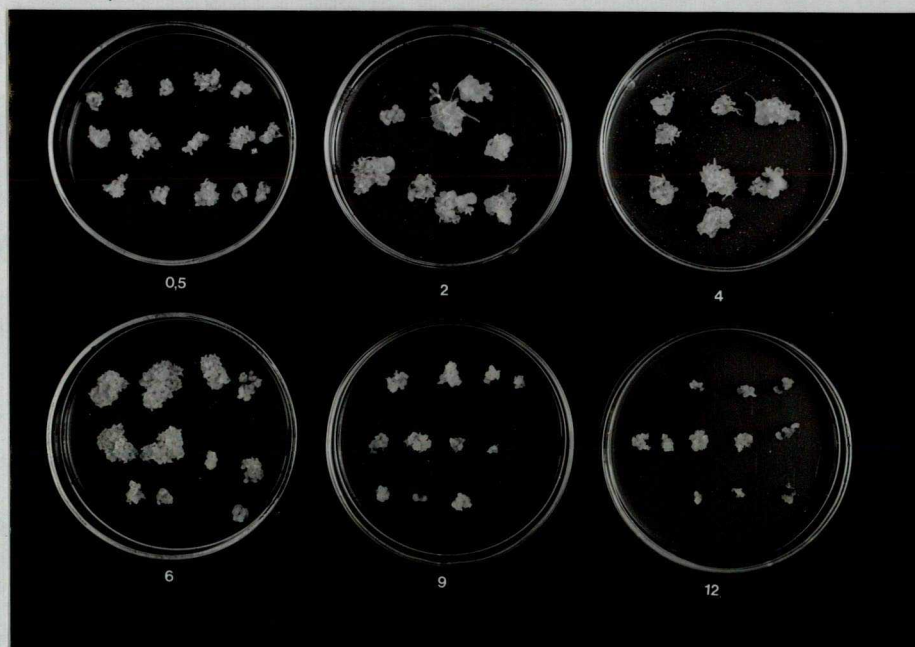
Különböző eredetű kalluszosok sulya a szacharóz
koncentrációjának függvényében*

Egy kallusz átlagos sulya



* = A = érett embrióból indított kallusz; B = a három görbe átlaga; C = levélből indított kallusz; D = éretlen embrióból indított kallusz.

Adataink azt mutatják, hogy 2 % szacharózt tartalmazó táptalajon a legerőteljesebb a kalluszk növekedése. Az ennél magasabb és alacsonyabb szacharózkoncentráción kevésbé nőttek a kalluszk /10. ábra/

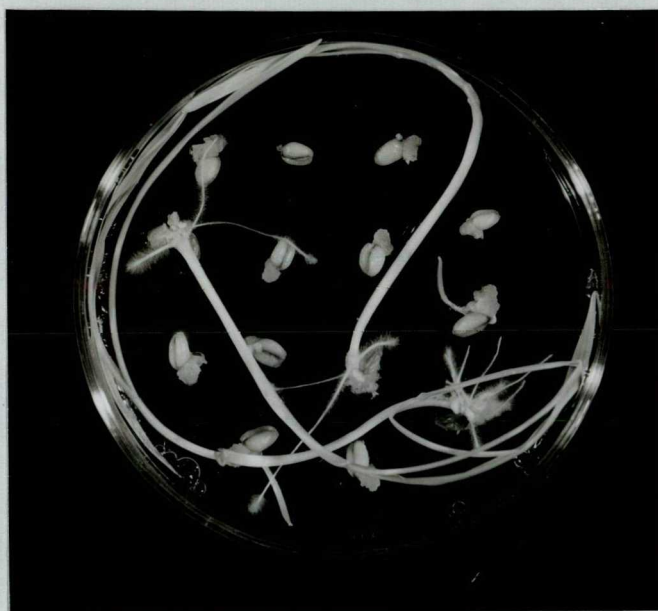


10. ábra T. aestivum levélkalluszk 0,5, 2, 4, 6, 9, 12 % szacharózt tartalmazó RMD 2 táptalajon

A további kísérletek céljára 2 mg l^{-1} 2,4-D + 2 % szacharózt tartalmazó RM táptalajt választottunk /RMD 2/, Sears és Deckard /1982/ kísérlete alapján ezzel párhuzamosan 1 mg l^{-1} 2,4-D + 2 % szacharózt tartalmazó RM táptalajjal is /RMD 1/ végeztünk kísérletet. Az RMD 1 és az RMD 2 táptalajt 150 mg l^{-1} L-asparaginnal kiegészítve használtuk /Sears és Deckard, 1982/.

3.2.2 Kalluszindukció gyökérből

T. aestivum /GK Kincső, GK Maraton/, T. durum /GK Minaret/ valamint T. monococcum gyökereiből indítottunk kalluszt. A szemeket sterilizáltuk és RMD 1 táptalajon csiráztattuk. A szemek nagy többségénél a kihajtó gyökérkezdemények rögtön elkalluszosodtak és a rügyecske növekedése is leállt, vagy szintén elkalluszosodott. Néhány esetben az elkalluszosodás nem következett be, és erőteljes gyökér, illetve hajtásnövekedést tapasztaltunk /11. ábra/.

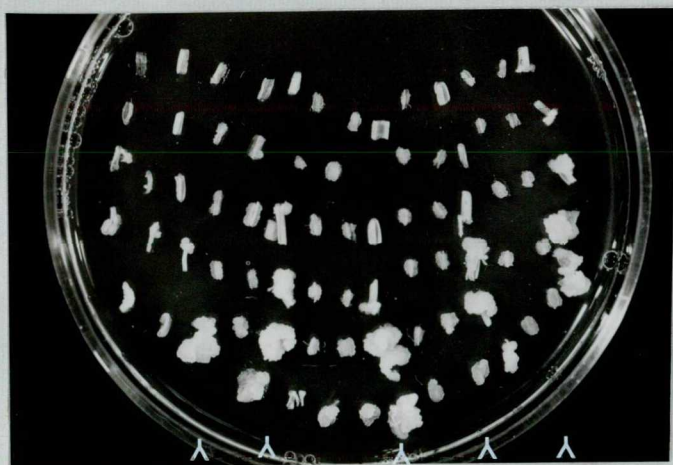


11. ábra Gyökérkallusz képződés Triticum aestivum szemekből /GK Kincső/

A kalluszképződés gyakorisága a következő volt: GK Kincső 78 %; GK Maraton 70 %; GK Minaret 82 %; T. monococcum 65 %. Az egyes fajtákból és a T. monococcumból egyaránt 40 szemet használtunk az elkalluszosításhoz.

3.2.3 Kalluszindukció levélből

E kísérletben T. aestivum /GK Kincső, GK Maraton/, T. durum /GK Minaret/ és T. monococcum levéldarabkákból indítottunk kalluszt RMD 1 és RMD 2 táptalajon. Ahogy várható volt /Wernicke és Brettell, 1980; Ahuja és munkatársai, 1982/ legintenzívebben a levélbázishoz legközelebb eső, és a belső levélörvhöz tartozó darabkák kalluszosodtak el /11. ábra/.



levélcsucs

levélalap

11. ábra Kalluszképződés fiatal T. aestivum levelek darabkáiból. A nyilak /Y/ a belső levélörvet jelzik. A felszeletelést a levélalapoknál kezdtük el és a levélcsucs felé haladtunk, körülbelül 2,5 cm magasságig.

Fajtánként 10 növényt és növényenként átlag 18 levélszegmentet próbáltunk elkalluszosítani. A lerakott T. aestivum és T. durum levélszegmentek 90 %-a, míg T. monococcum esetében csak 45 %-a kalluszosodott el.

