

LINKOMICIN-REZISZTENS *NICOTIANA PLUMBAGINIFOLIA*
MUTÁNSOK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS GENETIKAI JELLEMZÉSE

Egyetemi doktori értekezés

Cséplő Ágnes

tudományos segédmunkatárs

Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központja

Növényélettani Intézete

1982.



T A R T A L O M J E G Y Z É K

1. Bevezetés	1
1.1. Általános bevezetés	1
1.2. Célkitűzés	3
1.3. Irodalmi áttekintés	3
1.3.1. Linkomicin-rezisztencia prokariótákban	3
1.3.2. Linkomicin-rezisztencia algákban	4
1.3.3. Antibiotikum-rezisztens mutánsok magasabbrendű növényekben	5
2. Anyagok és módszerek	8
2.1. Kísérleti növények	8
2.2. Protoplaszt-izolálás	8
2.3. Mutagén-kezelés	9
2.4. Protoplaszt-tenyésztés	9
2.5. Rezisztens kolóniák szelekciója	10
2.6. Növényregeneráció és növényfenntartás	10
2.7. Az antibiotikum-rezisztencia tesztelése	11
2.7.1. Kalluszeszt	11
2.7.2. Csiranövényteszt	11
2.8. Kromoszómaszám-meghatározás	12
3. Eredmények	15
3.1. Linkomicin-rezisztens sejtvonalak szelekciója	15
3.2. A rezisztens sejtvonalakból regeneráltatott növények morfológiája	16
3.3. A regeneránsok linkomicin-rezisztenciája	19
3.4. A regeneránsok klindamicin-és sztreptomycin-rezisz- tenciája	



3.5. Az LR400, LR407 és LR413 sejt vonal linkomicin- rezisztenciájának öröklődése	21
4. Megvitatás	27
5. Összefoglalás	33
IRODALOMJEGYZÉK	34
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	

1. B E V E Z E T É S

1.1. Általános bevezetés

A növényi sejtekben mind a sejtmag, mind az organel-
lumok /kloroplasztisz, mitokondrium/ tartalmaznak örökítő-
anyagot. A sejtmagban és az organel-
lumokban hordozott ge-
netikai információ eltérő módon öröklődik. A sejtmagban
kódolt tulajdonságok mendeli szabályok szerint, az orga-
nellum-DNS-ben tárolt információk pedig a mendeli szabá-
lyoktól eltérően, általában anyai uton öröklődnek.

Az organel-
lumok DNS-e számos olyan gazdaságilag ér-
tékes tulajdonságot kódol, mint pl. a kloroplasztisz-ge-
nomban lokalizált, növényvédőszerrel szembeni reziszten-
cia /Pfister és Arntzen 1979/. Ezért az organel-
lumok DNS-
ében indukált mutációk egyrészt lehetőséget nyújtanak gya-
korlati szempontból előnyös tulajdonságokkal rendelkező
növényfajok szelekciójához, másrészt alapkutatási problémák
megoldásához is nagy segítséget adnak. Organel-
lum-mutációk
indukciójával felderíthetők az organel-
lumokban végbemenő
biokémiai folyamatok /fotoszintézis, légzés/ egyes lépései.
Segítségükkel nyomon követhető az organel-
lumok viselkedése
különböző rendszerekben, pl. protoplaszt-fuzió után /Galun
és Aviv 1982/. Az organel-
lumok DNS-ében kódolt mutációk
rekombinálásával az organel-
lumok részletes genetikai vizs-
gálata is elvégezhető. Meg kell jegyezni, hogy a virágos

növények többségénél megtalálható anyai öröklésment csak egyirányu organellumátvitelt eredményez, így a természetben nincs mód az organellumokban kódolt tulajdonságok újrakombinálódására /Sears 1980/.

Alacsonyabbrendű eukariótákban az organellumok szegregációja és rekombinációja jól ismert jelenség. Megfelelő mutánsparc létrehozása után rekombinációs gyakoriságon alapuló géntérképezést végeztek *Saccharomyces* élesztőgomba mitokondriális DNS-ével, valamint *Chlamydomonas* zöldalga kloroplasztisz DNS-ével /Gillham 1978/.

Az organellumok kétirányu átvitele protoplaszt-fúzió során lehetővé teszi az organellumszegregáció , és-rekombináció vizsgálatát magasabbrendű növényekben is. Virágos növények organellum-DNS-ében bekövetkező rekombinációt dohány mitokondriumban mutattak ki /Belliard és mt. 1978, Nagy és mt. 1981/, míg kloroplasztisz-DNS-rekombinációról még nincs irodalmi adat. Ez magyarázható azzal is, hogy a kis számban keletkező rekombináns plasztiszok kiválogatása megfelelő számu, szelektálható kloroplasztisz-marker hiányában technikailag nem kivitelezhető. Virágos növényekben ezideig csak egyféle ilyen célra alkalmas, genetikailag jól jellemzett, direkt szelektálható kloroplasztisz-mutánst irtak le /Maliga és mt. 1975/. Ez a mutáns sztreptomycinrezisztens és rezisztenciáját a kloroplasztisz-DNS kódolja.



1.2. Célkitűzés

Célom egy új típusu, kloroplasztisz-DNS-ben kódolt, szövettenyészetben szelektálható mutáns előállítás volt, amely a laboratóriumunkban korábban előállított /lásd 1.3.3. fejezet/ sztreptomycin-rezisztenciámmarkerrel kombinálva felhasználható rekombináns plasztiszok szelekciójára. Algákkal végzett kísérletek alapján erre a célra a linkomicin-rezisztencia-marker látszott alkalmasnak /lásd 1.3.2. fejezet/. A mutáns előállítását *Nicotiana glumbaginifolia* protoplaszttenyészetben végeztem, mivel ez a dohányfaj laboratóriumunkban a citoplazmás genetikai kísérletek általános alanya.

1.3. Irodalmi áttekintés

1.3.1. Linkomicin-rezisztencia prokariótákban

A linkomicin linkozamid típusu antibiotikum, amely a prokarióta típusu 70S riboszóma 50S alegységéhez kötődik. A linkomicin gátolja a peptidkötés kialakulását, amely rövid, funkcióképtelen fehérjék szintéziséhez vezet /Nierhaus és Wittmann 1980/. Linkomicinrezisztens mutáns törzseket izoláltak *E. coli*-ban mutagén kezelés után. A mutáció következtében megváltozott riboszóma-fehérjék nem kötötték az antibiotikumot /Apiron 1967/. A 23S riboszómális RNS megválto-

zása következtében létrejövő linkomicinrezisztenciát *Staphylococcus aureus* törzsnél irtak le /Lai és mt.1978/. Spontán linkomicinrezisztens törzseket találtak *Streptococcus pyogenes*-ben, Ezekben a törzsekben a rezisztenciát plazmid hordozta /Malke 1974/. Plazmid közvetítette rezisztenciát több különböző baktériumtörzsben is kimutattak /Malke és Holm 1981, Welch és mt. 1979/.

1.3.2. Linkomicinrezisztencia algákban

Az algák /és a magasabbrendű növények/ két eltérő típusu riboszómával rendelkeznek. A citoplazmában 80S, a sejtorganellumokban 70S szedimentációs állandóval jellemzett riboszómák találhatóak. Linkomicinnel csak a 70S riboszómákon folyó fehérjeszintézis gátolható.

Klindamicinre, egy linkomicinszármazékra /7-kloro-7-deoxi-linkomicin/ rezisztens *Chlamydomonas reinhardtii* zöldalगतörzset izoláltak sztreptomycinmutagenézis után /Sager 1972/. Az $50 \mu\text{gml}^{-1}$ klindamicinkoncentráción izolált mutáns rezisztenciáját anyai uton örököltette. A klindamicinrezisztenciáért felelős gén a kloroplasztisz-DNS-ben kódolt és a mutáció az 50S riboszómális alegység egyik fehérjéjének megváltozását eredményezte /Schlanger és Sager 1974, Bartlett és mt. 1979/. A klindamicinrezisztenciamutáció a cirkuláris géntérképen egy kapcsolódási csoportot alkot az eritromicin-, sztreptomycin-, neamin-, szpektinomycin-, és kar-

bomicin-rezisztenciamutációkkal /Schlanger és Sager 1974/.

