

***IN VITRO* SZÖVETTENYÉSZTÉSI, REGENERÁCIÓS ÉS TRANSZFORMÁCIÓS
RENDSZEREK KIALAKÍTÁSA A GAZDA-PARAZITA KÖLCÖNHATÁSOK
VIZSGÁLATÁHOZ *CUSCUTA TRIFOLII* FAJBAN**

Doktori dolgozat

Írta: Bakos Ágnes

Témavezető: dr. Lados Miklós

MEZŐGAZDASÁGI BIOTECHNOLÓGIAI KUTATÓKÖZPONT

MOLEKULÁRIS GENETIKAI INTÉZET

GÖDÖLLŐ

1996.

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS	2. o
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3.
1.1. Az élősködő növény magvainak csírázása	4.
1.2. A parazitizmus speciális szerve, a szívógyökér	5.
1.2.1. A szívógyökér iniciációja	5.
1.2.2. A szívógyökér feladata	10.
1.3. Az élősködő hatása a gazdanövény víz- és tápanyagkészleteire	11.
1.4. A gazdanövény és parazitája között létrejövő kapcsolat vizsgálata molekuláris biológiai módszerekkel	14.
1.5. A <i>Cuscuta</i> (aranka) fajok, mint modellnövények	15.
1.5.1. A <i>Cuscuta in vitro</i> tenyésztése	16.
1.6. Növényi transzformáció lehetőségei	17.
1.6.1. Transzformáció biolisztikus módszerrel	18.
1.6.2. Növényi génexpresszió tanulmányozása	19.
2. CÉLKITŰZÉSEK	20.
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	22.
3.1. Kísérleti anyagok	22.
3.1.1. Vegyszerek, enzimek	22.
3.1.2. Növények, baktérium törzsek, plazmidok	22.
3.1.3. Táptalajok, oldatok	23.
3.2. Módszerek	25.
3.2.1. Az arankamagok felszíni sterilizése	25.
3.2.2. Növény- illetve kalluszkultúra kialakítása, növényregeráció	25.
3.2.3. Arankanövények szövettani vizsgálata	26.
3.2.4. A növényi szövetek transzformációjában felhasznált DNS minták előkészítése	26.
3.2.5. A növényi szövetek transzformációja biolisztikus módszerrel	27.
3.2.6. GUS (β -glükuronidáz) aktivitás hisztokémiai kimutatása	28.
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK	29.
4.1. Kalluszképződés vizsgálata	29.
4.1.1. A különböző szénhidrátok kalluszképződésre gyakorolt hatásának vizsgálata	29.

4.2.	<i>Cuscuta</i> regenerálása kalluszból	32.
4.3.	A szomatikus embriófejlődés morfológiai és szövettani bizonyítékai	35.
4.3.1.	A regenerálódó csíranövények és szomatikus embriók mikroszkópos vizsgálata	36.
4.4.	<i>In vitro</i> növénykultúra kialakítása	39.
4.5.	<i>Cuscuta</i> transzformációja expressziós tesztplazmiddal	41.
5. ÖSSZEFOGLALÁS		44.
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS		47.
A DOLGOZAT ANYAGÁBÓL KÉSZÜLT PUBLIKÁCIÓK		48.
EGYÉB PUBLIKÁCIÓK		48.
IRODALOM		50.

RÖVIDÍTÉSEK

AMP	adenozin-5'-monofoszfát
cAMP	adenozin-3'5'-difoszfát
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
GUS	β -glükuronidáz
2,4-D	2,4-diklór-fenoxiecetsav
2,6-DMBQ	2,6-dimetoxi-p-benzokinon
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
MSB5	Murashige és Skoog sókat (MS) valamint Gamborg-féle vitaminokat (B5) tartalmazó táptalaj
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
Tris	trisz-/hidroximetil/-amino-metán
X-Gluc	5-bróm-4-klór-3-indol- β -D-glükuronid

BEVEZETÉS

Az utóbbi évtizedben egyre inkább a kutatások homlokterébe került a különböző organizmusok, ezen belül a növények között létrejövő kapcsolatok tanulmányozása. Ilyen növényi kapcsolat például a növényi parazitizmus.

A parazita növények - és főleg irtási lehetőségeik - tanulmányozása a század-előre nyúlik vissza. Ennek oka, hogy ezek a növények jelentős károkat okoznak a haszonnövény-kultúrákban. Ennek ellenére e növénykapcsolat kialakulásáról még ma is csak korlátozott mértékben vannak élettani és biokémiai ismereteink, molekuláris genetikai háttéréről pedig szinte semmilyen információnk nincs. Az élősködés jelenségével kapcsolatban számos kérdés vár még tisztázásra, pl. a parazita növény milyen módon képes „kijátszani” a gazdanövény védekezési mechanizmusait, vagy miután létrejött a parazita kapcsolat, miképpen alakítja át és állítja saját szolgálatába partner-növényének életműködését. Ezekre a kérdésekre a modellrendszerek tanulmányozása során kaphatunk választ. A parazitizmus vizsgálatának egyik lehetséges modellrendszere a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont (MBK) Genetikai Intézetében tanulmányozott kis aranka (*Cuscuta trifolii*) és a lucerna (*Medicago sativa*) együttélése.

1992-ben kapcsolódtam be az MBK Genetikai Intézetében a növényi élősködést vizsgáló kutatócsoport munkájába. Céljuk a jelenség genetikai háttérének felderítése, a parazitizmust meghatározó genetikai információk kimutatása és a folyamatban betöltött szerepük tisztázása. Ebben nyújthat segítséget a parazita növény *in vitro* szövettenyésztési, regenerációs valamint transzformációs rendszerének alkalmazása, melyek kialakítása volt a feladatom. Jelen dolgozatban ezen rendszerek kidolgozásához kapcsolódó kísérletek eredményeit ismertetem.

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Földünkön több mint 3000 azon zárvatermő virágos növények száma, amelyek más növényeken élősködve jutnak hozzá az életműködésükhöz nélkülözhetetlen vízhez, valamint az ásványi és szerves anyagokhoz.

A parazita zárvatermő növényeket a gazdára szorultság mértéke alapján két fő csoportba sorolják. Lehetnek holo- (teljes), illetve hemi- (fél) paraziták.

A holoparaziták csoportjába tartozó növények táplálkozása teljes mértékben a gazdanövényre támaszkodik, mivel szervezetükből hiányzik a klorofill, és mind a szén, mind a nitrogén asszimilációja igen kis mértékű. A hemiparaziták lehetnek fakultatív illetve teljes növényparaziták. Rendelkeznek ugyan klorofill rendszerrel, az ásványi anyagok és a víz tekintetében azonban a gazdanövényre szorulnak.

A virágos paraziták között további felosztás is lehetséges annak alapján, hogy az élősködő a gazdanövény mely szervéhez kapcsolódik. Ezek alapján beszélhetünk gyökérparazitákról - ilyen pl. a holoparazita szádorgó vagy a hemiparazita boszorkányfű - illetve szárparazitákról, melynek képviselői pl. a holoparazita arankák vagy a hemiparazita fagyöngyök (Stewart és Press, 1990).

Az élősködő növények gazdaspecifitása igen változó. Egyik végletet képviseli például az Orobanchaceae családba tartozó *Conopholis americana*, amelynek kizárólag a tölgyfa (*Quercus borealis*) a gazdanövénye. A másik végletet pl. az *Olex phyllanthi* (Olacaceae) jelenti, mely lágyszárúakon és fákön is képes megtelepedni.

Valamennyi virágos parazita közös jellemzője egy speciális szerv, a szívógyökér

(hausztórium) megléte. A hausztórium morfológiai és fiziológiai hidat képez az élősködő és a gazdanövény között. E szerv feladata a gazdanövénybe hatolás, a gazda szállítóedényrendszeréhez való csatlakozás, és onnan az oldott tápanyagok elvonása. Szerkezetének és működésének megismerése jelentősen hozzájárulhat a parazita kapcsolat megértéséhez.

1.1. Az élősködő növény magvainak csírázása

Ellentétben csaknem valamennyi más növénnel, a parazita zárvatermők az egyedfejlődésük kezdeti szakaszán a gazdanövényre vannak utalva. A Scrophulariaceae, Orobanchaceae, Rafflesiaceae és Lennoaceae rendekbe tartozó élősködő fajok csírázásukhoz a gazdából származó jelmolekulákat igényelnek. Legtöbb parazita rend csak ezt követően, egy második kémiai jel hatására fejleszt szívógyökereket.

Eddig három, gazdanövényből származó csírázást serkentő anyag létezését mutatták ki, melyek szerkezete jelentősen eltérő.

Az első természetben előforduló csírázást indukáló anyagot, a strigolt, gyapotból izolálták (Cook és mtsai, 1966; 1972). A szerkezetileg a szeszkviterpének közé tartozó anyag kizárólag a gyökérparaziták közé tartozó *Striga* csírázását serkenti, de az élősködő egyedfejlődésében nem játszik szerepet. A strigol a talajban már 10^{-15} mol $\cdot$ m $^{-3}$ koncentrációban is hatékony.

Egy másik csírázást stimuláló anyagot a *Striga* gazdanövényének, a ciroknak a gyökeréből izolálták. A gazdanövény gyökérszőrein megjelenő hidrofób cseppek bio-

lógiai aktivitással rendelkeznek. Az aktivitás a cseppek fő összetevőjének, a szorgoleon-358-nak (2-hidroxi-5-metoxi-3-[(8'Z,11')-8',11',14'pentadekatrién]-p-benzokinon) koncentrációjával áll összefüggésben (Chang és mtsai, 1986).

Egy harmadik anyagot a *Strigá*-nak és a *Alectra*-nak is gazdanövényeként ismert tehénborsó (*Vigna sinensis*) exudátumából azonosítottak (Herb és mtsai, 1987; Visser és mtsai, 1984). A ciklusos molekula három részből tevődik össze: egy xantin gyűrűből, egy telítetlen C₁₂-karbonsavból, valamint glicin és aszparaginsav dipeptidjéből.

A természetes eredetű csírázásserkentők mellett még számos csírázást indukáló vegyület ismert. Ilyen pl. a kinetin, zeatin, abszcizinsav, inozit, metionin vagy az etilén. Ezek a vegyületek azonban csak nagyságrendekkel nagyobb koncentrációtartományban hatékonyak a természetes stimuláló anyagokhoz képest (Stewart és Press, 1990). *In vivo* jelenlétükre nincs kísérleti bizonyíték.

1.2. A parazitizmus speciális szerve, a szívógyökér

1.2.1. A szívógyökér iniciációja

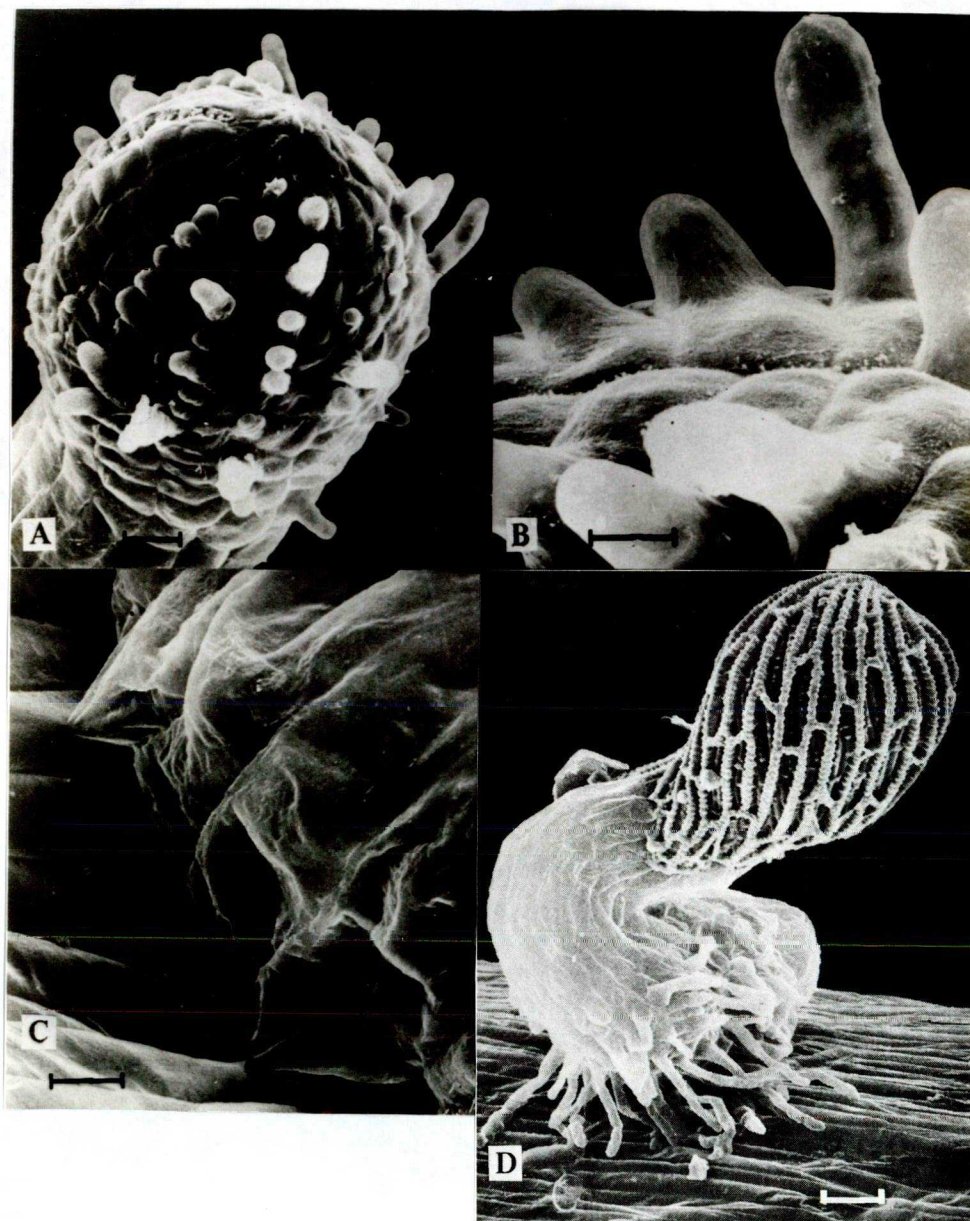
Az élősködő növények hausztóriumainak kialakulását számos kémiai anyag indukálhatja. Az első ilyen vegyületeket az *Astragalus gummifer*-ből mutatták ki, amely egyébként nem szolgál gazdanövényként a vizsgált parazita számára. A xenogozin A és B (7,2'-hidroxi-4'-metoxiizoflavon) a fenilpropanoidok közé tartozik (Lynn és mtsai, 1981). Számos szintetizált analóg molekula analízise kimutatta, hogy *Aganilis purpurea*

(Steffens és mtsai, 1986), valamint más gyökérparaziták esetében a metoxifenol csoport jelenléte szükséges az indukcióhoz.