3.2.4 Kalluszindukció érett- és éretlen embrióból

Hét T. aestivum és egy T. durum fajtából ki-preparált érett-és éretlen embriókból indítottunk kalluszt RMD 1 és RMD 2 táptalajon. A kalluszképződésre vonatkozó adatokat a 9. táblázatban foglaltuk össze. Látható, hogy a kalluszképződés gyakorisága praktikusán 100 % függetlenül a fajtától, illetve az embriók korától. Néhány esetben a rügyecske kicsirázott, de ez legtöbb esetben nem gátolta a kalluszképződést. Ha a csira növekedése folytatódott akkor kidobtuk a csirázó embriót. A táblázat elkészítéséhez nem vettük figyelembe a kicsirázott embriókat.

9. táblázat

Triticum aestivum és Triticum durum fajok összehason-
lítása az embrióból történt kalluszképződés alapján

Fajta	Embriók kora /nap/	Kalluszképződés gyakorisága [*]	
		indukciós táptalaj	
		RMD 1	RMD 2
Kincső	11	41/42	36/36
Kincső	14	36/36	36/36
Maraton	11	33/33	48/48
J-50	11	3/3	23/24
J-50	14	35/35	36/36
J-50	érett	53/57	59/60
Csongor	11	23/23	23/23
Csongor	13	56/56	48/48
Csongor	16	24/24	36/36
Csongor	érett	32/32	53/53
Tarján	11	33/33	20/20
Tarján	15	12/12	12/12
T-5	11	24/24	36/36
T-5	15	12/12	13/13
T-5	érett	58/59	47/47
Tiszatáj	11	28/28	24/24
Minaret-2	érett	28/30	30/33

* = a nevezőben: a táptalajra kitett embriók száma
a számlálóban: a kalluszt képző embriók száma

3.2.5 Organogenezis gyökér kalluszból

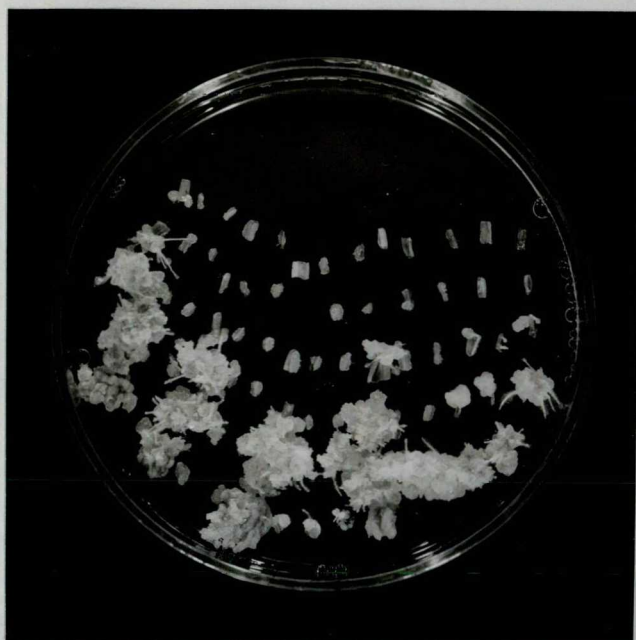
A primer kalluszokat egy hónap elteltével eltávolítottuk a szemekről és tovább oltottuk RMD 1 táptalajra. A T. monococcum eredetű kalluszok barnára színeződtek és elpusztultak az átoltás után. További egy hónap elteltével kétféle módszerrel próbálkoztunk hajtás indukció céljából: A kalluszok felét hormonmentes RM táptalajra helyeztük, a másik felét csökkentett $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ 2,4-D tartalmu táptalajon tenyésztettük tovább. Mindkét esetben erőteljes gyökérképződés indult meg, de hajtás egyik kalluszon sem jelent meg /13. ábra/.



13. ábra Gyökerek regenerálódása gyökérkalluszból
a táptalaj 2,4-D szintjének csökkentése után

3.2.6 Organogenezis levélkalluszból

A primer kalluszokat egy hónap múlva tovább oltottuk oly módon, hogy az egyes kalluszok megtartották az új táptalajon is eredeti pozíciójukat. A kalluszokat RMD 2-ről RMD 1-re, illetve RMD 1-ről olyan RM táptalajra oltottuk, mely $0,05 \text{ mg l}^{-1}$ NES-at és $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ /banziladenin/ BA-t tartalmazott /Ahuja és munkatársai, 1982/. A kalluszokon gyökerek jelentek meg mindkét táptalajon /14. ábra/.



14. ábra RMD 1 táptalajon gyökeresedő levélkalluszok /T. aestivum/

Kizárólag a GK Kincsőből indított kalluszok egy részén jelentek meg hajtáskezdemények a 2,4-D szintjének csökkentése után. A hajtásregenerációs gyakoriság /60 db kalluszt vizsgáltunk/ 8 % volt. A regenerációs képesség és az inokulumok tenyésztő-csucsától való távolsága között nem volt összefüggés.

3.2.7 Organogenezis érett- és éretlen embrió eredetű kalluszból

A megfelelő regenerációs módszer kiválasztása érdekében két kísérletsorozatot végeztünk. Az első kísérletsorozatban csak RMD 2 táptalajon indukált GK Kincső kalluszokkal dolgoztunk. A primer kalluszokat tovább oltottuk RMD 2-re. Egy hónap elteltével a kalluszokat hormonmentes vagy pedig indolecetsav, zeatin, 2-izopentenil-adenin és kinetin különböző kombinációit tartalmazó RM táptalajra oltottuk /lásd Irodalmi áttekintés 1.3.4/. A kísérlet eredményét a 10. táblázatban foglaltuk össze.

10. táblázat

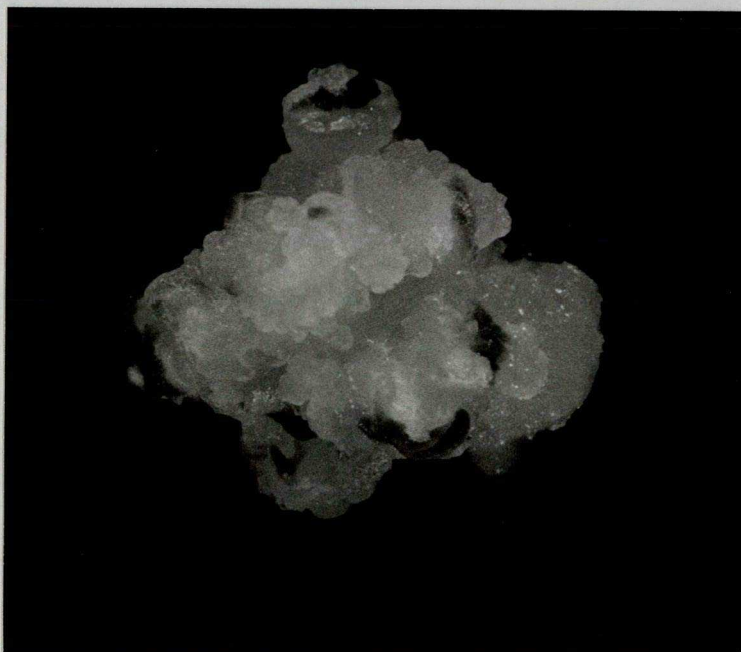
Hajtásképződés indukálása Triticum aestivum /GK Kincső/
kalluszból különböző hormonkombinációk segítségével

Kallusz eredete	Hajtásképződést mutató tenyészetek aránya%/			
	hormonkombinációk [*]			
	IES+ZEA	IES+IPA	IES+KIN	hormonmentes
érett embrió	11	6	0	4
éretlen embrió	40	36	0	6