1.3.3. Antibiotikumrezisztens mutánsok magasabbrendű növényekben

A 70-es évek elején megindult nagyarányú kutatás számos különböző mutáns sejtvonalelőállítását eredményezte /Wildholm 1977 a, b, Schieder 1978/. Az antibiotikumrezisztens sejtvonalak az eddig vizsgált mutáns sejtvonalaknak viszonylag kis hányadát képezik /Maliga 1980 a/. A legtöbb antibiotikumrezisztens sejtvonalat dohány szövettanában állították elő. A kanamicin, neomicin és sztreptomycin a prokarióta típusú 70S riboszóma 30S alegységéhez kötődve, míg a kloramfenikol, linkomicin és klindamicin a 70S riboszóma 50S alegységéhez kötődve gátolja a növényi szövetek fehérjeszintézisét /Nierhaus és Wittmann 1980/.

Kanamicinrezisztens sejtvonalat *N. sylvestris* és *N. tabacum* dohányfajban állítottak elő. A részletesen megvizsgált KR103 jelű kanamicinrezisztens *N. sylvestris* sejtvonalelvesztette regenerációs képességét, valamint pigmenthiányos volt /Dix és mt. 1977/. A morfogenezis képessége *N. knightiana* fajjal végzett protoplasztfúzió után visszaállt /Maliga és mt. 1977/. A vonal rezisztens volt sztreptomocinnal és neomicinnal szemben is /Dix 1981 b/. A KR103 vonal kanamicinrezisztenciájának öröklődése egy fúziós kísérlet alapján citoplazmatikus /Menczel és mt. 1978/.

A *N. tabacum*-ban izolált kanamicinrezisztens kalluszvonalakból sikerült növényeket regeneráltatni /Maliga és mt. 1980 b, Owens 1981/. A regeneránsok nagy része azonban elvesztette rezisztenciáját és a növények döntő többsége abnormális virágot hozott. A rezisztensek genetikai jellemzése nem történt meg.

Kloramfenikolrezisztens sejtvonalakokat *N. sylvestris* dohányfajban állítottak elő /Dix 1981 a/. A három különböző vonalból regenerált növények még rezisztensek voltak, de az önbeporzásból, illetve a keresztezésekből származó utódokban nem jelent meg a rezisztencia. A rezisztencia eltűnését epigenetikus változással vagy a szelektált tulajdonság szegregációjával magyarázta a szerző. A kloramfenikolrezisztens sejtvonalak nem voltak rezisztensek sztreptomocinnal és neomicinnel szemben /Dix 1981 b/.

Magasabbrendű növényekben izolált antibiotikumrezisztenciák teljes genetikai analizisét csak sztreptomocinrezisztencia esetében végezték el. A sztreptomocinrezisztencia öröklődése vagy mendeli /Maliga 1981 a/ vagy citoplazmatikus /Maliga és mt. 1975, Umiel 1979/, hasonlóan az algák sztreptomocinrezisztenciájának öröklődéséhez /Gillham 1978/.

A *Nicotiana tabacum* SRL mutáns egyike a genetikailag és biokémiaailag legjobban jellemzett citoplazmatikus mutánsoknak. A kallusz-szinten izolált sejtvonalból fertilis növényt regeneráltattak, amely anyai uton örökitette rezisztenciáját. Elektronmikroszkópos vizsgálatok szerint a mutáns

plastiszok sztreptomycin jelenlétében megőrzik normális ultrastrukturájukat /Maliga és mt. 1973, 1975/. A kloroplastisz-riboszóma-fehérjék kétdimenziós gélelektroforézisével kimutatták, hogy a riboszóma-fehérjék közül legalább egy megváltozott a mutáns növényekben /Yurina és mt. 1978, Capel és mt. 1979/. Antibiotikum-kötési vizsgálatok szerint a mutáns 30S alegységhez tizedannyi sztreptomycin kötődik, mint a vad típuséhoz /Bourque és mt. 1977/. Protoplasztfúzió után a *N. tabacum* SRL szülő kloroplastiszai és a sztreptomycinrezisztencia kapcsoltan szegregáltak /Menczel és mt. 1981/. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az SRL vonalban a rezisztencia plastisz - genomban lokalizált.

A többi citoplazmatikus sztreptomycinrezisztens vonal esetében csak a rezisztencia anyai uton történő átvitele bizonyított, a rezisztencia lokalizációjának pontos helye /plastisz vagy mitokondrium/ nem ismeretes /Umiel 1979, Maliga és mt. 1980 b, Maliga és mt. 1981 b/.

Magasabbrendű növényekben linkomicinrezisztens mutánst még nem állítottak elő, de a linkomicin hatását *in vitro* növényi rendszerekben részletesen megvizsgálták. A linkomicin nagyon hatásos kloroplastisz-fehérjeszintézisgátlónak bizonyult /Ellis és Hartley 1971/. Gátolja a ribulóz-1,5-difoszfát-karboxiláz nagy alegysége /Criddle és mt. 1970, Blair és Ellis 1973/, néhány tilakoidfehérje /Eaglesham és Ellis 1974, Ellis 1975/ és részlegesen a klorofill szinté-

zisét is /Linnae és Stewart 1967, Sárvári és mt. 1976/.
A linkomicin ezen kívül megakadályozza a kloroplasztisz-
membrán normális strukturájának kialakulását /Thomson és
Ellis 1972/.

2. Anyagok és módszerek

2.1. Kísérleti növények

Protoplasztokat diploid / $2n=2X=20$ / és haploid / $n=X=10$ /
Nicotiana plumbaginifolia Viviani növényekből izoláltam. A
növényeket steril körülmények között, termosztátszobában
/28C^o , 16 órás megvilágítás, 1500 lux, 70%-os relativ
páratartalom/ neveltem. Kontrollként felhasználtam a la-
boratóriumunkban izolált, citoplazmatikus sztreptomycin-
rezisztenciát hordozó *N.plumbaginifolia* SR402 és *N.plum-*
baginifolia Npl5 jelű vonalakat /Maliga P. nem közölte/.

2.2. Protoplasztizolálás

Steril körülmények között nevelt haploid *N.plumbagini-*
folia növény leveleit apró darabokra vágva 0,5%-os driselase
/Kyowa Hakko Kogyo Co., LTD Japan/ enzimoldatba tettem. Az
enzimet 0,4M szacharózt tartalmazó K₃-oldatban /1.táblázat/
oldottam /pH=5,6/, majd 0,45 μ m pórusátmérőjű Millipore

filteren átszűrtem. Az enzimatis emésztés 16 órán keresztül történt 26°C -on, gyenge fényben /100 lux/. A protoplaszt szuszpenziót $63\mu\text{m}$ pórusátmérőjű nylon filteren átszűrtem. A protoplasztokat ezután 3 percig 275g-vel centrifugáltam, majd a meniszkuszba feluszott protoplasztokat összegyűjtöttem, W5-mosóoldatban /1. táblázat/ felsuszpendáltam és 30g-vel centrifugáltam két percig.

2.3. Mutagén-kezelés

A frissen izolált protoplasztokat 0,4M glükózt tartalmazó K_3 -tápoldatban szuszpendáltam. 10mM-os N-nitrozo-N-etilurea /NEU/ törzsoldatból 0,1ml-t, ill. 0,3ml-t mértem be 10ml K_3 -tápoldatba, így a tápoldat mutagén-koncentrációja 0,1mM, ill. 0,3mM lett. A mutagén-kezelés után /24 óra, 28°C / centrifugálással /2perc, 30g/ eltávolítottam a mutagén-oldatot és a sejteket 0,4M glükózos K_3 -tápoldatban ujraszuszpendáltam.