A *Striga asiatica* esetében kinon típusú vegyület, a 2,6-dimetoxi-p-benzokinon (2,6-DMBQ) hatására fejlődik szívógyökér (1. ábra), amelyet a cirok gyökér extraktumából mutattak ki. Úgy tűnik, hogy ebben az esetben is, akárcsak a xenognozinoknál, a metoxi funkcióscsoport játszik kulcsszerepet az indukcióban (Chang és Lynn, 1986). Miután az indukáló anyagot csak a cirok gyökerének erőteljes rázatása, vagy ultrahangos feltárása után tudták kimutatni, feltehető, hogy erősen kötött formában, vagy a gyökér belső szöveteiben van jelen. A 2,6-DMBQ a lignin egyik lebontási terméke, amely lebontási folyamatot egyes gombák extracelluláris lakkázai végzik. Lakkáz aktivitás kimutatható a gyökérparaziták közé tartozó *Striga* és *Aganilis* gyökércsúcsában is (Chang és Lynn, 1986). E megfigyelések alapján feltételezhető, hogy az elősködő növények képesek a gazda gyökerében lévő felszíni fenilpropanoid komponensek megfelelően szubsztituált kinonig való lebontására.

Az *Aganilis* gazdanövényének gyökeréből izolált indukáló molekula pentaciklusos diterpén, amelyet szójaszapogenol B-nek ($3\beta,22\beta,24$ -trihidroxi-olean-12-én) nevezték el. A molekula bioszintézise eltér a fenilpropanoidokétól. Hatékonysága legalább egy nagyságrenddel kisebb a xenognozinokhoz képest. A hausztórium indukáló molekulák általában a 10^{-8} - 10^{-10} mol $\cdot$ m $^{-3}$ koncentrációtartományban hatékonyak. A szójaszapogenol teljes aktivitása valószínűleg a gyökér exudátum egyéb komponenseitől is függ (Steffens és mtsai, 1986).

A gyökérparaziták esetében mind a csírázást serkentő, mind a szívógyökér in-

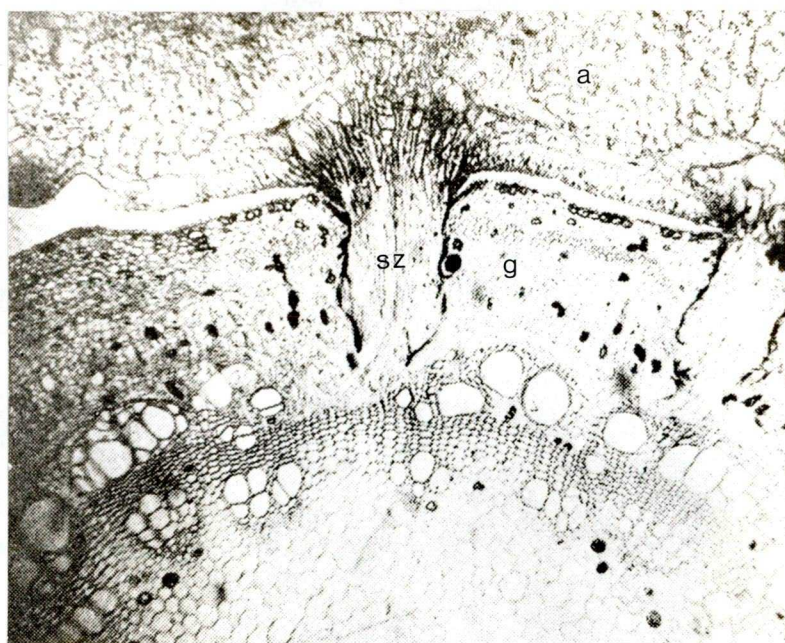


1. ábra *Striga asiatica* elsődleges hausztóriumának pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) képe. A-B: Az elsődleges szívógyökéren hosszanti sorokban hausztoriális szőrök képződése látható (a lépték 20 μm illetve 6 μm). C-D: A kukorica felszínéhez tapadó primér szívógyökerek (lépték: 10 μm illetve 50 μm). (Riopel és Baird, 1987)



dukcióban résztvevő anyagok szerepet játszanak a gazdaspecifitás meghatározásában. Egyes kutatók feltételezik, hogy a növényi élősködők akárcsak egyes növényevő rovarok a gazdanövény védekezőrendszerének alkotóelemeit ismerik fel (Atsatt, 1977). Ezek a komponensek csak meghatározott koncentrációtartományban gyakorolnak kedvező hatást a parazitára, azt meghaladva gátolják a fejlődését. Hasonló módon viselkedik számos csírázást serkentő anyag is. Az optimális koncentráción túl gátolják az élősködő csírázását. A vegyületek többsége vagy allelopátiás, mint pl. a szorgoleonok (Netzly és mtsai, 1988), vagy pedig bioszintetikusan a fitoalexinekhez tartozik, mint pl. a xenognozin B, amely a medikarpin közvetlen prekursora (Steffens és mtsai, 1986).

Cuscuta fajok esetében még nem határozták meg a gazdanövényből származó hausztórium fejlődését indukáló molekulát. A folyamatról azonban annyi ismert, hogy exogén citokinin alkalmazásával *de novo* szívógyökér (2. ábra) képződése idézhető elő a gazdanövényen élősködő *Cuscuta reflexa* növényeken, valamint annak izolált szár-részletein (Paliyath és mtsai, 1978; Tsivion, 1978). A hausztórium fejlődés kezdeti szakaszában alkalmazott citokinin elősegíti a szívógyökér teljes kialakulását (Tsivion, 1978). Az adenin illetve annak származékai, mint pl. az AMP vagy a cAMP ugyancsak elősegítik a szívógyökerek képződését (Gupta és Singh, 1982). Gupta és Singh (1983) feltételezik, hogy amikor a *Cuscuta* körbetekeredik a gazda szárán, a gazdanövény arankával érintkező részein citokinin akkumulálódik. A megnövekedett mennyiségű citokinin hatására indukálódnak a hausztóriumok. A szívógyökerek behatolása során az arankában magas proteáz (Srivastava és Singh, 1982), RN-áz (Gupta és Singh, 1983) és sejtfal lebontásban szerepet játszó (Nagar és mtsai, 1984) enzimaktivitás mutatható ki. Ezek



2. ábra Aranka (*Cuscuta*) a gazdanövény szárába mélyesztett szívógyökereivel. (Haraszti, 1978) a: aranka, g: gazdanövény, sz: szívógyökér.

a folyamatok feltehetően hozzájárulnak a gazdanövény sejtjeinek leépüléséhez. Hatásukra újabb citokininek keletkezhetnek (Sheldrake, 1973), amelyek a parazita növénybe transzlokálódva elősegíthetik a hausztóriumképződés továbbvitelét. Gupta és Singh 1985-ben közzétett eredményei is arra utalnak, hogy a citokininek szerepet játszanak a szívógyökér kialakításában. Eszerint az aranka hausztóriummal rendelkező részeinek kinetintartalma jóval nagyobb, mint a kapcsolódási terület alatt vagy felett lévő szárrészleteké. Az elősködő növény szívógyökereket hordozó szárrészleteinek a gazdanövény szárával érintkező oldalán a citokininkoncentráció szignifikánsan nagyobb, mint a nem érintkező oldalon.

1.2.2. A szívógyökér feladata

A parazita zárvatermők speciális szervének három funkciója van: a gazdanövényen való megtapadás, a behatolás, valamint a víz- és tápanyagfelvétel biztosítása (Visser és Dorr, 1987). Bár a különböző fajokban a szívógyökök funkcionálisan hasonlóak, morfológiájuk igen változatos. A megtapadást és behatolást követően a gazda és parazitája között apoplazmatikus kontinuum jön létre. Ez a tény számos kutatót vezetett arra a következtetésre, hogy a hemiparaziták hausztóriumai csak passzív szerepet töltenek be a víz és a tápanyagok felvételében és továbbításában (Raven, 1983). Újabb kutatások azonban azt valószínűsítik, hogy a szívógyökérben aktív metabolizmus folyik. Ultrastruktúrális vizsgálatok kimutatták, hogy a szívógyökök parenchima-sejtjei nagy mennyiségben tartalmaznak sejtorganellumokat (pl. mitokondriumokat, riboszómákat, diktioszómákat), valamint jól fejlett endoplazmatikus retikulummal rendelkeznek. A sejtek szoros kapcsolatban állnak a hausztórium szállítószövet-rendszerének faelemeivel, mint pl. a *Striga* esetében (Visser és Dorr, 1987), illetve a hausztoriális csatlakozási felszínen a gazdanövény xilémjével, mint pl. az *Olex* vagy a fagyöngy esetében (Kuo és mtsai, 1989). *Striga hermonthica* hisztokémiai vizsgálata során a szívógyökér sejtjeiben magas enzimaktivitást mutattak ki (Ba és Kahlem, 1979).

A *Striga hermonthica* és gazdanövényének a ciroknak (*Sorghum bicolor*) a xilémnedve eltérő szénhidrátokat, amino- és szerves savakat tartalmaz. A parazita farészében előforduló szénhidrátkoncentráció ötszöröse a gazdanövényben mért koncentrációnak. A fő komponens a mannit, amely teljes mértékben hiányzik a gazdanövény xilémnedvéből. Míg a cirokban a farész által szállított fő nitrogén tartalmú vegyület az aszpara-

gin, addig a *Strigában* a citrullin. A xilémnedv szerves sav összetétele is eltérő. A *Sorghumban* a malát és a citrát a két fő alkotóelem, melyek közül az utóbbi egyáltalán nem található meg a *Strigában*. A sikiminsav, amely nincs jelen a cirokban, a parazita xilémjéből kimutatható. Ezen eredmények alapján feltételezik, hogy a felvett nitrogén- és szénvegyületek aktívan metabolizálódnak a hausztóriumban, mielőtt a parazita szárába jutnának.

A szívógyökér tápanyagfelvételben betöltött, metabolikus szabályozó szerepére utalnak a *Cuscuta* vizsgálatával kapott eredmények is. Ez az élősködő növény a növekedéséhez szükséges tápanyagokat legnagyobb részét a gazdanövény háncsrészből nyeri. Ennek kiürítése közvetlenül a parazita apoplasztjába történik. A folyamat feltehetően metabolikus szabályozás alatt áll, mivel sem 0 °C-on, sem a metabolizmus inhibitorainak jelenlétében nem játszódik le (Wolswinkel, 1978; Wolswinkel és mtsai, 1984), hasonlóan ahhoz a transzportfolyamathoz, amely a pillangós növények anyai szöveteiből a fejlődő magok felé irányul (Wolswinkel és mtsai, 1984). Az apoplasztba történő ürítést szabályozó mechanizmus még nem ismert. Elképzelhető, hogy a gazdanövényből származó anyagok vivőmolekulák közvetítésével jutnak át a membránon, vagy a pórusokon keresztül történő tömegáramlás révén (Wolswinkel, 1985) ürülnek ki.

1.3. Az élősködő hatása a gazdanövény víz- és tápanyagkészleteire

A gazda farészéből táplálkozó paraziták nagyon erős transzspirációval rendelkeznek, amelynek mértéke gyakran egy nagyságrenddel meghaladja a gazdanövényét. Ez a tulajdonság a gyökér- és a szárélősködőkre egyaránt jellemző. *Amyema*

lynophyllum és *Pthyrusa maritima* esetében az éjszakai transzspiráció mértéke jelentősen meghaladja a gazdáét (Stewart és Press, 1990). Ezek a paraziták mind éjszaka, mind nappal képesek elvonni a vizet a gazdanövényből. Hasonló jelenség figyelhető meg számos más, a Scrophulariaceae családba tartozó hemiparazita esetében is. A *Strigák* esetében a sztómák csak lassan válaszolnak a vízhiányra. *Striga hermontica* vagy *S. asiatica* növényekben a vízmegvonás nem eredményezi a sztómák teljes bezáródását mindaddig, amíg a parazita levelének víztartalma 70%-ra nem csökken (Press és mtsai, 1987). Hasonló jelenség egyes fagyöngyök estében (*Amyema nestor*) is kimutatható. Ennek megfelelően a fagyönggyel fertőzött fák pusztulása a parazita által indukált vízhiánynak köszönhető (Knutson, 1979). A magas transzspirációs ráta a fő meghatározója a parazita növények alacsony vízpotenciáljának, amelyet legtöbbször a gazdához viszonyított magasabb ozmolaritás kísér. Az élősködő növények szöveiteiben a szerves ionok, különösképpen a kálium (Lamont, 1983; Stewart és Press, 1990) nagyobb koncentrációban vannak jelen, mint a gazdában. Ugyancsak magasabb koncentrációban találhatók meg az oldható szénhidrátok, mint pl. a glükóz és a fruktóz a fagyöngyök (Popp, 1987), a mannit az *Orobanche* (Press, 1989) és a *Striga* (Nour és mtsai, 1984) esetében. E szénhidrátok feltehetően részt vesznek a gazda és élősködője közötti ozmótikus grádiens létrehozásában. Kimutatták, hogy az alacsony molekulatömegű szénhidrátok részben a gazdanövényből származnak. Egyes összetevők, mint például a pinit csak abból a parazitából mutatható ki, amely olyan gazdanövényen élősködik, amely tartalmazza ezt a vegyületet (Popp, 1987).

A gazda farészével kapcsolatot tartó növényekkel ellentétben az elsődlegesen háncsrészből táplálkozik (pl. az *Orobanche*) pusztító hatása kezdetben nem a vízelvonásból adódik. Ez csak később válik meghatározóvá, amikor a szénhidrátok elvesztésének következtében már csökken a gazda gyökerének vízfelvétele (Stewart és Press, 1990).

Knutson (1979) feltételezi, hogy számos, az élősködő által okozott tünetért az indukált nitrogénhiány tehető felelőssé. Az ő elképzeléseit támasztják alá Jeschke és mtsai (1994) *Cuscuta*-n végzett vizsgálatai. Kimutatták, hogy a gazdanövény leveleinek nitrogéntartalma jelentősen csökkent a parazita jelenlétében. Véleményük szerint ennek két oka is lehet. Az aranka hausztórium metabolikus gyűjtőhelyként (sink) viselkedik, ezáltal mobilizálja a levelekben felhalmozott nitrogént és/vagy olyan nagy mértékben szívja el a szénforrásokat, hogy azokból nem marad elegendő a gazdanövény gyökérgümőiben végbemenő, a növény redukált nitrogénnel való ellátását biztosító nitrogénkötés eredeti szinten való fenntartásához. Ezzel szemben *Striga* fertőzés során nem mutatható ki változás a gazdanövény (*Sorghum*) leveleinek nitrogéntartalmában (Stewart és Press, 1990). A gazdanövény növekedésének lelassulásáért és a termés hozamok csökkenéséért - 16%-ban (cirok), illetve 20%-ban (köles) - a szénhidrátoknak a gazdából a parazitába történő áramlása a felelős. Ezek alapján Stewart és Press (1990) azt valószínűsítik, hogy a gazda életképességét nem a nitrogén, hanem a szén elvesztése határozza meg.

Fagyöngy fertőzés során a fő kationok mennyiségének csökkenése mutatható ki

a gazdanövényekben. A szerves ionok mennyiségének csökkenése azonban nem okoz jelentős változásokat a gazda növekedésében (Stewart és Press, 1990). *Cuscuta lupuliformis*-szal fertőzött *Vicia sativa* esetében az élősködő nagy mennyiségű káliumot vesz fel, ennek ellenére a gazdában nem következik be mérhető változás a makroelemek koncentrációjában (Ferr és mtsai, 1990). Úgy tűnik tehát, hogy amíg a szerves anyagokért folytatott verseny viszonylag csekély szerepet játszik a gazda produktivitásának meghatározásában, addig a szerves anyagok fontos meghatározói a gazdanövény megjelenésének.

