

A CELLULÁRIS INKOMPATIBILITÁS VIZSGÁLATA  
SZÓJA-BORSÓ HETEROKARIONOKBAN

Írta:

Praznovszky Tünde

Takarmánytermesztési Kutató Intézet,

Iregszemcse

Szeged, 1983.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3.
2. Irodalmi áttekintés	
2.1. Szomatikus hibrid szelekció növényi protoplasztok fúziója után	6.
2.2. Inkompatibilitás a növényi szomatikus hibridekben	13.
3. Anyagok és módszerek	22.
4. Eredmények	
4.1. A fúziós partnerek citológiai vizsgálata	29.
4.2. Borsó és szója protoplasztok fúziója	31.
4.3. Fúziós kísérletek inaktivált fúziós partnerekkel	43.
4.4. A fúziós gyakoriság növelése hidegkezeléssel, és a fúziós termékek szelektálása mikromanipulációval	50.
4.5. Az inkompatibilitás citológiai vizsgálata a fúziós tenyészetekben	54.
5. Eredmények megvitatása	68.
6. Összefoglalás	77.
7. Irodalomjegyzék	78.



## 1. Bevezetés

A Föld élelmezési problémáinak megoldására legkézenfekvőbb lehetőség a mezőgazdaság intenzív fejlesztése. Tekintettel a korlátozott területfelhasználási lehetőségekre a cél a lehető legkisebb területen a lehető legnagyobb élelmiszertermelés. A mezőgazdasági termőterületek állandó csökkenése miatt olyan hibridnövényeket kell előállítani, melyeknek termőképessége és alkalmazkodóképessége maximális.

A növénynemesítők munkáját évszázadok óta meghatározta az a tény, hogy ivaros úton csak bizonyos fajokat lehet keresztezni, ami a genetikai variabilitás keresztezéses módszerrel történő növelésének lehetőségét fajon belüli illetve rokon fajok közötti kombinációkra korlátozta. A keresztezési problémák megkerülésére már az 1900-as évek elejétől folytak próbálkozások, amelyek az inkompatibilitási okok miatt egyébként sikertelen genetikai kombinációkban néhány esetben lehetővé tették életképes növények felnevelését.

A magasabbrendű növényekre a 70-es évek elején kidolgozott protoplaszt fúziós technika nemcsak a növényi szomatikus sejtgenetikai kutatások számára nyújtott új perspektívát, de egyben ígéretes módszernek bizonyult nemrokon fajok szomatikus hibridjeinek előállítására is. A sejtfal enzimatis emésztésével bár-

mely növényi sejtből izolálhatók protoplasztok, amelyek kontrollált körülmények között egymással bármilyen kombinációban fúzionáltathatók. A fuzionált sejtekből növények regenerálhatók, s így faj- és nemzetséghibridek egyaránt előállíthatók. A szomatikus hibridizáció segítségével létrehozható bármely fúziós termék életképességét ma még nem, vagy csak részben ismert fiziológiai, biokémiai, genetikai folyamatok korlátozzák. Ilyen jelenség a szomatikus sejthibridizáció során megfigyelhető celluláris inkompatibilitás.

Dolgozatom a celluláris inkompatibilitás citológiai vizsgálatával foglalkozik.

Munkám célja kettős volt:

1. A sejthibridizáció során megfigyelhető citológiai jelenségek vizsgálatával közelebb kívántunk jutni az inkompatibilitás mechanizmusának megértéséhez illetve annak leküzdéséhez.
2. Munkám során egy olyan sejthibridkombinációt állítottam elő, amelynek mindkét "szülői" partnere a gyakorlati fehérjenövény nemesítési kutatások számára alapvető fontosságú. Így munkám egyben egy olyan hibridizációs munka kezdeti lépéseit is magában foglalja, melynek végső célja o-

lyan, esetleg gyakorlati haszonnal is biró hibridnövény előállítására, mely a természetben nem fordul elő, és hagyományos hibridizációs módszerekkel nem is állítható elő.

Munkámat az iregszemcsei Takarmánytermesztési Kutató Intézetben Dr Kurnik Ernő akadémikus, az intézet igazgatójának vezetésével, illetve az MTA SZBK Genetikai Intézetében Dr Dudits Dénes kandidátus, tud. főmunkatárs irányításával végeztem.

Köszönöm Dr Alföldi Lajos akadémikusnak, az SZBK főigazgatójának, hogy lehetővé tette munkám elvégzését.

Köszönöm munkatársaimnak, elsősorban Dr Hadlaczký Gyula kandidátus, tud. főmunkatársnak és Dr Lázár Gábor tud. munkatársnak aktív segítségét és tanácsait, mellyel munkámat segítették.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. Szomatikus hibrid szelekció növényi protoplasztok fúziója után

A növényi protoplasztok fúzióját követően különböző gyakorisággal jönnek létre heterokarionok a kevert populáción belül. A heterofúziós gyakoriság általában 10% vagy kevesebb, bár közöltek már magasabb 20-30%-os gyakoriságot is / Kao és mtsai, 1974/. A heterokarionok egy része a tenyésztés során hibridsejtek hozhat létre. A sikeres szomatikus sejthibridizáció egyik lényeges lépése ezeknek a hibridsejteknek a kisselektálása a nagyszámú nem fuzionált protoplaszt populációból.

A növényi szomatikus sejthibridizációs kísérletek során a különböző szelekciós módszerek széles skáláját alkalmazták.

#### a. Természetes különbségeken alapuló szelekciós rendszerek

Az első sikeres hibridszelekciót Carlson és mtsai / 1972/ végezték *Nicotiana glauca* és *Nicotiana langsdorfii* levél mezofill protoplasztok fúzióját követően. A szexuális hibridnövény tumoros jellegének ismeretében hormonmentes médiumon szelektáltak a paraszexuális sejthibridekre. A szomatikus hibridek a szexuálishoz hasonlóan képesek voltak exogén auxin és citokinin hiányában is nőni, ellentétben a szülői sejtekkel. A kinőtt kaluszok mind hibridnek bizonyultak, és belőlük az összes vizs-

gált karakterre nézve a szexuális hibriddel teljesen megegyező fertilis hibridnövények voltak felnevelhetők. A sok vitát kiváltott kísérletet csak 4 évvel később sikerült megismételni / Smith és mtsai, 1976/, de a szelektált paraszexuális hibridek kromoszóma száma a szexuális hibridénél magasabb volt, 56-64 közt variált. A módszer hátránya, hogy a szelekcióhoz szükséges a szexuális hibrid ismerete, így olyan szomatikus sejthibridek szelektálására, amelyek ivaros úton nem hozhatók létre, nem alkalmas. A szomatikus sejthibridizálás elsődleges célja pedig, ilyen hibridek előállítása.

A szülői partnerek actinomycin D-vel szemben mutatott eltérő érzékenysége, és a tenyésztésre használt médiumon a növekedési képességeiben megnyilvánuló különbségek szolgáltak alapul a *Petunia hybrida* x *Petunia parodii* paraszexuális hibridjeinek szelekciójában / Power és mtsai, 1976/. A szelekciós rendszert a később előállított szexuális hibrid in vitro körülmények közt mutatott növekedési igényeinek ismeretében, a médium hormonösszetételének megváltoztatásával sikerült tökéletesíteni / Power és mtsai, 1977/.

#### b. Vizuális markerek alapján történő hibridszelekció

Sokkal gyakoribb a recesszív albino mutációk komplementá-



cióján alapuló szelekció. Ez a módszer azonban sejtszinten nem alkalmazható, a zöldsülésre csak kallusz vagy növény szinten lehet szelektálni. Másik hátránya, hogy szelekciós nyomás nem mindig alkalmazható, ennek ellenére sok esetben alkalmazták eredményesen.

A klorofill deficiens mutációk komplementációján alapuló hibridszelekció első sikeres megvalósítása Melchers és Labib /1974/ nevéhez fűződik. A klorofill deficiens szülők fényérzékenysége alapján 4-5 hetes kalluszok 3-6000 luxon való tenyésztésével szelektáltak a szomatikus hibridekre. A módszer nemcsak *Nicotiana tabacum* intraspecifikus kombinációban, de *Nicotiana tabacum* x *Nicotiana sylvestris* interspecifikus / Melchers, 1977/ kombináció esetén is hatékonynak bizonyult.

A *Datura innoxia* intraspecifikus hibrideket ugyancsak a klorofill deficiens mutánsok komplementációja alapján szelektálták / Schieder, 1977/. Osztódó, klorofill deficiens és nem osztódó illetve kalluszképzésre képtelen vad típusú protoplasztok fúzióját követően, a zöld fenotípusra történő szelekció alapján izoláltak a *Nicotiana tabacum* x *Nicotiana glauca* / Evans és Mtsai, 1980/ illetve *Datura innoxia* x *Datura stramonium* / Schieder, 1978/ kombinációban szomatikus hibrideket.



A levélszint érintő mutánsok között nukleáris és plaztom mutánsok egyaránt előfordulnak. Gleba és mtsai / 1975/ erre alapozva dolgoztak ki szelekciós rendszert *Nicotiana tabacum* két különböző változatát használva szülői partnerként. Ebben a rendszerben azok a citoplazma hibridek is azonosíthatók, amelyekből az egyik mag eliminálódott.

Az első nem Solanaceae családba tartozó interspecifikus / *Daucus carota* x *Daucus capillifolius* / és intergenerikus / *Daucus carota* x *Aegopodium podagraria*, *Daucus carota* x *Petroselinum hortense* / hibridnövényeket is az albino komplementáció alapján szelektálták Dudits és mtsai / 1977, 1978, 1979/.

c. Metabolikus mutánsok alkalmazásán alapuló szelekciós rendszerek

A módszer alkalmazásának feltétele, hogy szelektálható markerekkel rendelkező mutáns sejtvonalkaink legyenek. Sajnos ma még kevés biokémiaailag és genetikailag is jellemzett mutáns sejtvonalt áll rendelkezésünkre magasabbrendű virágos növényekben.

Glimelius és mtsai / 1978/ nitrátreduktáz kofaktorában / *cnx-68*/ és apoenzimében /*nia-63*/ deficiens *Nicotiana tabacum* mutánsok sejthibridizációjából egyedüli nitrogénforrásként csak

NO<sub>3</sub>-ot tartalmazó médiumon szelektáltak sejthibrideket. A kísérlet bizonyította a NR deficiencia recesszív karakterét, valamint azt, hogy a mutációk különböző lókuszekben lokalizálhatók.

Márton és mtsai /1982/ ugyancsak NR deficiens mutánsok komplementációja alapján szelektáltak szomatikus hibrideket *Nicotiana plumbaginifoliából*.

White és mtsai /1979/ 5-metiltryptofán / 5-MT/ és S-2-aminoetilcisztein /AEC/ rezisztens *Nicotiana tabacum* sejtvonalak fúziójából kettős rezisztens szomatikus hibrideket szelektáltak, mivel az aminosav analóg rezisztens jellegek domináns markerként viselkedtek. Ugyancsak az 5-MT és AEC rezisztencia markerek domináns expressziója alapján szelektáltak szomatikus sejthibrideket *Daucus carota* intraspecifikus fúziós rendszerben / Harms, 1982/.

#### d. Szelekció fizikai módszerekkel

A módszer csak különböző morfológiájú protoplasztok fúziójából származó heterofúziós termékek kiválogatására alkalmas. Leggyakrabban levélprotoplaszt és sejtszuspenzióból származó protoplaszt fúziójából származó fúziós termékek szelektálására alkalmazzák. A fúziós termékek fénymikroszkóppal felismerhetők és mikromanipulátorral vagy mikropipettával kiemelhetők, majd

a szelektált sejtek egyedileg tenyészthetők / Kao, 1977; Gleba és mtsai, 1978; Menczel és mtsai, 1978; Praznovszky és mtsai, 1981; Hein és mtsai, 1983/. A módszer előnye, hogy általánosan alkalmazható.

Ha az alkalmazott fúziós partnerek morfológiailag nem különböznek, nem toxikus fluoreszcenz festékek alkalmazásával biztosíthatjuk a fúziós termékek azonosításának feltételeit. Galbraith és Mauch /1980/ különböző *Nicotiana* fajok levélprotoplasztok fúziójából származó fúziós termékeket különítették el a partnerek különböző színű fluoreszcenz festése alapján. Fluoreszcenz mikroszkóppal a kevert festődésű fúziós termékek könnyen felismerhetők és mikromanipulációval illetve elektronikus sejtosztályozóval /Bonner és mtsai, 1972/ kiválogathatók.

Harms és Potrykus /1978/ a szülői protoplasztok úszó denzitásában meglévő különbséget használták fel a heterofúziós termékek szelektálására. Izo-ozmotikus sűrűség-grádiensen történő centrifugálással a különbözőképpen ülepedő szülői protoplasztok egymástól és a heterokarionoktól viszonylag jó hatékonysággal elválaszthatók voltak.

e. Szelekció irreverzibilisen ható anyagcsere gátlók alkalmazásával

Általánosan alkalmazható módszer az először az emlős genetikából ismert / Wright, 1978/ irreverzibilisen ható biokémiai inhibitorok használatán alapuló szelekciós rendszer. Fúzió előtt különböző hatóhelyű enzim inhibitorokkal kezelve a szülői protoplasztokat, bennük az inhibitortól függően különböző metabolikus enzimek irreverzibilisen inaktiválódnak. Várhatóan csak azok a heterokarionok nőhetnek ki a fúziót követően, amelyekben létrejött a gátolt enzimek komplementációja. A leggyakrabban alkalmazott irreverzibilisen ható metabolikus inhibitorok a jódacetamid és a jódacetát / Lázár, 1980; Medgyessy és mtsai, 1980/, melyek azonos módon hatnak, az enzimek SH csoportját alkilálva idézik elő a metabolikus enzimek irreverzibilis inaktivációját / Dixon és Webb, 1979/.

Nehls 1978-ban *Solanum nigrum* és *Petunia hybrida* levélprotoplasztok fúziója előtt dietilkarbonát letális dóziséval kezelte a *Solanum* protoplasztokat, jódacetáttal a *Petuniákat*. A fúzió után szelektált 3 protoplasztból kettő volt képes osztódásra, és ezek közül egynek a citológiai analizisét végezték el. A vizsgálat alapján a kinőtt kolónia heterokarion eredetű volt. Valószínűbb azonban, hogy ebben az esetben citoplazmás komplementáció történt.

## 2.2. Inkompatibilitás a növényi szomatikus hibridekben

A növények korlátlan szexuális keresztezhetőségének akadálya a megtermékenyítés során illetve azt követően fellépő inkompatibilitás. A 70-es években kifejlesztett növényi szomatikus sejthibridizáció módszere alkalmasnak látszott a fenti probléma megkerülésére. Az eddigi kísérletek azonban, melyek szomatikus sejthibridek előállítására irányultak, azt bizonyították, hogy a szomatikus hibridizáció során is felléphetnek inkompatibilitási jelenségek / Power és mtsai, 1975; Kao, 1977; Dudits és mtsai, 1979; Gleba és Hoffmann, 1978/.

Az ivaros keresztezés során, a prezigóta és a postzigóta állapot néhány formája során fellépő inkompatibilitási reakciók a specializált szövetek és sejtek interakciójának eredményei. A zigóta és gyakran a postzigóta szinten megnyilvánuló inkompatibilitáshoz nagyon hasonló a szomatikus sejtek fúziójakor kialakult helyzet. A szomatikus sejthibridizáció során különböző eredetű növényi protoplasztokat fuzionáltatunk egymással. A fúziós eseményt inkompatibilitási reakció nem akadályozza. Gyakorlatilag bármely növény protoplasztjai fuzionáltathatók, sőt növényi protoplaszt és állati sejt fúziója sem gátolt /Dudits és mtsai, 1976; Hadlaczky és mtsai, 1980/. Ennek oka való-

szinüleg az, hogy a fúzió inkább fizikai, mint fiziológiai esemény. Ugyanakkor elképzelhető, hogy a fúzió folyamata aktiválhat egy inkompatibilitási szisztémát.

Az inkompatibilitási reakciót várhatóan inkább a kialakult heterokarionban az idegen citoplazmák és genomok interakciója váltja ki. A növényi protoplasztok fúziós termékei, a heterokarionok a különböző sejtmagfestődés alapján felismerhetők / Constabel és mtsai, 1975; Dudits és mtsai, 1976; Kao, 1977/. A heterokarionokban a citoplazmák keveredése a fúzió utáni órákban kezdődik / Fowke és mtsai, 1975/ és 10-24 órával később teljessé válhat / Gosch és Reinert, 1978/. A nem tökéletes citoplazma keveredés elősegíthet egy későbbi szegregációs eseményt.

Constabel és mtsai / 1980/ demonstrálták, hogy a protoplaszt fúzió után a fuzionált sejtekben a sejtek vakuolumai is fuzionálhatnak, és ez olyan szemcsés anyagok kicsapódását eredményezheti a citoplazmában, amely csökkenti a fúziós termékek életképességét, és a celluláris inkompatibilitási mechanizmus megnyilvánulásának tekinthető. A fúzió okozhatja a vakuolumok membránjának dezintegrálódását, amely különböző katabolikus enzimek, fenolok vagy más inhibitorok kiszabadulásához vezethet, ezáltal inaktiválva a metabolikus funkciókat, és csökkentve a heterokarionok életképességét, esetleg sejt-



halált okozva / Harms, in press /.

A heterokarionokban a citoplazma keveredést követően bizonyos esetekben létre jöhet az interfázisos magok premitotikus fúziója / Constabel és mtsai, 1975; Dudits és mtsai, 1976a; Kao, 1977/. Sokkal gyakoribb eset azonban, hogy a szülői sejtmagok szinkron mitózis során közös metafázist alkotva fuzionálnak. Az ilyen közös osztódások azt mutatják, hogy valódi hibrid sejtek létrejöhetnek intergenerikus kombinációk esetén is / Kao, 1977; Constabel és mtsai, 1976; Gleba és mtsai, 1978/. Ezek a valódi hibridek azt mutatják, hogy a tenyésztési körülmények által szabályozott dedifferenciált sejtszinten a szomatikus hibridizáció lehetősége nem függ szükségszerűen a fúziós partnerek filogenetikai távolságától. Dudits és mtsai, 1980-ban *Daucus carota* protoplasztokat fuzionáltak különböző *Umbelliferae* családhoz tartozó növények levélprotoplasztjaival, valamint *Pisum sativum* és *Secale cereale* protoplasztokkal. A fúziós termékek minden kombinációban osztódtak. Ebből a szerzők az előbb leírtakhoz hasonlóan arra következtettek, hogy a korai osztódások során, tekintet nélkül a filogenetikai távolságokra inkompatibilitás nem figyelhető meg. Ugyanakkor hibrid kalluszokat csak *Daucus carota* x *Aegopodium podagraria* és Da-

ucus carota x Petroselinum hortense kombinációk esetében sikerült szelektálni / Dudits és mtsai, 1979, 1980 /. A sikertelen hibridizációs kísérletekben a kalluszképzés hiánya valószínűleg a partnerek között fellépő inkompatibilitás következménye.