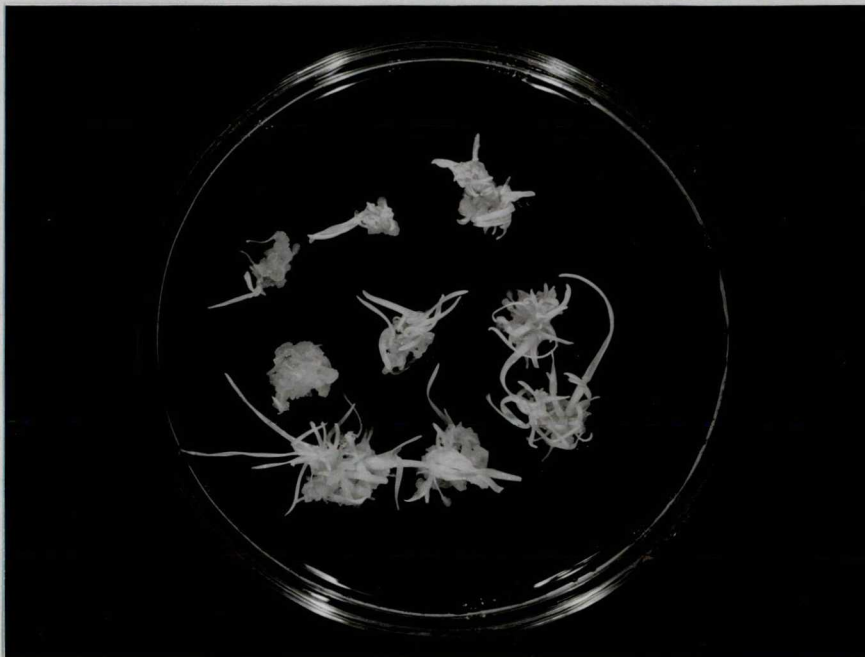
* = IES = indolecetsav, ZEA = zeatin, IPA = 2-izopentenil-adenin, KIN = kinetin. Az összes hormon 1 mg l^{-1} koncentrációban alkalmaztuk.

Ebben a kísérletben táptalajonként 40 db kalluszt vizsgáltunk. Az éretlen embrió eredetű kalluszok hajtásregenerációs képessége /IES+ZEA hormonokkal kiegészített táptalajon 40 %/ jóval nagyobb, mint az érettből származóké /IES+ZEA hormonokkal kiegészített táptalajon 10 %/. Az IES-ZEA, IES-IPA hormonkombinációk többszörösre emelték a regeneráló kalluszok arányát a hormonmentes táptalajhoz képest. A 15. ábra hajtáskezdemények kialakulását szemlélteti egy kalluszon. Körülbelül három hét

alatt a hajtáskezdemények 2-3 cm nagyságúvá fejlődtek, és ekkor, gyökereztetés céljából már eltávolíthattuk azokat a kalluszokról /16, 17 ábra/. A gyökeres növényeket /17 db-ot/ vernalizálás után fitotronban neveltük fel /18. ábra/. ✓



15. ábra Hajtáskezdemények T. aestivum kalluszon



16. ábra Fejlődő hajtások T.aestivum kalluszokon



17. ábra Meggyökeresedett hajtások hormonmentes RM táptalajon



18. ábra Kalluszból regenerált T.aestivum /GK Kincső/
növény

A második kísérletsorozatban az RMD 1 és RMD 2 táptalajon indukált kalluszokat /9. táblázat/ fokozatosan csökkentett 2,4-D koncentrációju táptalajra oltottuk, amely a kalluszok differenciálódását indukálta /a kísérletet részleteiben lásd: Anyag és módszer 2.14/. Hét T.aestivum és egy T. durum fajtából származó primer kalluszokat egy hónap elteltével feleannyi 2,4-D-t tartalmazó táptalajra oltottuk. Az átoltást megelőzően /az eredeti 2 és 1 mg l^{-1} táptalajon/ a primer kalluszok egy részén, az ugynevezett regeneráló kalluszokon /R/ hajtáskezdemények jelentek meg /15. ábra/; a differenciálódó /D/ kalluszok

zöld szektorokat tartalmaztak, végül a homogén /H/ kalluszok morfogénitása nélküliek voltak. A 11. táblázatban foglaltuk össze a különböző fajtákra vonatkozó adatokat. Szembetűnő, hogy az éretlen embriókból származó kalluszok sokkal nagyobb százalékban regenerálnak hajtást, mint az érettből indukáltak. Az egyes fajták között is lényeges különbséget találtunk, például a GK T-5 éretlen embrió eredetű kalluszainak 95-100 %-a R-típusú, míg a GK Csongornak csak 40 %-a. A magasabb hormontartalmu RMD 2-n indított kalluszokon kisebb %-ban jelentek meg hajtáskezdemények, mint az RMD 1-en indítottakon. Például a GK Kincsőnek RMD 1-en 77 %-a, míg RMD 2-n csak 36 %-a volt "R" típusú. Adataink szerint, az éretlen embriók kora, legalábbis az általunk vizsgált időintervallumon belül, nem befolyásolta lényegesen a belőlük indított tenyészetek hajtásregenerálóképességét; például a GK Csongor 11 napos : R = 35 %, 13 napos : R = 49 %, 16 napos : R = 35 %.

11. táblázat

Triticum aestivum és Triticum durum fajtákból származó
kalluszok összehasonlítása organizáltság szempontjából

Fajta	Embriók kora /nap/	A tenyészetek morfológiája /%/ [*]					
		RMD1 táptalajon			RMD 2 táptalajon		
		R	D	H	R	D	H
Kincső	11	77,5	22,5	-	36	33,3	30,5
Kincső	14	63	18,5	18,5	20	36	44
Maraton	11	3	-	97	-	-	100
J-50	11	-	-	100	4,5	9,5	86
J-50	14	40	28	32	22	22	56
J-50	érett	-	20	80	-	25	75
Csongor	11	35	43	22	8	52	40
Csongor	13	49	40	11	37	41	22
Csongor	16	35	65	-	9	50	41
Csongor	érett	-	10	90	2	10	88
Tarján	11	21	36	43	5	40	55
Tarján	15	33	8	59	-	-	100
T-5	11	95	2,5	2,5	91	9	-
T-5	15	100	-	-	91	9	-
T-5	érett	3	15	82	3	10	87
Tiszatáj	11	-	-	100	-	-	100
Minaret-2	érett	-	10	90	-	10	90

* R = regeneráló kallusz /kalluszok hajtáskezdeményekkel/

D = differenciálódó kallusz /a kalluszokon zöld szektorok, illetve differenciálódó strukturák vannak/

H = Homogén kallusz /dedifferenciálódott sejttömeg/



Az alacsonyabb hormontartalmu táptalajon a "D" típusu kalluszok egy részén is hajtások képződtek, más részük csak gyökeret fejlesztett. A gyökeres kalluszokból nem sikerült a későbbiekben hajtást indukálni. Az érett embriókból származó kalluszok tovább passzálva csak gyökeret fejlesztettek, hajtást nem tudtunk regeneráltatni egyik fajtából sem. Az éretlen embrióból származó kalluszok esetében a hajtáskezdemények már 1 mg l^{-1} 2,4-D is megjelentek, de számuk csak $0,6 \text{ mg l}^{-1}$ 2,4-D-t tartalmazó táptalajon sokszorozódott meg. Erőteljesen $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ 2,4-D-n nőttek és e növekedést gyökerek megjelenése kísérte /15. ábra/. A legmagasabb hajtásregenerációs gyakoriságokat a GK Kincső és a GK T-5-ös fajták éretlen embrióiból indukált szövettenyészetekben értük el /90-100 %/. A GK Maraton és a GK Tiszatáj éretlen embrióiból indukált kalluszokat viszont nem sikerült hajtásregenerációra készíteni /12. táblázat/. A gyökérszet növelése céljából a növénykéket hormonmentes RM táptalajba ültettük /16. ábra/, majd a meggyökeresedett kulturákat vernalizálás után fitotronban felneveltük /17. ábra/. Összesen 224 növényt ültettünk ki, és ebből 210-et sikerült felnevelni.