1.4. A gazdanövény és parazitája között létrejövő kapcsolat vizsgálata molekuláris biológiai módszerekkel

A növényi parazitizmus kialakulásának molekuláris biológiai módszerekkel történő vizsgálata világszerte újkeletű kutatási irány. Ezidáig csak kis számban jelentek meg kísérleti eredmények e területről.

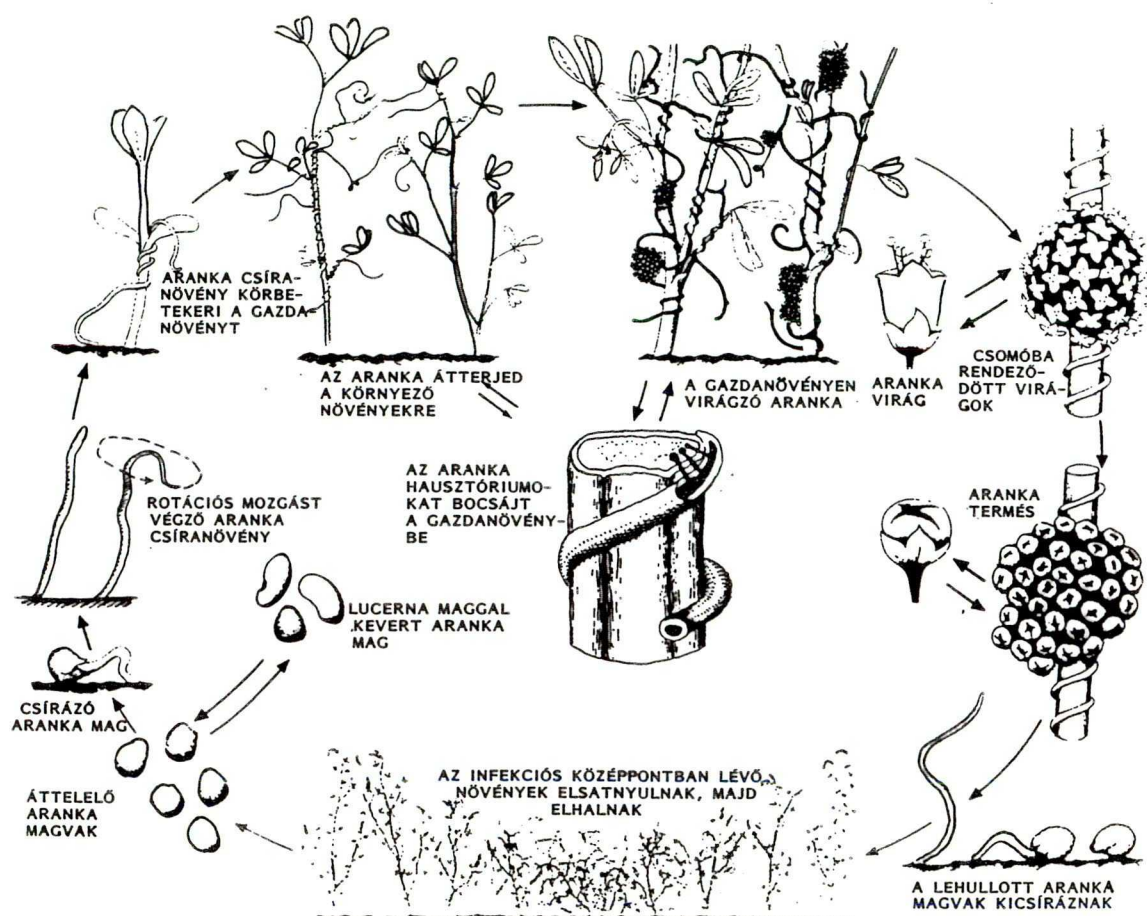
Albrecht és mtsai (1994) izoláltak olyan géneket, amelyek specifikusak a *Striga asiatica* fejlődésére illetve kialakulására. A csíranövényeket tisztított 2,6-DMBQ-val kezelték, aminek következtében hausztóriumok indukálódtak. A szívógyökereket hordozó, valamint a kontroll, nem kezelt csíranövényekből mRNS populációt izoláltak. „Differential display” technika alkalmazásával különbséget mutattak ki az indukált és a kontroll mRNS populáció között.

Subramaniam és mtsai (1994) a *Cuscuta reflexa*-t vizsgálták ebből a szempontból. Az élősködő szárának citokininnel (benzil-adenin) való bekenése után hausztórium

kezdemények jelentek meg. A szívógyökér kezdeményeket hordozó szárból kivont mRNS populációból cDNS klontárat készítettek. Összehasonlítva az indukálatlan mRNS populációval, specifikusan a citokinin hatására megjelenő klónokat izoláltak. A klónok inszertjeinek szekvenciaanalízise a citokróm b_5 (Subramaniam és Mahadevan, 1994), valamint egy prolinban gazdag fehérjét kódoló cDNS szakasz (Subramaniam és mtsai, 1994) jelenlétét mutatta ki. Adatbázisok elemzése során fény derült arra, hogy az utóbbi cDNS szakasz homológiát mutat olyan génekkel, amelyek a kukorica embrióban, illetve a paradicsom fiatal termésében fejeződnek ki.

1.5. A *Cuscuta* (aranka) fajok, mint modellnövények

A *Cuscuta* genusba tartozó fajok a növényi élősködés vizsgálatának lehetséges modellnövényei. Sárgás színű, levéllel nem rendelkező növények. Csak az egyedfejlődésük kezdeti szakaszában rendelkeznek gyökérrel, amely a vízfelszívásban és a csíranövény megtámasztásában játszik szerepet. A későbbiekben, a gazdanövénybe hatoló szívógyökér kifejlődése után, mind a tápanyag mind a víz tekintetében a gazdanövényre szorulnak. Különlegesen gyors növekedési képességükkel tűnnek ki a holoparazita növények közül (Kuijt, 1969). Hajtásaik, amelyek akár 5 cm-t is növekednek egy nap, rövid időn belül képesek ugyanazon gazdanövény szárát, illetve levelét megtámadni, azokon újabb és újabb kapcsolatot létesíteni (3. ábra). E tulajdonságuk teszi alkalmassá az aranka fajokat a növényi élősködés tanulmányozására.



3. ábra Az aranka (*Cuscuta*) életciklusa (Graham és mtsai, 1979 alapján)

1.5.1. A *Cuscuta* in vitro tenyésztése

A parazitizmus élettanának, illetve biokémiájának megértéséhez jelentősen hozzájárulhat az *in vitro* tenyésztési technikák alkalmazása. Ezidáig kevés laboratórium foglalkozott az arankák *in vitro* körülmények között történő vizsgálatával.

Maheshwari és mtsai (1980), majd Maheshwari és Sreekrishna (1982) tartottak fenn *in vitro* körülmények között *Cuscuta reflexa* hajtáscsúcsokat, amelyeken a hormo-

nok hatására bekövetkező növekedési válaszokat tanulmányozták. Rendszerük azonban nem alkalmas a parazitizmust szabályozó folyamatok vizsgálatára. Ennek oka, hogy az általuk meghatározott körülmények között a hajtások csak időszakos növekedésre képesek, és nem tarthatók életben hosszú ideig. Furuhashi (1991) közölt először olyan *in vitro* módszert, amelyben az aranka növények hosszútávon fenntarthatók voltak. A növényi kultúra (*Cuscuta japonica*) kialakításában alapvető fontosságú volt a kinetin alkalmazása. Hatására a szilárdított táptalajjal érintkező szárrészleteken tápanyag és vízfelvételben szerepet játszó, hausztóriumszerű kidudorodások fejlődtek. Furuhashi megemlíti, hogy a kidudorodások mellett esetenként kallusz is képződött. Ennek a növekedése azonban nekrozis következtében megállt.

1.6. A növényi transzformáció lehetőségei

Az idegen gént hordozó aranka vizsgálata információt nyújthat a parazitizmus kialakulása és fennállása során specifikusan megnyilvánuló gének szerepéről. A transzformáns *Cuscuta* létrehozása érdekében szükség van egy hatékonyan működő, irányított génbeviteli rendszer kidolgozására.

Idegen DNS növényekbe juttatására az utóbbi években már számos módszer áll a kutatók rendelkezésére. Egy ideig az volt az általános felfogás, hogy az *Agrobacterium tumefaciens* baktériummal történő transzformációhoz kifejlesztett vektorrendszer alkalmas bármely növényfajba, fajtába történő génbevitelre. Számos növény, köztük mezőgazdaságilag fontos egyszikű fajok azonban ellenállónak bizonyultak az *Agrobac-*

terium fertőzéssel szemben. A korlátozott gazdaspecificitásból adódó problémák elkerülésére a kutatók alternatív módszereket fejlesztettek ki. Ilyen pl. a protoplasztokba történő közvetlen DNS bevitel, amely elősegíthető polietilén-glikolos kezeléssel, elektroporációval vagy mikroinjektálással. Ezt a nagy hatásfokot biztosító eljárást azonban csak olyan növényeknél érdemes alkalmazni, amelyek protoplasztjaiból felnevelhető a teljes növény. Sok esetben ez a rendszer nem áll rendelkezésre. Ilyenkor jelenthet megoldást a DNS sejtfalon át történő bejuttatása. Két ilyen módszer létezik: a biolisztikus, részecskékkel történő DNS bevitel és a mikroinjektálás (Potrykus, 1991). A mikroinjektálás hátránya a biolisztikus eljárással szemben az, hogy alkalmazásakor csak egy sejt transzformálódik és a módszer nehezen kezelhető.

1.6.1. *Transzformáció biolisztikus módszerrel*

A biolisztikus, részecskék belövésével történő DNS-beviteli eljárást Klein és mtsai (1987) dolgozták ki. A DNS-t 4 μm átmérőjű wolfram mikrorészecskékhez adszorbeálva, az ún. génpuskával juttatták be a növényi szövetekbe. A szemcsék nemcsak a citoplazmába, hanem a sejtmagba is bejuthatnak, alkalmat adva a bejuttatott DNS integrálódására. A módszer nagy előnye, hogy könnyen kezelhető. Nincs szükség speciális vektorok alkalmazására, mint pl. az *Agrobacterium*-mal történő transzformáció során. Egy lövéssel számos sejt transzformálható, a génbevitel a növény szerveibe és szinte bármilyen sejtfallal rendelkező sejt- vagy szövettípusba megvalósítható. A szöveteknek akár a felszíni, akár a mélyebb rétegei is transzformálhatók. Az idegen

DNS bejuttatása a szövetekbe a „lövés” során beállított fizikai paraméterektől függ.

1.6.2. Növényi génexpresszió tanulmányozása

Transzformációs rendszerek kialakításával lehetőség nyílik a növényi génszabályozás tanulmányozására. Ennek érdekében olyan vektorokat alakítanak ki, amelyek a vizsgálandó promóterekhez kapcsoltnak jelző- ún. riportergéneket hordoznak. A kísérletek során az idegen géntermék mennyiségének változásait követik nyomon. A legáltalánosabb riportergének által kódolt enzimek a neomicinfoszotranszferáz (NPTII), a klór-*amfenikol*acetil-transzferáz (CAT), a luciferáz és a β -glükuronidáz (GUS)(Dudits és Heszky, 1990).

Az *E. coli uidA* lokusza által kódolt hidroláz számos β -glükuronid lebontását katalizálja. A GUS aktivitás kolorimetriás, spektrofotometriás, fluorometriás vagy hisztokémiai vizsgálatára rendelkezésre álló szubsztrátumok egyike az 5-bróm-4-klór-3-indol- β -D-glükuronid (X-Gluc). Az indol hasítási termék oxidatív dimerizációjával egy nagyon stabil, oldhatatlan, erős színű indigó festék keletkezik. Ez lehetőséget teremt az enzimaktivitás *in situ* szövetspecifikus kimutatására, a riportergének kifejeződését meghatározó promóterek szöveti működésének tanulmányozására (Jefferson, 1987; Jefferson és mtsai, 1987).

2. CÉLKITŰZÉSEK

A gazdanövények és növényi élősködőjük között fennálló kapcsolat molekuláris biológiai hátterének vizsgálata betekintést nyújthat a növények közötti kommunikáció folyamatába. A kapcsolat kialakítása és fenntartása során az élősködő növényben megnyilvánuló gének tanulmányozása elvezethet a jelenség mélyebb megismeréséhez. Csoportunk a parazitizmus tanulmányozására szolgáló modellrendszernek a kis aranka (*Cuscuta trifolii*) és a lucerna (*Medicago sativa*) együttélését választotta.

Cuscuta trifolii esetében munkatársaink kimutattak egy specifikusan a parazita kapcsolat kialakítása és/vagy fenntartása során megnyilvánuló gén jelenlétét (Lados, 1994; Bakos és Lados, 1994). A gazdanövényhez nem kapcsolódó aranka szárából, a nem fertőzött lucernából (*Medicago sativa*), valamint a szívógyökereket hordozó növényi részekből cDNS klóntárat állítottak elő. Differenciál-hibridizációval meghatároztak egy klónt, amely specifikus cDNS szakaszt hordoz. A genomikus DNS analízise során bizonyították, hogy a kérdéses cDNS a *Cuscuta* genomjából íródott át. Bázissorrendje nem mutatott homológiát az eddig ismert, adatbankokban található génekkel, így nem áll rendelkezésre információ a feltételezhető biológiai funkciót illetően.

Ahhoz, hogy az élősködőben specifikusan kifejeződő gének működését *in situ* nyomon lehessen követni és molekuláris szerveződésükről információt nyerjünk szükség van a parazita növény *in vitro* szövettenyésztési, regenerációs és transzformációs rendszerének kialakítására.

Ezen *Cuscuta*-rendszerek kialakítása érdekében az alábbi feladatok megoldását tűztük ki célul:

- A. Dedifferenciált sejteket tartalmazó kallusztenyészet létrehozása.
- B. A kalluszból történő növényi regeneráció körülményeinek meghatározása.
- C. *In vitro* növényi kultúra kialakítása.
- D. *Cuscuta* kalluszba történő génátviteli eljárás kidolgozása.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Kísérleti anyagok

3.1.1. Vegyszerek, enzimek

A kísérletekhez használt finomvegzszerek Reanal, Serva és Sigma gyártmányúak voltak. A táptalajok szilárdításához Oxoid No.1 bakteriológiai agart használtunk. Az X-Gluc-ot a Gold Biotechnology cégtől vásároltuk. A restrikciós endonukleázokat a Promegá-tól vagy az Amersham-től szereztük be.