2.4. Protoplaszttenyésztés

A protoplasztokat két héten át 0,4M glükózt tartalmazó K_3 -oldatban inkubáltam. A tenyészeteket ezután kihígítottam /10x/ 0,2M glükózt tartalmazó K_3 -tápoldattal, amely



zöldülést indukáló hormonkombinációt tartalmazott / 1mg l^{-1} benziladenint és $0,1\text{mg l}^{-1}$ naftilecetsavat/. A tenyészeteket általában 28C° -on, 16 órás megvilágítás mellett 1500 lx -on tartottam fenn, kivéve a fiatal /két-hetes/ tenyészeteket, amelyeket 100 lx -szal világítottam meg.

2.5. Rezisztens kolóniák szelekciója

A szelekció RMOP-táptalajon /lásd 1. táblázat/ történt. A táptalajt $0,8\%$ -os Difco Bacto-agarral szilárdítottam meg. A linkomicin-hidrokloridot /Medexport Moszkva, USSR/ desztillált vízben oldottam, majd $0,45\mu\text{m}$ pórus-átmérőjű Millipore -filteren átszűrtem. Az antibiotikum-törzsoldat megfelelő mennyiségét autoklávozott / 120C° , $20'$ /, majd 50C° -ra lehűtött táptalajhoz kevertem. A tenyészetek 10 cm átmérőjű petricsészékben átlagosan 1000 kolóniát tartalmaztak. A tenyésztés 28C° -on, 1500 lux megvilágítás mellett történt.

2.6. Növényregeneráció és növényfenntartás

Hajtások indukciója kalluszból RMB, ill. RMOP-/1. táblázat/ táptalajon történt. A hajtásokat gyökereztetés céljából $0,6\%$ agart tartalmazó P-táptalajra tettem /1. táblázat/. A növények steril körülmények közötti fenntartása hormon-

mentes RM-táptalajon /1.táblázat/ történt. A regenerán-
sokat havonta friss táptalajba passzáltam.

2.7. Az antibiotikum-rezisztencia tesztelése

2.7.1. Kalluszeszt

Az antibiotikum-rezisztenciát kalluszdarabok /50mg/
vagy levéldarabok /25mm²/ szelektív RMOP-táptalajon történő
tenyésztésével ellenőriztem. Az RMOP-táptalajon a rezisz-
tens kalluszok megzöldültek. A linkomicin, klindamicin és
sztreptomycin szelektív koncentrációi sorrendben a követ-
kezők: 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ és 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Az antibiotikumokat desztillált vízben oldottam, filter-
rel /0,45 $\mu\text{m } \phi$ Millipore/ sterilre szűrtem és törzsoldat-
ból mértem be. A klindamicint az Upjohn /Puurs, Belgium/,
a sztreptomocint az EGYT Gyógyszervegyészeti Gyártól /Bu-
dapest, Hungary/ vásároltuk. A kalluszok tenyésztési körü-
lményei megegyeznek a 2.4. pontban leirtakkal.

2.7.2. Csiranövényteszt

A magvak felszínét az alábbi módon sterilizáltam:

- mosás 75%-os etanolban 1 percig
- mosás 0,5%-os NaOCl-ban /10%-os háztartási hipoból higit-
va/, 2 perc

- mosás steril desztillált vízzel négyszer
- áztatás $0,5\text{mg ml}^{-1}$ koncentrációju gibberelinsavas oldatban, 2 óra.

A steril magvakat 3% szacharózt, 0,6% agart valamint $100\mu\text{g ml}^{-1}$ linkomicint tartalmazó RM-táptalajon termosztátszobában kicsiráztattam. A kéthetes csiranövények fenotipusát a belőlük $1000\mu\text{g ml}^{-1}$ linkomicint tartalmazó RMOP-táptalajon fejlődő kalluszok pigmentációja alapján is ellenőriztem.

2.8. Kromoszómaszám-meghatározás

Steril körülmények között nevelt növények 1-2 cm-es gyökerét 0,05%-os kolhicin desztillált vizes oldatában 3 órán keresztül kezeltem. Ezután a gyökérvégeket Carnoy-féle rögzítő keverékben /vizmentes alkohol : jégcet = 3 : 1/ fixáltam. Másnap 5-5 percig 96%-os, 75%-os, és 45%-os etanolban, majd desztillált vízben mostam a gyökereket. A gyökereket azután 1N HCl-ban, 60C° -on, 10 percig hidrolizáltam, majd desztillált vízzel öblítettem. A festés a szokásos kárminecetsavas technikával történt /5%-os kármin 45%-os ecetsavban, 15-20 percig/. A megfestett gyökércsucsokat levágtam, tárgylemezre helyeztem, lefedtem, majd enyhe melegítés után dörzspreparátumot készítettem. A metafázisos sejtekben a kromoszómákat Zeiss NU2 kutatómikroszkóp segítségével /1000x-es nagyításnál/ számoltam meg.

1. táblázat. A tápoldatok összetétele

Anyag	K ₃ ¹	RM ²	P ³	RMO ⁴	RMB ⁵	RMOP ⁶	W ₅ ⁷
	koncentráció /mg l ⁻¹ /						
NH ₄ NO ₃	240	1650	330	1650	1650	1650	-
KNO ₃	2400	1900	380	1900	1900	1900	-
CaCl ₂ x2H ₂ O	880	440	440	440	440	440	18400
MgSO ₄	120	180	180	180	180	180	-
NaH ₂ PO ₄ x2H ₂ O	156	-	-	-	-	-	-
KH ₂ PO ₄	-	170	170	170	170	170	-
/NH ₄ / ₂ SO ₄	130	-	-	-	-	-	-
FeSO ₄ x7H ₂ O	28	28	28	28	28	28	-
EDTAx2H ₂ O	37	37	37	37	37	37	-
H ₃ BO ₃	3	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	-
MnSO ₄ x4H ₂ O	10	22	22	22	22	22	-
ZnSO ₄ x7H ₂ O	2,3	10,6	10,6	10,6	10,6	10,6	-
KJ	0,75	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	-
Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	-
CuSO ₄ x5H ₂ O	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	-
CoCl ₂ x6H ₂ O	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	-
NaCl	-	-	-	-	-	-	9000
KCl	-	-	-	-	-	-	400
D-xilóz	250	-	-	-	-	-	-
m-inozit	100	-	-	100	100	100	-
tiamin-2HCl /B ₁ /	10	-	-	1	1	1	-
piridoxin-HCl /B ₆ /	1	-	-	-	-	-	-
nikotinsav	1	-	-	-	-	-	-

1. táblázat /folytatás/

Hormonok	koncentráció /mg l ⁻¹ /						
	K ₃ ¹	RM ²	P ³	RMO ⁴	RMB ⁵	RMOP ⁶	W ₅ ⁷
2,4-D	0,1	-	-	-	-	-	-
benziladenin	0,2	-	-	0,5	1,0	1,0	-
naftilecetsav	1,0	-	-	-	-	0,1	-
indolecetsav	-	-	-	2,0	-	-	-
Kinetin	-	-	-	-	-	-	-

A K₃ tápoldat 7,9g l⁻¹ glükózt, a 2, 3, 4, 5 és 6 jelű táptalajok 30g l⁻¹ szacharózt, a W₅ tápoldat 1g l⁻¹ glükózt tartalmazott. A táptalajok pH-ját KOH-dal 5,6-ra állítottam be. Az agar koncentrációja 0,8% volt.

1. = Kao-féle táptalaj /1974/ módosítva Nagy és Maliga /1976/ által. CaHPO₄ kihagyva, szacharóz helyett 0,4M glükóz
2. = Linsmaier és Skoog-féle RM-táptalaj /1965/.
3. = Módosított RM-táptalaj /Sidorov és mt. 1981/. Az NH₄NO₃ és KNO₃ mennyisége 1/5 része az RM-táptalajban levőnek.
4. = Maliga és mt. 1973
5. = Menczel és mt. 1981
6. = Sidorov és mt. 1981
7. = Medgyesy és mt. 1980

3. Eredmények

3.1. Linkomicinrezisztens sejtvonalak szelekciója

A mutagenizált *N.plumbaginifolia* protoplasztokat három hétig K₃-tápoldatban tenyésztettem. A negyedik héten a kolóniákat szelektív /1000 µg ml⁻¹ linkomicint tartalmazó/ RMOP-táptalajba szélesztettem /lásd 2.5. fejezet/. A linkomicin szelektív koncentrációját egy előző, *N.sylvestris* kallusztenyészettel végzett kísérletben már meghatároztam. 1000µgml⁻¹ linkomicinkoncentráció az eredetileg zöld kalluszok teljes kifehéredését okozta. A linkomicin hatását *N.plumbaginifolia* protoplaszttenyészettel ellenőrizve a zöldülésgátlás azonos koncentrációnál következett be. A linkomicin ebben a koncentrációban nem gátolja a kalluszok növekedését.

