

A SZOMATIKUS KOMPATIBILITÁS VIZSGÁLATA PROTOPLASZT
FUZIÓBÓL SZÁRMAZÓ SEJTEKEN

Doktori értekezés

Haydu Zsolt

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Központ
Genetikai Intézete

S z e g e d
1978.



TARTALOMJEGYZÉK

	oldalszám
I. BEVEZETÉS	3.
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5.
1. Növényi protoplasztok izolálása és tenyésztése	7.
2. Növényi protoplasztok fuziója	9.
3. A fuziók termékek azonosítása és szelekciója	13.
III. ANYAG ÉS MÓDSZER	20.
1. Sárgarépa és szója sejtek tenyésztése	20.
2. Protoplaszt izolálás sejtszuspen- zióból	21.
3. Protoplaszt izolálás levélből	21.
4. Protoplaszt fuzió indukálása poli- etilén-glikollal	23.
5. Protoplasztok tenyésztése	24.
6. A tenyészetek vizsgálata	26.
IV. EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE	27.
1. Sárgarépa növény regenerálása protoplasztból	27.
2. Növényi protoplasztok fuziók gyakorisá- gának növelése	32.
3. A szomatikus kompatibilitás vizsgálata a protoplaszt fuzióból eredő sejtek fej- lődésének korai szakaszában	43.
4. Albinó mutáns és vadtipusu sárgarépa sejtek tápanyag igényének vizsgálata	46.



oldalszám

V. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE	57.
1. Növény regenerálás protoplasztból	57.
2. Fúziós gyakoriság növelése növényi protoplasztoknál	58.
3. A szomatikus kompatibilitás vizsgálata a fuzionált sejtek fejlődésének korai szakaszában	65.
4. Albinó mutáns és vadtipusu sárgarépa sejtek vizsgálata	71.
VI. ÖSSZEFOGLALÁS	78.
VII. IRODALOMJEGYZÉK	81.
VIII. A DOLGOZATBAN HASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK JEGY- ZÉKE	95.

I.

B E V E Z E T É S

Az ivaros keresztezés módszerét a növénygenetikai és növénynemesítési kutatásokban elterjedten alkalmazzák. E módszernek azonban gyakran határt szab a fajon belül, illetve a fajok közt megnyilvánuló összeférhetetlenség, inkompatibilitás. Az inkompatibilitás megnyilvánulása miatt számos, elméleti vagy gyakorlati szempontból jelentős keresztezés nem valósítható meg. Különböző eljárások alkalmazásával az inkompatibilitás egyes esetekben megszüntethető, s így a korábban nem keresztezhető egyedek termékeny ivari kapcsolata bekövetkezhet /NETTANCOURT, 1977/.

Az inkompatibilitás leküzdésének elvileg új lehetősége nyílt meg a növényi protoplasztok tenyésztési és fúziós módszerének széleskörű elterjedésével. A különböző növényfajok szomatikus sejtjeiből izolált protoplasztok fúziójából felnevelt ún. paraszexualis hibridek előállíthatóságát már néhány esetben kísérletesen is bizonyították /CARLSON és mtsai, 1972; SMITH és mtsai, 1976; POWER és mtsai, 1976; DUDITS és mtsai, 1977; MALIGA és mtsai, 1977; SCHIEDER, 1978/. A paraszexualis hibridizáció folyamatának intenzív vizsgálata a módszer szélesebb körű alkalmazhatóságát oldhatja meg, s így elméleti és

gyakorlati szempontból egyaránt jelentős ismeretekhez és eredményekhez juthatunk. A disszertáció ennek a témakörnek néhány kérdésével foglalkozik.

A dolgozatban bemutatjuk a sárgarépa növények fejlődését protoplasztból. Ismertetjük a humán sejtek fúziós gyakoriságát növelő polietilén-glikol - dimetil-szulfoxid kezelés protoplaszt fúziót indukáló hatásával kapcsolatos eredményeket. Sárgarépa szuszpenzió és különböző fajok levél protoplasztjait fuzionáltatva azt vizsgáltuk, hogy a szexuálisan nem keresztezhető fajok protoplasztjainak fúzióját követően a heteroplazmikus sejtek korai fejlődése során tapasztalható-e inkompatibilitás? A sárgarépa A_1 albinó mutáns és vadtipusu protoplaszt tenyészetekben a mutáns sejtvonál alacsony osztódási gyakoriságának okát tanulmányoztuk.