12. táblázat

Buzafajták éretlen embrióiból RMD 1 és RMD 2
táptalajokon indukált hajtásregeneráló kallu-
szainak gyakorisága /%/

Fajta	RMD 1		RMD 2	
	összes kallusz /db/	hajtásre- generáló kallusz /%/	összes kal- lusz /db/	hajtás- regene- ráló kal- lusz /%/
GK Kincső	78	90	72	65
GK Maraton	33	0	48	0
J-50	38	50	60	22
GK Csongor	103	75	107	60
GK T-5	36	100	49	100
GK Tarján	45	45	32	15
GK Tiszatáj	28	0	24	0

Az összes felnevelt növény fertilis volt.

A regeneráltatott növények fenotipusos változásokat
nem mutattak.

3.2.8 Különböző szacharózkoncentrációk hatása a hajtásregenerációra

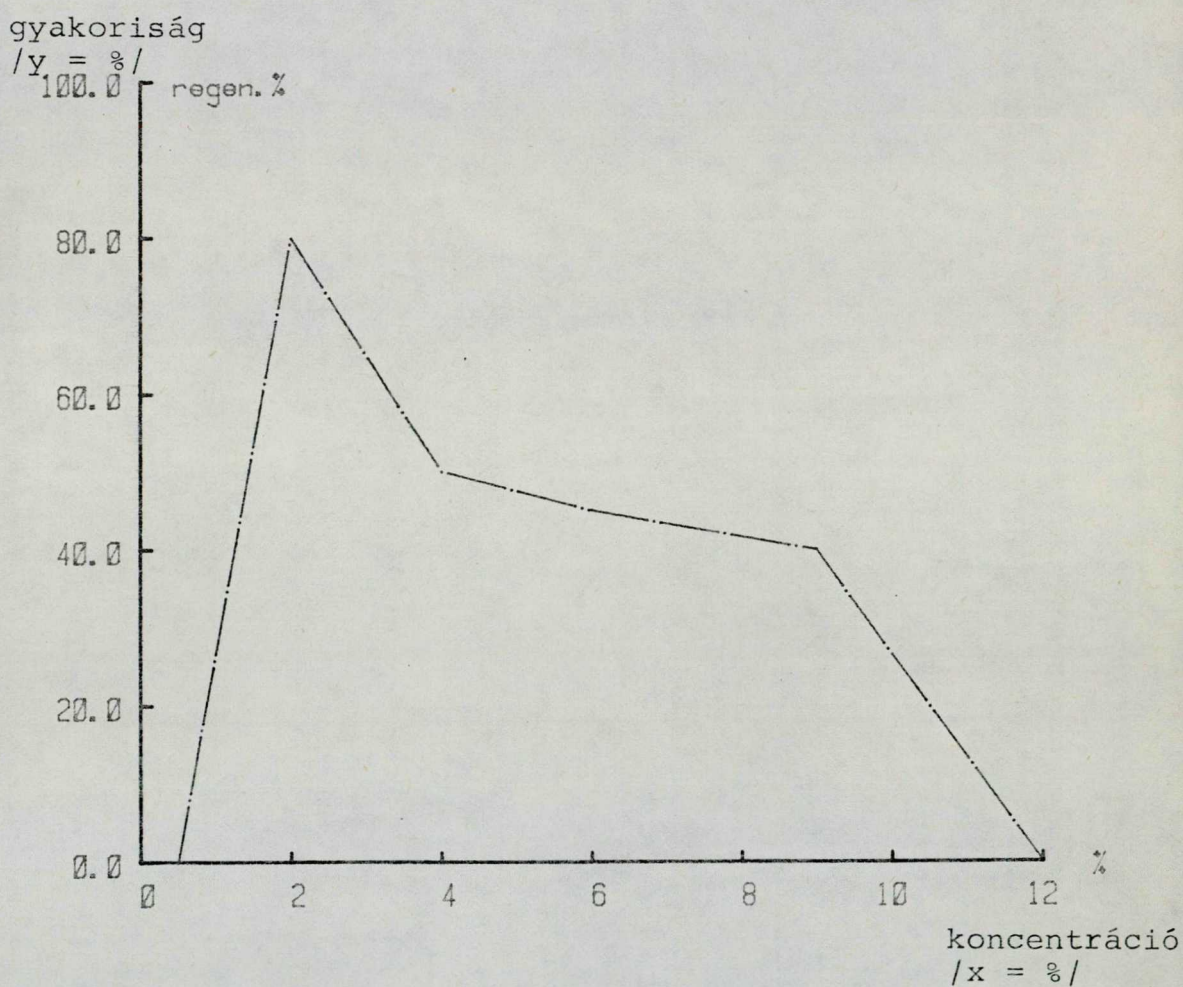
GK Kincső éretlen embriókat kalluszosítottunk el 0,5, 2, 4, 6, 9 és 12 % szacharózt és 1 mgl^{-1} 2,4-D-t tartalmazó RM táptalajokon. A kapott kalluszosokat átoltottuk 0,5, majd $0,1 \text{ mgl}^{-1}$ 2,4-D-t és a megfelelő szacharózkoncentrációkat tartalmazó táptalajokra, hajtásregeneráltatás céljából. A 19. ábra grafikonján foglaltuk össze a különböző szacharózkoncentrációk hatását a hajtásregenerációra.

A kalluszosok legnagyobb arányban a 2 % szacharózt tartalmazó táptalajon fejlesztettek hajtást. Az ettől eltérő cukorkoncentrációkon csökkent a hajtásregeneráló kalluszosok aránya.

Az általunk kipróbált hajtásregeneráltatási eljárások közül tehát Sears és Deckard, 1982-ben publikált módszerét találtuk a legjobbnak.

19. ábra

Különböző szacharózkoncentrációk hatása T. aestivum
éretlen embriókból indukált hajtásregeneráló kalluszos
gyakoriságára*



* y = hajtásregeneráló kalluszos aránya /%/

x = cukorkoncentráció /%/

4. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

4.1 Kloroplastisz átvitel besugárzott protoplastok fúziójával

4.1.1 A besugárzás hatása

Kísérleteink során, a jódecetsavas inaktivációt követően, a fúziós termékből származó növények nagy többsége hibridnek bizonyult, ami azt mutatja, hogy a heterokarionokban a sejtmagok fúziója nagy gyakorisággal bekövetkezett. Ennek következtében a N. plumbaginifolia sejtmagszegregánsok aránya is igen alacsony lett /74 klónból 1 db; 7. táblázat/. Ezzel szemben a besugárzásos inaktiváció tetemesen emelte a N. plumbaginifolia magszegregánsok arányát, és ez az arány a besugárzási dózis nagyságától függött. A legkedvezőbb értéket /84 %-os sejtmagszegregáns gyakoriságot/ 210 Jkg^{-1} dózismagysággal értük el /7. táblázat/. Magas sejtmagszegregáns gyakoriságot ért el Aviv és Galun /1980/ is, 50 Jkg^{-1} /5 krad/ röntgenbesugárzással. Kísérletükben 15 klónból 13 lett sejtmagszegregáns /86 %/. A röntgensugárzás letális dózis értéke kb. 15 Jkg^{-1} /1,5 krad/, míg a gamma sugárzásé az általunk használt dózisteljesítmények mellett kb. 50 Jkg^{-1} . A 80-90 % szegregáns gyakoriság eléréséhez, mindkét rendszerben kb. a

letális dózis háromszorosára volt szükség. A legalacsonyabb dózissal /50 Jkg⁻¹/ elért 44 % gyakoriság jól megfelel Sidorov és munkatársai /1981/ által publikált értéknek /60 Jkg⁻¹ dózissal 38 % szegregáns gyakoriságot értek el/.