Az RMOP-táptalaj magas citokinin-koncentrációja miatt általában a kalluszsövetek zöldülését indukálja. A linkomicin szelektív koncentrációja azonban megakadályozta a szenzitív kalluszok megzöldülését, így csak a rezisztens kalluszok képeztek zöld kolóniákat. Ezeket izoláltam és rezisztenciájukat szelektív linkomicin-koncentrációju táptalajon két alkalommal ismételten ellenőriztem. Azokat a sejtvonalat tekintettem rezisztensnek, amelyek a szelektív táptalajon történő harmadik átoltás után is zöldek maradtak.

Linkomicinrezisztens sejtvonalkat mind haploid, mind diploid *N.plumbaginifolia* protoplaszttenyészetben izoláltam. A rezisztens kolóniák előfordulási gyakoriságát azonban csak a diploid anyagnál tudtam meghatározni /2.táblázat/, mivel a haploid protoplasztokkal végzett kísérlet technikai okok miatt /fertőzés/ kiértékelhetetlen volt ilyen szempontból.

2. táblázat. Linkomicinrezisztens kolóniák gyakorisága diploid *N.plumbaginifolia* protoplaszttenyészetben

Mutagén kezelés	Vizsgált kolóniák száma	Rezisztensek száma	Rezisztensek előfordulási gyakorisága
-	$5,8 \times 10^4$	6	$1,0 \times 10^{-4}$
0,1 mM NEU	$12,0 \times 10^4$	70	$5,8 \times 10^{-4}$
0,3 mM NEU	$4,5 \times 10^4$	31	$6,9 \times 10^{-4}$

3.2. A rezisztens sejtvonalkból regeneráltatott növények morfológiája

Az előállított 107 diploid rezisztens sejtvonalból 91 vonal esetében sikerült RMB-táptalajon hajtásokat regeneráltatni. 12 vonal elvesztette regenerációs képességét, míg négy sejtvonalat fertőzés következtében vesztettem el.

A haploid protoplaszt-tenyészetben izolált rezisztens sejtvonalak közül kettő vonalat vizsgáltam részletesen /LR-400 és LR-401/. Az LR-400 vonalból regenerált növények morfológiája azonos volt a szenzitív *N.plumbaginifolia* növényével /1.ábra/. A növények kromoszómaszáma diploid volt. Az LR-401 vonal esetében a növények a vad típustól eltérő morfológiával és aneuploid kromoszómaszámmal rendelkeztek. A kromoszómaszám 20 és 40 között váltakozott. A normális morfológiától való eltérés legszembetűnőbb jele az volt, hogy az LR-401 növények nem hoztak virágot. Így genetikai analízist az LR-401 növényekkel nem tudtam végezni.

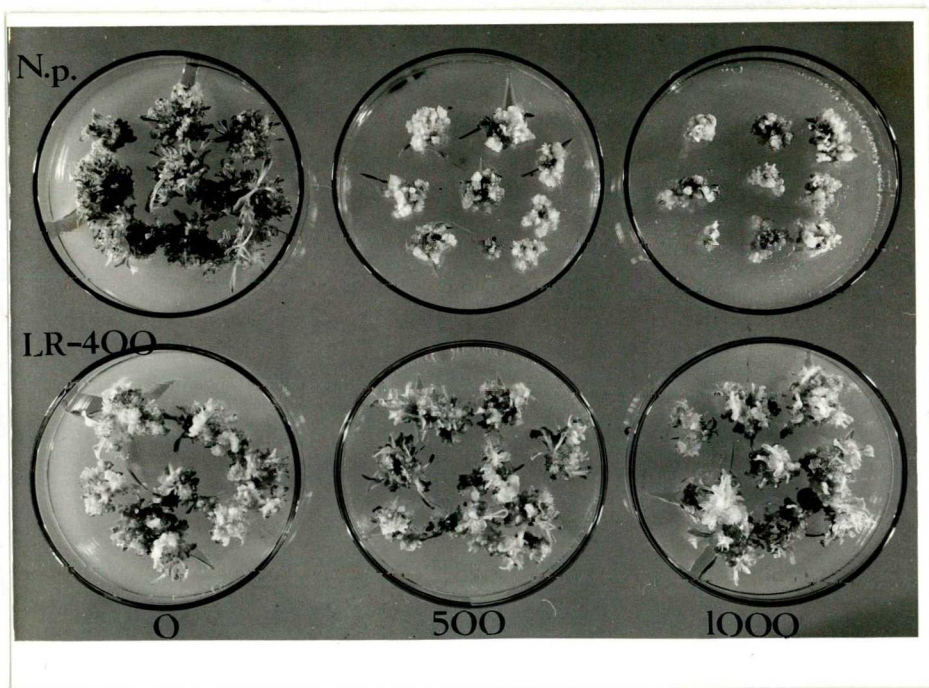
A diploid sejtvonalak közül az LR-407 és LR-413 jelűeket vizsgáltam meg részletesen. Az ezekből a vonalokból regenerált növények normális *N.plumbaginifolia* morfológiával és diploid kromoszómaszámmal rendelkeztek.



1. ábra. A linkomicinrezisztens LR-400 növény és a vad típusu *N. plumbaginifolia* növény morfológiája

3.3. A regeneránsok linkomicinrezisztenciája

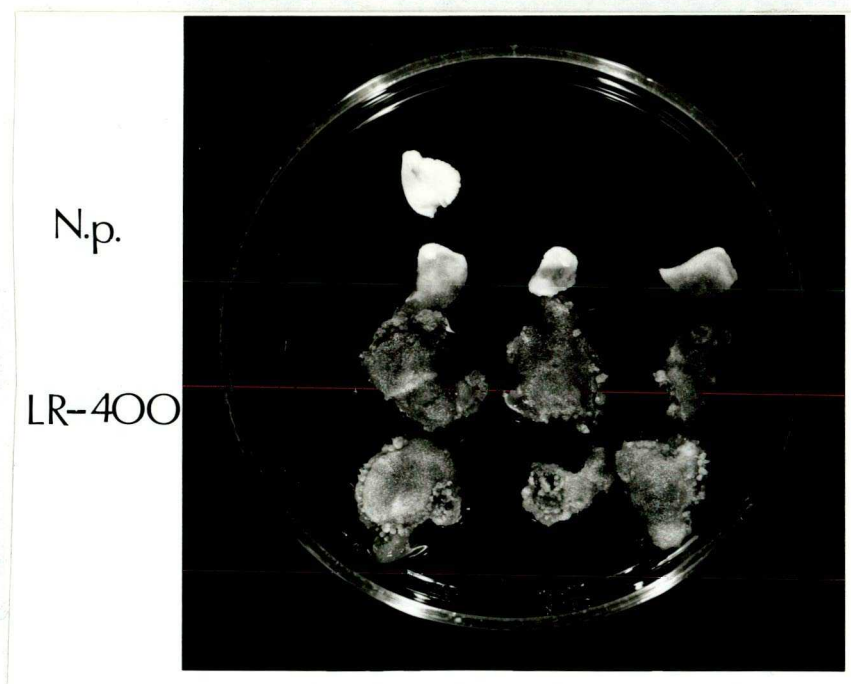
A növények levelének szelektív táptalajon történő tenyésztésével ellenőriztem, hogy azok rezisztensek-e. Mindegyik vonalból 6-6 növényt vizsgáltam meg. A levél-darabokból fejlődő kalluszok zöld színe alapján valamennyi regeneráns rezisztensnek bizonyult /2.ábra/. A 2. ábra az LR-400 vonal linkomicin-levélrezisztencia-tesztjét mutatja be. Kontrollként vad típusu *N.plumbaginifolia* /N.p./ növény leveleit használtam.