Ahhoz, hogy a hibrid sejtben "stabil" kariotípus alakuljon ki, valószínűleg szükség van a hibrid sejten belül a szülői magok sejtciklusának szinkronizációjára. A sejtciklus megzavarása ugyanis elkerülhetetlenül a mitózis zavarához, egyenlőtlen kromoszóma eloszláshoz és kromoszóma eliminációhoz vezet. A szinkron sejtciklus kialakulásának teljes hiánya feltehetően a fúziós partnerek között sejtszinten fellépő inkompatibilitási reakció eredménye.

A szinkron sejtciklus kialakulását követően is felléphet inkompatibilitás a további osztódások során. Az osztódó hibridsejtek citológiai vizsgálata bepillantást nyújthat a hibrid sejtben kialakuló koordináció folyamatába.

Intergenerikus fúziós termékekben megfigyelhető, hogy sok esetben a kialakult közös metafázisban az azonos eredetű kromoszómák egy csoportban, összeragadva maradnak, nem egyenlő a különböző szülőből származó kromoszómák eloszlása / Kao és mtsai, 1974/. Ez a szituáció szintén feltehetően az inkompati-



bilitás egyik megnyilvánulásának tekinthető. A későbbi osztódások során ugyanis az egyenlőtlen kromoszóma eloszlás kromoszóma szegregációhoz, és a hibrid kallusz kialakulásának hiányához vezet.

Szója és *Nicotiana glauca* szomatikus hibrid sejtvonali citológiai analizise / Kao, 1977/ a *Nicotiana* kromoszómák fokozatos eliminációját mutatta. A *Nicotiana* kromoszómák gyakran öszszeragadtak, gyűrűt, hidakat képeztek, többszörös befűződést mutattak, fragmentálódtak és az osztódások során elvesztek. Az izoenzim vizsgálatok megerősítették, hogy a kromoszóma vesztés egyirányú és random / Wetter, 1977/. A kromoszómák morfológiai változásának oka nem ismert, de úgy tűnik, hogy kapcsolatban áll a celluláris inkompatibilitással, és a kromoszóma elimináció itt is az aszinkron mitózis következménye / Kao, 1977/. Amikor " back " fűziót végeztek *Nicotiana* protoplasztokkal, sokkal stabilabb kromoszóma konstitúció jött létre a szója x *Nicotiana glauca* szomatikus hibrid sejtekben / Wetter és Kao, 1980/. Gleba és Hoffmann /1978/ *Arabidopsis thaliana* x *Brassica campestris* szomatikus hibrid sejtekben szintén megfigyelték a kromoszómák számbeli és morfológiai változását, de ebben az esetben a kromoszóma elimináció sokkal lassabban kö-

vetkezett be, és nem volt kizárólagosan egyirányú folyamat. A hibrid sejtek még 7 hónappal a fúzió után is hordoztak mindkét szülőből származó marker kromoszómákat. A fúzióból származó egyik hibrid vonal nagy mértékű kromoszóma elimináció és kromoszóma átrendeződés után morfogenezisre volt képes, és változatos morfológiájú hibrid hajtásokat produkált / Hoffmann és Adachi, 1981/. Dudits és mntsai /1979/ *Daucus carota* és röntgen kezeléssel inaktivált *Aegopodium podagraria* fúziójából származó hibrid növényekben nem találtak *Aegopodium* kromoszómát, de a növény hordozta az *Aegopodium* néhány tulajdonságát. Ebben az esetben azonban nem tisztázott, hogy ez a kariotípus a hibridsejt osztódása során bekövetkezett kromoszóma vesztés következménye-e, vagy a fúzió során létrejött intergenerikus géntranszfer eredménye.

Ha a heterokarionokban az osztódások során kromoszóma vesztéssel egy stabil kariotípus alakul ki, akkor létrejöhet hibrid sejt vonal.

A hibrid kalluszból hibrid növény kialakulásához szükséges a differenciálódás folyamatának zavartalansága, koordináltsága. A differenciálódás folyamata lehet egy újabb lényeges megnyilvánulási lehetősége a celluláris inkompatibilitás

nak a szomatikus hibridekben. Dudits és mtsai /1980a/ *Daucus carota* x *Petroselinum hortense* fúzióját követően azt találták, hogy a morfogénikus indukció után drasztikusan megnőtt az indukált kalluszok letalitása, miközben a nem indukált hibridek növekedése mint differenciálatlan szövet, zavartalan volt. A szerzők ebből arra következtettek, hogy a differenciáció során valószínűleg egy korábban inaktív szomatikus inkompatibilitás nyilvánult meg.

Ha sikerül a szomatikus sejthibridizáció eredményeképpen hibrid növényt létrehozni, a növénynek és utódainak vizsgálata érdekes megfigyelésekkel szolgálhat. A szomatikus sejthibridizációval előállított intergenerikus hibridek például sem kariotípus szerint, sem fenotípusosan nem voltak " normálisak " / Dudits és mtsai, 1979; 1980/.

A *Solanum tuberosum* x *Lycopersicon esculentum* / Melchers és mtsai, 1978/ szomatikus sejthibridizációval előállított hibrid növény intermedier volt, mindkét szülőre jellemző morfológiát mutatott, és steril virágokat hozott. A hibrid növény a citológiai vizsgálatok szerint aneuploid volt. Feltételezték, hogy a virágok sterilitása az inkompatibilitási mechanizmus megnyilvánulásának következménye. A növény illékony kom-

ponenseinek gázkromatográfiás vizsgálata szerint / Ninnemann és Jüttner, 1981/ azonban a két genom a vizsgált tulajdonságra nézve sikeresen működik együtt a másodlagos metabolizmus szintjén. A sterilitás oka, tehát feltételezhetően az aneuploidia lehet.

Az eddigi szomatikus sejthibridizációs kísérletek eredményeként sikerült más intergenerikus kombinációból is / Krumbiegel és mtsai, 1979; Gleba és mtsai, 1979/ olyan hibrid növényeket előállítani, amelyek szexuális keresztezéssel nem hozhatók létre. Ennek ellenére megfigyelhető, hogy a szomatikus sejthibridizációval létre hozható hibridnövény kialakulásának valószínűsége korrelál az alkalmazott szülői partnerek filogenetikai távolságával.

További kísérletek szükségesek annak vizsgálatára, hogy filogenetikailag nem rokon fajok fúziós termékeikben miért nem képesek együttműködni és osztódásra. A szomatikus inkompatibilitás a szomatikus hibridsejt szintjén a fúziós partnerektől függő különböző mechanizmusokat használva nyilvánul meg. A szomatikus inkompatibilitás lehet egy tisztán passzív folyamat, amelyben az egyik fúziós partner fejlődése a másik partner aktiv hatása nélkül gátolt vagy késleltetett a fúziós ter-

mékben. Ennek oka lehet egyszerű fizikai probléma, nem tökéletes citoplazma keveredés és citoplazma gradiens kialakulása, vagy a sejtfolyamatok koordinálatlansága. A szomatikus sejtinkompatibilitás második típusa lehet az egyik partner direkt aktivitásának eredménye a másik fúziós partnerrel szemben. Ehhez szükséges egy inkompatibilis fúziós partner jelenléte, amely kioldóként szolgál egy visszautasító válasz kialakulásához a másik partnerben. A szomatikus sejt inkompatibilitás harmadik típusa a fúziós partnerek kölcsönös aktiv interakciója amely két különböző inkompatibilitási válasz eredményeképpen valósulhat meg a hibrid sejtben.

A szomatikus inkompatibilitás mechanizmusának vizsgálatára legmegfelelőbbek a mechanikailag izolált vagy szelektált egyedileg tenyésztett fúziós termékek lennének, de ezeknek a termékeknek a vizsgálata számos felmerült technikai probléma / a fúziós termékek szelektálása illetve izolálása, egyedi sejtek tenyésztése, a szülői magok differenciált festése / megoldását feltételezi.



### 3. Anyagok és módszerek

#### a. Sejtvonalak és médiumok

A szója / *Glycine max* L. Merr. / SB-1 sejtvonal a Prairie Regional Laboratory / Saskatoon, Kanada /-ból származik. A szója sejteket Médium 1 tenyésztőoldatban / Kao és mtsai, 1974/ neveltük rázatott szuszpenziós kultúrákban 25°C-on, állandó 1700 lux fényintenzitás mellett. A tenyészeteket 2-3 naponként passzáltuk.

A kísérletek során a borsó / *Pisum sativum* L. / egyik fajtájának / Petit provencal / két különböző genotípusát / I, II/ használtuk. A borsó magokat 70%-os alkohollal majd 0.1%-os higanykloriddal kezelve sterilizáltuk. Az így nyert magokat steril csirázattal B5 / Gamborg és Eveleigh, 1968/ táptalaj hormonmentes változatában. A borsó növényeket 25°C-on, 1700 lux fényintenzitás mellett termosztát szobában neveltük.

#### b. Protoplaszt izolálás

A szója protoplasztok izolálását 24 órával a sejtek friss médiumba történt átoltása után kezdtük meg. A szója sejtszuszenziót 3:1 arányban kevertük sejtfalbontó enzimkeverékkel. Minden esetben az alábbi összetételű enzimkeveréket használtuk : 2% Onozuka celluláz R-10, 0.5% drizeláz / Kyowa Hakko

Kogyo Co., Tokyo, Japan/, 0.5% hemicelluláz / Rhom and Haas/,  
1% pectináz / Fluka/, 0.35 M szorbitol, 0.35 M mannitol, 3 mM  
2-/N-morfolino/etánszulfonsav/ /MES/ /Sigma/, 6 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  
0.7 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , pH:5.6.

A sejtfal leemésztése  $25^\circ\text{C}$ -on, 20 órás inkubációval történt  
50 fordulat/perc állandó rázatás mellett.

A borsó protoplasztokat sterilen csiráztatott 10 napos  
növénykék leveléből izoláltuk. A leveleket az alsó epidermisz  
lenyúzása után a már leirt enzimkeverék és Médium 1 tápoldat  
1:1 arányú keverékébe tettük, majd 5 órán át inkubáltuk.

#### c. Protoplaszt fúzió

A frissen izolált szója és borsó protoplasztokat steril  
44  $\mu$ -os rozsdamentes acélszűrőn átszűrtük, majd centrifuga-  
csövekbe tettük és 3 percig 1000 fordulat/perc / Janetzki  
K-23-as centrifuga/ centrifugálással az enzimből kiülepített-  
tük. Ezután a protoplasztokat P 0.4 G oldatban / 0.4 M glükóz,  
0.7 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH: 5.6/ / Kao és Michayluk, 1974/,  
reszuszpendáltuk, majd újra lecentrifugáltuk. A protoplaszto-  
kat  $10^5$  protoplaszt/ ml koncentrációban P 0.4 G oldattal hi-  
gitottuk, majd a szója és borsó protoplasztokat 1:1 arányban  
kevertük, és a keverékből 1 ml-eket 6 cm átmérőjű plastik

petri csészékbe cseppentettünk. 10 perc ülepités után csészénként 1 ml polietilén-glikol / PEG/ oldatot adtunk cseppenként a protoplasztokhoz, a PEG oldat összetétele : 50% 4000 molekulású PEG / Polysciences, Warrington/, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.7 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH:5.6. 20 perc kezelés után a letapadt protoplasztokról a fölös mennyiségű PEG-et eltávolítottuk, és kimosó oldattal / 100 mM glicin oldat pH:10.5 1:1 arányban keverve 0.7 M glükóz, 100 mM  $\text{CaCl}_2$  és 10% DMSO oldatával/ 5 percig inkubáltuk. Ezután a tenyészetet utómosó oldattal / 0.37 M glükóz, 1.3 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH:6/ elárasztottuk és 10 percig inkubáltuk. A mosást még kétszer megismételtük, egyszer az utómosóval és egyszer a tenyésztő táptalajjal. Végül a protoplasztokat vagy Kao-féle Médium A protoplaszt tenyésztő oldatban / Kao, 1977/, vagy  $\text{C}_2\text{VII}$  / Kao és Michayluk, 1974/ táptalajban tenyésztettük fúzió után. A tenyészetekhez két hét után 3 lépésben 10 nap alatt fokozatosan Médium 1 tápoldatot adtunk, majd 4 hét után agarral szilárdított / 0.8%/ Médium 1 táptalajra szélesztettük. Kontrollként minden kísérletben szülői protoplasztok PEG kezelt illetve kezeletlen tenyészetét és 1:1 arányban kevert borsó és szója protoplasztok tenyészetét alkalmaztuk. A heterofúziós gyakoriságot 1000 szója protoplasztra vonatkoz-



tatva adtuk meg. A szülői sejtek osztódási gyakoriságát 1000, a heterofúziós termékek osztódási gyakoriságát 20-40 sejt értékelésével határoztuk meg. A tenyészetek in vivo fénymikroszkópos vizsgálatakor Wild M 40 típusú mikroszkópot használtunk. Osztódottnak tekintettük azokat a sejteket, amelyekben az új sejtfa az ún. sejtlemes / phragmoplast / látható volt.

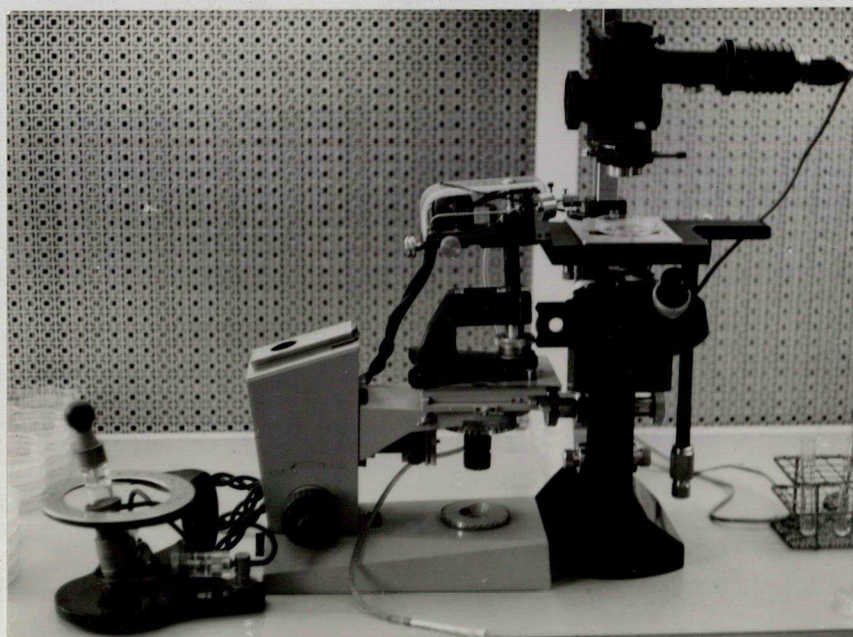
d. A fúziós partnerek inaktiválása

A borsó I genotipusból származó mezofill levélprotoplasztok inaktiválása BX-150 /TRAKIS/ röntgen készülékkel történt. Az enzimidatban lévő protoplasztokat 10 ml térfogatban 6 cm átmérőjű plastik petri csészébe tettük, és 9000 rad dózissal kezeltük. A kezelési idő 20 perc volt az alkalmazott 0.5mm Al szűrő, 15 cm tárgy távolság, 5 mA és 150 KW mellett 470 rad/perc teljesítménnyel.

A szója protoplasztok inaktiválása jódecetamiddal történt az izolált protoplasztok enzimidatból való kimosása után. A kezelést 25<sup>o</sup>C-on végeztük 2 mM jódecetamid tartalmú P 0.4 G mosó oldattal. 20 perc inaktiválás után a protoplasztokat 3-szor mostuk P 0.4 G oldattal. A kezelt tenyészetekben az osztódási gyakoriságot 5000 sejt értékelésével állapítottuk meg.

e. A heterofúziós termékek elkülönítése mikromanipulációval

A mikroszkóppal azonosított heteroplazmás sejtek kiemeléséhez Amplival mikroszkóppal összeépített Micromanipulateur de Fonbrune Réf. 141 típusú mikromanipulátort használtam / 1. ábra/.



1. ábra. A fúziós termékek kiemelésére használt készülék.

A kiemelést sterilfülkében / Gelaire laminar air flow, Gelman/ végeztem.

Az izolált sejtek tenyésztésére különböző módszereket alkalmaztunk:

1. Cuprak petri csésze / Coster 3268/ vájataiban, a kondicionált táptalaj egy cseppjében egyedileg tenyésztettük a hete-

rofúziós termékeket / Kao,1977 /.

2. 8/32 típusú dializáló hüvelyből / Serva / kialakított kamrácskában tenyésztettük a kiemelt sejteket. A hártyán keresztül érintkeztek a sejtek az eredeti tenyészettel.

3. Szója sejteket tartalmazó 0.5%-os agaros protoplaszt táptalajra helyezett üvegkarikában tenyésztettük a heteroplazmás sejteket. A szója sejteket dajka tenyészatként használtuk a kiemelt sejtek tenyésztése során.

4. 5  $\mu$ -os nylon hálóból képzett kamrát a fúziós tenyészetbe helyeztünk, majd ebben tenyésztettük a heterofúziós sejteket.

A protoplaszt tenyészeteket 25<sup>o</sup>C-on, szórt fényben inkubáltuk.

#### f. Hidegkezelés

A szója sejtszuszpenziót közvetlenül a protoplaszt izolálást megelőzően hidegkezeltük / Yamada és mtsai,1980/. A hidegkezelés 4<sup>o</sup>C-on, 10 órán át történt, állandó rázatás mellett.