3.1.2. Növények, baktérium törzsek, plazmidok

Növények

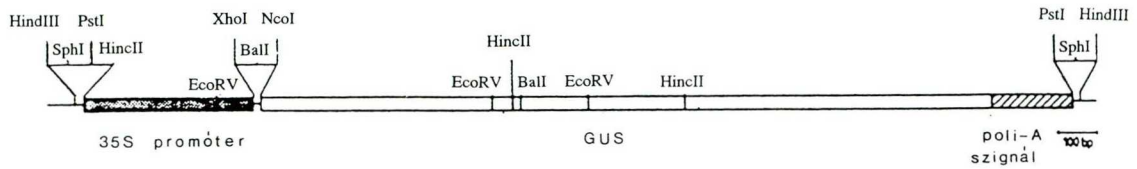
A Kompolton gyűjtött aranka (*Cuscuta trifolii*, Bab. et Gibs.) magokat Dr. Bócsa Iván akadémikus, a Gödöllői Agrártudományi Egyetem Fleischman Rudolf Intézetének professzora bocsátotta rendelkezésünkre. A lucerna (*Medicago sativa* bv. *Verko*) magok ugyancsak Kompoltról származtak. A magokat a felhasználásig sötétben, 4-6 °C-on tároltuk.

Baktérium törzsek:

DH-5 α : *F*⁻, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi1*, *hsdR17*, (*rk*⁻,*mk*⁺),
supE44, *relA1*, Δ (*lacZYA-ArgF*) *U169* [ϕ 80 *dlac* Δ (*lacZ*)
M15] Hanahan, Bethesda Research Laborato-
 ries (1983)

Plazmidok:

pRT103GUS CaMV 35S promóter által szabályozott β -glükuronidáz
 (GUS) riportergént hordozó pUC19 alapú plazmid (4. áb-
 ra) Töpfer és mtsai (1988)



4. ábra A pRT103GUS transzformációs plazmid *HindIII* fragmentumának fizikai és genetikai térképe

3.1.4. Táptalajok, oldatok

Valamennyi táptalajt autoklávban, 121 °C-on, 20 percig sterilizáltuk.

Baktériumtáptalajok:

LB: 10 g Bacto tripton, 5 g Bacto élesztő kivonatot és 10 g NaCl-ot tartalmaz literenként (pH 7.2). A szilárdítás 1.2 % (m/v) agarral történt (Sambrook és mtsai, 1989).

Növényi táptalajok: ld. 1. táblázat

Oldatok

NS	0.2N NaOH, 1% SDS
TE	10 mM Tris és 1 mM EDTA pH 8.0
TEG	25 mM Tris, 10 mM EDTA, 50 mM glükóz, pH 8.0
TAE	40 mM Tris-acetát, 1 mM EDTA, pH 7.5
X-gluc	3 mg/ml X-gluc foszfát pufferben (0.1 M, pH 7.0)

1. táblázat

MSB5, növénykultúra és szövettenyészet fenntartó táptalaj

Összetevők	mg/l
<u>Makroelemek (MS)</u>	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170
KNO_3	900
NH_4NO_3	650
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
<u>Mikroelemek (MS)</u>	
H_3BO_3	6.2
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	15.6
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
KI	0.83
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
Na_2EDTA	37.3
<u>Vitaminok (B5)</u>	
Thiamin.HCl	10
Pyridoxin	1
Nikotinsav	1
Mio-inozitol	100
Szénhidrát	30 g/l
(agar	0.7 %)
pH	5.7

MS (Murashige és Skoog, 1962)

B5 (Gamborg, 1975)

3.2. Módszerek

3.2.1. Az arankamagok felszíni sterilizése

A *Cuscuta* magok felszínének sterilizéséhez Furuhashi (1991) eljárását alkalmaztuk kisebb módosítással: A magokat 95% (m/m) kénsavval kezeltük, majd háromszor mostuk steril desztillált vízzel. Ezt követően Tween 20 detergenst tartalmazó 2% (m/v)-os kalcium-hipoklorit oldatban ráztunk egy órán keresztül. Steril desztillált vízzel ötször átmostuk. Az utolsó mosóvízben további egy órán keresztül tároltuk 4 °C-on.

A kezelt magokat Petri csészében, 1% (m/v)-os, 5.5 pH-jú, MS sókat tartalmazó agaron csíráztattuk.

3.2.2. Növény- illetve kalluszkultúra kialakítása, növényregeneráció

A kalluszosítási kísérleteinkhez 10 db, 5-10 mm hosszúságú csíranövényt, a regeneráltatás során pedig 1 db leválasztott szomatikus embriót helyeztünk minden 15 ml folyékony táptalajt tartalmazó 100 ml-es Erlenmeyer lombikba. A növénykék megfelelő oxigénellátását 200 fordulat/perc sebességű rázatással biztosítottuk.

Mind az *in vitro* növény-, mind a kalluszkultúra kialakítására és a kallusztenyészetből kiinduló növényregenerálásra irányuló kísérleteink során MSB5 alaptáptalajt alkalmaztunk. Ez MS makro-, mikro elemekből és B5 vitaminokból épült fel (1. táblázat). Az alkalmazott szénhidrátok koncentrációja 3% (m/v) volt, ha a táptalajban csak egy típus volt jelen. Párban alkalmazva a koncentráció 1.5-1.5% (m/v) volt. A folyékony, egyidejűleg maltózt, szorbitot, 5 mg/l kinetint és 0.75 mg/ml 2,4 -D-t tartalmazó táptalajon kifejlődött kallusz, azonos összetételű, szilárdított táptalajon (továbbiakban: kalluszfenntartó táptalaj) évekig tenyészthető. A folyékony közegben fejlődő kultúrákat

a táptalaj teljes cseréjével hetente, a szilárd táptalajon növekedőket pedig havonta oltottuk át.

A növényregenerációs kísérleteknél a kalluszfenntartó táptalajon növekedő differenciálatlan sejtcsoportokat olyan táptalajokra helyeztük át, amelyek csak a növekedést szabályozó anyagok tekintetében tértek el egymástól.

A csíráztatás során napi 16 órás, 20 W/m^2 , fehér fényű fluoreszcens megvilágítást alkalmaztunk. A kalluszokat sötétben neveltük. A regeneráció vizsgálatát sötétben, illetve 16 órás fényperiódus alkalmazásával végeztük.

A növényi tenyészeteket $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ -on tartottuk.

3.2.3. *Az arankanövények szövettani vizsgálata*

A szövettani metszeteket a Sárkány és Szalai (1957) által leírt módszerek szerint végeztük. A vizsgálandó növényeket legalább 24 órán át 30%-os etanolban tároltuk. Az ezt követő víztelenítés során a mintákat, oldatonként fél órára, 50%, 75%, 96%, 100% alkoholba, alkohol:benzol 2:1, 1:1, 1:2 arányú keverékébe, majd 100% benzolba helyeztük. Az így előkészített növényi anyagokat 5% méhviaszt tartalmazó edzett paraffinba ágyasztuk be. Mikrotómmal $13 \mu\text{m}$ vastagságú metszeteket készítettünk, amelyeket malachitzölddel és vezuvinnal festettünk. A mikrofotók Zeiss Kutatómikroszkóp alkalmazásával, 21 DIN érzékenységgű FUJICOLOR színes negatív filmre készültek.

3.2.4. *A növényi szövetek transzformációjában felhasznált DNS minták előkészítése*

A DNS minta előkészítését Sambrook és mtsai (1989) által leírt módszerek alapján végeztük. A plazmid DNS-t 500 ml LB táptalajban, $100 \mu\text{g/ml}$ ampicillin antibiotikum jelenlétében növesztett baktériumkultúrából preparáltuk.



Az 500 ml baktériumkultúrát centrifugáltuk. A sejteket 10 ml TEG-ben szuszpendáltuk, majd 20 ml NS hozzáadásával 0 °C-on, 10 perces inkubálással tártuk fel. A mintákat 15 ml nátrium-acetát (3 M, pH 4.8) hozzáadása után újabb 10 percig tartottuk 0 °C-on. A csapadékot 20 perces centrifugálással távolítottuk el. A plazmid DNS-t 1 térfogat izopropanollal (15 perc, 0 °C) kicsaptuk, majd centrifugáltuk. A csapadékot 70%-os etanolos mosás, majd szárítás után 3 ml TE-ben oldottuk fel.

Az így nyert DNS-t CsCl - ethidium-bromid egyensúlyi sűrűség grádiens centrifugálással tisztítottuk tovább. A preparált plazmid DNS felépítését restrikciós endonukleázokkal történő emésztéssel ellenőriztük. A minták elválasztására 1%-os agaróz gélt és TAE puffert alkalmaztunk. Molekulatömeg markerként vad típusú lamda fág DNS-ének emésztéséből származó, ismert molekulatömegű fragmentumokat használtunk. A gélelektroforézist követően a DNS-t 0.5 µg/ml etidium-bromiddal festettük és 254 nm hullámhosszúságú ultraibolya fénnnyel tettük láthatóvá.

3.2.5. Növényi szövetek transzformációja bioliztikus módszerrel

A vizsgálni kívánt plazmid DNS-t a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Növényi Biotechnológiai Intézetében kifejlesztett „Génpuska” segítségével juttattuk be a növényi szövetekbe. A DNS belövés körülményeit dr. Jenes Barnabás dolgozta ki. A nagy tisztaságú (3.2.4. fejezetben leírtak szerint tisztított) plazmid DNS-t 1 µg/µl koncentrációban, steril desztillált vízben oldottuk fel. Ezt követően, Perl és mtsai módszere szerint (1992), Ca(NO₃)₂-tal kötöttük az 1.1 µm átmérőjű wolfram szemcsékhez (M10-GTE/Sylvania). A DNS-sel borított szemcséket 25 kilobar nyomású nitrogén gáz segítségével gyorsítottuk. A transzformáció során a csíranövényeket 1%-os desztillált vizes agaron, a kalluszokat kalluszfenntartó táptalajon tartottuk.

3.2.6. *GUS* (β -glükuronidáz) aktivitás hisztokémiai kimutatása

A vizsgálandó növényi mintákat X-gluc oldatba helyeztük, majd 16 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-on. A növényi szövetekben megnyilvánuló β -glükuronidáz aktivitásnak köszönhető kék szín megjelenését másnap, sztereomikroszkóp alatt vizsgáltuk meg. Zöld növényi anyagok esetében, a kék szín elkülönítését nehezítő klorofillt 70%-os etanollal távolítottuk el. A vizsgálandó gén tranziens expressziójának kimutatására a növényi anyagokat a transzformációt követő 48 óra elteltével festettük hisztokémiai módszerrel.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

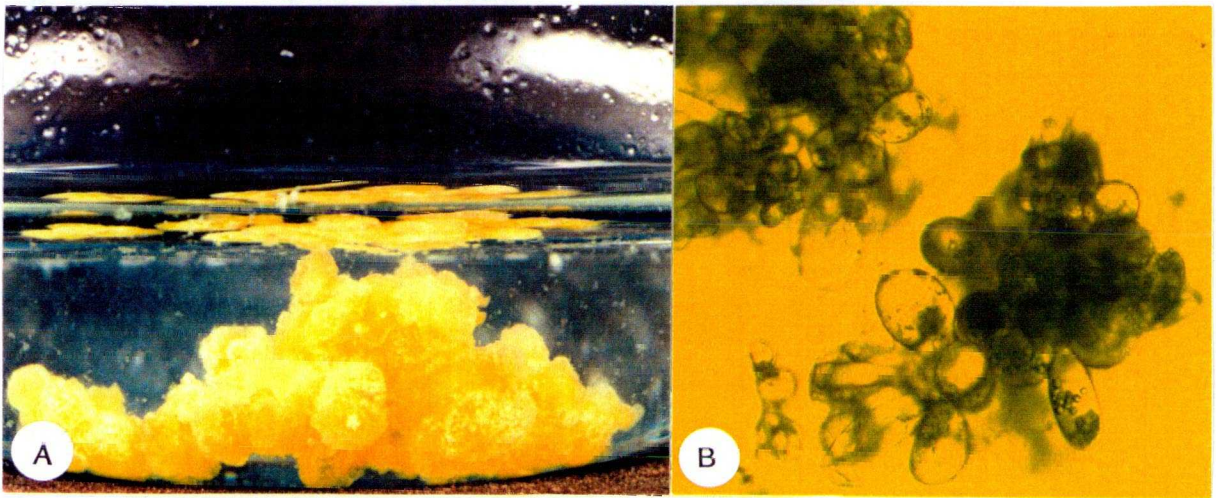
4.1. Kalluszképződés vizsgálata

Cuscuta trifolii 5-10 mm hosszúságú intakt csíranövényeken, illetve csíranövények szárrészletein vizsgáltuk a kallusz szövet kialakulását. A növényi anyagokat szilárdított táptalajra helyeztük, amelyben szénforrásként glükóz volt jelen. A táptalajok növekedésszabályozó anyagokat is tartalmaztak: 1 mg/l kinetint, valamint 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 2.0 és 2.5 mg/l 2,4-D-t. Amikor az alkalmazott 2,4-D koncentráció meghaladta az 1 mg/l értéket a szárrészletek elpusztultak. Amennyiben a koncentráció ez alatt az érték alatt maradt, a növények 5 hétig éltek, de kallusz kialakulását nem tapasztaltuk. A további kísérleteket folyékony táptalajon végeztük. Az alkalmazott táptalaj glükózt, valamint 1-10 mg/l kinetin és 0.5-1 mg/l 2,4-D különböző kombinációit tartalmazta. A folyékony közegben a szárrészek elpusztultak. Ezzel szemben, ha a tenyésztés során mindkét növekedést szabályozó anyag jelen volt, az intakt csíranövényeken kalluszszerű struktúrák jelentek meg. A legkedvezőbbnek 5 mg/l kinetin és 0.75 mg/l 2,4-D kombinációja bizonyult.