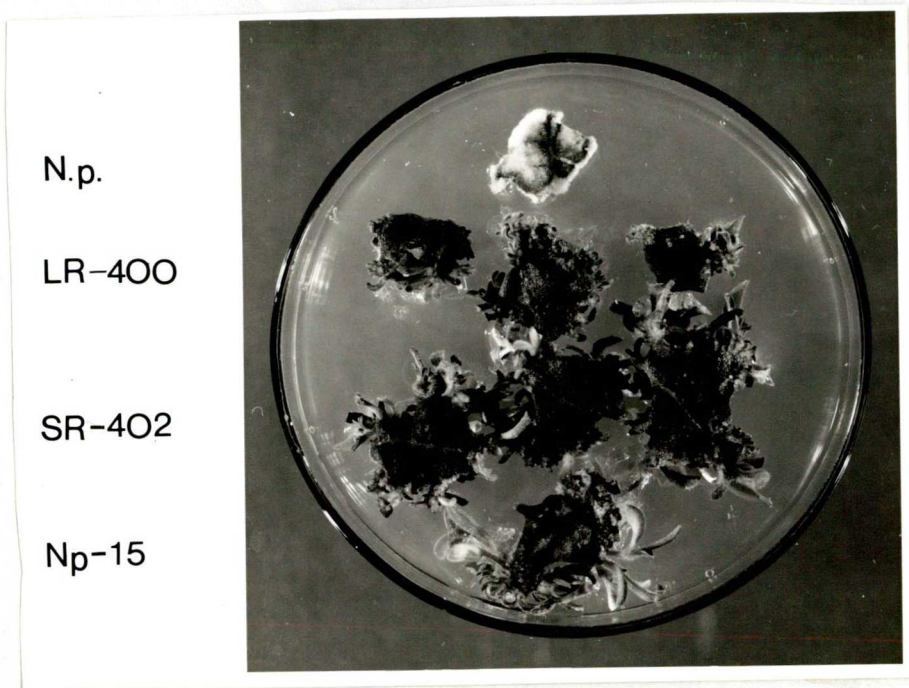
2.ábra. Az LR-400 növény linkomicin-levélrezisztencia-tesztje

3.4. A regeneránsok klindamicin-és sztreptomycinrezisztenciája

A regenerált növényeket klindamicin-/7-kloro-7-deoxi-linkomicin/ és sztreptomycin-rezisztenciára is ellenőriztem levélteszttel /lásd 3.3. fejezet/. Klindamicinre mind a négy vonal rezisztensnek bizonyult. A 3.ábrán az LR-400 vonal klindamicinrezisztencia-tesztje látható. Sztreptomycinrel szemben viszont a regeneránsok érzékenyek voltak /4.ábra/. A 4.ábrán az SR-402 és Npl5 sztreptomycinrezisztens *N.plumbaginifolia* vonalak viselkedését is bemutatom.



3. ábra. Az LR-400 vonal klindamicin-levélrezisztencia-tesztje



4. ábra. Az LR-400 vonal sztreptomycin-levélrezisztencia-
tesztje

3.5. Az LR-400, LR-407 és LR-413 sejtvonallinkomicinre-
zisztenciájának öröklődése

Az üvegházba kiültetett LR-400 növények virágoztak, de önbeporzás után nem adtak életképes magot. Az eredeti szenzitív diploid növényvel való megporzás után viszont sikerült utódokat kapni /F1/. Ezeket a magvakat kicsiráztattam linkomicin-tartalmu táptalajon, ahol valamennyi csiranövény rezisztensnek bizonyult. Az F1-nemzedékből 5 növényt kiültettem az üvegházba. Valamennyi növény virágzott és termékeny volt. Az F1 növényeket önmagukkal /F2/ és a szenzitív növényvel mindkét irányba kereszteztem. A kapott

magvakat szelektív táptalajon kicsiráztattam. Az adatok azt mutatják, hogy az LR-400 vonalban a linkomicinrezisztencia anyai uton öröklődik /3.táblázat/.

A rezisztencia ellenőrzése céljából a csiranövények egy részéből szelektív RMOP-táptalajon kalluszt indukáltattam. A második teszt az előzővel megegyező eredményt mutatott /4. táblázat/. Az utódokban a csiranövény-és kalluszteszt alapján szegregáció /szenzitív egyedek vagy kallusz-szektorok megjelenése/ nem volt /5.ábra/.

Az LR-407 és LR-413 vonalak esetében a linkomicinrezisztencia az F1 nemzedékben szintén anyai uton öröklődött.

3. táblázat. A linkomicinrezisztencia öröklődése az
LR-400 vonalban

Növények	Összes csira- növény száma	Szenzitív csiranövények száma	Rezisztens csiranövények száma
<i>N. plumbaginifolia</i> /önbeporzás/	1112	1112	-
F2	119	0	119
F1 _♀ x <i>N. plumbagini-</i> <i>folia</i> _♂	214	0	214
<i>N. plumbaginifolia</i> _♀ x x F1 _♂	220	220	0

F2 = LR-400_♀ x *N. plumbaginifolia* _♂ keresztezésből származó
növények önbeporzásából adódik

F1 = LR-400_♀ x *N. plumbaginifolia* _♂ keresztezésből származó
növények

4. táblázat. Az LR-400 F2 csiranövények linkomicinre-
zisztenciájának ellenőrzése RMOP-táptalajon

Csiranövények	^c Növekedés		^d Zöldülés	
	Linkomicin-HCl / μgml^{-1} /		Linkomicin-HCl / μgml^{-1} /	
	0	1000	0	1000
^a N.p.	307 [±] 257	317 [±] 132	+	-
^b F2	579 [±] 260	936 [±] 383	+	+
F1 _♀ x N.p.♂	220 [±] 121	451 [±] 226	+	+
N.P.♀ x F1♂	372 [±] 169	272 [±] 378	+	-

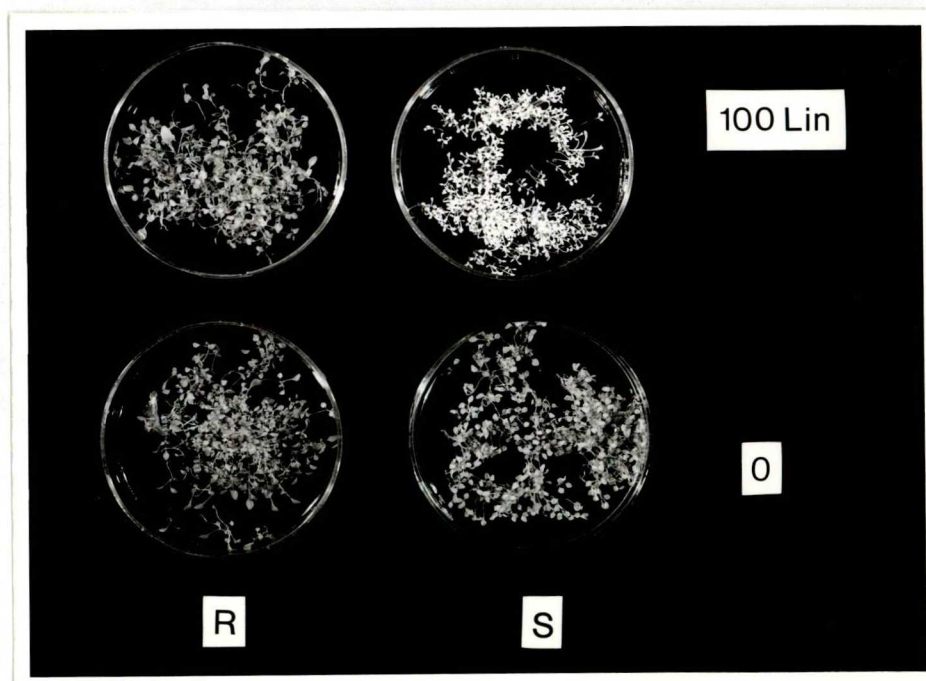
^a A szenzitív *N.plumbaginifolia* önbeporzásából származó csiranövények

^b Az LR-400_♀ x *N.plumbaginifolia* ♂ keresztezésből származó növények önbeporzásából nyert csiranövények

^c A kalluszok átlagsulya /mg/[±]S_x; 20 paralell átlaga. Inkubálás fényben /1500 lux/.