#### g. Citológiai vizsgálatok

A citológiai analízis előtt a sejteket 0.05%-os kolchicinnel kezeltük 2-4 órán át, majd etilalkohol-ecetsav 3:1 arányú keverékével / Baker,1969 / 20 percig fixáltuk. 1 N HCl-val



60°C-on történt 10-16 perces hidrolízis után a sejteket Schiff-féle aldehid reagenssel / Sárkány és Szalai, 1966/ festettem kb. 1 órán át. A preparátum készítés előtt a gyökereket és a kalluszokat enzim oldattal / 2% pektináz, 2% celluláz/ emésztettem 0.5-1 órán át. A sejteket 45%-os ecetsavban fedőlemez alatt a tárgylemezen szétnyomtam, majd folyékony nitrogénnel lefagyasztottam / Conger és Fairchild, 1953/. A fedőlemez lepattintása után a preparátumot szárítottam, majd 2%-os Giemsa oldattal / 2% Giemsa / Biogal /, 1/15 M -os Sørensen-féle 6.8-as pH-jú foszfát pufferben/ újra festettem. A festődés mértékét folyamatosan ellenőriztem mikroszkópon keresztül. Kellő intenzitású festődés elérésekor a preparátumot desztillált vízzel leöblítettem és megszáritottam. A száraz, festett lemezeket xilolba mártottam, tiszta fedőlemezre kanadabalzsamot vagy DePeX-et /Serva/ cseppentettem és ezzel a preparátumot lefedtem. Az így állandósított preparátumok színváltozás és szennyeződés nélkül tárolhatók.

A citológiai vizsgálatok Zeiss NU-2 típusú kutató mikroszkóppal történtek. A fotók ORWO NP 15 és Agfachrome színes negatívanyagra, a papírképek Forte Bromofort fotopapírra készültek.

#### 4. Eredmények

##### 4.1. A fúziós partnerek citológiai vizsgálata

A protoplaszt fúzióból származó heterofúziós termékek vizsgálatához nélkülözhetetlen a szülői partnerek előzetes citológiai vizsgálata.

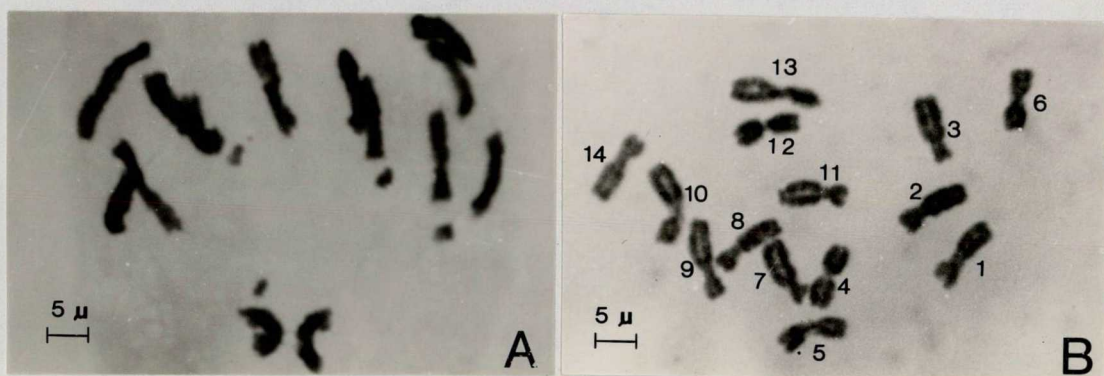
A borsó partner citológiai vizsgálatát 2 napig csirázta-  
tott magok gyökércsúcsából készült dörzspreparátumok alapján  
végeztük. A kolchicinnel kezelt gyökércsúcsban a kromoszómák  
megrövidültek, és metafázisban a másodlagos befűződések egyér-  
telműen nem ismerhetők fel, ezért a vizsgálatokat elvégeztük  
profázisos és prometafázisos / 2.A ábra/ kromoszómákon is.

A borsó diploid kromoszóma száma  $2n=14$  / 2.B ábra/. A kromo-  
szómák átlagos hosszúsága a kolchicin kezelt metafázisos sej-  
tekben 8-10  $\mu$  között változik.

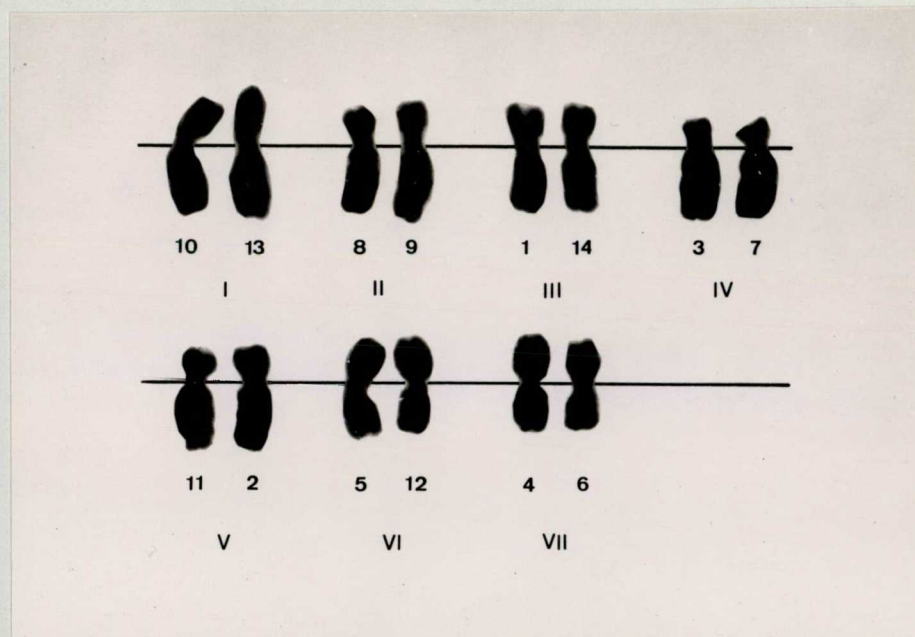
A kariotipus grafikus ábrázolásával / 3. ábra/ vagy a ho-  
mológ kromoszómapároknek a karok aránya / rövid és hosszú kar  
mért hosszának hányadosa / vagy a relativ hosszúság alapján  
történő sorbaállítással elkészíthető az idiogram, amely jól  
szemlélteti az adott kromoszómaszerelvény morfológiai sajátos-  
ságait.

Alaki sajátosságaik alapján a 7 homológ párt az alábbiak  
szerint csoportosíthatjuk:

- I. Metacentrikus - 1 kromoszómapár
- II. Szubmetacentrikus - 4 kromoszómapár
- III. Szatellites - 2 kromoszómapár

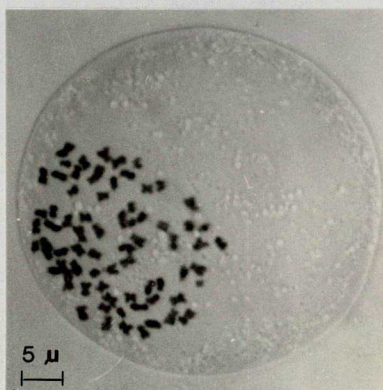


2. ábra A: a borsó prometafázisos kromoszómái,  
B: a borsó metafázisos kromoszómái osztódó gyökérmerisztémából.



3. ábra. A 2.B ábrán bemutatott borsó metafázis idiogramja.

A sejtszuspenzióból származó szója protoplasztokban a kromoszómák száma 50-100 közt változik. A kromoszómák kis mérete / 1-2  $\mu$  / miatt / 4. ábra/ részletes kariotipus analízist nem tudtam végezni, erre azonban nem is volt szükség, ugyanis a szülői kromoszómák közt olyan nagy a morfológiai eltérés, hogy egy hibridben biztosan elkülöníthetők.



4. ábra. Metafázisos szója protoplaszt SB-1 sejtszuspenzióból

#### 4.2. Borsó és szója protoplasztok fúziója

A fúzió előtt szükségesnek láttuk a protoplasztok tenyésztési körülményeinek optimalizálását.

Miután az irodalomból ismert és a laborban használt protoplaszt-táptalajok közül egyikben sem sikerült a borsó mezofill sejtekből származó protoplasztok osztódását megfigyelni, ezért a tenyésztési körülmények optimalizálásáról csak a szója protoplasztok esetében beszélhetünk.

Megállapítottuk, hogy a Kao A és a C<sub>2</sub>VII protoplasztáptalajokban a szója protoplasztok egyformán jól osztódnak. A legnagyobb osztódási gyakoriságot 35.1%-ot, 10<sup>5</sup> protoplaszt/ml denzitásnál kaptuk / 1. táblázat /.

teny. idő nap	5x10 <sup>3</sup> pp/ml	10 <sup>4</sup> pp/ml	10 <sup>5</sup> pp/ml	5x10 <sup>5</sup> pp/ml	10 <sup>6</sup> pp/ml
3.	26.1%	28.5%	35.1%	34.0%	30.2%

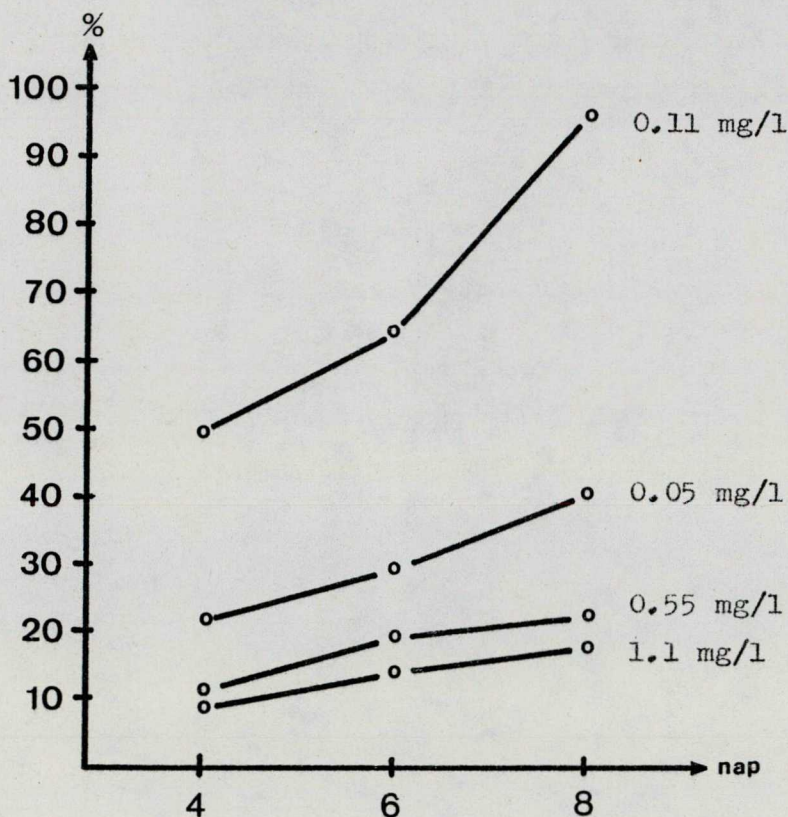
1. táblázat. A szója protoplasztok osztódási gyakorisága a protoplaszt denzitás függvényében.

A protoplasztok tenyésztése szempontjából lényegesnek bizonyult a táptalajok hormon / 2,4-D / koncentrációja. Vizsgálataink szerint a szója protoplasztok legmagasabb osztódási gyakorisága 0.11 mg/l 2,4-D koncentrációnál érhető el / 5. ábra/. A görbe jól szemlélteti a magasabb 2,4-D hormon koncentráció sejtosztódás gátló hatását.

A protoplasztok és a fúziós termékek tenyésztéséhez a fentiek alapján a szója protoplasztokra optimalizált táptalajokat és tenyésztési körülményeket használtuk.

A fúzióhoz a levélprotoplasztokat / 6.A ábra / és a szó-

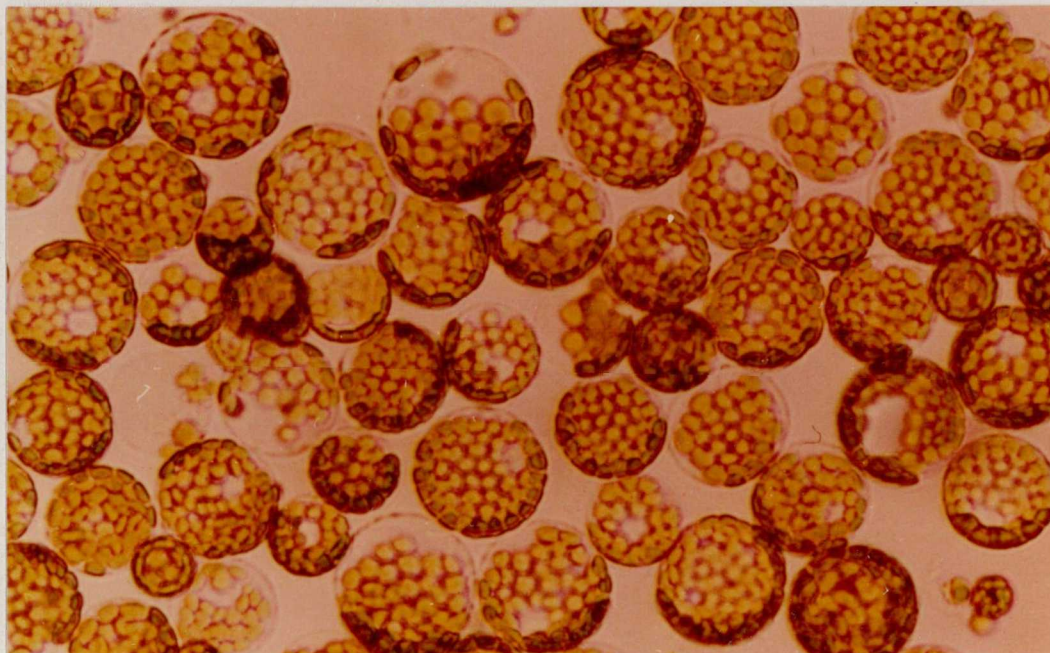




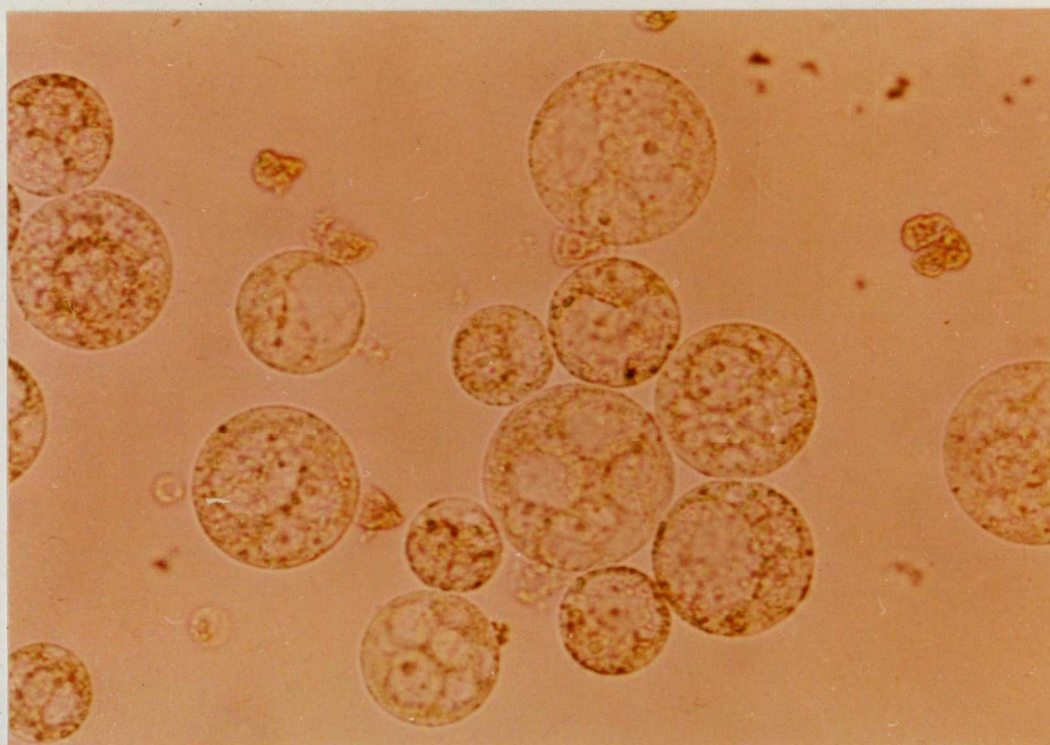
5. ábra. A 2,4-D hatása az SB-1 szója protoplasztok osztódására.

ja protoplasztokat / 6.B ábra / 1:1 arányban úgy kevertük össze, hogy a végső protoplaszt denzitás  $10^5$  protoplaszt/ml volt. A PEG kezelés-hatására / lásd 3. fejezet / a protoplasztok agglutinálódnak, a membránok összetapadnak / 7. ábra /, majd végbemegegy a protoplasztok fúziója és a citoplazmák keveredése / 8. ábra /. A fúziós termékek azonosítására jól felhasználható a borsó kloroplasztiszok és a szója szintelen amiloplasztjainak jelenléte a közös citoplazmában / 8. ábra /. Az in vivo fénymikroszkópos vizsgálatok alapján a használt kísérleti körü-

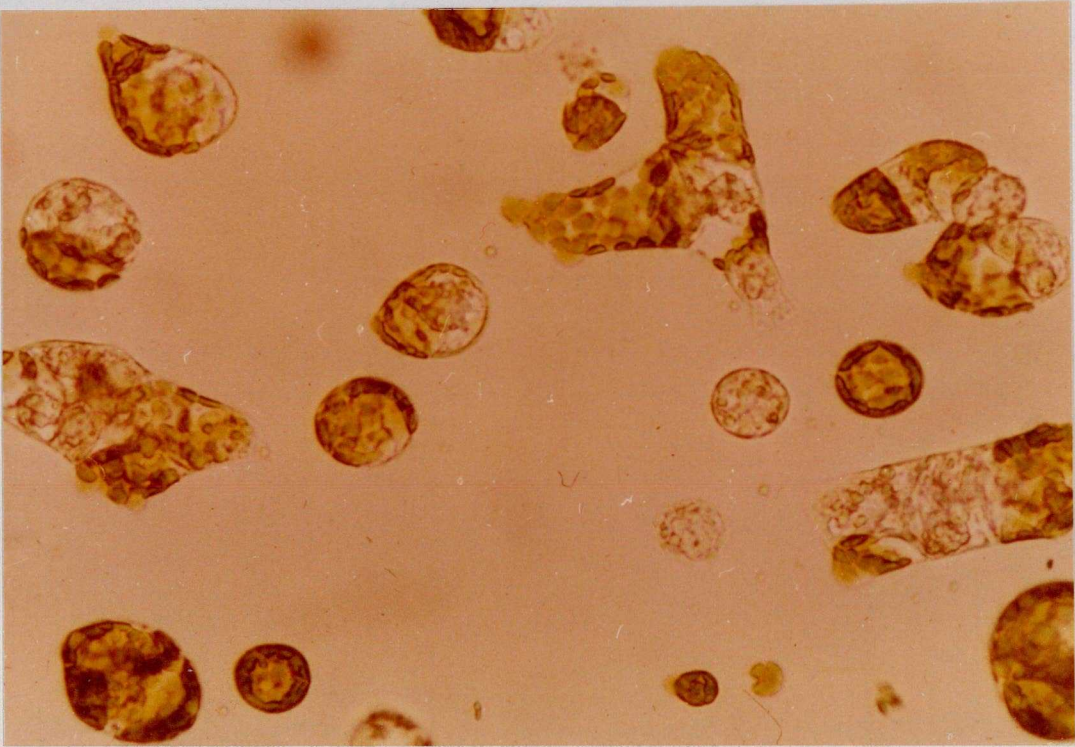
mények között az átlagos heterofúziós gyakoriság 2-5% között volt.