A besugárzott protoplasztok citoplazmájának átvitelét végeztük el, ezért érdekes volt például a kloroplasztisz mutációra utaló variegáltság /mozaikos levél, ahol albinó és pigmenttartalmú részek váltakoznak/ vizsgálata. A felnevelt 210 db növény egyike sem volt variegált. Más fenotipusos változást sem találtunk, ami citoplazmában bekövetkező mutációra utalt volna. Ugy látszik, hogy a citoplazmatikus organellel nem túl érzékenyek a gamma-sugárzásra, így a besugárzás citoplazmára gyakorolt mutagén hatása gyakorlatilag nem befolyásolta az átviteli módszer hatékonyságát.

4.1.2 A regenerált növények kromoszómaszáma

A N. plumbaginifolia sejtmagszegregánsok diploidok vagy tetraploidok voltak /8. táblázat/. A tetraploid növények megjelenésének oka lehetett az in vitro tenyészetekben gyakori poliploidizáció /Bayliss, 1980/, vagy pedig származhattak több mint két protoplaszt fúziójából /Melchers és Sacristán, 1977; Medgyesy és munkatársai, 1980/. A citológiai

tanulmányozott 43 klón egyikében sem találtunk aneuploid kromoszóma számot, tehát ezekben az esetekben a besugárzott citoplazma donor sejtmagjának eliminálása teljes volt, ami a magas sugárdózisoknak tulajdonítható. Kromoszóma transzfer besugárzott protoplasztból fuzióval lehetséges /Dudits és munkatársai, 1980/, de adataink szerint ritka esemény lehet, és így nem csökkenti lényegesen az organelum transzfer hatékonyságát.

4.1.3 Kloroplasztisztranszfer

Néhány esetben rezisztens kalluszból szenzitív növényeket regeneráltattunk /7. táblázat/, ami azzal magyarázható, hogy a szenzitív kloroplasztiszok fennmaradtak a fenotípusosan rezisztens kalluszokban. A klónok száma, amelyekből szenzitív növények regeneráltak, csökkent a besugárzási dózisok emelésével, és gyakorlatilag nulla lett a magasabb dózisok esetében.

Más fuziós rendszerhez hasonlóan ahol szintén sztreptomycinrezisztenciára történt szelekció /Medgyesy és munkatársai, 1980/ kevert kloroplasztiszpopulációt nem észleltünk a szexuális keresztezésből származó F_1 nemzedékben. A szelekciós rendszerünk tehát hatékony volt.

4.1.4 A besugárzással inaktiváló rendszer összehason- litása más fúziós rendszerekkel

Medgyesy és munkatársai /1980/ Nicotiana tabacum SR 1 sztreptomycinrezisztens kloroplasztiszait vitték át N. sylvestris-be, protoplasztfúzióval. A N. tabacum SR 1 protoplasztokat jódecetsavval inaktiválták a fúzió előtt. A jódecetsav, lévén metabolikus inaktivátor /lásd: Irodalmi áttekintés 1.3.2/ nincs káros hatással a sejtmagokra, így nem befolyásolja a protoplasztfúziót követő hibrid sejtmag képződést. Ennek eredményeként a 137 heterokarion eredetű sejtkolóniából mindössze 16 darab /11 %/ volt olyan, melyből kizárólag az SR 1 kloroplasztiszokat hordozó N. sylvestris sejtmagszegregánsok regenerálódtak. Ezzel szemben a besugárzásos inaktiválással 84 % kloroplasztisz transzfer gyakoriság is elérhető.

Egy olyan rendszer, ahol sejtmag nélküli protoplasztokat /citoplaszt/ fuzionáltatnak protoplasztokkal, szintén hatásos lehet organellum transzfer létrehozására /Lörz és Potrykus, 1980/. Maliga és munkatársai /1983/ N. tabacum SR 1 citoplasztokat fuzionáltak N. plumbaginifolia protoplasztokkal és sztreptomycin rezisztens kolóniákat szelektáltak a fúzió után.

A klónok mintegy 10 %-a volt N. plumbaginifolia sejtmagszegregáns, a többi hibrid volt, és egy N. tabacumot is találtak. Ez az érték jelentősen elmarad a besugárzásos inaktiváció során elérhető átviteli gyakoriságtól, aminek technikai okai vannak. A citoplaszt készítmény ugyanis minden esetben tartalmaz protoplasztokat is, amelyekből nehéz megszabadulni, másrészt a citoplasztok rendkívül érzékenyek a PEG kezelésre. Így a protoplaszt + protoplaszt fuzióból származó klónok felusulnak a populációban.

Sidorov és munkatársai /1981/ a besugárzást kombinálva jódecetsavas inaktivációval /lásd: Irodalmi áttekintés 1.3.2/, alkalmas rendszert hoztak létre a kloroplasztisz transzfer megvalósítására. Rendszerükkel lehetséges, bár kevésbé hatékonyan olyan citoplazmatikus organelumok átvitele is, melyeknek nincs szelektálható genetikai markerük, emiatt széleskörűen fel lehet használni ezt a módszert a legkülönbözőbb citoplazma transzfer kísérletekben. Értekezésemben leírt tökéletesített besugárzásos módszer segíthet ilyen típusú kísérletek hatékonyságának növelésében is.

4.2 Jól regeneráló szövettenyészetek létrehozása buzából

4.2.1 Buza kallusztényészetek és táptalajaik

Az egy- és kétszikű szövettenyészetekhez általánosan használják a Murashige és Skoog /1962/ által kifejlesztett MS-táptalaj változatait. A kísérleteinkben alkalmazott RM táptalaj szintén az MS egyik változata, melynek szervesetlen só összetétele azonos az MS szervesetlen komponenseivel. Az MS-táptalajt, hormon és cukor komponensein változtatva alkalmaztuk dohány, illetve buza szövettenyészetekhez egyaránt /3. táblázat/. A különböző cukorkoncentrációkkal végzett kísérleteink alátámasztják, hogy az egyszikű szomatikus szövettenyészetekhez általánosan használt 2 %-os szacharózkoncentráció optimális a buzakalluszok növekedéséhez és a hajtásregeneráció indukálásához egyaránt /Ozias-Akins és Vasil, 1982/.

Kísérleteink szerint kallusz indukálása a legkülönbözőbb szervekből buza esetében sem jelent különösebb nehézséget, ha megfelelő koru /élettani stádiumu/ szerveket használunk. A tapasztalatok szerint az érett és éretlen embriókból indukált kalluszok regenerációs képessége között nagy különbség oka az, hogy

az érett embrió szkutelluma csak megduzzad, de valójában csak kis mértékben kalluszosodik el, így a kallusz többnyire a csirázásnak induló rügyecskéből /és a koleoptilból/ és a gyököcskéből származik. Az éretlen embrió szkutelluma ténylegesen elkalluszosodik /Ozias és Vasil, 1982/ és ebből a kalluszból már nagy gyakorisággal lehet hajtást regeneráltatni.