^d₊ = kalluszok fényben inkubálva zöldek; - = kalluszok fényben inkubálva fehérek

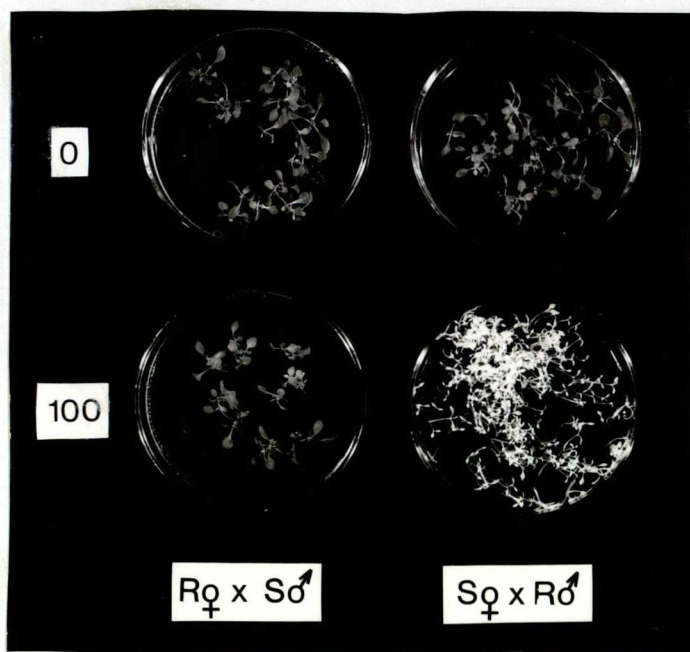
5. ábra. Az LR-400 F2 csiranövények linkomicinrezisztencia-
tesztje



R = LR-400♀ x *N.plumbaginifolia* ♂ keresztezésből származó
növények önbeporzásából nyert csiranövények

S = Szenzitiv *N.plumbaginifolia* önbeporzásából nyert csira-
növények

5. ábra. Az LR-400 F2 csiranövények linkomicinrezisztencia-tesztje /folytatás/



$R_{\text{♀}} \times S_{\text{♂}} = F1_{\text{♀}} \times N. plumbaginifolia \text{♂}$ keresztezésből
származó csiranövények

$S_{\text{♀}} \times R_{\text{♂}} = N. plumbaginifolia \text{♀} \times F1_{\text{♂}}$ keresztezésből
származó csiranövények

4. Megvitatás

A linkomicinrezisztens sejtvonalak spontán előfordulási gyakorisága diploid protoplaszttenyészetben $1,0 \times 10^{-4}$ volt, amit NEU kezeléssel sikerült $5,8-6,9 \times 10^{-4}$ -re emelni. Összehasonlításként megemlítem, hogy ugyanebben a rendszerben a sztreptomycinrezisztens sejtvonalak előfordulási gyakorisága alacsonyabb volt. A spontán előfordulási gyakoriság sztreptomycinrezisztencia esetében $2,7 \times 10^{-6}$, míg az indukált $0,1 \text{ mM NEU}$ frekvencia $8,7 \times 10^{-5}$ -nek bizonyult /Maliga és mt.1982/.

Az LR-400 vonal szelekciója haploid kiindulási anyagból történt, de a regenerált növények már diploid kromoszómaszámúak voltak. Ez a szövettenyészetben gyakran bekövetkező diploidizáció /vagy poliploidizáció/ eredménye, ami jól ismert jelenség /D'Amato 1978, Bayliss 1980/. Aneuploid, 20-tól 40-ig terjedő kromoszómaszámú növények regenerációja az LR-401 vonalból ugyancsak a szövettenyésztés alkalmazásának tulajdonítható. Valószínű, hogy az aneuploidia okozta az LR-401 növények torz morfológiáját és a virágzás hiányát. Az LR-400 vonal himsterilitása a mutagén-kezelés hatására bekövetkező egyéb mutációk következménye lehet.

Az LR-400 vonal esetében a vad típusu növényrel történő megporzás után sikerült termékeny utódokat kap-

ni, így tisztázhattam a rezisztencia öröklésmenetét. A linkomicinrezisztencia a keresztezési adatok szerint /lásd 3.5. fejezet/ az LR-400 vonalban anyai uton öröklődött. Hasonló eredményre vezettek az LR-407 és LR-413 vonallal végzett keresztezések is. Az LR-400 vonalnál az F₁-ben tapasztalt rezisztencia még magyarázható lenne azzal is, hogy a linkomicinrezisztencia domináns sejtmaghoz kötött mutáció eredménye. Ebben az esetben viszont az F₂-ben 3:1 /linkomicinrezisztens : linkomicinszenzitív/; a vad típusu, szenzitív növényvel történő keresztezésekénél pedig, a keresztezés irányától függetlenül, 1:1 arányu szegregációt kellett volna kapni.

A linkomicinrezisztencia kallusz- és növény szinten is stabilnak bizonyult, ez azonban még nem zárja ki linkomicinszenzitív faktorok jelenlétének lehetőségét. Magasabbrendű növényekben kevert organelumpopuláció általában nem marad fenn hosszabb ideig. Biparentális kloroplasztisz-átvitelt mutató fajokban /*Oenothera*, *Pelargonium*/ még a variegált növények is döntően tiszta plasztiszpopulációkat tartalmazó sejtekből állnak. /Kirk és Tilney-Basset 1978/. Protoplasztfuziót követően az általános tapasztalat az, hogy a kevert kloroplasztiszpopulációból még a növényregeneráció előtt tiszta szülői populációk jönnek létre a sejtosztódás során /Chen és mt. 1977, Menczel és mt. 1981/. Kevert

mitokondriumpopuláció azonban néhány esetben növényregeneráció után is megfigyelhető /Menczel L. személyes közlés/. A linkomicinrezisztens vonalakban szegregáció /linkomicinszenzitiv csiranövények megjelenése linkomicinrezisztens csiranövények mellett/ nem volt. A keresztezések során a rezisztens vonalokból származó csiranövények, amennyiben az anya rezisztens volt, kivétel nélkül rezisztensnek bizonyultak, vagyis a vonalakban a citoplazmatikus linkomicinrezisztencia-faktor homogén populációt alkotott; a szenzitiv faktorok eltűnése már a növényregeneráció előtt megtörtént. A gyors organelum-kitisztulás oka nem ismert /Kung 1977/.

A szövettényészetben előállított megváltozott fenotípusu sejtvonalak epigenetikus változás vagy mutáció következtében jelenhetnek meg. Epigenetikus változás minden olyan fenotípusváltozás, ami nem mutáció következtében jön létre /Siminovitch 1976/. Az epigenetikus változás tipikus példája a növényi sejtvonalak hormon-independenssé válása /Zryd 1979, Meins 1976/ vagy a cikloheximidrezisztencia, amit dohány és sárgarépa szövettényészetben is vizsgáltak /Maliga és mt. 1976, Gresshoff 1979/. Az epigenetikus változás és a mutáció több alapvető kritérium alapján megkülönböztethető egymástól. A linkomicinrezisztens sejtvonalakban a rezisztencia stabilitása kalusz- és növény szinten /nem-szelektív körülmények között is/, valamint a rezisztencia öröklődése azt mutatja, hogy

a linkomicinrezisztencia mutáció eredménye, mivel az epigenetikus változások növényi szinten nem stabilak és sohasem öröklődnek.