4.1.1. A különböző szénhidrátok kalluszképződésre gyakorolt hatásának vizsgálata

A glükóz tartalmú táptalajon fejlődő kallusz nagyon kemény, tömör felépítésű volt. Feltételeztük, hogy a kalluszszerkezet kialakítását az alkalmazott szénhidrát

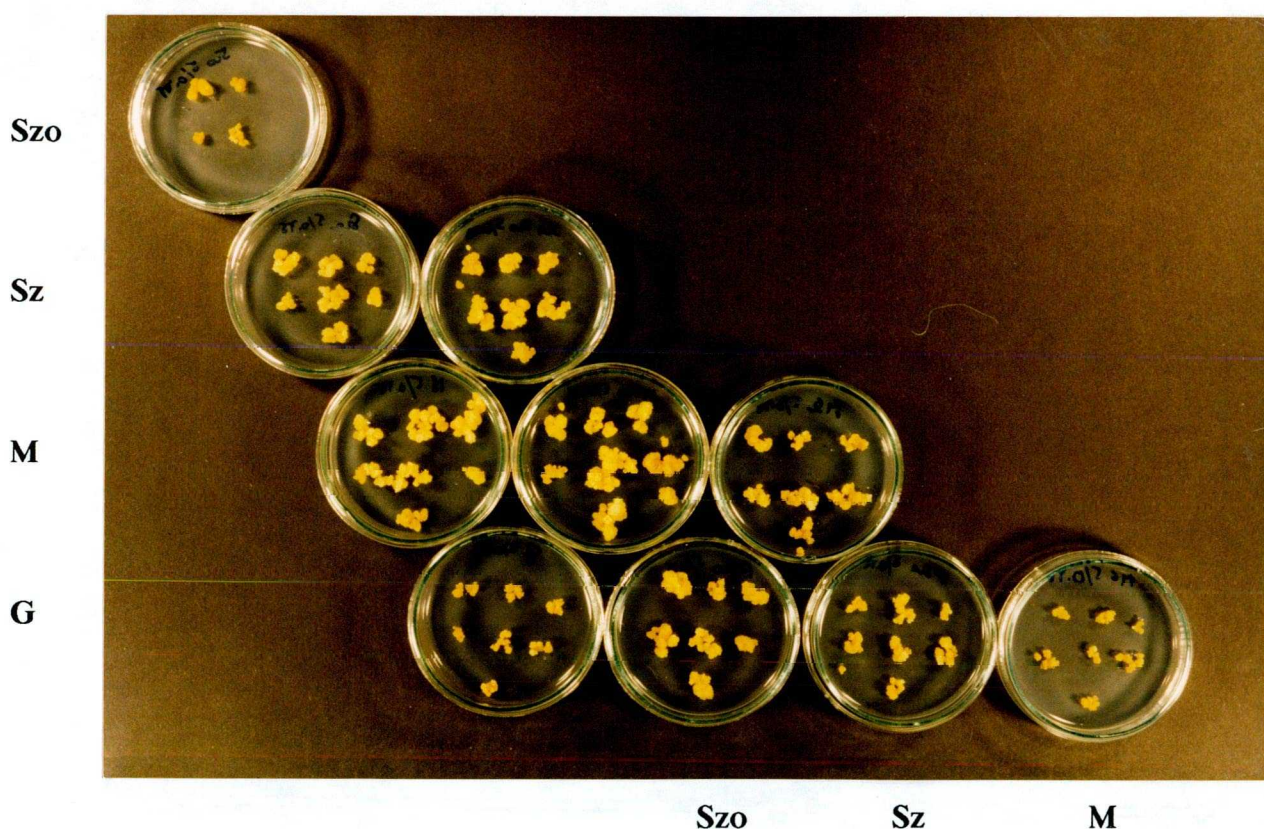
minősége nagy mértékben befolyásolja. Négy szénhidrát, a glükóz, a szacharóz, a szorbit és a maltóz hatását vizsgáltuk meg. A cukrokat egyedül vagy páronként alkalmaztuk. Azt tapasztaltuk, hogy a szénforrás minőségének változtatásával jelentősen változott a növekedő kalluszok szerkezete. A legtömörebb szerkezetű kallusz glükóz jelenlétében fejlődött. A maltóz-szorbit illetve maltóz-szacharóz párok esetén alakult ki olyan törékeny, laza szerkezetű kallusz, amelyekről kisebb sejtcsoportok leválását is megfigyeltük (5. ábra). Az így létrehozott kallusztenyészetek 6 hónapig stabilan fenntarthatók voltak.



5. ábra Kalluszfejlődés maltóz és szacharóz szénforrást, 5 mg/l kinetin és 0.75 mg/l 2,4-D növekedést szabályozó anyagokat tartalmazó MSB5 folyékony táptalajban. **A:** Fiatal, 5-10 mm-es csíranövényekből indított kalluszkultúra. **B:** Nagy kalluszcsoomókról leváló, osztódó sejtaggregátumok.

A folyékony táptalajban fejlődött kalluszokat azonos összetételű, de szilárdított táptalajra helyeztük át. Amennyiben az egyes szénhidrátokat önmagukban alkalmaztuk, akkor a maltóz bizonyult legjobb szénforrásnak kallusznövekedés szempontjából. Ezt követte a szacharóz, a szorbit és a glükóz. Bár a szorbit önmagában is elősegítette a

kalluszképződést, kedvező hatása más szénhidrátok mellett nyilvánult meg igazán. Valamennyi vizsgált szénhidrát esetében a jelenlévő szorbit fokozta a kalluszok növekedését. A *Cuscuta trifolii* kalluszkultúra kialakulásában tehát a maltóz-szorbit szénhidrát pár bizonyult legmegfelelőbbnek (6. ábra). Ezeket a szénhidrátokat, valamint 5 mg/l kinetint és 0.75 mg/l 2,4-D-t tartalmazó táptalajon a tenyészet évekig fenntartható.



6. ábra A szénhidrátok hatása a kalluszképződésre.

A kalluszokat a különböző szénhidrátokat tartalmazó folyékony táptalajból azonos összetételű, szilárdított táptalajra helyeztük át egy hónapra. **G:** glükóz, **M:** maltóz, **Sz:** szacharóz, **Szo:** szorbit.

A szénhidrátok élősködés folyamatában betöltött pontos szerepéről ugyan még nincsenek ismereteink, irodalmi adatok utalnak arra, hogy egyes cukrok (pl. glükóz,

fruktóz) illetve cukoralkoholok (pl. mannit, pinit) fontos szerepet töltenek be a paraziták metabolizmusában (1.3. fejezet). Ennek ismeretében nem váratlan jelenség, ha a parazita növény kalluszának kialakulását is meghatározza az alkalmazott szénhidrátok minősége és esetleg speciális, a szövettenyésztési gyakorlatban nem általánosan használt szénhidrátokon fejlődik legjobban.

Bár a szövettenyészetek kialakításánál leggyakrabban alkalmazott szénhidrát a szacharóz és a glükóz, ismeretes, hogy a szorbit - a cukoralkoholok között kivételként - elősegíti az alma (Chong és Taper, 1974) illetve a Rosaceae családba (Coffin és mtsai, 1976) tartozó növények kalluszainak növekedését. A maltóz, a *Petunia* (Raquin, 1983), a búza (Last és Brettell, 1990) és az árpa (Finnie és mtsai, 1989) antérakultúra esetében, valamint a lucerna szomatikus embrióképződés elősegítésében (Strickland és mtsai, 1987) bizonyult hatékonyabbnak a többi vizsgált szénhidráttal szemben.

Rendszerünkben kedvező hatásúnak bizonyult két szénhidrát kalluszfenntartásban betöltött szerepéről nem állnak rendelkezésünkre kísérleti adatok. Elképzelhető, hogy szénforrásként és/vagy ozmotikumként vesznek részt a folyamatban. Szerepük tisztázására további vizsgálatokra van szükség.

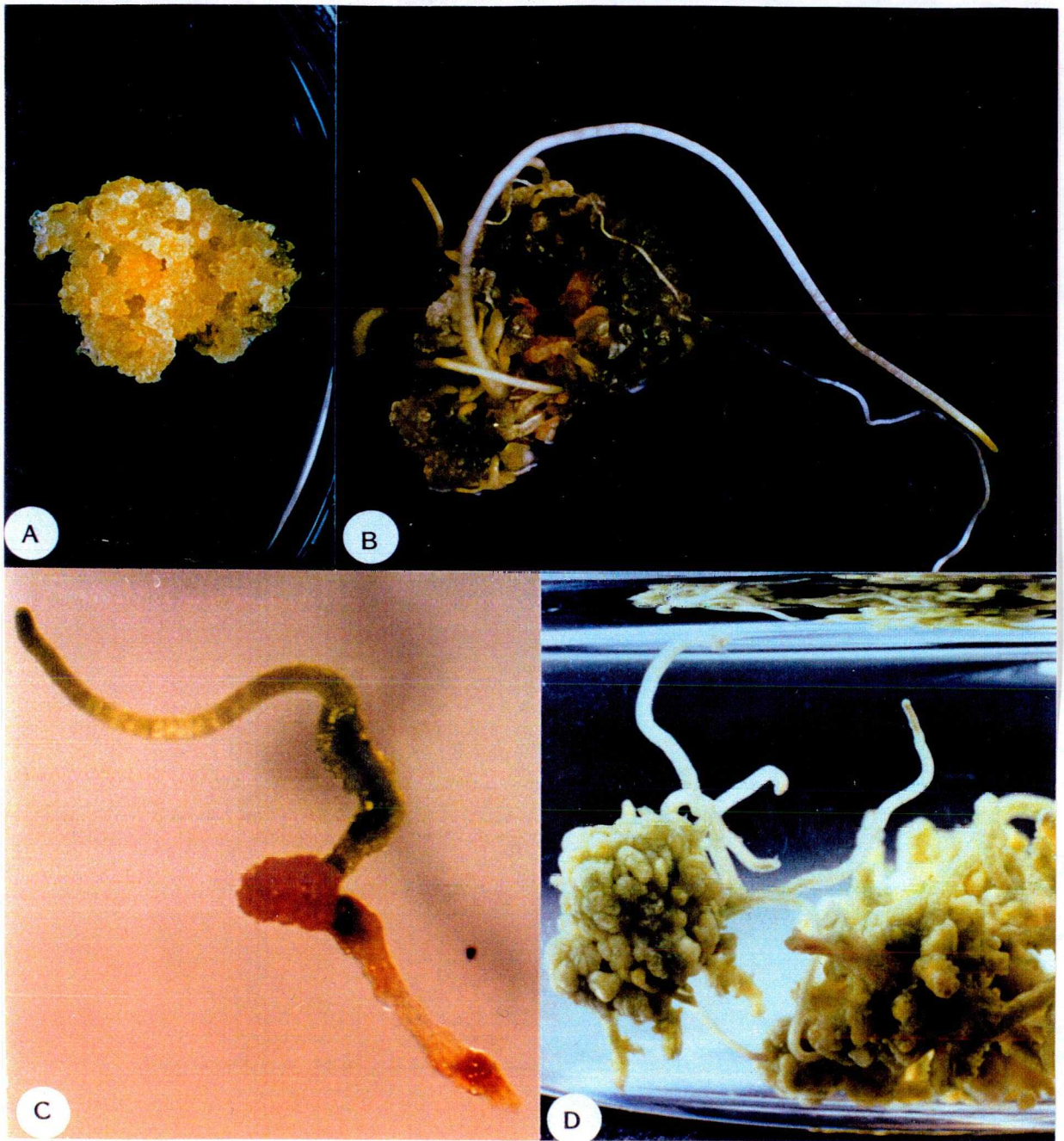
4.2 *Cuscuta* regenerálása kalluszból

Maheshwari és Baldev (1961) megfigyelte, hogy az auxin tartalmú táptalajon fenntartott zigotikus embrió eredetű *Cuscuta reflexa* kalluszokon alkalomszerűen szomatikus embriók alakultak ki. Ezekből később növények fejlődtek. Mi is hasonló jelen-

séget tapasztaltunk szilárd táptalajon 5 mg/l kinetin, 0.75 mg/l 2,4-D, maltóz és szorbit szénforrás együttes jelenlétében fejlődő *Cuscuta trifolii* kalluszok esetében. Annak érdekében, hogy az embrióképződés ne véletlenszerűen indukálódjon, megvizsgáltuk a megvilágítás, a kinetin alkalmazásának, valamint a növekedésszabályozók teljes elhagyásának a folyamatra gyakorolt hatását. Abban az esetben, ha a táptalaj nem tartalmazott növekedést szabályozó, hormonszerű anyagokat vagy ha egyedül kinetint alkalmaztunk 2 mg/l koncentrációban, a kalluszokban a megvilágítástól függetlenül indukálódott az embrióképződés (7B. ábra). Ezek a megfigyelések összhangban vannak más növényeken végzett kísérletek eredményeivel (Maróti, 1976). Számos növényi kallusz esetében bizonyították, hogy a 2,4-D megvonása (pl. sárgarépa, liliom) és a kinetin alacsonyabb koncentrációban való alkalmazása (aszparagusz) elősegítette az embriogenezist. Rozsnok esetében a folyamat a megvilágítástól függetlennek bizonyult.

Nemcsak a kalluszon differenciálódtak embriók. Újabb embriók kialakulását a különböző fejlődési stádiumban lévő embriókon is megfigyeltük, valamint abban az esetben is, amikor a csíranövények hajtása érintkezett a kinetint tartalmazó táptalajjal (8A, 7C. ábra). E folyamat (másodlagos embriogenezis) eredményeként 2 mg/l kinetin jelenlétében, valamint megvilágítás alkalmazásával, több éven keresztül fenntartható, embriogén kallusztenyészet alakult ki.

In vitro növénykultúra kialakítása érdekében a szomatikus embriókból fejlődő csíranövényeket leválasztottuk a tenyésztetről, és folyékony, 2 mg/l kinetint, valamint maltózt és szorbitot tartalmazó táptalajba helyeztük át. Az *in vitro* képződött csíranövények a tenyésztési körülmények hatására hajtásokat hordozó aggregált struktúra-



7. ábra *Cuscuta* kalluszból történő növényregeneráció.

A: Maltózt, szacharózt, 5 mg/l kintint és 0.75 mg/l 2,4-D-t tartalmazó MSB5 szilárd táptalajon fejlődő kallusz. **B:** 2 mg/l kintint tartalmazó táptalajon kialakuló embriogén kallusztenyészet és az embriókból fejlődő hajtások. **C:** A kultúráról „leválasztott” csíranövény. **D:** A „leválasztott” csíranövényből kifejlődő aggregált struktúrák 2 mg/l kintint tartalmazó folyékony táptalajban.

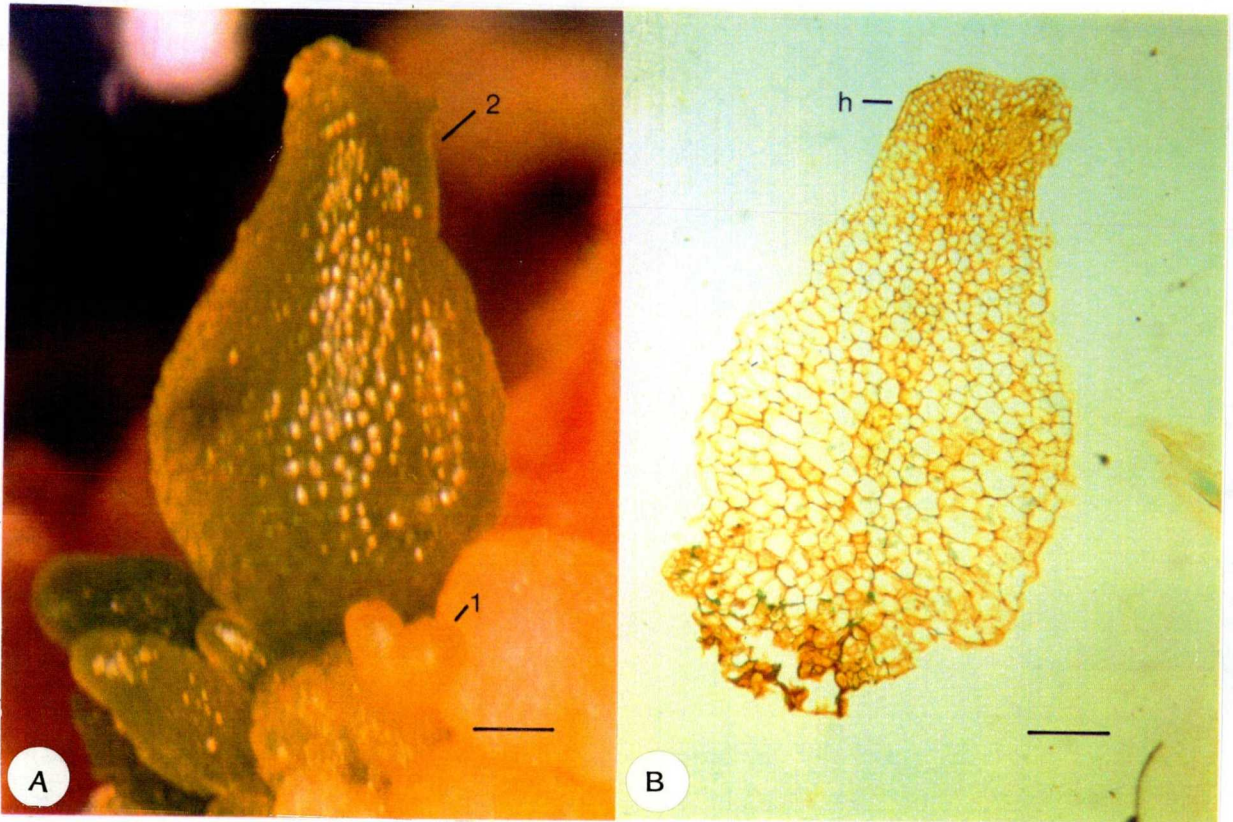
kat (7D. ábra) alakítottak ki a zigotikus csíranövényekhez hasonló módon (ld. 4.4 fejezet).