4.2.2. Növényregeneráció

A gyökér eredetű kalluszokon a 2,4-D szint csökkentése erőteljes gyökérképződést váltott ki. Hajtást regeneráltatni azonban nem sikerült. Az irodalom szerint is gyökér eredetű kalluszból nagyon alacsony hatásfokkal sikerült csak a hajtás regeneráltatás /Shimada és munkatársai, 1969/, és napjainkig sincsen buza gyökérkalluszra jó regeneráltatási módszer kidolgozva /Tissue Culture for Crops, 1982/, és ezért felhagytunk az ilyen típusú próbálkozásokkal. ✓

A levélből indított kallusz jobb eredménnyel kecsegtetett, hiszen cirokkal /Wernicke és Brettell, 1980/ és különböző kölesfajokkal /Haydu és Vasil, 1981/ végzett sikeres regenerálási kísérletek után buza levélkalluszból indított szuszpenziós tenyészetekből is sikerült növényt regeneráltatni /Ahuja és munkatársai, 1982/. Kincső levél-

eredetű kalluszból sikerült nekünk is növényt regeneráltatnunk, bár kis gyakorisággal /8 %/. Mivel az bebizonyosodott kísérletünk során is, hogy a levél eredetű kalluszból képesek az organogenezisre, érdemes lesz szélesebb fajtakörrel megismételni a kísérletet.

Schaeffer és munkatársainak /1979/ sikerült érett embrióból származó kalluszból hajtást regeneráltatni a 2,4-D szintjének csökkentésével és IES + kinetin hormonkombinációk alkalmazásával. Kísérleteink során szintén sikerült elérni növények regenerációját kis gyakorisággal érett embrióból származó tenyészetekből is, de a regenerációs gyakoriság növelésére nem volt hatásos sem a 2,4-D szintjének csökkentése, sem pedig Schaeffer és munkatársai által használt hormonkombináció. Indolecetsav + zeatin kombinációval 11 %-os regenerációs gyakoriságot értünk el. Előnyös lenne, ha sikerülne az érett embrióból nyert kallusz tenyészetek hajtásregenerációs képességét megnövelni, mert a buzaszemek az év minden időszakában rendelkezésre állnak és könnyen kezelhető alapanyagként szolgálnak a kísérletek számára.

A legjobb eredményt éretlen embrióból indított kallusszal érték el az egyszikűek esetében /lásd Irodalmi áttekintés 1.3.5/ és ez igaz a buza szövettényészetekre is /Sears és Deckard, 1982/. Nekünk is éretlen embrióból származó kallusszal sikerült elérni a legmagasabb hajtásregenerációs gyakoriságot /GK T-5 vonal esetében 100 %, GK Kincső fajta esetében 90 %/. Ha összehasonlítjuk ezeket az irodalomban leirt eredményekkel; Wacherle és munkatársai /1979/ 68 %, Sears és Deckard /1982/ 100 %, Ozias-Akins és Vasil, 1982/ 60 % látható, hogy az általunk elért gyakoriság eléri a publikációkban szereplő értékeket. Sears és Deckard /1982/ által leirt módon beállított kísérlet volt a leghatékonyabb a hajtásregeneráció szempontjából. Módszerüket átvéve sikerült az általuk leirt magas hajtásregenerációs gyakoriságot elérni.

ÖSSZEFOGLALÁS

Disszertációm két kísérletsorozatot tárgyal. Az egyik kísérletsorozat elvégzésével az volt a célunk, hogy meghatározzuk azt a ^{60}Co gamma sugár dózist, mely segítségével optimális hatásfoku organelum átvitel lehet létrehozni dohányfajok között protoplaszt fúziós rendszerben.

E kísérletsorozat keretében Nicotiana tabacum SR 1 sztreptomycin rezisztens kloroplasztiszait vittük át Nicotiana plumbaginifoliába protoplaszt fúzióval. A fúzió előtt a N. tabacum SR 1 protoplasztokat különböző a letálisnál nagyobb dózisu ^{60}Co besugárzással kezeltük. A fúzió után a inaktivált N. tabacum SR 1 szülő sztreptomycin rezisztenciájára szelektáltunk. A rezisztens sejtkolóniákból regenerált növények azonosítása morfológia, kromoszómaszám és izoenzim vizsgálat alapján történt. A regenerált növények jelentős része diploid N. plumbaginifoliának bizonyult, melyek azonban mind rezisztensek voltak. A N. tabacum plasztiszok átvitelét a sztreptomycin rezisztencia mellett a kloroplasztisz DNS restrikciós mintázata is alátámasztotta. Az 50, 120, 210 és 300 Jkg^{-1} dózisu besugárzás után a klónok 40, 57, 84 és 70 %-a volt

N. plumbaginifolia típusu sztreptomycin rezisztens sejtmagszegregáns. A N. tabacum SR 1 protoplasztok sugárkezelése tehát megakadályozta a nem fuzionált protoplasztok osztódását, és nagymértékben csökkentette a maghibridek részarányát a heterokarion eredetű klónok között, az optimálisnak talált 210 Jkg^{-1} dózis esetén egyhatodára.

A másik kísérletsorozat célja az volt, hogy buza fajtákból jól regenerálódó szövettenyészeteket állítsunk elő, amelyek így alkalmasak a sejtgenetikai módszerek bevezetésére.

Különböző koru levélből, gyökérből, érett és éretlen embrióból szövettenyészeteket indítottunk 2,4-D-t tartalmazó módosított MS alaptáptalajon. Kallusz tenyészetet minden anyagból sikerült előállítani és az indukciós táptalajon fenntartani. Hajtásregeneráció céljából /az irodalom alapján/ a tenyészeteket hormonmentes, az indukciós táptalajtól eltérő hormonkombinációju vagy fokozatosan csökkentett 2,4-D koncentrációkat tartalmazó táptalajon növesztettük. Regeneráló tenyészeteket nagy gyakorisággal csak éretlen embriókból kaptunk. A hormonmentes és a különböző hormonkombinációkat tartalmazó táptalajokon a regenerálódási gyakoriság alacsony volt /5-30 %/. A 2,4-D koncentrációjának fo-

kozatos csökkentésével hormonmentességig azonban az éretlen embirő eredetű kalluszok 80-90 %-ában sikerült hajtás regenerációt indukálni. Ezt az értéket két fajtával /GK Kincső és GK T-5/ értük el. Bizonyos fajták kalluszi hajtást egyáltalán nem regeneráltak /GK Tiszatáj, GK Maraton/. A regenerált hajtásokat hormonmentes táptalajon meggyökeresítettük és klimakamrában felneveltük. A felnevelt 210 növény között szomaklonális variabilitást nem tapasztaltunk.

Irodalomjegyzék

- Atchison, B.A., Whitfeld, P.R., Bottomley, W.
/1976/: Comparison of chloroplast DNA by specific
fragmentation with Eco RJ endonuclease. Molec.
Gen.Fenet. 148, 263-269.
- Ahuja, P.S., Pental, D., Cocking, C.E. /1982/:
Plant Regeneration from Leaf Base Callus and
Cell Suspensions of Triticum aestivum.
Z. Pflanzenzüchtg. 89, 139-144.
- Aviv, D., Galun, E. /1980/: Restoration of Fertili-
ty in Cytoplasmic Male Sterile /CMS/ Nicotiana
glauca by Fusion with X-irradiated N. tabacum
protoplasts. Theor. Appl. Genet. 58, 121-127.
- Bayliss, M.V. /1980/: Chromosomal variation in
plant tissues in culture.
Int. Rev. Cytol. Suppl. 11A, 113-144.
- Belliard, G., Pelletier, G., Vedel, F., Quetier, F.
/1978/: Morphological characteristics and chloroplast
DNA distribution in different cytoplasmic parasexu-
al hybrids of Nicotiana tabacum. Molec. Gen. Genet.
165, 231-238.
- Belliard, G., Vedel, F., Pelletier, G. /1979/:
Mitochondrial Recombination in Cytoplasmic Hybrids
of Nicotiana tabacum by Protoplast Fusion. Nature 281,
401-403.
- Bottomley, W., Spencer, D., Whitfeld, P.R. /1974/:
Protein synthesis in isolated spinach chloroplasts:
Comparison of lightdriven and ATP-driven synthesis.
Arch. Biochem. Biophys. 164, 106-117.