A *N. tabacum* SR1 mutáns esetében bizonyítani lehetett, hogy a sztreptomycinrezisztencia-mutáció kloroplasztisz-DNS-ben kódolt. Protoplaszt-fúzió után ugyanis a hibrid növényekben az SR1 típusu kloroplasztiszok jelenléte mindig rezisztens fenotípust eredményezett /Menczel és mt . 1981/. A dolgozatban tárgyalt vonalakkal ilyen kísérletet nem végeztem, de *N. sylvestris*-ben előállított citoplazmatikus linkomicinrezisztenciára nézve hasonló szegregációs adatok állnak rendelkezésemre. A *N. sylvestris* LR105 jelű növényből a rezisztenciafaktort protoplasztfúzió után *N. plumbaginifolia* sejtmagháttérbe vittem át. A kísérlet eredményeképpen létrejött *N. plumbaginifolia* linkomicinrezisztens növényekben kizárólag *N. sylvestris* típusu kloroplasztiszokat találtunk /Cséplő, Á., Nagy, F., Lázár, G., Maliga, P. közöletlen eredmények/. Ez arra utal, hogy a citoplazmatikus linkomicinrezisztencia kloroplasztisz-DNS-ben kódolt mutáció eredménye, hasonlóan az *N. tabacum* SR1 mutánshoz.

A mutáció következtében létrejövő antibiotikum-rezisztens mutánsok kialakulásukat tekintve három csoportba sorolhatók: felvételi mutánsok, inaktivációs mutánsok és kötőhely-mutánsok /Nierhaus és Wittmann 1980/. A *Chlamydomonas* zöldalgában izolált, kloroplasztisz-DNS-hez kötött

antibiotikumrezisztens mutánsok többsége a harmadik kategóriába sorolható /Gillham 1978/. A klindamicinrezisztens zöldalga törzsben a mutáció a kloroplasztisz-riboszóma 50S alegysége egy fehérjekomponensének megváltozását idézte elő /Schlanger és Sager 1974/. Az eddig genetikailag és biokémiailag legjobban jellemzett magasabbrendű növényi antibiotikumrezisztens mutáns /*N. tabacum* SR1/ is valószínűleg kötőhely típusu mutáns. A biokémiai vizsgálatok során kiderült, hogy a mutáció következtében a kloroplasztisz 30S riboszóma-alegységének egy fehérjéje a vad típustól eltérő elektroforetikus mobilitással rendelkezik /Yurina és mt. 1978/, valamint a mutáns kloroplasztiszriboszóma a vadtípushoz viszonyítva tizedannyi sztreptomocint köt meg /Bourque és mt. 1977/. A linkomicinrezisztens mutánsok rezisztenciájának kialakulási mechanizmusa nem ismert, de valószínűleg ezekben a vonalakban is a kötőhely megváltozása okozza a rezisztenciát, hasonlóan az előbb felsorolt esetekhez. A kérdés eldöntése további vizsgálatokat igényel.

A linkomicinrezisztenciát előidéző mutáció a sejteket egyuttal klindamicinnel szemben is rezisztenssé tette. Ez nem meglepő, miután a klindamicin a linkomicinnel szerkezetileg rokon antibiotikum /Magerlein és mt. 1967/. Nincs keresztrezisztencia viszont sztreptomocinre, ami szintén érthető, ha figyelembe vesszük az antibiotikumok eltérő kémiai szerkezetét és azt, hogy a linkomicin és sztrepto-

micin más-más riboszóma-alegységhez kapcsolódva fejti ki fehérjeszintézist gátló hatását /lásd 1.3.3.fejezet/.

A linkomicinrezisztens sejtvonalakban a rezisztencia-mutáció lokalizációját, valamint a rezisztencia mechanizmusát további genetikai és biokémiai vizsgálatokkal fogjuk tisztázni. Ha a citoplazmatikus linkomicin-rezisztencia kloroplasztisz-DNS-ben bekövetkezett mutáció eredménye, akkor a linkomicin-rezisztenciát a sztreptomycin-rezisztenciával kombinálva, kettős rezisztenciára történő szelekció alapján, kloroplasztisz-rekombináns sejtvonalak előállítására tudjuk felhasználni.



5. Összefoglalás

- 5.1. *N.plumbaginifolia* haploid és diploid protoplaszttenyészetben mutagén kezelés után linkomicinrezisztens sejtvonalkat izoláltam.
- 5.2. A sejtvonalak kallusz-szinten és növényé regenerálás után is megtartották rezisztens fenotípusukat.
- 5.3. A regenerált növényekkel végzett keresztezésekkel kimutattam, hogy a linkomicin-rezisztencia anyai uton öröklődik. Virágos növényeknél ezek az első ilyen fenotípusú mutánsok.
- 5.4. A jellemzett vonalak rezisztensek klindamicinnel, egy linkomicin származékkal szemben, de szenzitívek sztreptomicinre.

I R O D A L O M J E G Y Z É K

- Apirion, D. Tree genes that affect *Escherichia coli* ribosomes. *J.Mol.Biol.* 30, 255-275 /1967/
- Bartlett, S.G., Harris, E.H., Grabowy, T.C., Gillham, N.W. and Boyton, I.E. Ribosomal subunits affected by antibiotic resistance mutations at seven chloroplast loci in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol.gen.Genet.* 176, 199-208 /1979/
- Bayliss, M.V. Chromosomal variation in plant tissues in culture. In: International review of cytology. Suppl. 11A. Academic Press, New York, pp. 113-139 /1980/
- Belliard, G., Vedel, F. and Pelletier, G. Mitochondrial recombination in cytoplasmic hybrids of *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion. *Nature* 281, 401-403 /1979/
- Blair, G.E. and Ellis, R.J. Protein synthesis in chloroplasts. I. Light-driven synthesis of the large subunit of fraction I protein by isolated pea chloroplasts. *Biochem.Biophys.Acta* 319, 223-234 /1973/
- Bourque, D.P., Horn, N.A. and Capel, M.S. Altered chloroplast ribosome of a streptomycin resistant mutant of *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol.* 59 /Suppl. 110/ /1977/
- Capel, M., Redman, B. and Bourque, D.P. Quantitative analysis of complex two-dimensional electropherograms. *Anal. Biochem.* 97, 210-228 /1979/
- Chen, K., Wildmann, S.G. and Smith, H.H. Chloroplast DNA distribution in parasexual hybrids as shown by polypeptide composition of Fraction I protein. *Proc. Natl.Acad.Sci. USA* 74, 5109-5112 /1977/

- Criddle, R.S., Dau, B., Kleinkopf, G.E. and Huffaker, R.C. Differential synthesis of ribulosediphosphate carboxylase subunits. *B.B.Res.Commun.* 41, 621-627 /1970/
- D'Amato, F. Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants. In: *Frontiers of plant tissue culture 1978.* /Thorpe, T.A. ed./ pp. 287-295 /1978/
- Dix, P.J., Joó, F. and Maliga, P. A cell line of *Nicotiana sylvestris* with resistance to kanamycin and streptomycin. *Mol.Gen.Genet.* 157, 285-290 /1977/
- Dix, P.J. Inheritance of chloramphenicol resistance, a trait selected in cell culture of *Nicotiana sylvestris*. *Speg. and Comes. Ann.Bot.* 48, 315-319 /1981a/
- Dix, P.J. Cross-resistance in cell lines of *Nicotiana sylvestris* selected for resistance to individual antibiotics. *Ann.Bot.* 48, 321-325 /1981b/
- Eaglesham, A.R.J. and Ellis, R.J. Protein synthesis in chloroplasts. II. Light-driven synthesis of membrane proteins by isolated pea chloroplasts. *Biochem. Biophys. Acta* 335, 396-407 /1974/
- Ellis, R.J. and Hartley, M.R. Sites of synthesis of chloroplast proteins. *Nature New Biol.* 233, 193-196 /1971/
- Ellis, R.J. Inhibition of chloroplast protein synthesis by lincomycin and 2-/4-methyl-2,6-dinitroanilino/-N-methylpropionamide. *Phytochemistry* 14, 89-93 /1975/
- Galun, E. and Aviv, D. Cytoplasmic hybridization - genetic and breeding applications. In: *Application of plant tissue culture methods for crop improvement.* Macmillan Publishing Corp. in the press