A dolgozatban ismertetett eredmények a sárgarépa alapozott szomatikus hibridizációs munkákhoz adnak újabb ismereteket.

II.

I R O D A L M I Á T T E K I N T É S

Dohány szövettenyészetek hormon igényének vizsgálata vezetett arra a felismerésre, hogy a táptalajban levő naftilecetsav és adenin /SKOOG és TSUI, 1948/, illetve indolecetsav és adenin /SKOOG és TSUI, 1951 cit. SKOOG, 1971/ arányának változtatásával a differenciálatlan kallusz szövetek morfogenezise, gyökér és hajtás redifferenciálódása indukálható és irányítható. Különböző hormonok és hormon hatású vegyületek alkalmazása, valamint a tenyésztés körülményeinek helyes megválasztása számos faj szövettenyészetében eredményezett szerv redifferenciálódást. MURASHIGE /1974/ összefoglalójában több mint 150 faj in vitro embrió és hajtás képződése szerepelt. Ujabb adatok szerint mintegy 150 gazdasági szempontból jelentős faj esetében értek el hasonló eredményeket /NARAYANASWAMY, 1977/.

STEWART és munkatársai /1964/ sárgarépan végzett vizsgálatait azt bizonyították, hogy nemcsak a differenciálatlan szövetek, hanem az egyes sejtek is képesek arra, hogy in vitro tenyészetekben teljes növényé fejlődjenek, vagyis egyetlen sejt is tartalmazza a teljes növényé fejlődéshez szükséges valamennyi genetikai információt. A növényi sejteknek ezt a tulajdonságát totipotenciának nevezik. Haploid sejtek totipotenciájának első

bizonyítékát *Datura anthera* kultúrában nevelt haploid növények adták /GUHA és MAHESVARI, 1964/, s általános jellegét számos egy- és kétszikű fajnál elért eredmény mutatja /VASIL és NITSCH, 1975/.

A növényi protoplasztok izolálásának és tenyésztésének széleskörű elterjedése azt is igazolta, hogy a haploid /OHYAMA és NITSCH, 1972; SCHIEDER, 1975; THOMAS és mtsai, 1976/ és diploid /TAKEBE és mtsai, 1971; GRAMBOW és mtsai, 1972, stb./ sejtek sejtfaluk eltávolítása után is megtartják totipotenciájukat, s az megfelelő tenyésztési körülmények között érvényre jut. Ez a tény olyan genetikai vizsgálatokra ad lehetőséget, melyekben a klasszikus ivaros keresztezésektől eltérően a növényi szomatikus sejtekből izolált protoplasztok fuziójával előállított hibridekben tanulmányozható a szülői tulajdonságok megjelenése és öröklődése.

Ahhoz, hogy a növényi protoplasztok fuziójából eredő szomatikus hibridek előállíthatók legyenek, több feltétel megvalósulása szükséges:

- a protoplaszt → növény rendszer megvalósulása a kísérletekhez használt fajoknál,
- megfelelő fuzió módszer,
- morfológiai, biokémiai, stb. markerek, melyekkel a hibridek azonosíthatók, illetve szelektálhatók.

A következőkben az említett témák irodalmát tekintjük át.