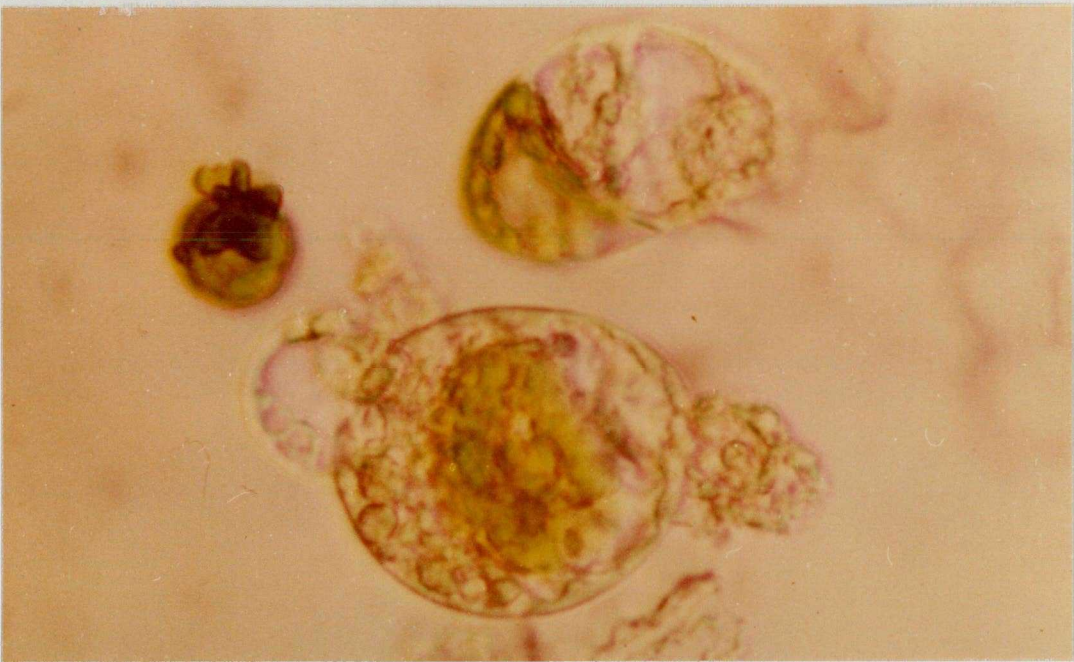
6.A ábra. Borsó levélprotoplasztok.



6.B ábra. Szója sejtenyészethől származó protoplasztok.



7. ábra. Polietilén glükol által előidézett összetapadása a szója és borsó protoplasztoknak.



8. ábra. Fúzionált protoplaszt.

A protoplaszt fúziós kísérletek kontrolljaként az alábbi tenyészeteket használtuk:

1.  $10^5$  protoplaszt/ml denzitású borsó I levélprotoplaszt tenyészet.

Sejtfalregenerációt és sejtosztódást nem tapasztaltunk.

A protoplasztok deformálódtak majd elpusztultak.

2.  $10^5$  protoplaszt/ml denzitású PEG kezelt borsó I levélprotoplaszt tenyészet.

A PEG kezelt protoplasztok a fentiekhez hasonlóan viselkedtek azzal a különbséggel, hogy a protoplasztok többsége már a PEG kezelés során szétpukkadt. Sejtfalregenerációt és sejtosztódást itt sem tapasztaltunk.

3.  $10^5$  protoplaszt/ml denzitású szója protoplaszt tenyészet.

24 óra múlva osztódó sejtek figyelhetők meg / 11% /.

4.  $10^5$  protoplaszt/ml denzitású PEG kezelt szója protoplaszt tenyészet.

A szója protoplasztok a PEG kezeléssel szemben ellenállóbbnak bizonyultak, mint a borsó protoplasztok. A protoplasztok többsége / fuzionált és nem fuzionált / ép maradt és 24 órával a PEG kezelés után a sejtek osztódása megfigyelhető volt.

5.  $10^5$  protoplaszt/ml denzitású borsó I és szója protoplasztok 1:1 arányú keveréke.

Spontán fúziót nem találtam, és csak a szója sejtek osztódása volt megfigyelhető.

A borsó-szója protoplasztok fúzionáltatását követően 24 óra múlva már megfigyelhető a szója protoplasztok sejtfal regenerációja és a sejtek osztódása.

Meghatározott tenyésztési idő elteltével / 3,4,5,6 nap / megállapítottam az osztódási gyakoriságot mind a fúzionáltatott, mind a kontroll tenyészetekben / 2. táblázat /. Az osztódási gyakoriságokat 8 független kísérlet eredményeinek átlagában adtam meg. Megállapítható, hogy a PEG kezelt borsó I-szója tenyészetekben mind a szülői sejtek, mind a fúziós termékek osztódása végbemegy / 9. ábra /. Különbség figyelhető meg azonban a különböző sejtek esetében az osztódás megindulásának idejében és az osztódási gyakoriságokban.

A szója sejtek osztódása már 24 óra múltán megfigyelhető, míg a borsó I sejtek csak a 4., a heterofúziós termékek pedig az 5. napon kezdenek osztódni. 6 napos tenyésztés után a szója sejtek osztódási gyakorisága eléri a 79.2%-ot, a borsó sejteké a 21.9%-ot, a heterofúziós termékeké a 33.3%-ot.

tenyésztés ideje napokban	szója pp. tenyészet	PEG kezelt szója pp. tenyészet	borsó pp. tenyész.	PEG kezelt borsó pp. tenyész.	kevert szója + borsó pp. tenyészet		PEG kezelt szója + borsó pp. tenyészet		
					borsó	szója	borsó	szója	fúziós termék
3.	32.1%	30.1%	0.0%	0.0%	0.0%	29.1%	0.0%	24.3%	0.0%
4.	50.9%	48.6%	0.0%	0.0%	0.0%	49.0%	7.3%	48.3%	0.0%
5.	64.1%	63.9%	0.0%	0.0%	0.0%	63.2%	14.9%	64.5%	22.3%
6.	82.1%	79.9%	0.0%	0.0%	0.0%	81.2%	21.9%	79.2%	33.3%

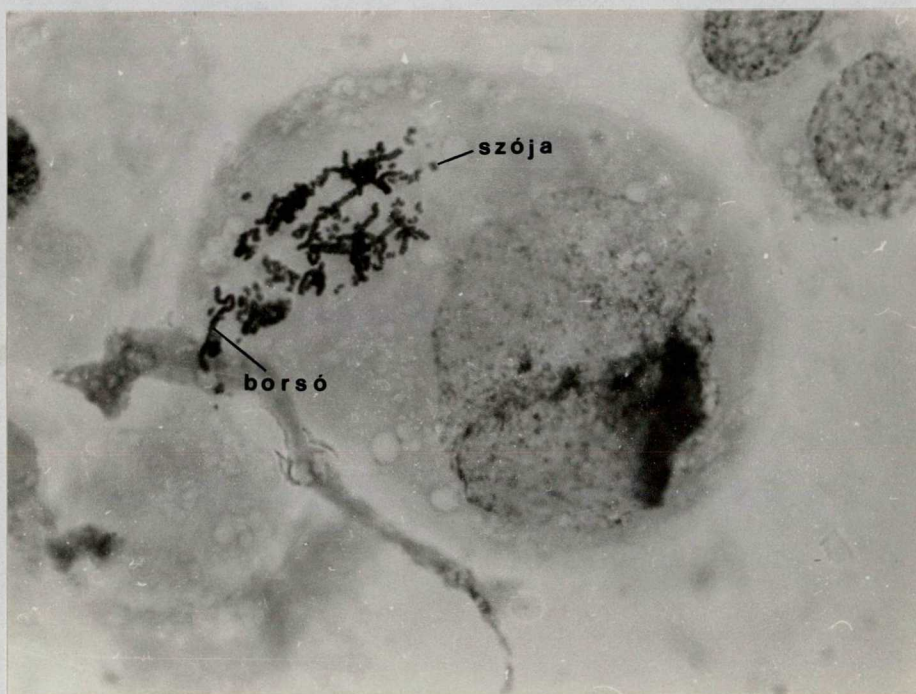
2. táblázat. A szója és borsó I levélprotoplasztok fúziós tenyészeiben és a kontroll tenyészetekben a szülői sejtek és a heterofúziós termékek osztódási gyakorisága a tenyésztés során.



9. ábra. Többszörösen osztódott heterofúziós sejt.

A tenyészetek *in vivo* fénymikroszkópos kiértékelésén túl elvégeztük a 6 napos PEG kezelt tenyészetek citológiai vizsgálatát is. A szója és borsó kromoszómák morfológiai különbsége alapján sikerült szinkron osztódó heterofúziós terméket találnom / 10. ábra / a tenyészetek átvizsgálása során, amely a hibrid kallusz előállításának lehetőségét valószínűsítette.

Ezt követően a szója és borsó I levélprotoplasztok fúziójából származó tenyészeteket 4 hét tenyésztés után Médium 1 agaros táptalajra szélesztettük, és a kapott kalluszokból el-



10. ábra. Szinkron osztódó fúziós termék.

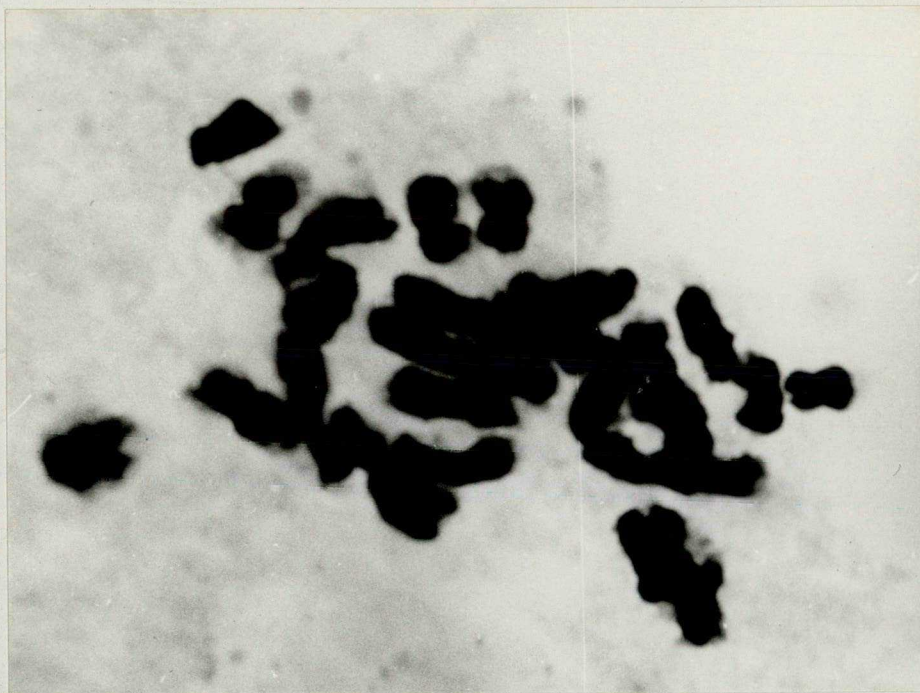
végeztük azoknak a kompakt, zöld kalluszoknak a citológiai vizsgálatát, amelyek megjelenésükben eltértek a jellegzetes laza szerkezetű szója kallusz morfológiától. A citológiai vizsgálatok során a kalluszok egy kis hányada szójának / 11. ábra / , többsége pedig borsónak / 12. ábra / bizonyult. A szója kalluszok a sejtszuspenzióból származó sejtekhez hasonlóan magas ploidszintű sejtekből álltak, és a kromoszóma szám a "klonális eredetű" kalluszon belül is variált.

A borsónak bizonyult kalluszok kromoszóma száma is a kallusz-



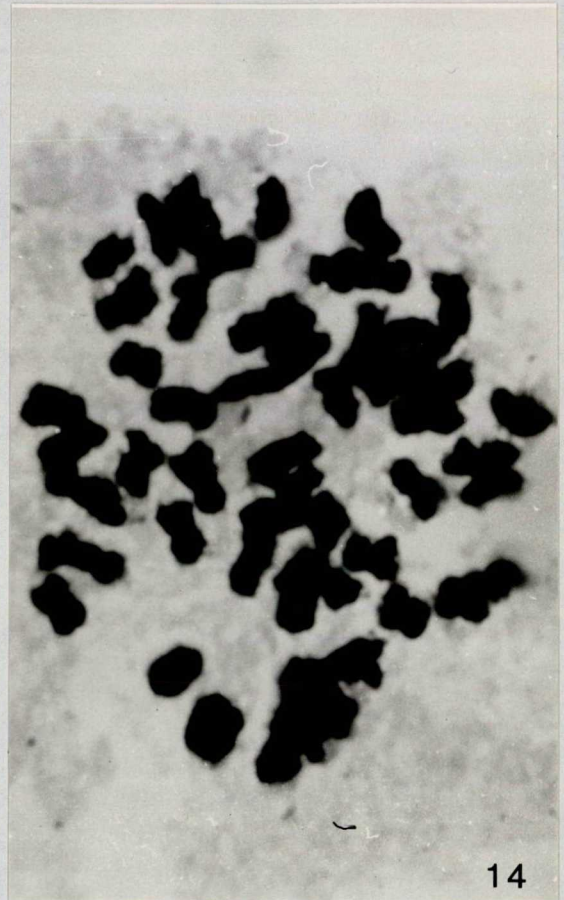


11. ábra. Szója kalluszból származó osztódó sejt.



12. ábra. Borsó kalluszból származó metafázisos sejt.

tenyészetekre jellemző nagy kromoszóma szám variabilitást mutatott / 14-69 /. A normális diploid kromoszóma számú sejtek mellett / 13. ábra / poliploid sejtek is nagy számban megtalálhatók / 14. ábra /.



13. ábra. Borsó kalluszból származó diploid sejt.

14. ábra. Borsó kalluszból származó poliploid sejt.

Tartós tenyésztés során a borsó kallusok többsége hormonmentes Médium 1 agaros táptalajon gyökér organizációt mutatott.

A leirt kísérleti körülmények között a szója és borsó I levélprotoplasztok fúziójából hibrid kalluszt 14 fúziós kísérletben egy alkalommal sem tudtunk izolálni.

#### 4.3. Fúziós kísérletek inaktivált fúziós partnerekkel

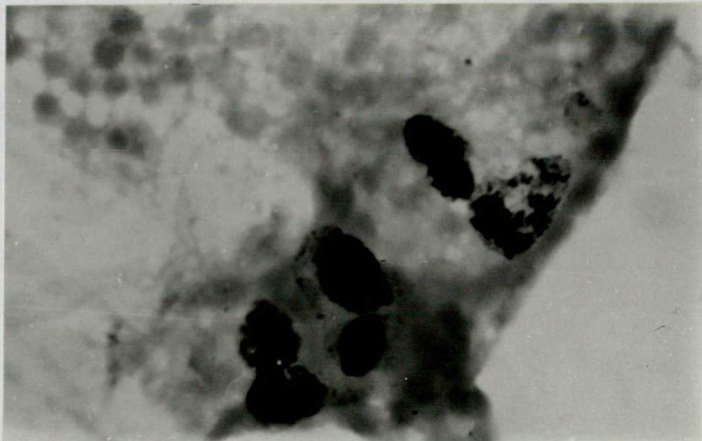
Az előzőleg leirt kísérleti körülmények között a fúziót követően mindkét fúziós partner képes volt osztódásra és kallusz képzésre. Annak a ténynek, hogy a fúzióból nem kaptunk hibrid kalluszt egyik lehetséges magyarázata, hogy a szülői sejtekből származó kallusok a tenyésztés során túlnövik a heterofúziós termékeket. E lehetőség kizárására megkíséréltem a fúziós partnerek osztódását meggátolni a szülői protoplasztok fúzió előtti inaktivációjával.

Kettős inaktiváció, vagyis a két fúziós partner eltérő módon történő inaktivációja után ideális esetben csak a fuzionált protoplasztokban mehet végbe a komplementáció, azaz csak a heterofúziós termékek élhetnek túl.