- Brewbaker, J.L., Upadhyaya, M.D., Mäkinen, Y., MacDonald, T. /1968/: Isoenzyme polymorphism in flowering plants. III. Gel electrophoretic methods and applications, *Physiol.Plant.* 21, 930-940.
- Capel, M., Redman, B., Bourque, D.P./1979/: Quantitative Comparative Analysis of Complex Two-dimensional Electropherograms, *Anal.Biochem.* 97, 210-228.
- Carew, D.P., Schuartiny, A.E. /1958/: Production of Rye Embryo Callus. *Botan.Gaz.* 119, 237-239.
- Carter, O., Yamada, Y., Takahashi, E. /1967/: Tissue Culture of Oats. *Nature* 214, 1029-1030.
- Chen, K., Wildman, S.G., Smith, H.H. /1978/: Chloroplast DNA Distribution in Parasexual Hybrids as Shown by Polypeptide Composition of Fraction 1 Protein. *Proc.Nat.Acad.Sci.* 74, 5109-5112.
- Cocking, E.C. /1960/: A Method for the Isolation of Plant Protoplasts and Vacuoles. *Nature* 187, 962-963.
- Darr, S., Machado, V.S., Arntzen, C.I. /1981/: Uniparental Inheritance of a Chloroplast Photosystem II polypeptide Controlling herbicide Binding. *Biochem. Biophys. Acta* 637, 219-228.
- Dudits, D., Nemet, G., Haydu, Z. /1975/: Study of Callus Growth and Organ Formation in Wheat *Triticum aestivum* Tissue Cultures. *Can. J. Botany* 53, 957-963.

Dudits, D.O., Fejér, G., Hadlaczky, Gy., Koncz, C., Lázár, G. and Horváth G. /1980/: Intergenetic genetransfer mediated by plant protoplast fusion. *Molec. Gen. Genet.* 179, 283-288.

Frankel, R., Galun, E. /1977/: Pollination mechanism, reproduction and plant breeding. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York

Frankel, R., Scowcroft, W.R. and Whitfeld, P.R. /1979/: Chloroplast DNA variation in isonuclear male-sterile lines of Nicotiana. *Molec. Gen. Genet.* 169, 129-135.

Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. /1968/: Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. *Exp. Cell. Res.* 50, 151-158.

Gengenbach, B.G., Green, C.E., Donovan, C.M. /1977/: Inheritance of selected pathotoxin resistance in maize plants regenerated from cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5113-5117.

Gleba, Y.Y., Hoffman, F. /1978/: Hybrid Cell Liens Arabis thaliana + Brassica campestris No Evidence for Specific Chromosome Elimination. *Molec. Gen. Genet.* 165, 257-264.

Gosch-Wackerle, G., Avivi, L., Galun, E. /1979/: Induction, Culture and Differentiation of Callus from Immature Rachises, Seeds and Embryos of Triticum. *Z. Pflanzenphysiol.* 91, 267-278.

Green, C.E. and Phillips, R.L. /1975/: Plant Regeneration from Tissue Cultures of Maize. *Crop. Science.* 15, 417-421.

Green, C.E. /1978/: In Vitro Plant Regeneration in Cereals and Grasses. 411-418.
In: *Frontiers of Plant Tissue Culture, 1978* Edited by Trevar A. Thorpe

Haydu, Z., Vasil, I. K. /1981/: Somatic Embryo-
genesis and Plant Regeneration from Leaf Tissues
and Anthers of Pennisetum purpureum Schum.
Theor, Appl. Genet. 59, 269-273.

Kao, K.N., Michayluk, M.R. /1974/: A Method for
High-frequency Intergeneric Fusion of Plant
Protoplast, Planta 115, 355-367.

Kao, K.N., Constabel, F., Michayluk, M.R.,
Gamborg, O.L. /1974/: Plant protoplast fusion
and growth of intergeneric hybrid cells. Planta
120, 215-227.

Kao, K.N. /1977/: Chromosomal Behaviour in Somatic
Hybrids of Soybean + Nicotiana Glauca .
Molec. Gen. Genet. 150, 225 - 230.

Keller, W.A., Melchers, G. /1973/: The Effect of High pH
and Calcium on Tabacco Leaf Protoplast Fusion .
Z. Naturforsch. 28c, 737-747.

LaRue, C.D., /1949/: Cultures on the Endosperm of
Maize, Am. J. Botany 34, 585-586.

Lazar, M.D., Collins, G.B., Vian, W.E. /1983/:
Genetic and Environmental Effects on the Growth
and Differentiation of Wheat Somatic Cell Cultures.
The Journal of Heredity 74, 353-357.

Leaver, C.I. /1980/: Mitochondrial genes and
male sterility in plants. Trends Biochem. Sci. 5,
248-252.

Lörz, H., Potrykus, I. /1980/: Isolation of subpro-
toplasts for genetic manipulation studies pp. 377-382.
In: Advances in Protoplast Research. Edited by
L. Ferenczy and G. L. Farkas. Publishing House of
the Hungarian Academy of Sciences, Budapest

Lu, C., Vasil, I. K. /1981/: Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Leaf Tissues of Panicum maximum Jacq. Theor. Appl. Genet, 59, 275-280.

Lu, C., Vasil, I.K. and Ozias-Akins, P. /1982/: Somatic Embryogenesis in Zea mays L. Theor. App. Genet. 62, 109-112.

Maliga, P., Sz.-Breznovits, A., Márton, L. /1973/: Streptomycin-resistant Plants from Callus Culture of Haploid Tabacco. Nature New Biol. 244, 28-30.

Maliga, P., Sz.Breznovits, A., Márton, L., Joó, F. /1975/: Non-Mendelian Streptomycin-resistant Tabacco Mutant With Altered Chloroplasts on Mitochondria. Nature 255, 401-402.

Maliga, P., Lázár, G., Joó, F., H-Nagy, A., Menczel, L. /1977/: Restoration of Morphogenic Potential in Nicotiana by Somatic Hybridization. Molec. Gen. Genet. 157, 291-296.

Maliga, P., Menczel, L., Sidorov, V., Márton, L., Cséplő, A., Medgyesy, P., Trinh Mauh Dung, Lázár, G., Nagy, F. /1983/: Cell culture mutants and their uses. In: Plant Improvement and Somatic Cell Genetics. Edited by J. K. Vasil, K. I. Frey and W.R. Scoucroft. Academic Press, New York

Maurer, H., R: Disc. electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis. In: Walter de Gruyter, Berlin-New York, 1971.

Medgyesy, P., Menczel, L., Maliga, P. /1980/: The Use of Cytoplasmic Streptomycin Resistance: Chloroplast Transfer from Nicotiana tabacum Into Nicotiana glauca, and Isolation of Their Somatic Hybrids. Mol. Gen. Genet. 179, 693-698.

Melchers, G. and M.D., Sacristán, /1977/: Somatic hybridization of plants by protoplast fusion. II. The chromosome numbers of somatic hybrid plants of four different fusion experiments. pp. 169-177. In: La culture des tissus et des cellules des végétaux. Messon, Paris.