Az *in vitro* regenerálódó aranka nem veszítette el a lucernafelismerő képességét, a növényházban nevelt gazdanövény szárára rátekeredett és az érintkező részeken hausztóriumokat hozott létre.

4.3. A szomatikus embriófejlődés morfológiai és szövettani bizonyítékai

A növényi sejt- és szövettenyészetekből a regeneráció két úton indulhat el. Az egyik lehetőség az, hogy csak a hajtás vagy csak a gyökér differenciálódik. Ezt a jelenséget nevezzük organogenezisnek. A másik lehetőség az ún. szomatikus embriogenezis, amikor a tenyészetben embriók fejlődnek. Ennek során a hajtás és a gyökér egyidejűleg alakul ki. A szomatikus embriogenezis mind morfológiai, mind anatómiai vonatkozásban közel azonos a zigotikus embriogenezissel. A megtermékenyített petesejtből történő differenciálódás egymást követő stádiumai, a gömb-, szív- és torpedófázis a szomatikus embriók fejlődésekor is megfigyelhetők és morfológiailag jól elkülöníthetők.

A 2 mg/l kinetint tartalmazó, szilárdított táptalajra átoltott kalluszok a szöveti differenciáció jeleit mutatták. Jól felismerhetők voltak a zigotikus embriófejlődés különböző fázisaiban lévő embriók (8A. ábra). Az embriódifferentiáció eredményeként olyan növénykéik jöttek létre, melyek alakilag hasonlóak voltak a magokból kifejlődő csíranövényekhez (9A,D. ábra). Sem a zigotikus sem a szomatikus embrióeredetű csíranövények nem rendelkeztek sziklevéllel, alakjuk fonálszerű volt. Mindkét növénykén



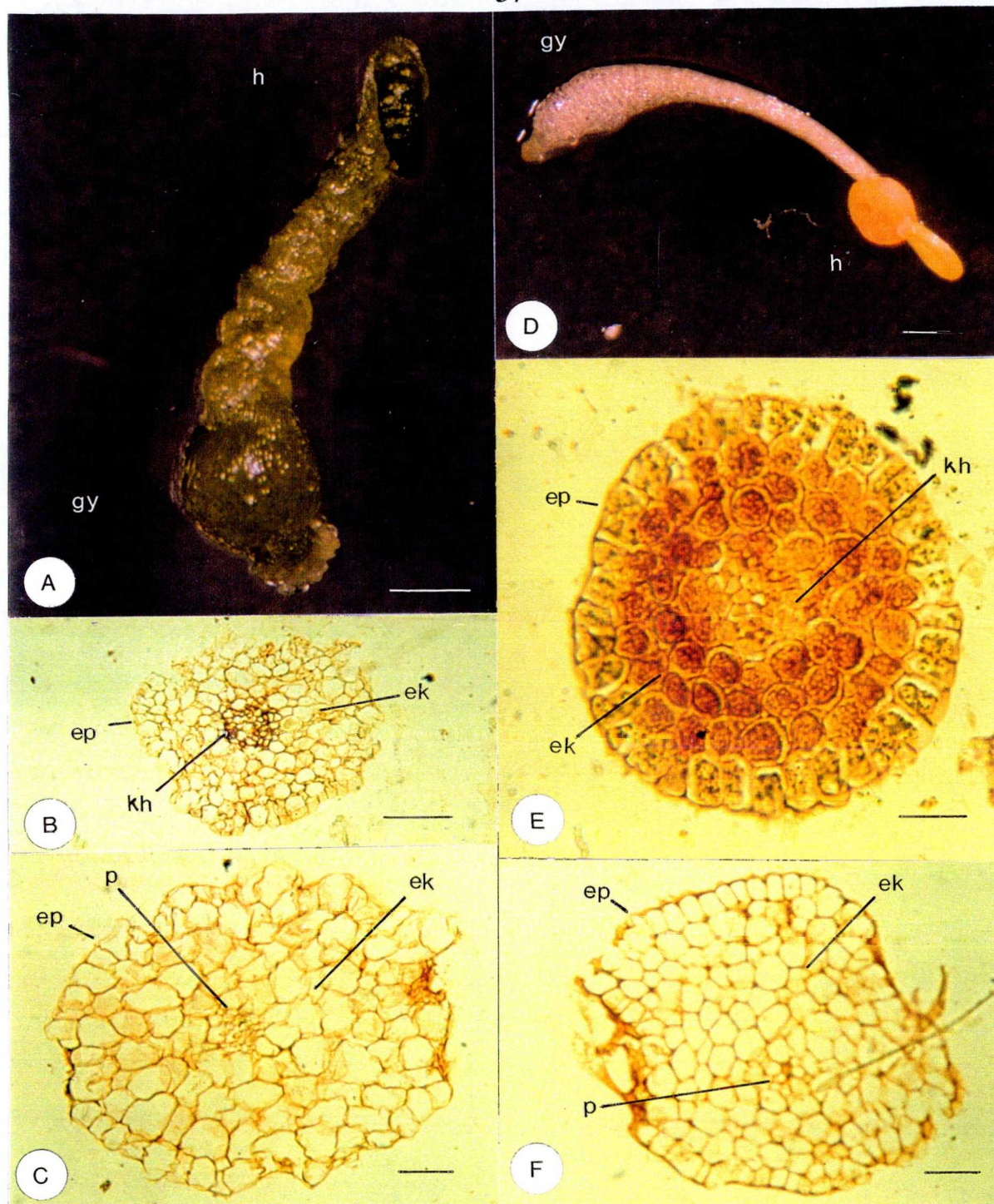
8. ábra A szomatikus embriogenezis bizonyítása. I.

A: 1. szív- 2. torpedóstádiumú *Cuscuta* szomatikus embrió **B:** Torpedóstádiumú embrió metszeti képe. h: hajtáspólus (lépték: 25 μ m)

szembetűnő volt egy jellegzetes megvastagodás (9A,D. ábra), amely a növény gyökerének tekinthető. Ez a szerv feltehetően a vízraktározásban játszik szerepet (Szatala és Gimesi, 1965).

4.3.1. A regenerálódó csíranövények és szomatikus embriók mikroszkópos vizsgálata

A szomatikus embriogenezis folyamata akkor bizonyított, hogyha a zigotikus és a szomatikus embriók, illetve az azokból fejlődő csíranövények szövettanilag is megfeleltethetők egymásnak. Annak igazolására, hogy a *Cuscuta trifolii* esetében a regeneráció ezúton valósul meg, a szomatikus sejt eredetű, torpedó fejlődési stádiumban lévő



9. ábra A *Cuscuta* szomatikus embriogenezis bizonyítása. II.

Szomatikus sejt eredetű embrióból fejlődő csíranövény makroszkópos képe (A, lépték: 200 μm); száracsckájának (B, lépték: 25 μm), illetve gyökérrészének keresztmetszeti képe (C, lépték: 50 μm).

Zigotikus eredetű embrióból fejlődő csíranövény makroszkópos képe (D, lépték: 200 μm); száracsckájának (E, lépték: 10 μm), illetve gyökérrészének keresztmetszeti képe (F, lépték: 50 μm). gy: gyökérpólus, ep: epidermisz, ek: elsődleges kéreg, h: hajtáspólus, kh: központi henger, p: prokambiális nyaláb.

embrió, illetve a kalluszból regenerálódó és a magból fejlődő csíranövények szöveti felépítését vizsgáltuk. A szomatikus sejt eredetű és a megtermékenyített petesejtből származó csíranövények között nemcsak alaki, hanem nagy fokú szövetszerkezeti hasonlóság is tapasztalható (9. ábra). A két eltérő eredetű csíranövény száracskájának keresztmetszeti képén (9B,E. ábra), a lombosmoha szárához hasonló, nagyon kezdetleges és differenciálatlan szöveti felépítés (Sárkány, 1960) látható. Elkülöníthetők az epidermisz, az elsődleges kéreg parenchimatikus sejtjei, valamint a központi henger, amelyben hancs- és fanyalábok helyezkednek el. A két csíranövény alapi részén található gyökérben (9C,F. ábra) a száracskával összehasonlítva nagyobb mennyiségű, vakuolizált sejteket tartalmazó parenchimaszövet figyelhető meg. Ez valószínűleg összefüggésben áll a gyökér víztartó szerepével. A zigotikus eredetű csíranövény gyökerének központi részében prokambiális nyaláb húzódik (Szatala és Gimesi, 1965). Ennek jelenléte a szomatikus eredetű csíranövényben is kimutatható.

A polaritás már a torpedóstádiumú embrióban is megfigyelhető (8B. ábra). Az embrió a nagy méretű vakuolizált sejtek mellett osztódó szövetre jellemző, kisméretű sejteket is tartalmaz, amelyek a feltételezett hajtáscsúcs részét képezik. A kétpólusú szerkezet a szomatikus, illetve a zigotikus csíranövényben válik kifejezetté. Ezen eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a *Cuscuta trifolii* esetében a dedifferenciált kalluszból történő növényregenerálódás szomatikus embriogenezis útján megy végbe.

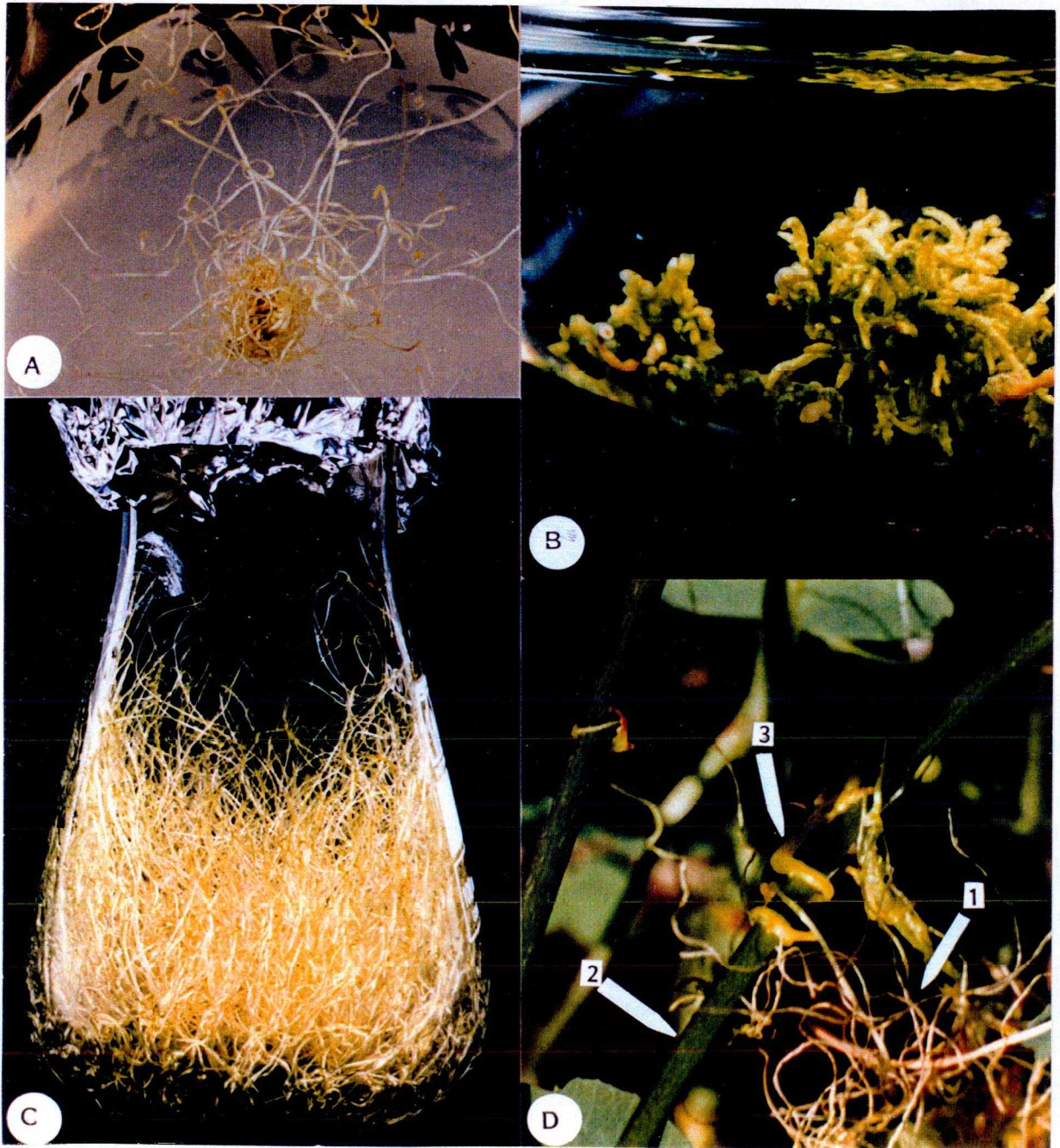
4.4. *In vitro* növénykultúra kialakítása

In vitro növénykultúra létesítéséhez fiatal, 5-10 mm hosszúságú csíranövényeket használtunk. A növényeket glükóz szénforrást és 1mg/l kinetint (Furuhashi, 1991) tartalmazó szilárdított táptalajra helyeztük. A csíranövények a tenyésztéstartást követő 8. hétre számos hajtáskezdeményt fejlesztettek (10A. ábra), amelyek aggregált struktúrát alkottak. A hajtások igen lassan növekedtek és 2-3 cm elérése után elszáradtak. Ezt követően még néhány újabb hajtás jelent meg. Ezek a struktúrák 13-16 hétig maradtak fenn. Feltételezve, hogy a hajtások pusztulásáért a túl nagy mértékű transzspiráció és/vagy a kis felszínen történő tápanyagfelvétel a felelős, a csírákon való hajtásképződést azonos összetételű folyékony közegben is megvizsgáltuk. A csíranövények sokkal gyorsabban fejlesztettek hajtást a folyadékkultúrában, mint szilárd táptalajon. Növekedésük mértéke is jóval nagyobb volt. Gyorsan növekvő aggregált struktúrák képződtek (10B. ábra), amelyeken az első hajtások már az indítást követő 6. héten megjelentek.