A borsó I genotípusú levélprotoplasztok esetében megpróbálkoztam a sejtmagok röntgen sugárzással történő inaktiválá-

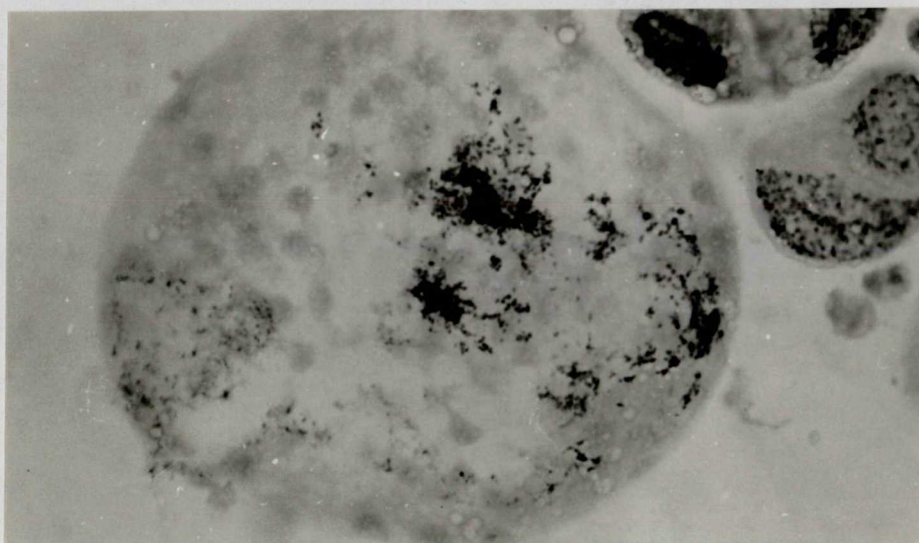
sával. A borsó I levélprotoplasztokat az izolálás után 9000 rad röntgen dózissal kezeltem, amely a kontroll kísérletekben letálisnak bizonyult. A kezelés a sejtmag DNS-ének fragmentálódását okozza, a sejtek osztódásra képtelenné válnak.

A besugárzási kísérletekkel párhuzamosan megpróbáltam olyan borsó genotípust találni, melynek protoplasztjai az általam használt fúziós körülmények között osztódásra képtelenek. Ennek eredményeképpen a Petit provençal fajtán belül találtam olyan genotípus változatot, amely a fenti követelménynek eleget tett. A továbbiakban borsó II-nek nevezett genotípus változat levélprotoplasztjai a fúziót követően is osztódásra képtelenek bizonyultak. Ritkán homofúzióból származó többmagvú borsó protoplasztokban a sejtmagok osztódása megfigyelhető volt, melyet azonban citokinézis nem követett / 15. ábra /.



15. ábra. Citokinézis nélkül osztódott borsó protoplaszt.

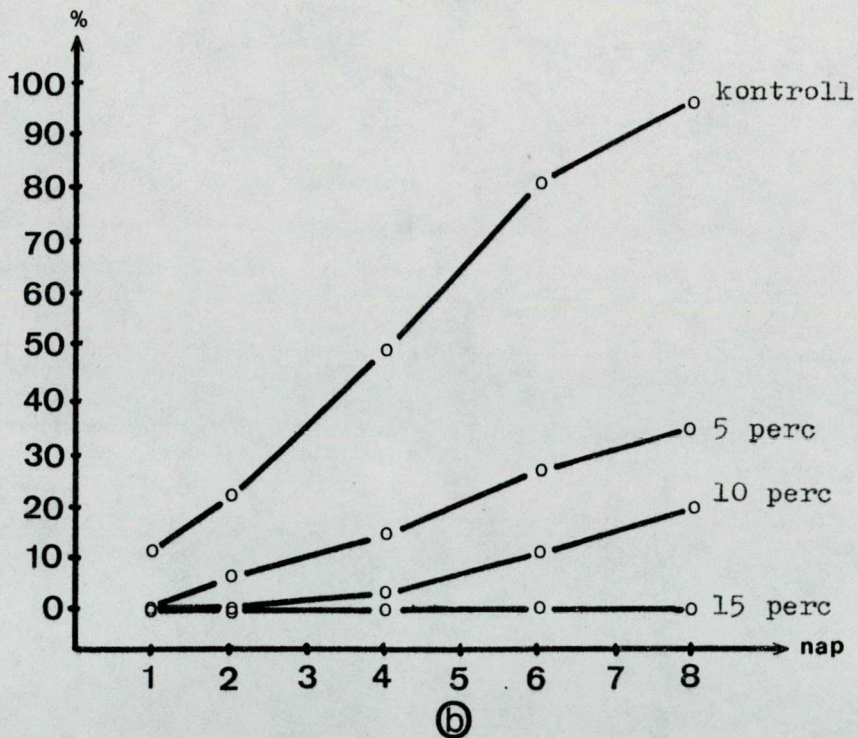
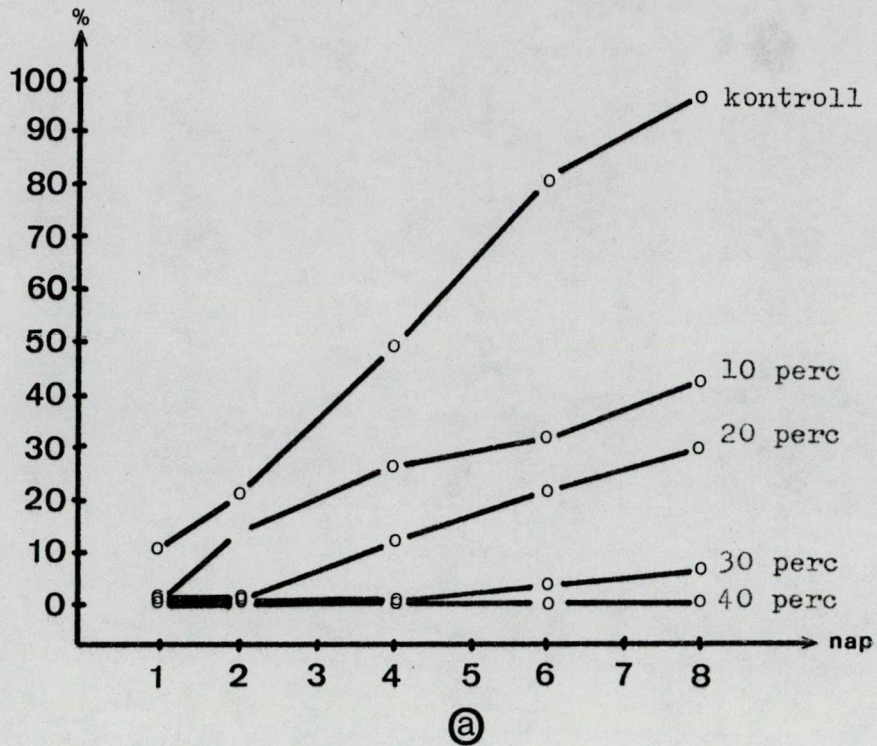
A protoplasztok többségében azonban a sejtmagok néhány nap tenyésztés után degradálódtak / 16. ábra /, és a protoplasztok elpusztultak.



16. ábra. Borsó protoplaszt degradálódott sejtmaggal.

A szója protoplasztok fúzió előtti inaktiválására az irodalomból ismert jódacetamid kezelést használtam. A jódacetamid az SH csoportokkal rendelkező enzimek irreverzibilis gátlásával fejti ki inaktiváló hatását. Meghatároztam azt a legalacsonyabb jódacetamid koncentrációt, amely 100%-os osztódás gátlást képes előidézni. 1 mM jódacetamid koncentrációnál különböző kezelési idők mellett csak viszonylag hosszú / 40 perces / jódacetamid kezelés idézett elő teljes osztódás gátlást / 17. ábra /. 2 mM jódacetamid koncentráció alkalmazásával

15 perc kezelési idő is elegendőnek bizonyult a szója protoplasztok osztódásának teljes gátlásához / 17. ábra /.



17. ábra. a: 1 mM jódacetamid;

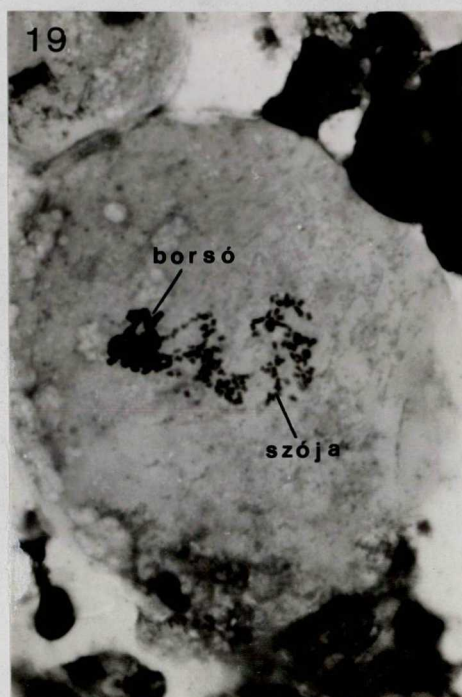
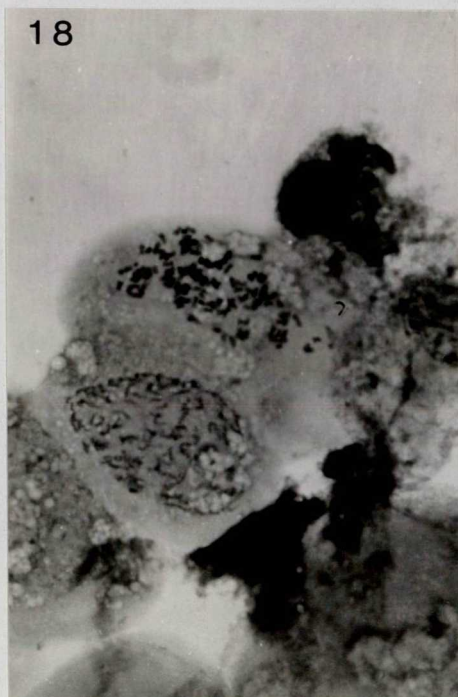
b: 2 mM jódacetamid kezelés hatása a szója protoplasztok osztódási gyakoriságára.

A fentiek alapján a fúzió előtt a szója protoplasztokat 25°C-on végzett 2 mM-os jódacetamiddal történt 15 perces kezeléssel inaktiváltuk. A fúziós kísérletek során az inaktivált szója protoplasztokat vagy röntgen kezeléssel inaktivált borsó I levélprotoplasztokkal, vagy osztódásra képtelen borsó II levélprotoplasztokkal fuzionáltattuk. Az inaktivációs kezelések a fúziós gyakoriságot nem befolyásolták, és a heterofúziós gyakoriság az előbbi kísérletekhez hasonlóan 2-5% között mozgott.

A 6 napos fúziós tenyészetek citológiai vizsgálatát elvégezve azt találtam, hogy az inaktivált protoplasztok fúziójából származó tenyészetekben osztódó sejtek figyelhetők meg. 4 kísérlet átlagában azt kaptuk, hogy az osztódó sejtek 90%-a szója / 18. ábra /, 10%-a szinkron osztódó heterokarion / 19. ábra / volt. A tenyészetekben 6 nap tenyésztés után a különböző morfológiailag ép sejtek előfordulási gyakoriságát a következő táblázat szemlélteti / 3. táblázat /:

nem osztódó szója	nem osztódó het.kar.	osztódott szója	osztódott heterokarion	mitotikus szója	mitotikus heterokarion
16.5%	16.1%	62.3%	0.55%	4.33%	0.37%

3. táblázat. Az inaktivált fúziós tenyészetekben előforduló morfológiailag ép sejtek gyakorisága.

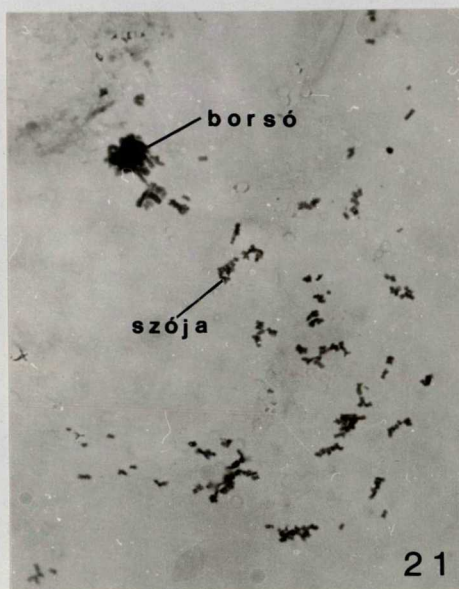
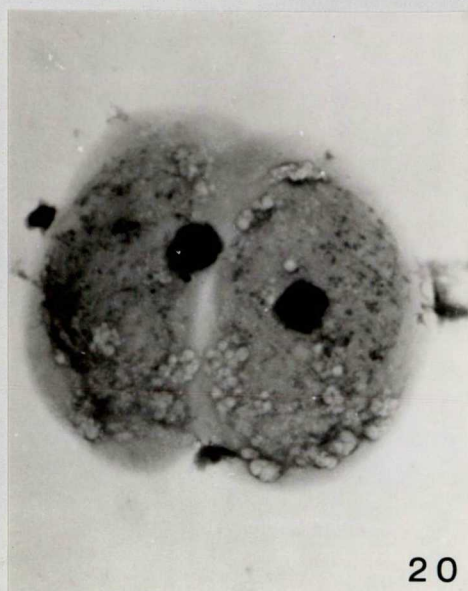


18. ábra. Jódacetamid kezelt osztódó szója sejt.

19. ábra. Inaktivált protoplasztok fúziójából származó szinkron osztódó fúziós termék.

A tenyészetekben morfológiailag ép borsó sejtet nem találtam. Az egyszeri osztódáson átment heterokarionokban a borsó mag minden esetben szeparálva volt /20. ábra/, és a sejt szója morfológiát mutatott. Az esetek 2/3-ában csak az egyik utódsejt tartalmazott borsó magot. A mitotikus heterokarion mérete 4-5-szöröse volt az átlagos sejtméretnek, és valószínűleg nem szintetizált sejtfalat, ezért a mitotikus heterokarionok könny-





20. ábra. Osztódozott heterokarion szeparálódott borsó maggal.

21. ábra. Szétpukkadt mitotikus heterokarion inaktivált fúziós  
tenyészetből.

nyen szétpukkadtak / 21. ábra /. A szétpukkadtt mitotikus hetero-  
karionokban a szülői kromoszómák együtt maradtak / 22. ábra /.

Annak ellenére, hogy 15 perc 2mM-os jódcetamid kezelést követően  
a szója kontrollban osztódó sejtet nem találtam, a fúziós kísér-  
letekben a szója sejtek viszonylag magas osztódási gyakoriságát  
figyeltem meg. A jódcetamid kezelési időt 20 percre emelve azon-  
ban a fúzió után osztódó sejtet, sem heterokariont, sem szülőit  
nem kaptam. 2 mM jódcetamid koncentráció és 15 perc mellett az



22. ábra. Szétpukkadtt mitotikus heterokarion kromoszómái.

inaktivált fúziós partnerekkel végzett fúziós kísérletekből kapott tenyészeteket agarra szélesztve 1 hónapos tenyésztés után sem kaptunk kinövő kalluszt. Ugyanezt tapasztaltam azokban a kísérletekben is amikor borsó II levélprotoplasztokat használtam az inaktivált szója fúziós partnereként.

#### 4.4. A fúziós gyakoriság növelése hideg kezeléssel és a fúziós termékek szelektálása mikromanipulációval

Miután az inaktiválásos fúziós kísérletek sem vezettek eredményre a hibrid kallusz előállítására szempontjából, egy az előzőektől eltérő kísérleti rendszerrel próbálkoztam meg. Egyrészt hidegkezeléssel megnöveltem a fúziós gyakoriságot,

másrészt a heterofúziós termékeket mechanikai úton kiválogattam, elkerülve ezzel az inaktiválást, és ezzel az inaktivációhoz használt jódacetamid esetleges káros hatását a heterofúziós termékek életképességére.

A fúziós gyakoriság megnövelését a szója sejtszuszpenzióinak közvetlenül a protoplaszt izolálás előtti hidegkezelésével értem el. A 10 órán át  $4^{\circ}\text{C}$ -on tartott sejtszuszpenzióból izolált szója protoplasztokkal végre hajtott fúzió során a fúziós gyakoriság 10-12%-ra nőtt, míg a nem kezelt protoplasztokkal végzett fúzió továbbra is csak 2-5%-ot eredményezett. A hidegkezelés a szója protoplasztok életképességét és osztódási gyakoriságát a kontroll tenyészetek szerint nem befolyásolta. A hidegkezelt sejtszuszpenzióból származó szója protoplasztok és a borsó II levélprotoplasztok fúziójából származó heterofúziós termékeket a 3. fejezetben bemutatott készülékkel szelektáltam. A heterofúziós termékek a kloroplasztiszok illetve az amiloplasztiszok együttes jelenléte alapján in vivo a tenyésztés 7. napjáig viszonylag jól megkülönböztethetők. A tenyészetek kb. a tenyésztés 4-6 napjáig optimálisak a heterofúziós termékek kiemelése szempontjából. Ezt megelőzően a heteroplazmás sejtek még túl érzékenyek a mechanikai hatásokra, a 6. nap után pedig már nehezebben különböztet-

tők meg a szülői sejtektől.

A sterilen kiemelt heteroplazmás sejtek tenyésztésére 4 különböző módszert alkalmaztam :

- a. A kiemelt heteroplazmás sejteket egyenként Cuprak petri csésze tenyésztő vájataiba tettem, és a tenyészetből származó kondicionált táptalaj cseppben egyenként próbáltam nevelni a sejteket.
- b. Több kiemelt heteroplazmás sejtet tettem a plastik petri csészébe ragasztott féligáteresztő hártyából kialakított tenyésztő kamrába. A kiemelt sejtek a hártyán keresztül érintkeztek az eredeti tenyészettel.
- c. A kiemelt sejteket lágy agarba ágyazott üvegkarikába tettem. Az agarban lévő szója sejtek dajka tenyészetként szoltak a tenyésztés során.
- d. A heteroplazmás sejteket nylon hálóból képzett bülcsőbe helyeztem, a kiemelt sejtek a háló pórusain keresztül érintkezhettek az eredeti tenyészettel.

A kísérletek eredményeit a 4. táblázat összegzi.

Az a. módszer szerint történt tenyésztéskor a kiemelt sejtek a tenyésztés során végig jól vizsgálhatók fénymikroszkóppal in vivo. A sejtek a tenyésztés folyamán vakuolizálódtak, to-

vábbi osztódás, citokinézis nem történt, és 3 esetet kivéve a sejtek néhány nap / 2-6 nap / elteltével elpusztultak. A három kinőtt kolónia citológiaiilag egyértelműen szójának bizonyult.

tenyésztés módja	kísérletek száma	kiemelt sejtek száma	kinőtt kalluszok száma	kinőtt kalluszok jellege
a.	13	201	3	szója
b.	5	67	4	szója
c.	3	41	0	-
d.	24	405	18	szója

4. táblázat. A mikromanipulátorral kiemelt sejtek tenyésztésének eredményei.