1. Növényi protoplasztok izolálása és tenyésztése

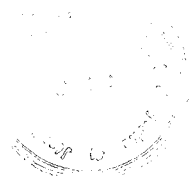
A növényi sejteket körülvevő sejtfal ozmotikus stabilizátor jelenlétében történő eltávolítása eredményezi a protoplasztokat. A sejtfal eltávolításának általánosan alkalmazott módja az enzimés emésztés. Növényi protoplasztok enzimés izolálásáról először COCKING /1960/ számolt be. Paradicsom gyökereket *Myrothecium verrucaria* gombából preparált celluláz enzim 5 %-os oldatában inkubálva protoplasztok képződtek. *Myrothecium* celluláz alkalmazásával zab koleoptilből, levélből és gyökérből, valamint *Convolvulus* és saláta kalluszból /RUESINK és THIMANN, 1966/, csiga enzimmel /Glusulaze/ cukorrépa, retek, hagyma és borsó gyökérből, illetve spenót és *Taraxacum* levélből /PINTO DA SILVA, 1969/ izoláltak protoplasztot, de az izolálás hatékonysága ezeknél a kezdeti munkáknál aránylag alacsony volt. Hatékonyabb módszernek bizonyult a dohány levelek esetében a sejtek szabaddá tétele pektinázzal /Macerozyme/, majd a sejtfal emésztése cellulázzal /Onozuka P 1500; TAKEBE és mtsai, 1968/. Egyszerűbb és hatékony módszer a pektinááz és celluláz készítmények kombinált alkalmazása az izoláló oldatban /POWER és COCKING, 1969/. Intenzíven növő *Haplopappus gracilis* sejt-szuszpenzióból celluláz /Onozuka P 1500/ enzimmel izoláltak nagy hatékonysággal protoplasztot /ERIKSSON és

JONASSON, 1969/.

A protoplasztok tenyésztése szempontjából kedvező volt, ha az izoláláshoz használt cellulázt és pektinázt /Sigma/ tápfolyadékban oldották fel /KAO és mtsai, 1970/. A sejtek, sejtcsoportok fala különböző enzimek készítmények keverékének hatására tökéletesebben leemészthető. Celluláz, pektináz és hemicelluláz /Rhozyme HP 150/ alkalmazásával fúzióra alkalmas protoplasztokat izoláltak /KAO és MICHAYLUK, 1974/, s a fúziós gyakoriság magasabb volt, ha az izoláló oldat Driselaze enzimek készítményt is tartalmazott /KAO és mtsai, 1974/.

Paradicsom gyökérből izolált protoplasztok a tenyésztés során sejtfalat regeneráltak /COCKING, 1961, POJNAR és mtsai, 1967/. Haplopappus protoplasztoknál sejtfal regenerációt és sejtmag megduplázódást figyeltek meg /ERIKSSON és JONASSON, 1969/. Dohánylevél protoplasztok agarral szilárdított táptalajba kiszélesztve sejtfalat regeneráltak és osztódtak /NAGAT és TAKEBE, 1970/. A többszörösen osztódó sejtek kolóniákat hoztak létre, s megfelelő hormon összetételű táptalajon hajtások képződtek /TAKEBE, és mtsai, 1971; NAGATA és TAKEBE, 1971/.

Szuszpenzió eredetű szója /KAO és mtsai, 1970/, valamint szója és Haplopappus /KAO és mtsai, 1971/ protoplasztokból regenerált sejtek többszöri osztódását figyelték meg



a tenyésztés során. Sárgarépa gyökérből, illetve szuszpenzióból izolált protoplasztok többszöri osztódását követően embrió /KAMEYA és UCHIMIYA, 1972/ és teljes növény /GRAMBOW és mtsai, 1972/ fejlődött.

A protoplaszt - teljes növény rendszer számos faj esetében ismert. A Solanaceae családba tartozó fajok különösen jó objektumnak bizonyultak. Az eddig közölt eredményeket a I. táblázat foglalja össze.

Megfelelő szelekciós markerek esetében a protoplaszt - kallusz szint elérése is alkalmas lehet genetikai vizsgálatokra. A protoplasztból kallusszá fejlődő fajokat GAMBORG /1976/ foglalta össze. Itt említjük meg, hogy újabban néhány egyszikű faj szuszpenzió és hajtás eredetű protoplaszt tenyésztéseiben kaptak kallusz képződést /Triticum monococcum - DUDITS és NÉMET, 1976; árpa - KOBLITZ, 1976; kukorica - POTRYKUS és mtsai, 1977/.

2. Növényi protoplasztok fúziója

A protoplasztok fúziójával történő hibrid előállítás gondolata már akkor felvetődött, amikor a protoplaszt izolálás, fúzió és tenyésztés számos kérdése még megoldatlan volt /SCHENK és HILDEBRANDT, 1968; NICKELL és TORREY, 1969; KELLER és mtsai, 1970; POWER és mtsai, 1970/.