A továbbiakban a kinetin hajtásfejlődésre gyakorolt hatását vizsgáltuk 1-10 mg/l koncentrációtartományban. Az optimum koncentráció 2 mg/l-nek adódott: a hajtások már a kultúra indítását követő 4. héten megjelentek, és további két hét elteltével betöltötték a rendelkezésükre álló teret (10C. ábra).

A hajtáskezdeményeket és hajtásokat hordozó aggregált növényi struktúrák több részre oszthatók. Ezáltal lehetőség nyílik új, „klonális” kultúrák létrehozására.

Az *in vitro* növényi kultúrában fejlődött hajtásdarabokat levágtuk és növényház-



10. ábra *In vitro* növénykultúra létrehozása és tesztelése *in vivo*.

A: Szilárd, 1mg/l kinetint tartalmazó táptalajon fejlődő *Cuscuta* hajtások. **B:** 2 mg/l kinetint tartalmazó folyékony táptalajban három hét tenyésztés után kialakuló aggregált struktúrák. **C:** A 10B. ábrán látható struktúrákból az indítást követő hatodik hétre számos hajtás fejlődött ki. **D:** Az *in vitro* növénykultúrából származó hajtásdarabok gazdanövénnyel érintkezve parazita módon viselkednek. 1. Levágott *Cuscuta* szárdarabok, 2. Lucerna szár, 3. Parazita kapcsolódás.

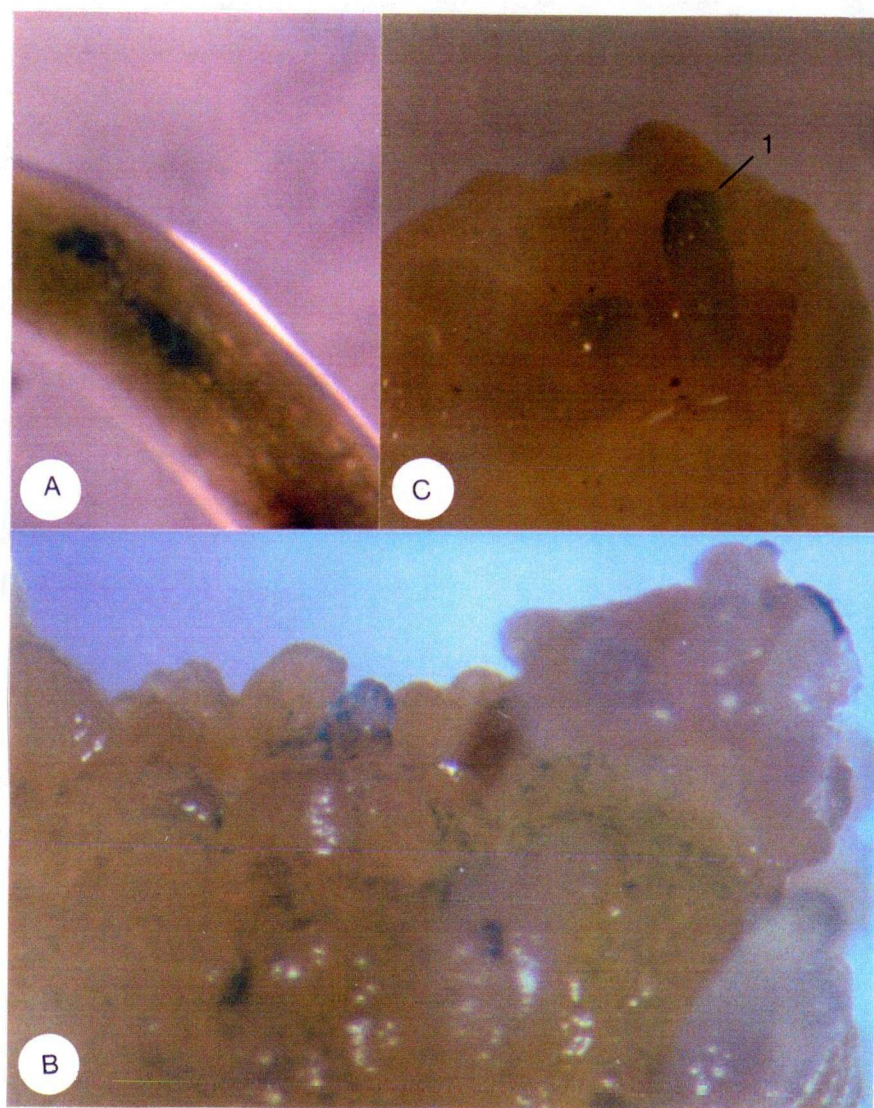
ban nevelt gazdanövényre helyeztük. A szárdarabok parazita módon viselkedtek. A gazdanövényre tekeredést követően működőképes hausztóriumokat (10D. ábra) és számos új hajtást fejlesztettek.

4.5. *Cuscuta* transzformációja expressziós tesztplazmiddal

Az ismert transzformációs eljárások közül a Klein és mtsai (1987) által kidolgozott biolisztikus módszert választottuk. Alkalmazhatóságának bizonyítására tesztplazmidot használtunk, amely hordozta az *E. coli* β -glükuronidázt (GUS) kódoló struktúrgént (Jefferson és mtsai, 1987). Az enzimaktivitás szövetspecifikus megnyilvánulását X-Gluc szubsztráttal vizsgáltuk, miáltal lehetőségünk nyílt a GUS gént hordozó plazmid növényi sejtekbe jutásának hisztokémiai nyomkövetésére.

A transzformációs tesztplazmid (pRT103GUS - 4. ábra) által hordozott GUS struktúrgén expresszióját a karfiol mozaik vírus (CaMV) 35S promótere határozta meg. A számos növényben, és azok különböző szöveteiben erős expressziót mutató (Jefferson és mtsai, 1987; Ow és mtsai, 1986) promóter működését csíranövényben és kalluszszövetben vizsgáltuk. 48 órával a belövést követően végeztük el X-Gluc-kal a szövetek festését. Sem a *Cuscuta trifolii* csíranövény, sem a kallusza nem mutatott GUS alapaktivitást. Ezzel szemben, a 35S promótert hordozó plazmidot tartalmazó kalluszokban és csíranövényekben kimutatható volt a jelzőgén tranziens expressziója. A 11A. és 11B. ábrán megfigyelhető kék színreakció jól mutatja, hogy a β -glükuronidáz aktivitás a wolfram részecskék becsapódási helyein nyilvánult meg.

Mivel a virális promóter mind a dedifferenciálódott, mind a differenciált szöve-



11. ábra pRT103GUS tesztplazmiddal transzformált kalluszban és csíranövényben megnyilvánuló β -glükuronidáz aktivitás hisztokémiai kimutatása. Tranziens expresszió aranka csíranövényben (A) és kalluszban (B). C: GUS enzimaktivitás kimutatása 1 hónappal a kallusz transzformálást követően. 1. Differenciálódó, β -glükuronidáz expressziót mutató aranka embrió.

tekben működött, alkalmasnak látszott a transzformálást követő integráció nyomonkövetésére kalluszban és a kalluszból regenerálódó növényekben. A pRT103GUS plazmiddal transzformált kalluszokat egy hónap elteltével hisztokémiai módszerrel ismét megvizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy számos sejt, illetve sejtcsoport mutat GUS

aktivitást. A 11C. ábrán az is szembetűnik, hogy nemcsak a kalluszban, hanem a spontán differenciálódó aranka embriókban is kimutatható a β -glükuronidáz enzim működése. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a növényi szövetekbe juttatott plazmid DNS beépülhetett a növényi genomba és az általa hordozott információ megnyilvánul a regeneráció során is. Természetesen a hisztokémiai vizsgálat nem nyújt elegendő bizonyítékot a tesztplazmid genomba integrálódására. Szükség van a beépülés DNS szinten történő, Southern DNS-DNS hibridizációval való ellenőrzésére is. Ezek a vizsgálatok folyamatban vannak.

A kísérleteink során használt tesztplazmidba épített CaMV 35S promóter nemcsak a transzformációs esemény nyomonkövetésére alkalmazható. Olyan vizsgálatokra is felhasználható, amelyek során a növényben egy idegen fehérje szintézisét kívánjuk elérni. Jefferson és mtsai (1987b) kimutatták, hogy a promóter a növények gyökerében működik legnagyobb mértékben. Ez alapján feltételezhető, hogy a gyökerekkel nem rendelkező kifejlett *Cuscuta*-ban a 35S promóter a fejlődő szívógyökérben biztosítja majd legnagyobb mértékben az általa irányított gének kifejeződését.

A fentiekben ismertetett kísérleti eredményeinket összefoglalva, a *Cuscuta trifolii* növényregenerációs rendszer kidolgozása megteremtette a lehetőséget a transzformációs aranka létrehozására. Bár a transzformációs rendszer kialakításában még csak a kezdeti lépésekig jutottunk el, kísérleteink alapján elmondhatjuk, hogy a biolisztikus génátviteli módszer alkalmas a parazita növénybe történő génbevitelre.

A transzformációs rendszer végleges kialakításával az élősködőben olyan szabályozó mechanizmusok tanulmányozására nyílik majd lehetőség, amelyek speciálisan a parazitizmus kialakításában és fenntartásában játszanak szerepet.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során olyan *in vitro* növényi rendszereket alakítottunk ki, melyek többek között a *Cuscuta* transzformációs rendszer alapját képezik. Ily módon a későbbiekben lehetőség adódhat az élősködő növény parazitizmusban szerepet játszó génjeinek tanulmányozására.

Megoldottuk a növényi dedifferenciáció, majd a regeneráció kérdését. Ezt követően meghatároztuk a dedifferenciált szövetekbe történő génátviteli eljárást.

A. Dedifferenciált sejteket tartalmazó kallusztényészet létrehozása

1. Megállapítottuk, hogy *Cuscuta* kalluszsövet csíranövényből kiindulva, MSB5 folyékony táptalajon 5 mg/l kinetin és 0.75 mg 2,4-D jelenlétében fejlődik.
2. A kallusz szerkezetét jelentősen befolyásolja az alkalmazott szénhidrátok minősége. Gyors növekedésű, törékeny szerkezetű kallusz az egyidejűleg maltózt és szorbitot tartalmazó táptalajon fejlődik ki.
3. A folyékony táptalajból szilárdított közegre áthelyezett kallusz 5 mg/l kinetin, 0.75 mg/l 2,4-D, maltóz és szorbit jelenlétében évekig fenntartható.

B. A kalluszból történő növényi regeneráció körülményeinek meghatározása

1. A kalluszokon embrióképződés indukálható maltózt, szorbitot és 2mg/l kinetint, illetve növekedésszabályozókat nem tartalmazó MSB5 táptalajon.

2 mg/l kinetin jelenlétében az ún. másodlagos embriogenezis jelensége figyelhető meg, ami által több évig fenntartható embriogén kallusztenyészet hozható létre.

2. Makroszkópos és mikroszkópos vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy rendszerünkben a növényregeneráció szomatikus embrióképződés révén valósul meg. Kimutattuk az embriogenezisre jellemző fejlődési stádiumokat a differenciálódó növények között. Az *in vitro* tenyészetből regenerálódó növényeken a makroszkóposan is megfigyelhető hajtás- és gyökérpólus egyidejű jelenlétét szövettani metszetek vizsgálatával is alátámasztottuk.

C. *In vitro* növényi kultúra kialakítása

Kidolgoztuk az *in vitro* növényi kultúra kialakításának módszerét. Ennek során az *in vitro*, vagy a magból kifejlődő csíranövényeket folyékony, maltózt, szorbitot és 2mg/l kinetint tartalmazó MSB5 táptalajba helyeztük. Mind a szomatikus, mind a zigotikus eredetű csíranövény hajtásokat fejlesztő aggregált struktúrát alakított ki. A levágott hajtások a növényházban nevelt lucernát, mint gazdanövényt felismerték és működőképes hausztóriumokat fejlesztettek.

D. *Cuscuta* kalluszba történő génátviteli eljárás kidolgozása

1. Expressziós tesztplazmid segítségével kimutattuk, hogy a részecskékkel történő génbeviteli módszerrel *Cuscuta*-szövetekbe idegen gének juttathatók.

2. A β -glükuronidáz jelzőenzim alkalmas a promóterműködés *Cuscuta*-ban történő vizsgálatára, mivel a parazita növény szövetei nem mutatnak β -glükuronidáz alapaktivitást.
3. Bizonyítottuk, hogy a CaMV 35S promóter megnyilvánul a *Cuscuta trifolii* dedifferenciált (kallusz), illetve differenciálódott (csíranövény, regenerálódó embriók) szöveteiben.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek dr. Lados Miklósnak, és dr. Orosz Lászlónak, hogy lehetővé tették, hogy bekapcsolódjak a növényi parazitizmus vizsgálatával foglalkozó csoport munkájába.

Köszönöm a Növényi Biotechnológiai Intézet Sejtbiológiai Csoportjának, hogy helyet szorítottak számomra a laborjukban, valamint hasznos tanácsokkal láttak el a munkám során. Külön köszönet illeti dr. Fári Miklóst, Toldi Ottót valamint dr. Nagy Istvánt.

Köszönöm dr. Jenes Barnabásnak a génbeviteli kísérleteknél nyújtott segítségét, valamint a dolgozatot illető kritikai észrevételeit.

Köszönöm dr. Babos Károlynak, az ELTE Növény-szervezettani Tanszék docensének, hogy segítséget nyújtott a szövettani metszetkészítés technikájának elsajátításában.

Köszönet illeti Takács Gábort a mesterien elkészített fotókért, Borsics Tamást az áldozatos lektori munkájáért.

Hálával tartozom szüleimnek, hogy idáig eljuthattam.