A b. és c. tenyésztési mód sem bizonyult használhatónak a heterofúziós termékek felnevelésére, és a módszer bonyolultsága miatt 8 kísérlet elvégzése után a d. módszert részesítettem előnyben. A nylon hálóban történő tenyésztés minden szempontból kielégítőnek látszott, hiszen a heterofúziós termékek a kiemelés ellenére továbbra is ugyanabban a tenyészetben nőhettek. A módszer hátránya, hogy ebben az esetben a kiemelt sej-

tek fénymikroszkópos megfigyelése a tenyésztés során a kamrán belül lehetetlen volt. A kísérletek nagy száma ellenére ezzel a módszerrel sem sikerült az izolált heterofúziós termékekből hibrid kalluszt kapni. A kinőtt kalluszok ebben az esetben is mindig szójának bizonyultak.

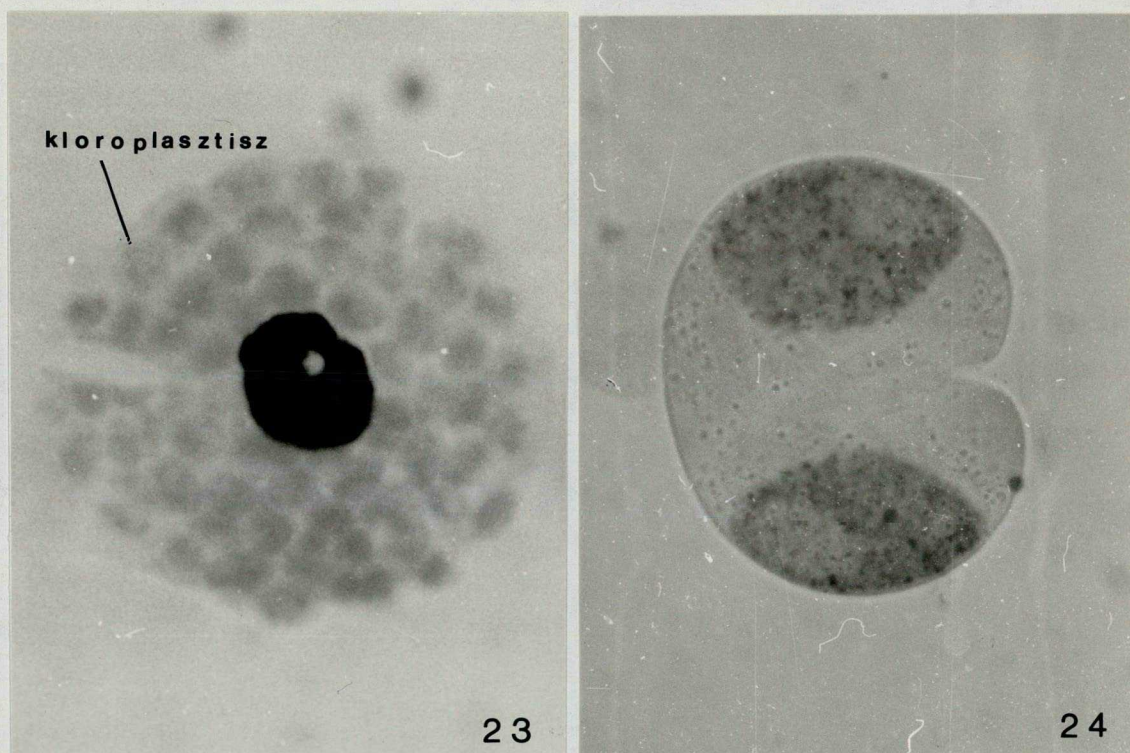
A mikromanipulációval szelektált heterofúziós termékek citológiai vizsgálatát különböző technikai nehézségek miatt nem végezhettem el. Ezek az okok a következők voltak: 1. a kísérletenként mikromanipulációval összegyűjthető ép heterofúziós termékek alacsony száma / kísérletenként 15-25 sejt/ 2. jelenleg nem áll rendelkezésünkre olyan mikrocitológiai módszer, amely 1 vagy 2 sejt megbízható citológiai analizisét / fixálás, differenciált magfestés / lehetővé tenné, ezért miután elsődleges célunk hibrid kallusz izolálása volt, valamennyi mikromanipulációval szelektált heterofúziós terméket továbbtenyésztésre használtunk fel.

#### 4.5. Az inkompatibilitás citológiai vizsgálata a fúziós tenyészetekben

Miután a szója-borsó szomatikus sejthibridizációs kísérletekből hibrid kalluszt előállítani nem sikerült, ennek eset-

leges citológiai okának, illetve a feltételezett celluláris inkompatibilitás citológiai vizsgálattal kimutatható megnyilvánulásának vizsgálata céljából részletes citológiai analízist végeztem a fúziós tenyészetekben. A vizsgálat kvalitatív jellegű volt, minden tapasztalt jelenséget megpróbáltam bemutatni és értelmezni.

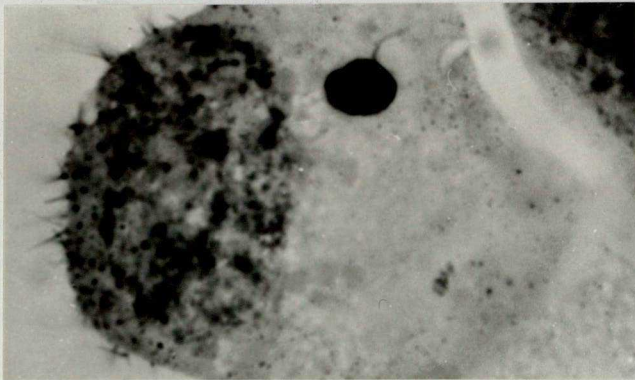
A kombinált Feulgen-Giemsza festéssel a borsó / 23. ábra / és a szója / 24. ábra / sejtmagok egyértelműen megkülönböztethetők voltak a fuzionált sejtekben is.



23. ábra. Interfázisos borsó protoplaszt.

24. ábra. Interfázisos szója sejt.

A borsó sejtek magja erősen festődő kompakt struktúrát mutatott és esetenként megfigyelhető volt a kloroplasztiszok festődése is. A lazább szerkezetű, jellegzetesen szemcsézett szója sejtmagok pedig lényegesen világosabb festődést mutattak. A szója és borsó sejtmagok méretbeli és festődésbeli különbsége alapján a heterokarionok egyértelműen azonosíthatók voltak / 25. ábra /.

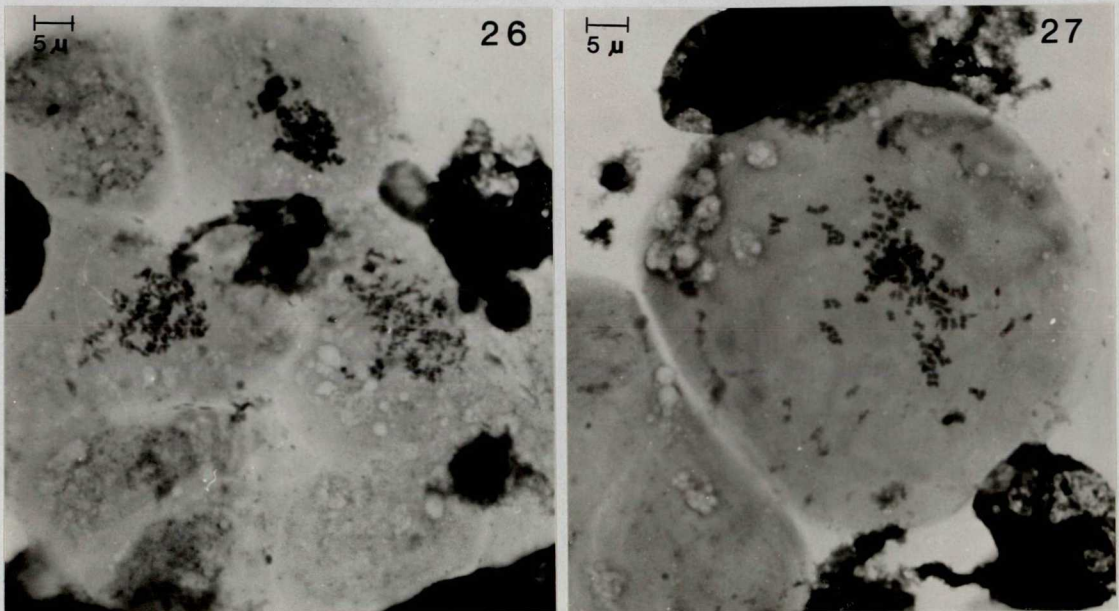


25. ábra. Szója-borsó heterokarion.

A citológiai vizsgálatokat először az inaktiválásos fúziós tenyészetekben végeztük el. 6 napos tenyésztés után a nagyrészt elpusztult populációban csak kis számú ép sejtet figyeltünk meg. Az ép sejtek 82%-a szója volt, amelyek morfológiája általában nem tért el a kezeletlen szója sejtektől / 26. ábra /. Előfordult azonban óriás méretű egyszeri osztódáson át-



ment szója sejt is / 27. ábra /.

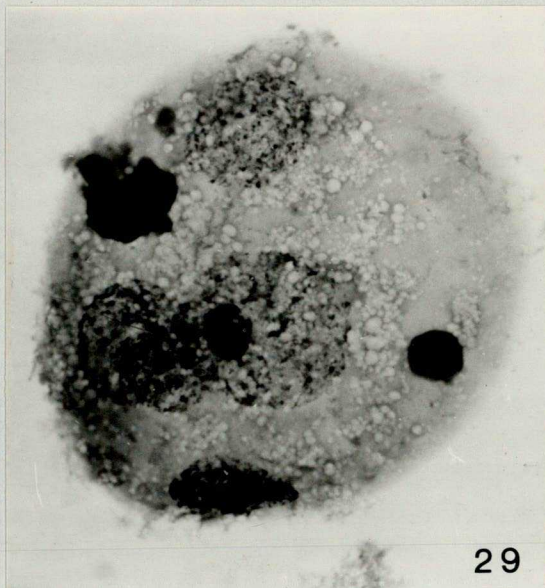
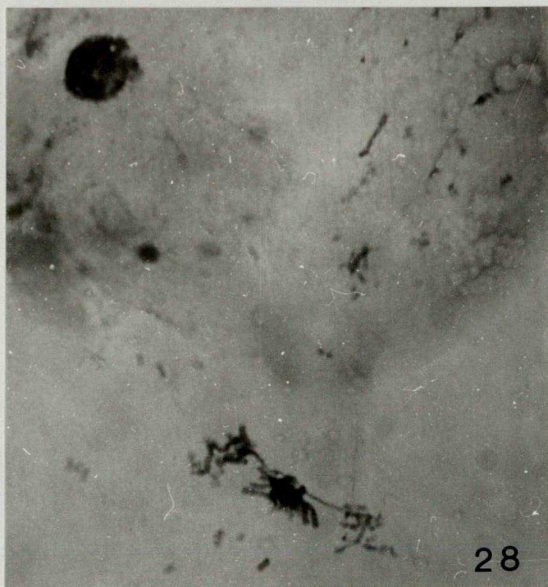


26. ábra. Jódacetamid kezelt szója sejtek.

27. ábra. Jódacetamid kezelt, óriás méretű szója sejt.

Az ábrák jól szemléltetik a tenyészet állapotát is, amelyre jellemző az elpusztult sejtek igen nagy tömege. Az ép és vizsgálható sejtek 17%-a bizonyult heterokarionnak, de ezeknek a sejteknek csak 5.3%-a volt képes osztódásra. A mitotikus heterokarionok óriás méretű sejtek voltak, amelyek a preparálás során gyakran szétpukkadtak / 28. ábra /. A közös mitózisban a borsó kromoszómák együtt maradván elkülönültek a szója kro-

moszómáktól. Ez a későbbi osztódások során a borsó kromoszómák eliminációjához vezethetne. A tenyészetek vizsgálata során azonban csak olyan osztódott heterokarionokat találtunk, amelyek a többszöri osztódás ellenére is egy közös citoplazmában tartalmazzák a magokat, citokinézis láthatóan nem volt / 29. ábra /. Szabályosan osztódott, citokinézisen átment heterokariont nem találtam.



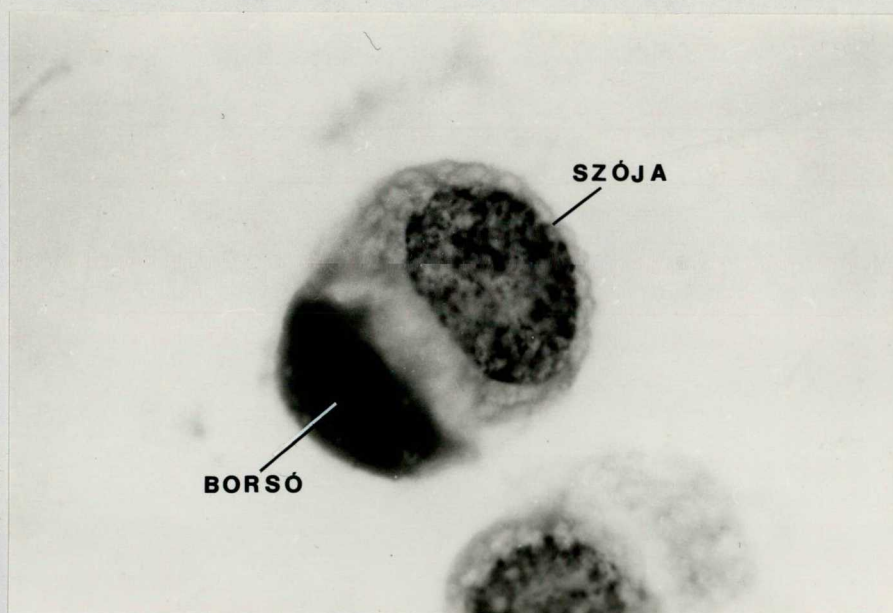
28. ábra. Inaktivációs fúzióból származó mitotikus heterokarion.

29. ábra. Citokinézis nélkül osztódott heterokarion.

A nem inaktivált borsó II és szója protoplasztok fúziójából származó tenyészetek citológiai vizsgálatát is 6 napos

tenyészeteket használva végeztem. Az in vivo fénymikroszkópos vizsgálatok szerint ugyanis a fúziós termékek csak a tenyésztés 4.-5. napjától kezdenek el osztódni, idősebb tenyészetekben pedig már lehetetlen a különböző eredetű kolóniák elkülönítése.

A fúzió következtében kialakult szója-borsó heterokarionok további fejlődése a tenyésztés során különbözőképpen mehet végbe. A 30. ábrán látható heterokarion például egyáltalán nem fejlődött, a két szülői mag teljesen inaktív maradt, 6 nappal a fúzió után is. A borsó protoplasztból származó plazma részben jól láthatók a megfestett kloroplasztiszok, és láthatóan nem keveredett a kétféle szülői citoplazma a fúziót követően.



30. ábra. Szója-borsó heterokarion.

Ha a létrejött heterokarion osztódásnak indul, először mindig a nagy mitotikus aktivitású szója mag osztódása figyelhető meg, a borsó sejtmag inaktív marad / 31. ábra /.



31. ábra. Szója mitózis a heterokarionban.

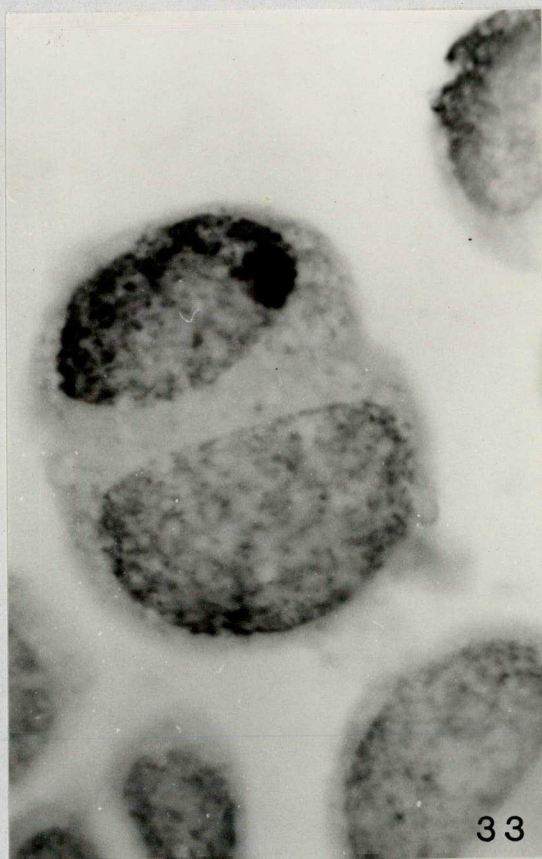
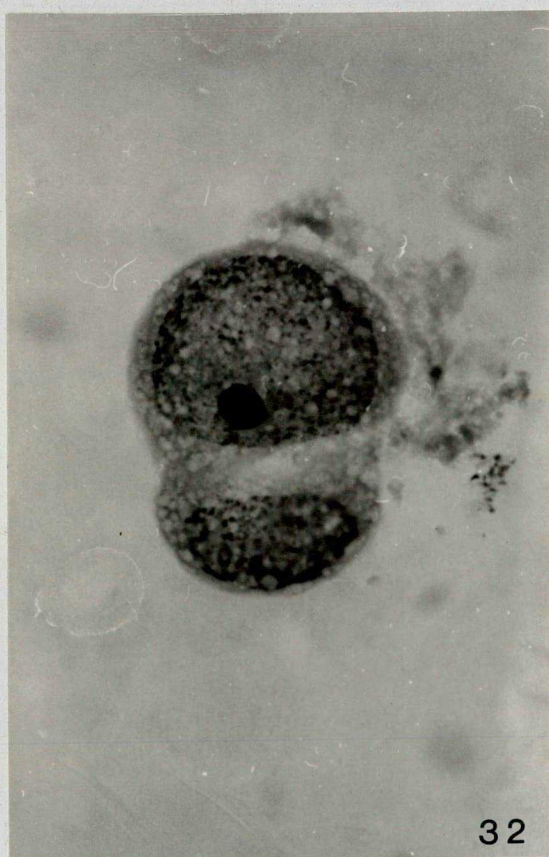
Az osztódó heterokarion fejlődése különbözőképpen mehet végbe:

1. A heterokarionban csak a szója sejtmag osztódik. Az utódsejtek közül az egyikben megtalálható az elkülönült, nem osztódó borsó mag / 32. ábra /. A heterofúziós termék első osztódásának eredménye egy "szegregáns" szója sejt és egy heterokarion.