Menczel, L., Nagy, F., R.-Kiss, Zs., Maliga, P. /1981/: Streptomycin Resistant and Sensitive Somatic Hybrids of Nicotiana tabacum + Nicotiana knightiana: Correlation of Resistance to N. tabacum Plastids. Theor. App. Genet. 59, 191-195.

Methodology and Discussion of Project Accomplishments /1982/: 9-20. In: Tissue Culture for Crops, Progress Report Tissue Culture for Crops Project, Department of Botany and Plant Pathology Colorado State University Fort Collins, Colorado.

Murashige, T., Skoog, F. /1962/: A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tabacco Tissue Cultures. Physiol. Plantarum 15, 473-497.

Nahors, W. M., Heyser, W.J., Dykes, A. T., DeMott, J.K. /1983/: Long-duration, High-frequency Plant Regeneration from Cereal Tissue Culture, Planta 157, 385-391.

Nagy, J. I., Maliga, P. /1976/: Callus Induction and Plant Regeneration from mesophyll protoplasts of Nicotiana sylvestris. Z. Pflanzenphysiol 78, 453-455.

Ozias-Akins, P., Vasil, I. K. /1982/: Plant Regeneration from Cultured Immature Embryos and Inflorescences of Triticum aestivum L. /Wheat/: Evidence for Somatic Embryogenesis, Protoplasma 110, 95-105.

Potrykus, I., Harms, C.T., and Lörz, H. /1976/:
Problems in Culturing Cereal Protoplast
In: Cell Genetics in Higher Plants, 1976.
Eds: D. Dudits, G.L., Farkas and P. Maliga

Poulsen, C., Porath, D., Sacristán, M.D., Melchers, G.
/1980/: Peptide Mapping of The Ribulose Bisphosphate
Carboxylase Small Subunit from the Somatic Hybrid
of Tomato and Potato. Carlsberg Res. Commun. 45,
249-267.

Power, I.B. and Cocking, E.C. /1970/: Fusion of
Isolated Plant Protoplast. Nature 225, 1016-1018.

Reinert, I. /1959/: Über die Kontrolle der
Morphogenese und die Induktion von Adventiv-
-embryonen an Gewebekulturen aus Karotten.
Planta, /Berlin/ 53, 318-333.

Schaeffer, G.W., Baenziger, S.P. and Warley, J.
/1979/: Haploid Plant Development from Anthers
and In Vitro Embryo Culture of Wheat, Crop Science 19,
697-702.

Schenk, R.U., Hildebrandt, A.C. /1972/: Medium and
Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous
and Dicotyledonous Plant Cell Cultures, Can. J.
Botany 50, 191-204.

Sears, B.B. /1980/: Elimination of plastids during
spermatogenesis and fertilization in the plant
kingdom. Plasmid 4, 233-255.

Sears, R. G. and Deckard, L.E. /1982/: Tissue
Culture Variability in Wheat: Callus induction
and Plant Regeneration, Crop. Science 22, 546-550.

Shimada, T., Sasakuma, T. and Tsunewaki, K.
/1969/: In Vitro Culture of Wheat Tissues. I.
Callus Formation, Organ Redifferentiation and
Single Cell Culture, Can. J. Genet. Cytol. 11,
294-304.

Sidorov, V.A., Menczel, L., Nagy, F., Maliga, P.
/1981/: Chloroplast Transfer in Nicotiana Based
on Metabolic Complementation Between Irradiated
and Iodoacetate Treated Protoplasts,
Planta 152, 341-345.

Steward, F.C. - Mapes, M.O., Smith, I. /1958/:
Growth and organized development of cultured cells.
I. Growth and division of freely suspended cells.
Am. J. Bot. 45, 693-703.

Straus, J. /1960/: Maize Endosperm Tissue Grown
in Vitro. III. Development of a Synthetic Medium.
Am. J. Botany 47, 641-647.

Takebe, I., Otsuki, Y., Aoki, S. /1968/: Isolation
of tobacco mesophyll cells in intact and active
state. Cell Physiol. 9, 115-124.

Takebe, I. Labib, G., Melchers, G. /1971/: Regene-
ration of Whole Plants from Isolated Mesophyll
Protoplasts of Tobacco. Naturwissensch. 58, 318-320.

Thomas, E., King, J.P., Potrykus, I. /1979/:
Improvement of Crop Plants via Single Cells in vitro
- an Assessment Z. Pflanzenzüchtg. 82, 1-30.

Vasil, V., Hildebrandt, A.C. /1965/: Differentiation of
Tobacco Plants from Single, Isolated Cells in Micro-
cultures. Science 150, 889-892.

Vasil, V. and Vasil, I. K. /1980/: Isolation and Culture of Cereal Protoplasts. Theor. App. Genet. 56, 97-99.

Vasil, V., Da-Yuan Wang, Vasil, I.K. /1983/: Plant Regeneration from Protoplasts of Napier Grass /Pennisetum purpureum Schum/. Z. Pflanzenphysiol. 111, 233-239.

Wackerle, G., Avivi, L., Galun, E. /1979/: Induction, Culture and Differentiation of Callus from Immature Rachises, Seeds and Embryos of Triticum. Z. Pflanzenphysiol. 91, 267-278.

Wallin, A., Glimelius, K., Eriksson, T. /1974/: The Induktion of Aggregation and Fusion of Daucus carota Protoplast by Polyethylene glycol. Z. Pflanzenphysiol. 74, 64-80.

Wernicke, W., Brettell, R. /1980/: Somatic Embryogenesis from Sorghum bicolor Leaves, Nature, 287, 138-139.

Wernicke, W., Brettell, S.I.R. /1982/: Morphogenesis from Cultured Leaf Tissue of Sorghum bicolor - Culture Initiation, Protoplasma 111, 19-27.

Wernicke, W., Potrykus, I., Thomas, E. /1982/: Morphogenesis from Cultured Leaf Tissue of Sorghum bicolor - The morphogenetic Pathways, Protoplasma 111, 53-62.

Wright, W.E. /1978/: The Isolation of Heterokaryons and Hybrids by a Selective System Using Irreversible biochemical Inhibitors. Exp. Cell Res. 112, 395-407.

Yurina, N.P., Odintsova, M.S., Maliga, P. /1978/: An Altered Chloroplast Ribosomal protein in a Streptomycin Resistant Tabacco Mutant. Theor. Appl. Genet. 52, 125-128.

Zamora, B.A., Scott, J. K. /1983/: Callus Formation and Plant Regeneration from Wheat Leaves, *Plant Science Letters*, 29, 183-189.

Zelcer, A., Avivi, D., Galun, E. /1978/: Interspecific Transfer of Cytoplasmic Male Sterility by Fusion Between Protoplasts of Normal Nicotiana sylvestris and X-ray Irradiated Protoplasts of Male-sterile N. tabacum.

Z. Pflanzenphysiol. 90, 397-407.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok Dr. Maliga Pálnak, hogy lehetővé tette számomra a disszertáció elkészítését.

Köszönetet mondok Dr. Menczel Lászlónak szakmai irányításáért és a munkám során felmerült problémák megoldásához nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom Dr. Nagy Ferencnek a kloroplasztisz DNS analízis elvégzéséért és Kiss Zsuzsának a kromoszómaszámolásban nyújtott segítségért.

Megköszönöm Dr. Márton Lászlónak és Dr. Medgyesy Péternek korrekt bírálatát, mely segítette a disszertáció megírását.

Ezúton mondok köszönetet az MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete Vezetőségének, hogy engedélyezte a dolgozat elkészítését, amelyet az MTA Szegedi Biológiai Központjában végzett kísérleteim alapján irtam.