A DOLGOZAT ANYAGÁBÓL KÉSZÜLT PUBLIKÁCIÓK

1. **Bakos, Á., Fári, M., Toldi, O. and Lados, M.** (1995) Plant regeneration from seedling derived callus of dodder (*Cuscuta trifolii*, Bab. et Gibs.) *Plant Sci.* 109: 95-101
2. **Bakos, Á., és Lados, M.** (1994) A lucerna (*Medicago sativa*) és az aranka között kialakuló parazitizmus molekuláris genetikai alapjainak vizsgálata. Magyar Genetikusok Egyesületének III. Konferenciája, Debrecen (poszter)
3. **Lados, M. és Bakos, Á.** A lucerna (*Medicago sativa*) és az aranka között kialakuló parazitizmus molekuláris genetikai alapjainak vizsgálata. Növényvédelmi Tudományos Napok, 1996. 02. 27-28. (előadás)

EGYÉB PUBLIKÁCIÓK

1. **Dusha, I., Bakos, Á., Kondorosi, Á., de Bruijn, F. J. and Schell, J.** (1989) *Rhizobium meliloti* early nodulation genes (nodABC) are nitrogen regulated: Isolation of a mutant strain with efficient nodulation capacity on alfalfa in the presence of ammonium. *Mol. Gen. Genet.* 219: 89-96
2. **Kondorosi, Á., Kondorosi, É., Dusha, I., Bánfalvy, Zs., Gyuris, J., John, M., Schmidt, J., Bakos, Á., Hoffman, B., Duda, E., de Bruijn, F. J. and Schell, J.** (1989) Factors controlling root nodule induction by *Rhizobium meliloti*. In: *Molecular signals in Microbe-Plant Symbiotic and Pathogenic Systems*, Lugsenber B (Ed), Springer Verlag

3. Páldi, A., d'Auriol, L., Misralli, M., **Bakos, Á.**, Chaouat, G. and Szekeres-Bartho, G. (1994) Expression of the gene coding for the progesteron receptor in activated human lymphocytes. *Endocrine Journal* 2: 317-319
4. Élő, P., Nagy, T., **Bakos, Á.**, Dallmann, G., Papp, P. és Orosz, L. (1994) A DNS és fehérje illeszkedéséről: Különböző operátorok kölcsönhatása a 16-3 fágban. Magyar Genetikusok Egyesületének III. Konferenciája, Debrecen (poszter)

IRODALOM

Albrecht, H., Peterson, P. W., Timko, M. P. and Yoder, J. I. (1994) Isolation characterisation of cDNAs involved in haustorium development in parasitic angiosperms. In: *Abstracts of 4th International Congress of Plant Molecular Biology*; Amsterdam, No. 1774

Atsatt, P. R. (1977) The insect herbivore as a predictive model in parasitic seed plant biology. *Am. Nat.* 111: 579-586

Ba, A. T. and Kahlem, G. (1979) Mise en évidence d'activités enzymatiques au niveau de l'haustorium d'une phanérogame parasite; *Striga hermonthica* (Scrophulariaceae). *Can. J. Bot.* 57: 2564-2567

Bakos, Á., és Lados, M. (1994) A lucerna (*Medicago sativa*) és az aranka között kialakuló parazitizmus molekuláris genetikai alapjainak vizsgálata. Magyar Genetikusok Egyesületének III. Konferenciája, Debrecen (poszter)

Chang, M. and Lynn, D. G. (1986) Haustoria and the chemistry of host recognition in parasitic angiosperms. *J. Chem. Ecol.* 12: 561-579

Chang, M., Netzly, D. H., Buttler, L. G. and Lynn, D. G. (1986) Chemical regulation of distance: characterization of the first naturel host germination stimulant for *Striga asiatica*. *J. Am. Chem. Soc.* 108: 7858-7860

Chong, C. and Taper, C. D. (1974) Malus tissue cultures. II. Sorbitol metabolism and carbon nutrition. *Can. J. Bot.* 52: 2361-2364

Coffin, R., Taper, C. D. and Chong, C. (1976) Sorbitol and sucrose as carbon source for callus culture of some species of Rosaceae. *Can. J. Bot.* 54: 547-551

Cook, C. E., Wichard, R. P., Turner, B., Wall, M. E. and Egley, G. H. (1966) Germination of witchweed (*Striga lutea* Lour.): Isolation and properties of a potent stimulant. *Science* 154: 1189-1190

Cook, C. E., Wichard, R. P., Wall, M. E., Egley, G. H. and Coggan, P. et al. (1972) Germination stimulant II. The structure of strigol- A potent seed germination stimulant for witchweed (*Striga lutea* Lour.). *J. Am. Chem. Soc.* 94: 6198-6199

Dudits, D. és Heszky, L. (1990) *Növénybiotechnológia; Mezőgazdasági Kiadó;* 205-248 o.

Ferr, A., Benharrat, H., Rey, L. and Renaudin, S. (1990) About some effects of the parasitism of *Cuscuta lupuliformis* Krock, on *Vicia sativa* L.: incidence on the biomass and on the content in several important mineral elements. *C. R. Acad. Sci. Paris* 310: 113-120

Finnie, S. J., Powell, W. and Dyer, A. F. (1989) The effect of carbohydrate composition and concentration on anther culture response in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Breeding* 103: 110-118

Furuhashi, K. (1991) Establishment of a successive culture of an obligatory parasitic flowering plant, *Cuscuta japonica*, *in vitro*. *Plant Sci.* 79: 241-246

Gamborg, O. L. (1975) Callus and cell culture, In: *Plant Tissue Culture Methods*, (Eds.: O.L. Gamborg and L.R. Wetter); National Research Council of Canada Publication No. 14383; pp. 1-10

Graham, J. H., Frosheiser, F. I., Stuteville, D. L. and Erwin D. C. (1979) *A compendium of alfalfa diseases*; American Phytopathological Society; pp. 53-55

Gupta, A. and Singh, M. (1982) Mechanism of parasitisation by *Cuscuta reflexa*: Formation of haustoria by adenine and its derivatives. In: *Proceedings of 51st Annual Meeting of Society of Biological Chemists (India) at Chandigarh*, Nov. 18-20; pp. 192-193.

Gupta, A. and Singh, M. (1983) Mechanism of parasitisation by *Cuscuta reflexa*: RNase activity in the haustorial region of *Cuscuta* and infected host tissues. *Physiol. Plant.* **58**: 523-526

Gupta, A. and Singh, M. (1985) Mechanism of parasitism by *Cuscuta reflexa*: Distribution of cytokinins in different regions of the parasite vine. *Physiol. Plant.* **63**: 76-78

Haraszti, Á. (1978) *Növénysszervezetten, A gyökér morfológiája c. fejezet* (szerk.: Haraszti Á.); Tankönyvkiadó, Budapest; 261.o.

Herb, R., Visser, J. H. and Schildknecht, H. (1987) Recovery isolation preliminary structural investigation of germination stimulants produced by *Vigna unguiculata* Walp. cv Sanders upright. In: *Parasitic Flowering Plants. Proceedings of the 4th International Symposium on Parasitic Flowering Plants*; Marburg: Phillips Universität; pp. 351-366

Jefferson, R. A. (1987) Assaying Chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant. Mol. Biol. Rep.* **5**: 387-405

Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. and Bevan, M. W. (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a selective and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO J.* **6**: 3901-3907

- Jeschke, W. D., R  th, N., B  umel, P., Czygan, F. C. and Proksch, P. (1994)** Modelling the flow and partitioning of carbon and nitrogen in the holoparasite *Cuscuta reflexa* Roxb. and its host *Lupinus albus* L. II. Flows between the host and parasite and within the parasitized host. *J. Exp. Bot.* 45: 801-812
- Klein, T. M., Wolf, E. D., Wu, R. and Sanford, J. C. (1987)** High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327: 70-73
- Knutson, D. M. (1979)** How parasitic seed plants induce disease in other plants. In: *Plant Disease: An advanced treatise*, (Eds.: J.G. Horsfall and E.B. Cowling); New York: Academic; 4: 293-312
- Kuijt, J. (1969)** *The biology of parasitic flowering plants*; University of California Press, Berkeley, CA; pp 136-143
- Kuo, J., Pate, J. S. and Davidson, N. J. (1989)** Ultrastructure of the haustorial interface and apoplastic continuum between host and the root hemiparasite *Oxalis phyllanthi* (Labill.) R. Br. (Oleaceae). *Protoplasma* 150: 27-39
- Lados, M. (1994)** Molecular genetic studies of alfalfa (*Medicago sativa*) and *Cuscuta trifolii* host-parasite interaction. In: *Abstracts of 4th International Congress of Plant Molecular Biology*; Amsterdam, No. 1773
- Lamont, B. (1983)** Mineral nutrition of mistletoes. In: *The Biology of Mistletoes* (Eds.: D.M. Calder, P. Bernhardt); New York: Academic; pp. 185-204
- Last, D. I. and Brettell, R. I. S. (1990)** Embryo yield in wheat anther culture is influenced by the choice of sugar in the culture medium. *Plant Cell Rep.* 9: 14-16

- Lynn, D. G., Steffens, J. C., Kamut, V. S., Garden, D. W., Shabanowitz, J. and Riopel, J. L.** (1981) Isolation and characterization of the first host recognition substances for parasitic angiosperms. *J. Am. Chem. Soc.* 103: 1868-1870
- Maheshwari, P. and Baldev, B.** (1961) Artificial production of buds from the embryos of *Cuscuta reflexa*. *Nature* 191: 197-198
- Maheshwari, R., Shailini, C., Veluthambi, K. and Mahadevan, S.** (1980) Interaction of gibberellic acid and indole-3-acetic acid in the growth of excised *Cuscuta* shoot tips *in vitro*. *Plant Physiol.* 65: 186-192.
- Maheshwari, R. and Sreekrishna, S.** (1982) The apical control of lateral bud development in excised shoot tips of *Cuscuta reflexa* cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.* 56: 74-81
- Mallaburn, P. S., Press, M. C. and Stewart, G. R.** (1990) Haustorial structure and function in *Striga hermonthica*. *J. Exp. Bot.* 41: 1355-1360
- Maróti, M.** (1976) *Növényi szövettan és szövettan alapjai*; Akadémiai Kiadó, Budapest; 207-209. o.
- Murashige, T. and Skoog, F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-495
- Nagar, R., Singh, M. and Sanwal, G. G.** (1984) Cell wall degrading enzymes in *Cuscuta reflexa* and its hosts. *J. Exp. Bot.* 35: 1104-1112
- Netzly, D. H., Riopel, J. L., Ejeta, G. and Butler, L. G.** (1988) Germination stimulants of witchweed (*Striga asiatica*) from hydrophobic root exudate of sorghum (*Sorghum bicolor*). *Weed Sci.* 36: 441-446

- Nour, J. J., Todd, P., Yaghmaie, P., Panchal, G. and Stewart, G. R.** (1984) The role of mannitol in *Striga hermonthica*. In: *Proceedings of the Third International Symposium on Parasitic Weeds*; Aleppo: ICARDA/IPSPRG; pp. 81-89
- Ow, D. W., Wood, K. V., de Luca, M., de Wet, J. R., Helinski, D. R. and Howell, S. H.** (1986) Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* 234: 856-859
- Paliyath, G., Maheshwari, R. and Mahadevan, S.** (1978) Initiation of haustoria in *Cuscuta* by cytokinin application. *Curr. Sci.* 47: 427-429
- Perl, A., Kless, H., Blumenthal, A., Galili, G. and Galun, E.** (1992) Improvement of plant regeneration and GUS expression in scutellar wheat calli by optimization of culture conditions and DNA microprojectile delivery procedures. *Mol. Gen. Genet.* 235: 279-284
- Popp, M.** (1987) Osmotica in *Amyema miquelii* (Lehm. ex Mig.) Thieghem and *Amyema pendulum* (Sieber ex Sprengel) Thieghem, (Loranthaceae) on different hosts. *Parasitic Flowering Plants. Proceedings of the 4th International Symposium on Parasitic Flowering Plants*; Marburg: Phillips Universität; pp. 621-630
- Potrykus, I.** (1991) Gene transfer to plants: Assessment of published approaches and Results. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 42: 205-225
- Press, M. C., Tuohy, J. M. and Stewart, G. M.** (1987) Gas exchange characteristics of the *Sorghum-Striga* host-parasite interaction. *Plant. Physiol.* 84: 814-819 ✓
- Press, M. C.** (1989) Autotrophy and heterotrophy in root hemiparasites. *Trends Ecol. Evol.* 4: 258-263

Raven, J. A. (1983) Phitophages of xylem and phloem: a comparision of animal and plant sap-feeders. *Adv. Ecol. Res.* 13: 135-234

Raquin, C. (1983) Utilization of different sugars as carbon source for *in vitro* anther culture of *Petunia*. *Z. Pflanzenphysiol.* 111: 453-457

Riopel, J. L. and Vance Baird, Wm. (1987) Morphogenesis of the early development of primary haustoria in *Striga asiatica*. In: *Parasitic Weeds in Agriculture. Vol. I. Striga*, (Ed. L.J. Musselman); CRC Press; pp. 114, 122

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2nd ed.); Cold Spring Harbor Laboratory Press

Sárkány, S. és Szalai, I. (1957) *Növénytársaszerkezettani praktikum*, Növényi mikrotechnika alapjai c. fejezet; Tankönyvkiadó, Budapest; 444-594. o.

Sárkány, S. (1960) *Növénytársaszerkeztan, 1. füzet*; ELTE Jegyzet Felsőoktatási Jegyzetellátó Vállalat, Budapest; 146. o.

Sheldrake, A. R. (1973) The production of hormones in higher plants. *Biol. Rev.* 48: 509-559

Srivastava, M. és Singh, M. (1982) Mechanism of parasitisation by *Cuscuta reflexa*: Protease activity in the haustoria bearing and the other parts of *Cuscuta* vine. In: *Proceedings of 51st Annual Meeting of Society of Biological Chemists (India) at Chandigarh*, Nov. 18-20; pp. 205.

Steffens, J. C., Lynn, D. G. and Riopel, J. L. (1986) An haustorial inducer for the root parasite *Agalinis purpurea*. *Phytochemistry* 25: 2291-2298

Stewart G. R. és Press M. C. (1990) The physiology and biochemistry of parasitic angiosperms. *Ann. Rev. Plant. Mol. Biol.* 41: 127-151

Strickland, S. G., Nichol, J. W., McCall, C. M. and Stuart, D. A. (1987) Effect of carbohydrate source on alfalfa somatic embryogenesis. *Plant Sci.* 48: 113-121

Subramaniam, K., Ranie, J., Sirinivasa, B. R., Sinha, A. M. and Mahadevan, S. (1994) Cloning and sequence of a cDNA encoding a novel hybrid prolin-rich protein associated with cytokinin-induced haustoria formation in *Cuscuta reflexa*. *Gene* 141: 207-210

Subramaniam, K. and Mahadevan, S. (1994) The cDNA sequence of cytochrome b₅ associated with cytokinin-induced haustoria formation in *Cuscuta reflexa*. *Gene* 149: 375-376

Szatala, Ö. és Gimesi Antal (1965) *Az aranka (Cuscuta) biológiája és az üzemi védekezés módszerei*. Károlyi Mihály Mezőgazdasági Könyvtár és Dokumentációs Központ

Töpfer, R., Pröls, M., Schell, J. and Steinbiß, H-H. (1988) Transient gene expression in tobacco protoplasts: II. Comparision of the reporter gene systems for CAT, NPTII, and GUS. *Plant Cell. Rep.* 7: 225-228

Tsivion, Y. (1978) Possible role of cytokinins in non specific recognition of a host and in early growth of haustoria in the parasitic plant, *Cuscuta campestris*. *Bot. Gaz.* 139: 27-31

Visser, J. H., Herb, R. and Schildknecht, H. (1984) Recovery and preliminary chromatographic investigation of germination stimulants produced by *Vigna unguiculata* Walp. cv. Sanders upright. *J. Plant Physiol.* 129: 375-381

Visser, J. H. and Dorr, I. (1987) The haustorium. In: *Parasitic Weeds in Agriculture I. Striga* (ed. L. J. Musselman); CRC Press; pp. 91-106

Wolswinkel, P. (1978) Phloem unloading in stem parts by *Cuscuta*: The release of ^{14}C and K^+ to the free space at 0°C and 25°C . *Physiol. Plant.* 42: 167-172 ✓

Wolswinkel, P., Ammerlaan, A. and Peters, H. F. C. (1984) Phloem unloading of amino acids at the site of ^{a Hachement of} *Cuscuta europeae*. *Plant Physiol.* 75: 13-20 ✓

Wolswinkel, P. (1985) Phloem unloading and turgor-sensitive transport: factors involved in sink control of assimilate partitioning. *Physiol. Plant.* 65: 331-339 ✓