2. Az inaktív borsó mag teljes egészében az egyik utódsejt

magjába integrálódik, a másik utódsejt magja szója / 33. ábra /.

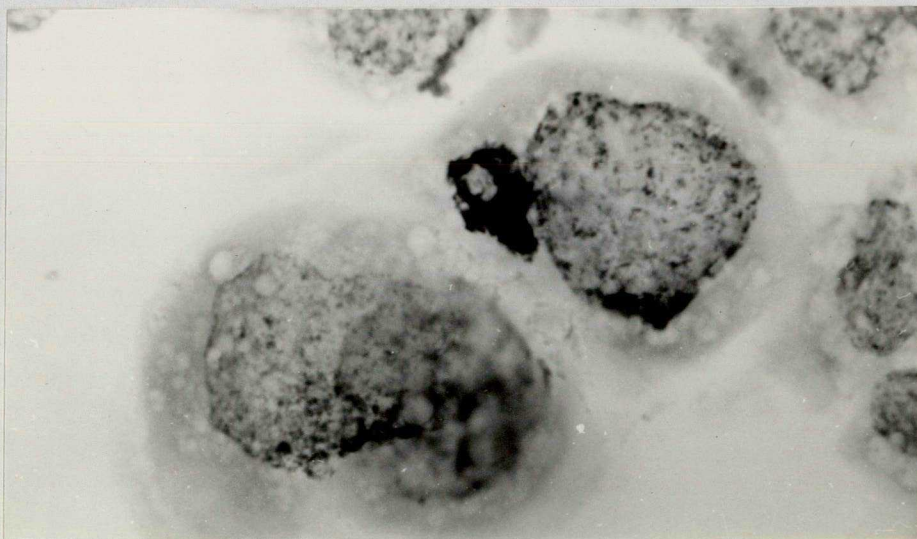
Az integrálódás ellenére könnyen felismerhetők a szülői magok a differenciált festődés alapján. Az erősen festődő borsó mag jelenléte jól kimutatható a laza szerkezetű, világosan festődő szója maganyagban.



32. ábra. Osztódot heterokarion elkülönült borsó maggal.

33. ábra. A borsó maganyag integrálódott a szója magba.

3. A mitotikusan inaktív borsó magnak csak egy része integrálódik az egyik utódsejt magjába, a borsó maganyag többi része elkülönülve marad / 34. ábra /.

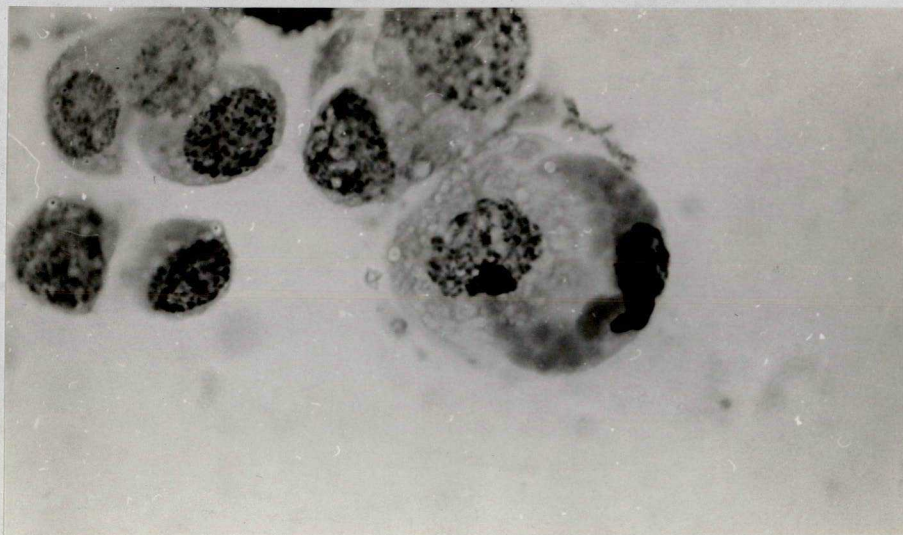


34. ábra. A borsó maganyag egy része integrálódott az utódsejt magjába.

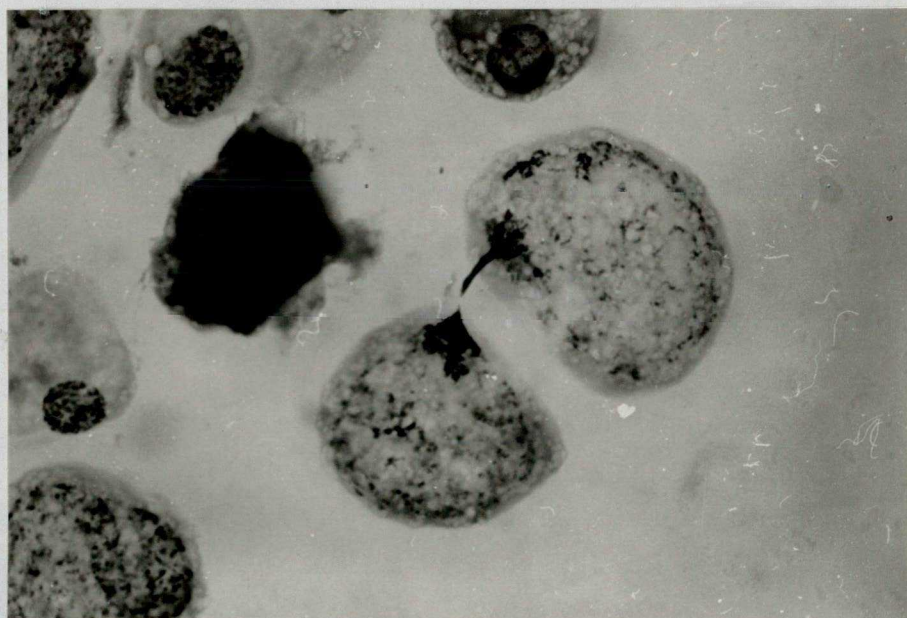
4. A mitotikusan inaktív borsó maganyag még a citokinézis előtt mindkét utódsejt magjába integrálódik / 35. ábra /. A képen látható esetben még a citoplazmák keveredése sem tökéletes, ezt mutatja a festődött kloroplasztiszok szeparálódása az egyik sejtrészben.

5. A nem osztódó borsó mag anyaga mindkét utódsejt magjába integrálódik. Az inaktív magot a citokinézis folyamata mecha-

nikusan ketté osztja / 36. ábra /.



35. ábra. Citokinézis előtt integrálódott a borsó mag az utódsejtek magjába.



36. ábra. A borsó maganyagot a citokinézis ketté osztja.

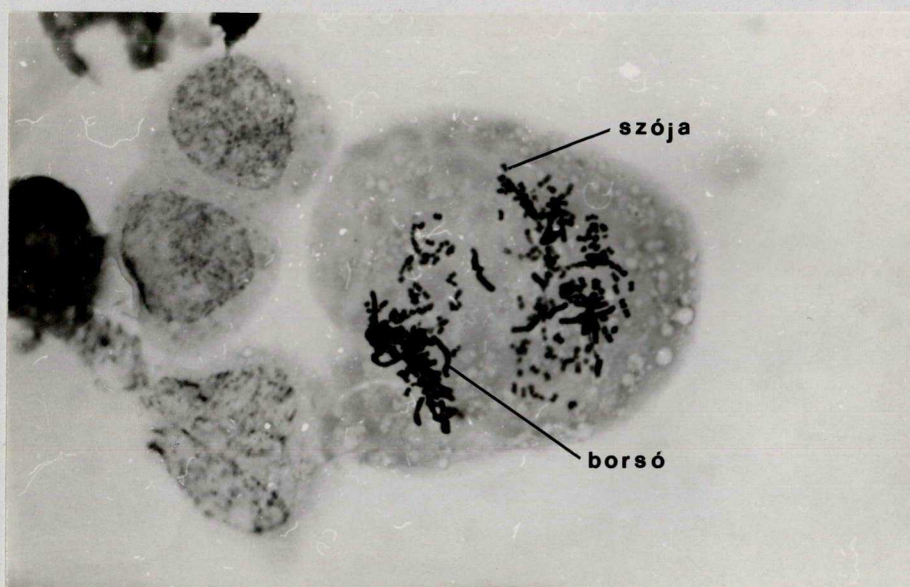
6. A mitotikusan inaktív borsó maganyag mindkét utódsejt magjába integrálódik. Az utódsejtek hibrid volta a citokinézist követően is jól felismerhető a magok differenciált festődése alapján / 37. ábra /.



37. ábra. Osztódott szója-borsó hibridsejt.

7. A borsó mag mitotikus aktiválódása csak a szója magok előzetes osztódását követően figyelhető meg, és csak a szójával közösen osztódva / 38. ábra /. A szinkron mitózisban könnyen felismerhetők a nagy méretű borsó kromoszómák a nagy számú apró szója kromoszóma között. Önállóan osztódó borsó sejtet sohasem figyeltem meg.





38. ábra. Szinkron osztódó heterokarion.

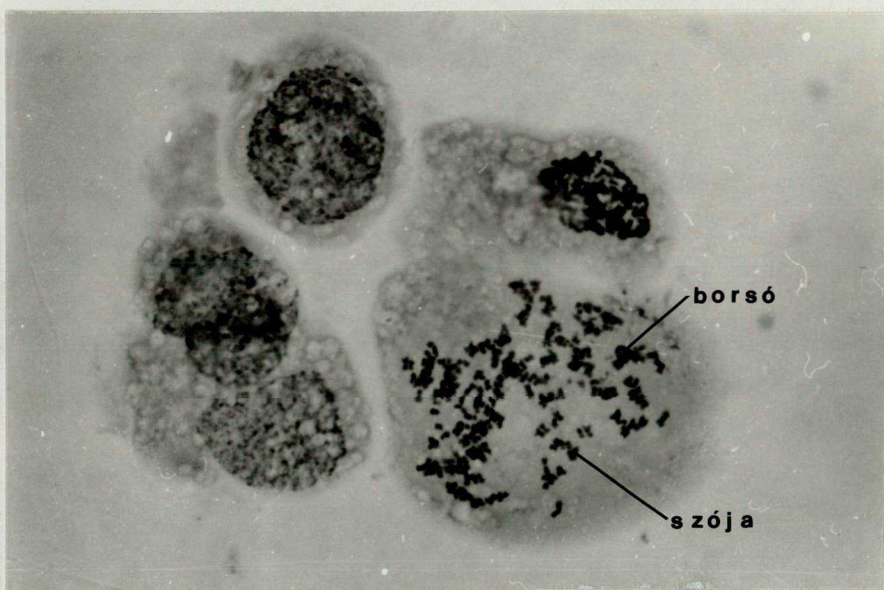
8. A 39. ábrán egy heterokarionból osztódással kialakult sejtcsoport látható, melyben a szója sejtmag osztódása nyilvánvalóan megelőzte a borsó maganyag mitózis nélküli, feltehetően korai kromoszóma kondenzációval / PCC / kialakult kettéválását a szója mag második osztódása során.

9. A 40. ábra a szinkron mitózist követően a borsó és szója kromoszómák egyenlőtlen eloszlását mutatja a hibrid utódsejtekben. Az egyik utódsejt csak 1 nagy borsó kromoszómát és számos apró szója kromoszómát hordoz, míg a másik sejtben a bor-

só kromoszómák vannak többségben a szójával szemben.



39. ábra. Feltehetően PCC-vel kialakult osztódott heterokarion.



40. ábra. Egyenlőtlen kromoszóma eloszlás az utódsejtekben.

10. A többszöri osztódáson átment hibridsejteket vizsgálva azt tapasztaltam, hogy a heterokarion első néhány osztódását követően kialakult utódsejtektől eltekintve a későbbi osztódások során borsó kromatin jelenlétét citológiai módszerekkel kimutatni nem sikerült / 41. ábra /. A borsó maganyag eliminációja figyelhető meg a hibridsejtek osztódása során.



41. ábra. Heterokarion osztódásából kialakult sejtcsoport.

## 5. Eredmények megvitatása

Az irodalomból eddig ismert szója-borsó szomatikus sejt-hibridizációs kísérletek / Kao és mtsai, 1974; Constabel és mtsai 1975, 1976; Fowke és mtsai, 1977 /eredményei alapján arra következtettek, hogy a szója-borsó hibridekben az általuk vizsgált fejlődési szintig nem lép fel inkompatibilitási reakció. Ezekre az adatokra támaszkodva próbálkoztunk meg sejt-szuszpenzió eredetű szója és mezofill levélprotoplasztok fúziójából hibrid kallusz előállításával.

A Petit provencal borsófajta I-es genotipusú növényeiből izolált mezofill levélprotoplasztok és az SB-1 szója sejtszuszpenzióból származó protoplasztok fúzióját követően a tenyészetek in vivo fénymikroszkópos és citológiai vizsgálata egyaránt megerősítette az eddigi irodalmi adatokat / Kao és mtsai, 1974; Constabel és mtsai, 1975; 1976 /, osztódó hibridsejtek voltak megfigyelhetők a fúziós tenyészetekben. Ellentétben azonban Kao és mtsai / 1974 / illetve Constabel és mtsai / 1976 / megfigyeléseivel a fúziós tenyészetekben a heterofúziós termékek mellett mindkét szülői partner képes volt osztódásra, sőt mindkét szülői sejtpopuláció előbb kezdett osztódni, mint a hetero-

fúziós termékek / 2. táblázat /. A fúziós tenyészetekből származó borsó kalluszok morfológiai kapacitással is rendelkeztek, hormonmentes Médium 1 agaros táptalajon gyökér organizációt mutattak. A borsó levélprotoplasztok tenyésztésével foglalkozó irodalomból eddig hasonló eredmény nem ismeretes / Constabel és mtsai, 1973; Arnolds és mtsai, 1976; Shi-rong Jia, 1982 /.

A várakozással ellentétben a fúziós tenyészetekből a tenyésztés során csak borsó és szója kalluszokat kaptunk. Tekintve, hogy a tenyészetben mind a szülői mind a fúziós termékek osztódtak, a hibrid kallusz kialakulásának hiánya magyarázható a szelekció hiányával és az alacsony fúziós gyakorisággal. Ezeknek az okoknak a kiküszöbölése céljából alkalmaztunk a további kísérletek során inaktivációs szelekciós módszereket. A szója protoplasztokat jódacetamid kezeléssel inaktiváltuk a fúzió előtt, amely az SH tartalmú enzimsoportokat gátolva a sejtek 100%-os inaktivációját biztosította a kontroll tenyészetekben. A fúziót követően azonban azt tapasztaltam, hogy a kontroll tenyészetekben letális jódacetamid kezelés a fúziós tenyészetekben nem biztosította a szója sejtek inaktivációját. Ez a megfigyelés nem egyezik az eddigi irodalmi adatokkal

/ Nehls,1978; Medgyesy és mtsai,1980; Lázár,1980 /. A jelenség egyik lehetséges magyarázata lehet, hogy a jódacetamid kezelés különbözőképpen hatott az egyes szója protoplasztokra, és a más-más módon gátolt protoplasztok homofúziója során komplementációval helyreállhat az osztódási képesség. A jódacetamid kezelés mindezek ellenére biztosította a heterokarionok arányának háromszorosára történt növekedését az osztódásra képes populáción belül.

A borsó I levélprotoplasztokat röntgen kezeléssel inaktiváltuk a fúziót megelőzően / Dudits és mtsai,1980 /. A használt kezelés teljes mértékben biztosította a borsó partner inaktivációját a fúziós tenyészetekben is. Ennek ellenére később a borsó II genotípusú növényekből származó levélprotoplasztokat alkalmaztuk fúziós partnerként, mivel ezek a levélprotoplasztok inaktiváció nélkül is képtelenek voltak osztódásra mind a kontroll, mind a fúziós tenyészetekben.

Az inaktivációs fúziós kísérletekből származó tenyészetekből nem kaptunk kinövő kalluszt. A tenyészetek citológiai vizsgálatából kitűnt, hogy a fúzió során létrejönnek ugyan heterokarionok, de ezeknek a sejteknek 94%-a nem osztódott. Az osztó-

dott heterokarionokban sok esetben nem volt eldönthető, hogy nem egy osztódásra képtelen borsó magot hordozó osztódott szója sejtről van-e szó, amely nem teszi lehetővé hibrid kallusz kialakulását a későbbi osztódások során sem. A mitotikus heterokarionok jellegzetes morfológiát mutattak, 4-5-szörös méretre duzzadtak és citoplazmájuk világossá vált a szója sejtekhez viszonyítva. Találtam azonban hasonló morfológiájú szója sejteket is, így ez az alaki változás feltehetően nem a heterokarion állapot következménye. Hibridsejtek citokinézisen átment formáját a tenyészetek vizsgálata során nem figyeltem meg. Az inaktivációs fúziós kísérletek eredménytelenségét magyarázhatja a jódacetamid káros hatása az alacsony fúziós gyakoriság miatt amúgyis kis számú heterokarionok életképességére. Ezért ennek a lehetőségnek a kiküszöbölése érdekében az inaktivációval történő szelekció helyett inkább a heterofúziós termékek mikromanipulációval történő szelektálását alkalmaztam a további fúziós kísérletek során.

Yamada és mtsai / 1980 / megfigyeléseivel megegyezően a fúziós gyakoriság növekedését tapasztaltam a szója sejtszuspenzió protoplaszt izolálás előtti hidegkezelésének eredményeként.

A fúziós gyakoriság megnövelése előfeltétele volt a heterofúziós termékek mikromanipulációval történő szelektálásának. A hidegkezelés következtében létrejött 10-12%-os heterofúziós gyakoriság elegendő heterofúziós terméket biztosított értékelhető kísérletek elvégzéséhez. A kiemelt nagy számú heterokarion a különböző tenyésztési módszerek mellett sem eredményezett hibrid kallusz kialakulását. A 3. táblázatban összegzett kísérletek eredménytelensége a hibrid kallusz kialakulása szempontjából a következőképpen magyarázható:

1. A kiemelt heterofúziós termékek egy bizonyos stádiumig életképesek, de a kallusz szövet képződése gátolt.
2. A heterofúziós termék osztódása során a borsó genetikai anyaga eliminálódik, azaz a szója szegregál és a szója túlnövi a hibrid szövetet.
3. Miután a vizuális szelekciónál lényeges marker a kloroplasztisz jelenléte, nem zárható ki, hogy bizonyos százalékban heterofúziós termékként olyan szójakat emeltem ki, amelyek kloroplasztiszt vettek fel, tehát nem valódi heterokarionok.