- Gillham, N.W. Organelle heredity. Raven Press, New York /1978/
- Gresshoff, P.M. Cycloheximide resistance in *Daucus carota* cell cultures. Theor. Appl. Genet. 54, 141-143 /1979/
- Kao, K.W., Constabel, F., Michayluk, M.R. and Gamborg, O.L. Plant protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cells. Planta 120, 215-227 /1974/
- Kirk, J.T.O. and Tilney-Bassett, R.E.A. The plastids. Their chemistry, structure, growth and inheritance. Elsevier North-Holland, Amsterdam /1978/
- Kung, S. Expression of chloroplast genomes in higher plants. Ann. Rev. Plant. Physiol. 28, 401-437 /1977/
- Lai, C.J., Weisblum, B., Fahnestock, S.R. and Nomura, M. Alteration of 23S ribosomal RNA and erythromycin-induced resistance to lincomycin and spiramycin in *Staphylococcus aureus*. J. Mol. Biol. 74, 67-72 /1973/
- Linnae, A.W. and Stewart, P.S. The inhibition of chlorophyll formation in *Euglena* by antibiotics which inhibit bacterial and mitochondrial protein synthesis. B.B. Res. Commun. 27, 511-516 /1967/
- Linsmayer, E.M. and Skoog, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 18, 100-127 /1965/
- Magerlein, B.J., Birkenmayer, R.D. and Kagan, F. Chemical modification of lincomycin. Antimicrob. Agents Chemother. 1966, 727-736 /1967/
- Maliga, P., Breznovits, Á. and Márton, L. Streptomycin resistant plants from callus culture of haploid tobacco. Nature New Biol. 244, 28-30 /1973/

- Maliga,P., Sz.-Breznovits,Á. and Márton,L. Non-mendelian streptomycin resistant tobacco mutant with altered chloroplasts and mitochondria. *Nature /London/* 255, 401-402 /1975/
- Maliga,P., Lázár,G., Sváb,Z. and Nagy,F. Transient cycloheximide resistance in a tobacco cell line. *Mol. gen.Genet.* 149, 267-271 /1976/
- Maliga,P., Lázár,G., Joó,F., H.-Nagy,A. and Menczel,L. Restoration of morphogenic potential in *Nicotiana* by somatic hybridization. *Mol.Gen.Genet.* 157, 291-296 /1977/
- Maliga,P. Isolation, characterization and utilization of mutant cell lines in higher plants. In: International review of cytology. Suppl. 11A. /Vasil,I.K. ed./ Academic Press, pp. 225-250 /1980a/
- Maliga,P., Le Thi Xuan, Dix,P.J. and Cséplő,Á. Antibiotic resistance in *Nicotiana*. In: Plant cell cultures: results and perspectives. /Sala,F., Parisi,B., Cella,R., Ciferri,O. eds./ Elsevier/North-Holland, Amsterdam, pp. 161-166 /1980b/
- Maliga,P. Streptomycin resistance is inherited as a recessive mendelian trait in a *Nicotiana sylvestris* line. *Theor.Appl.Genet.* 60, 1-3 /1981a/
- Maliga,P., Sidorov,V.A., Cséplő,Á. and Menczel,L. Induced mutations in advancing *in vitro* culture techniques. In: Induced mutations as a tool for plant improvement. pp. 339-352. IAEA, Vienna /1981b/
- Maliga,P., Menczel,L., Sidorov,V., Márton,L., Cséplő,Á., Medgyesy,P., Trinh Manh Dung, Lázár,G. and Nagy F. Cell culture mutants and their uses. In: Plant improvement and somatic cell genetics. /Vasil,I.K., Frey,K.J., Scowcroft,W.R. eds./ Academic Press, New York-London /in the press/

- Malke, H. Genetics of resistance to macrolide antibiotics and lincomycin in natural isolates of *Streptococcus pyogenes*. Mol.Gen.Genet. 135, 349-367 /1974/
- Malke, H. and Holm, S.E. Expression of streptococcal plasmid-determined resistance to erythromycin and lincomycin in *Escherichia coli*. Mol.Gen.Genet. 184, 283-295 /1981/
- Medgyesy, P., Menczel, L. and Maliga, P. The use of cytoplasmic streptomycin resistance: Chloroplast transfer from *Nicotiana tabacum* into *Nicotiana sylvestris* and isolation of their somatic hybrids. Mol.Gen.Genet. 179, 693-698 /1980/
- Meins, F.Jr. 5-bromodeoxyuridine: a specific inhibitor of cytokinin-habituation in tobacco cell culture. Planta 129, 239-244 /1976/
- Menczel, L., Lázár, G. and Maliga, P. Isolation of somatic hybrids of cloning *Nicotiana* heterokaryons in nurse cultures. Planta 143, 29-32 /1978/
- Menczel, L., Nagy, F., Kiss, Zs. and Maliga, P. Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* + *Nicotiana knightiana*: Correlation of resistance to *N. tabacum* plastids. Theor.Appl.Genet. 59, 191-195 /1981/
- Nagy, F., Török, I. and Maliga, P. Extensive rearrangements in the mitochondrial DNA in somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana knightiana*. Mol.Gen.Genet. 183, 437-439 /1981/
- Nagy, J.J. and Maliga, P. Callus induction and plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Nicotiana sylvestris*. Z.Pflanzenphysiol. 78, 453-455 /1976/

- Nierhaus, K.H. and Wittman, H.G. Ribosomal function and its inhibition by antibiotics in prokaryotes. *Naturwiss.* 67, 234-250 /1980/
- Owens, L.D. Characterization of kanamycin-resistant cell lines of *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol.* 67, 1166-1168 /1981/
- Pfister, K. and Arntzen, J. The mode of action of photosystem II-specific inhibitors in herbicide-resistant weed biotypes. *Z.Naturforsch.* 34c, 996-1009 /1979/
- Sager, R. Cytoplasmic genes and organelles. Academic Press, New York /1972/
- Sárvári, É., Halász, G., Nyitrai, P. and Láng, F. Effect of lincocin treatment on the greening process in bean [*Phaseolus vulgaris*] leaves. *Physiol.Plant.* 36, 187-192 /1976/
- Schlanger, G. and Sager, R. Localization of five antibiotic resistances at the subunit level in chloroplast ribosomes of *Chlamydomonas*. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 71, 1715-1719 /1974/
- Schieder, O. Production and uses of metabolic and chlorophyll deficient mutant. In: *Frontier of plant tissue culture 1978.* /Thorpe, T.A. ed./ University of Calgary Press, Calgary, pp. 393-401 /1978/
- Sears, B.B. Elimination of plastids during spermatogenesis and fertilization in the plant kingdom. *Plasmid* 4, 233-255 /1980/
- Sidorov, V.A., Menczel, L., Nagy, F. and Maliga, P. Chloroplast transfer in *Nicotiana* based on metabolic complementation between irradiated and iodoacetate treated chloroplasts. *Planta* 152, 341-345 /1981/



- Simonovitch, L. On the nature of hereditable variation in cultured somatic cells. *Cell* 7, 1-11 /1976/
- Thomson, W.W. and Ellis, R.J. Inhibition of grana formation by lincomycin. *Planta* 108, 89-92 /1972/
- Umiel, M. Streptomycin resistance in tobacco. III. A test on germinating seedlings indicates cytoplasmic inheritance in the St-R701 mutant. *Z. Pflanzenphysiol.* 92, 295-301 /1979/
- Welch, R.A., Jones, K.R. and Macrina, F.L. Transferable lincosamide-macrolide resistance in *Bacteroides*. *Plasmid* 2, 261-268 /1979/
- Widholm, J.M. Selection and characterization of biochemical mutants. In: Plant tissue culture and its biotechnological application. /Barz, W., Reinhard, E., Zenk, M.H. eds./ Springer-Verlag, Berlin, pp. 112-122 /1977a/
- Widholm, J.M. Selection and characterization of amino acid analog resistant plant cell cultures. *Crop Sci.* 17, 597-600 /1977b/
- Yurina, N.P., Odintsova, M.S. and Maliga, P. An altered chloroplast ribosomal protein in a streptomycin resistant mutant. *Theor. Appl. Genet.* 52, 125-128 /1978/
- Zryd, J.P. Colchicine-induced resistance to antibiotic and amino-acid analogue in plant cell culture. *Experientia* 35, 1168-1169 /1979/

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Maliga Pálnak és Menczel Lászlónak a gyakorlati és elméleti munkában nyújtott segítségéért.