A szója borsó II protoplasztfúzióból származó tenyész-





tek citológiai vizsgálata során arra kerestem választ, hogy mi történik a heterokarionok fejlődése során, s hogy találok-e citológiai bizonyítékot a feltételezett inkompatibilitásra.

A vizsgálatokból kiderült, hogy a kialakult heterokarionok többsége képes osztódásra, de az osztódások során a borsó mag gyakran elkülönülve marad, nem jön létre hibrid mag. Ezekből a heterokarionokból hibrid kallusz kialakulása nem várható / 30. 31. 32. ábra /.

Azokban az esetekben, amikor a borsó maganyag egésze vagy része integrálódik a szója magba, tehát kialakul a hibrid sejtmag, gyakori, hogy a szója sejtek további osztódása során sem válik a borsó maganyag mitotikusan aktívá. A megfigyelt osztódott heterokarionokat értékelve azt tapasztaltam, hogy a szója sejtmag osztódása mindig megelőzi a borsó osztódását. A 39. ábrán látható sejtcsoport is a heterokarionban található 1 vagy 2 szója sejtmag osztódásával indult, a borsó mitotikusan inaktív maradt és elkülönült. A szója magok második osztódásakor - feltehetően a szója magok hatásának következtében létrejött PCC során - a borsó maganyag mitózis nélkül ketté vált és a két utódsejt közül az egyiknek a magjába integrálódott is. A sejtek további osztódása során az ilyen módon integrálódott

és egyenlőtlenül eloszlott borsó kromatin is aktiválódhat mitotikusan. Ennek citológiai bizonyítéka a 40. ábra, amelyen megfigyelhető, hogy a borsó maganyag ketté válása és integrálódása az utódsejtek magjába a szója sejtmagok osztódását követően történt meg. Az egyenlőtlenül eloszlott mitotikusan inaktív borsó maganyag a további osztódás során aktiválódott, kromoszómát képzett és résztvett az utódsejtek mitózisában. Feltételezhető, hogy ez az az állapot, amikor a borsó tartósan képes integrálódni a szójába, amennyiben valamilyen szelekciós nyomással megakadályozhatjuk a borsó kromoszómák eliminációját.

Ha a borsó maganyag a szója sejtek további osztódása során sem válik mitotikusan aktívá a hibridben, a tenyésztés során az osztódó sejtekből eliminálódik, elvész. Az elimináció a celluláris inkompatibilitás megnyilvánulásának tekinthető.

Az inkompatibilitás azonban sok esetben nem lép fel rögtön az első osztódások során, mint ezt már más szerzők is leírták

/ Kao és mtsai, 1974; Constabel és mtsai, 1975; 1976/. Előfor-

dul, hogy a borsó mag a szója magok osztódását követően mitotikusan aktiválódik, kromoszómát képez és résztvesz a szinkron osztódásban és az utódsejtek magképzésében. A kromoszóma elosz-

lás azonban mindig egyenlőtlen. A hibrid sejtek osztódása során a borsónak a szójához képest viszonylag lassú osztódása és a borsó kromoszómák eliminációja miatt a mitotikusan aktív borsó maganyag is eliminálódik a hibridből, és citológiai módszerekkel azonosítható hibrid kallusz nem alakul ki. Ebben az esetben az elimináció oka feltehetően a szója és borsó magok sejtciklusának aszinkronitása, ami pedig az inkompatibilitás megnyilvánulásának tekinthető.

A kísérleti eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy az SB-1 sejtszuszpenzió eredetű szója protoplasztok és a borsó Petit provencal I-II genotípusú mezofill eredetű levélprotoplasztok fúziójából származó heterokarionokban:

- a. Van celluláris inkompatibilitás, melynek következtében nem alakul ki a heterokarionokban szimmetrikus osztódás.
- b. Ez az inkompatibilitási reakció nem olyan mértékű, hogy megakadályozná a szülői magokból a kromoszóma képződést és a közös szinkron osztódás kialakulását.
- c. Az inkompatibilitás legnyilvánvalóbb citológiai bizonyítéka a borsó maganyag mitotikusan inaktív vagy aktivizálódott formában egyaránt tapasztalható eliminációja, amelynek valószínűleg elsődleges oka a szója és borsó sej-

tek sejtciklusának aszinkronitása.

- d. Az inkompatibilitás ellenére a borsó maganyag integrálódhat a szója genomba, osztódhat, tehát direkt szelekcióval benttartható a hibridben, de valódi hibrid, amelyben mindkét szülői maganyag 1:1 arányban van jelen feltehetően nem állitható elő.

## 6. Összefoglalás

Dolgozatomban ismertettem az SB-1 szója sejtszuszenzió eredetű protoplasztok és borsó Petit provencal I-II genotipusú mezofill levélprotoplasztok fúziójával végzett sejthibridizációs kísérleteket, és a fúziós tenyészetek citológiai analizisét.

1. A szója és borsó I-II genotipusú levélprotoplasztok fúzióját követően kialakulnak hibridsejtek, amelyek osztódásra képesek.
2. A fúziós tenyészetekből szelekciós módszerek alkalmazásával sem sikerült hibrid kalluszt létrehozni.
3. A fúziós tenyészetek citológiai vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a létrejött heterokarionokban az osztódások során fellép olyan inkompatibilitási reakció, amely a borsó maganyag fokozatos eliminációját okozza.
4. Az inkompatibilitás azonban nem akadályozza a borsó maganyag integrálódását a szójába, a hibrid sejt osztódását, tehát direkt szelekcióval a borsó maganyag benntartható lenne a hibridben, de olyan valódi hibrid, amelyben mindkét szülői genom 1:1 arányban van jelen, valószínűleg nem állitható elő.

7. Irodalomjegyzék

1. Arnold, S. and Eriksson, T. /1976/ Factors influencing the growth and division of pea mesophyll protoplasts. *Physiol. Plant.* 36, 193-196.
2. Baker, J.R. /1969/ Cytological technique. 58.
3. Bonner, W.A., Hulett, H.R., Sweet, R.G. and Herzenberg, L.A. /1972/ Fluorescence activated cell sorting. *Rev. Sci. Instrum.* 43, 404-409.
4. Carlson, P.S., Smith, H.H. and Dearing, R.D. /1972/ Parasexual interspecific plant hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2292-2294.
5. Conger, A.D. and Fairchild, L.M. /1953/ A quick-freeze method for making smear slides permanent. *Stain Tech.* 28, 281-283.
6. Constabel, F., Kirkpatrick, J.W. and Gamborg, O.L. /1973/ Callus formation from mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*. *Can. J. Bot.* 51, 2105-2106.
7. Constabel, F., Dudits, D., Gamborg, O.L. and Kao, K.N. /1975/ Nuclear fusion in intergeneric heterokaryons. *Can. J. Bot.* 53, 2092-2095.

8. Constabel, F., Weber, G., Kirkpatrick, J.W. and Pahl, K.  
/1976/ Cell division of intergeneric protoplast fusion products. *Z. Pflanzenphysiol.* 79, 1-7.
9. Constabel, F., Koblitz, H., Kirkpatrick, J.W. and Rambold, S.  
/1980/ Fusion of cell sap vacuoles subsequent to protoplast fusion. *Can. J. Bot.* 58, 1032-1034.
10. Dixon, M. and Webb, E.C. /1979/ Enzyme inhibition and activation. In: *The enzymes* Acad. Press. New York and London 332-381.
11. Dudits, D., Raskó, I., Hadlaczky, Gy. and Lima-de-faria, A.  
/1976/ Fusion of human cells with carrot protoplasts induced by polyethylene glycol. *Hereditas* 82, 121-124.
12. Dudits, D., Kao, K.N., Constabel, F. and Gamborg, O.L.  
/1976 a/ Fusion of carrot and barley protoplasts and division of heterokaryocytes. *Can. J. Genet. Cytol.* 18, 263-269.
13. Dudits, D., Hadlaczky, Gy., Lévi, É., Fejér, O., Haydú, Zs. and Lázár, G. /1977/ Somatic hybridization of *Daucus carota* and *Daucus capillifolius* by protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.* 51, 127-132.

14. Dudits, D., Hadlaczký, Gy., Bajszár, Gy., Koncz, Cs.,  
Lázár, G. and Horváth, G. /1978/ Plant regeneration from  
intergeneric cell hybrids. *Plant Sci. Lett.* 15, 101-112.
15. Dudits, D., Koncz, Cs., Bajszár, Gy., Hadlaczký, Gy.,  
Lázár, G. and Horváth, G. /1979/ Intergeneric transfer  
of nuclear markers through fusion between dividing and  
mitotically inactive plant protoplasts. In: *Proceedings  
of Symp. on plant tissue culture. Pavia.*
16. Dudits, D., Hadlaczký, Gy., Lázár, G. and Haydú, Zs.  
/1980/ Increase in genetic variability through somatic  
cell hybridization of distantly related plants species.  
In: F. Sala, B. Parisi, R. Cella and O. Ciferri /eds./  
*Plant cell cultures: Results and perspectives*, p. 207-  
-214. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
17. Dudits, D., Fejér, O., Hadlaczký, Gy., Koncz, Cs., Lázár,  
G. and Horváth, G. /1980 a/ Intergeneric gene transfer  
mediated by plant protoplast fusion. *Molec. gen. Genet.*  
179, 283-288.
18. Evans, D.A., Wetter, L.R. and Gamborg, O.L. /1980/ Soma-  
tic hybrid plants of *Nicotiana glauca* and *Nicotiana tabacum*



- obtained by protoplast fusion. *Physiol. Plant.* 48, 225-230.
19. Fowke, L.C., Rennie, P.J., Kirkpatrick, J.W. and Constabel, F. /1975/ Ultrastructural characteristics of intergeneric protoplast fusion. *Can. J. Bot.* 53, 272-278.
  20. Fowke, L.C., Constabel, F. and Gamborg, O.L. /1977/ Fine structure of fusion products from soybean cell culture and pea leaf protoplasts. *Planta* 135, 257-266.
  21. Galbraith, D.W. and Mauch, T.J. /1980/ Identification of fusion of plant protoplasts II : Conditions for the reproducible fluorescence labelling of protoplasts derived from mesophyll tissue. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 98. S 129-140.
  22. Gamborg, O.L. and Eveleigh D.E. /1968/ Culture methods and detection of glycanases in suspension cultures of wheat and barley. *Can. J. Biochem.* 46, 417-421.
  23. Gleba, Y.Y., Butenko, R.G. and Sytnik, K.M. /1975/ Protoplast fusion and parasexual hybridization in *Nicotiana tabacum* L. *Dokl. Acad. Nauk. USSR.* 221, 1196-1198.
  24. Gleba, Y.Y. /1978/ Tobacco plants from single mesophyll protoplasts. *Naturwissenschaften* 65, 158-159.
  25. Gleba, Y.Y. and Hoffmann, F. /1978/ Hybrid cell lines *Arabidopsis thaliana* + *Brassica campestris*: No evidence

- for specific chromosome elimination. *Molec. gen. Genet.* 165, 257-264.
26. Gleba, Y.Y. and Hoffmann, F. /1979/ "Arabidobrassica":  
Plant-genom engineering by protoplast fusion. *Naturwissensch.* 66, 547-554.
27. Glimelius, K., Eriksson, T., Grafe, R. and Müller, A.J.  
/1978/ Somatic hybridization of nitrate reductase-deficient mutants of *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion. *Physiol. Plant.* 44, 273-277.
28. Gosch, G. and Reinert, J. /1978/ Cytological identification of colony formation of intergeneric somatic hybrid cells. *Protoplasma /Berl./* 96, 23-38.
29. Hadlaczky, Gy., Burg, K., Maróy, P. and Dudits, D. /1980/  
DNA synthesis and division in interkingdom heterokaryons. *In vitro* 16, 647-650.
30. Harms, C.T. and Potrykus, I. /1978/ Enrichment for heterokaryocytes by the use of iso-osmotic density gradients after plant protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.* 53, 49-55.
31. Harms, C.T. /1982/ Gene expression in higher plant somatic hybrids. *Biol. Rev.*

32. Harms, C.T. /1983/ Somatic incompatibility in the development of higher plant somatic hybrids. *Quart. Rev. Biology*, in press.
33. Hein, T., Przewozny, J. and Schieder, O. /1983/ Culture and selection of somatic hybrids using an auxotrophic cell line. *Theor. Appl. Genet.* 64, 119-122.
34. Hoffmann, F. and Adachi, T. /1981/ Arabidobrassica: Chromosomal recombination and morphogenesis in assymetric intergeneric hybrid cells. *Planta* 153, 586-593.
35. Kao, K.N., Constabel, F., Michayluk, M.R. and Gamborg, O.L. /1974/ Plant protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cells. *Planta /Berl./* 120, 215-227.
36. Kao, K.N. and Michayluk, M.R. /1974/ A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta* 115, 355-367.
37. Kao, K.N. /1977/ Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soybean-Nicotiana glauca. *Molec. gen. Genet.* 150, 225-230.
38. Krumbiegel, G. and Schieder, O. /1979/ Selection of somatic hybrids after fusion of protoplasts from *Datura innoxia* Mill. and *Atropa belladonna* L. *Planta* 145, 371-375.

39. Lázár, G. /1980/ A cikloheximid rezisztencia, mint differenciált funkció megnyilvánulásának szabályozása sárgarépában /*Daucus carota*/. Egyetemi doktori értekezés, JATE Szeged.
40. Márton, L., Dung, T.M., Menczel, R.R. and Maliga, P. /1982/ Nitrate reductase deficient cell lines from haploid protoplast cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Molec. gen. Genet.* 182, 301-304.
41. Medgyesy, P., Menczel, L. and Maliga, P. /1980/ The use of cytoplasmic streptomycin resistance: chloroplast transfer from *Nicotiana tabacum* into *Nicotiana sylvestris*, and isolation of their somatic hybrids. *Molec. gen. Genet.* 179, 693-698.
42. Melchers, G. and Labib, G. /1974/ Somatic hybridization of plants by fusion of protoplasts. I. Selection of light resistant hybrids of "haploid" light sensitive varieties of tobacco. *Molec. gen. Genet.* 135, 277-294.
43. Melchers, G. /1977/ Microbial techniques in somatic hybridization by fusion of protoplasts. *International Cell Biology*, 207-216.

44. Melchers, G., Sacristan, M.D. and Holder, A.A. /1978/  
Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated  
from fused protoplasts. Carlsberg Res. Commun. 43, 203-218.
45. Menczel, L. Lázár, G. and Maliga, P. / 1978/ Isolation  
of somatic hybrids by cloning Nicotiana heterokaryons  
in nurse culture. Planta 143, 29-32.
46. Nehls, R. /1978/ The use of metabolic inhibitors for  
selection of fusion products of higher plant protoplasts.  
Molec. gen. Genet. 166, 117-118.
47. Ninnemann, H. and Jüttner, F. /1981/ Volatile substances  
from tissue cultures of potato, tomato and their somatic  
fusion products- Comparison of gas chromatographic patterns  
for identification of hybrids. Z. Pflanzenphysiol. 103,  
95-107.
48. Power, J.B., Frearson, E.M., Hayward, C. and Cocking, E.C.  
/1975/ Some consequences of the fusion and selective  
culture of Petunia and Parthenocissus protoplasts.  
Plant. Sci. Lett. 5, 197-207.
49. Power, J.B., Berry, S.F., Frearson, E.M. and Cocking, E.C.  
/1977/ Selection procedures for the production of inter-  
species somatic hybrids of Petunia hybrida and Petunia

- parodii. I. Nutrient media and drug sensitivity complementation selection. *Plant Sci. Lett.* 10, 1-6.
50. Power, J.B., Frearson, E.M., Hayward, C., George, D., Evans, P.K., Berry, S.F. and Cocking, E.C. /1976/ Somatic hybridisation of *Petunia hybrida* and *Petunia parodii*. *Nature* 263, 500-502.
51. Praznovszky, T., Kurnik, E., Paál, H. and Dudits, D. /1981/ Sejthibridizációs kísérletek szója és borsó protoplastok fúziójával. *Biológia* 29, 213-218.
52. Sárkány, S. és Szalai, I. /1966/ Növénytárszerkezettani gyakorlatok. Tankönyvkiadó, Budapest. 608.
53. Schieder, O. /1977/ Hybridisation experiments with protoplasts from chlorophyll-deficient mutants of some Solanaceous species. *Planta* 137, 253-257.
54. Schieder, O. /1978/ Somatic hybrids of *Datura innoxia* Mill. + *Datura stramonium* L. var. *tatula* L. *Molec. gen. Genet.* 162, 113-119.
55. Shi-rong Jia /1982/ Factors affecting the division frequency of pea mesophyll protoplasts. *Can. J. Bot.* 60, 2192-2196.



56. Smith, H.H., Kao, K.N. and Combatti, N.C. /1976/ Inter-specific hybridisation by protoplast fusion in *Nicotiana* Confirmation and extension. *J. Hered.* 67, 123-128.
57. Wetter, L.R. /1977/ Isoenzyme patterns in soybean-*Nicotiana* somatic hybrid cell lines. *Molec. gen. Genet.* 150, 231-235.
58. Wetter, L.R. and Kao, K.N. /1980/ Chromosome and isoenzyme studies on cells derived from protoplasts fusion of *Nicotiana glauca* with *Glycine max-Nicotiana glauca* cell hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 57, 273-276.
59. White, D.W.R. and Vasil, I.K. /1979/ Use of amino acid analogue-resistant cell lines for selection of *Nicotiana sylvestris* somatic cell hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 55, 107-112.
60. Wright, W.E. /1978/ The isolation of heterokaryons and hybrids by a selective system using irreversible biochemical inhibitors. *Exp. Cell. Res.* 112, 395-407.
61. Yamada, Y., Hara, Y., Katagi, H. and Senda, M. /1980/ Protoplast fusion: Effect of low temperature on the membrane fluidity of cultured cells. *Plant Physiol.* 65, 1099-1102.