I. táblázat: Protoplasztból teljes növénné regenerált fajok

Faj latin neve	Protoplaszt eredete	Irodalom
<u>Solanaceae család</u>		
Atropa belladonna	S	GOSCH és mtsai, 1975
Datura innoxia	L	SCHIEDER, 1975
Lycopersicon esculentum	L	GAMBORG, 1976
L. peruvianum	L	ZAPATA és mtsai, 1977
Nicotiana glauca	L	NAGY és MALIGA, 1976
N. tabacum	L	TAKEBE és mtsai, 1971
Petunia hybrida	L	DURAND és mtsai, 1973
P. parodii	L	HAYWARD és POWER, 1975
Solanum dulcamara	L	BINDING és NEHLS, 1977
S. tuberosum	L	BUTENKO és mtsai, 1977
<u>Egyéb fajok</u>		
Asparagus officinalis	kladodium	BUI-DANG-HA és MACKENZIE, 1975
Brassica napus	L	KARTHA és mtsai, 1974b
Daucus carota	S	GRAMBOW és mtsai, 1972
Ranunculus sceleratus	L	DORION és mtsai, 1975
Physcomitrella patens		STUMM és mtsai, 1975
Sphaerocarpos donnellii		WENZEL és SCHIEDER, 1973

Rövidítések: S= sejtszuszpénzió,
L= levél.

A protoplasztok fúziója az izolálás során is bekövetkezhet /POWER és mtsai, 1971; MILLER és mtsai, 1971; KELLER és mtsai, 1973; USUI és mtsai, 1974/, de a szomatikus hibridek szempontjából a homoplazmikus fúzióknak nincs jelen-

tőisége. A különböző fajok protoplasztjait tartalmazó szuszpenzióban a spontán fúzió nem következik be, vagy gyakorisága igen alacsony, így a fúzió eléréséhez megfelelő indukáló ágens szükséges.

POWER és munkatársai /1970/ 0.25 M-os NaNO_3 oldatban figyeltek meg protoplaszt fúziót. Nátrium-nitrát oldattal más szerzők /POTRYKUS, 1971; 1973a; CARLSON és mtsai, 1972/ is sikeresen indukáltak fúziót. ERIKSSON /1971/ a tengervíz összetételéhez hasonló sóoldatban bekövetkezett fúzióról számolt be. Brassica fajok protoplasztjainak fúzióját nátrium-klorid és nátrium-nitrát oldattal sikeresen indukálták és magasabb fúziós gyakoriságot kaptak kálium-kloridot és kálium-nitrátot tartalmazó izoláló oldatból eredő protoplasztok esetében /KAMEYA és TAKAHASHI, 1972/. POTRYKUS /1973b/ lizozim hatására bekövetkező protoplaszt aggregációról és fúzióról számolt be, de a lizozim erős toxikus hatását is tapasztalta, amely a fúziós produktumok pusztulását eredményezte. KELLER és munkatársai /1973/ Sendai vírus, magas hőmérséklet, deplazmolizáló ozmotikus sokk, nátrium-nitrát, lizolecitin, ATP, ADP, cAMP és poli-L-ornitin kezelés hatását vizsgálva alacsony /0,1-1 %/ fúziós gyakoriságot észleltek.

WITHERS /1973/ a nátrium-nitrát oldattal indukált

protoplaszt fúzió folyamatát elektronmikroszkóppal tanulmányozta és megfigyelte, hogy a nátrium-nitrát jelenlétében a protoplasztok aggregálódnak, köztük plazmolemma-plazmolemma kapcsolat jön létre, majd ezt követi a plazmolemma fúziója és a citoplazmák egyesülése. Kalciumsók és Concanavalin A esetében a fénymikroszkóposan megfigyelhető aggregációt nem követte fúzió. Sendia virust alkalmazva fúziót figyelt meg, de a protoplasztok igen erősen károsodtak. Lizolecitinnek, mono- és triolajsav-glicerinnak nem volt fúziót indukáló hatása.

KAMEYA /1973/ zselatinnal, HARTMANN és munkatársai /1973/ szerológiai módszerrel, GLIMELIUS és munkatársai /1974/ Concanavalin A-val kapott agglutinációról számoltak be, de kísérleteikben az agglutinációt követő fúziót nem bizonyították.

KELLER és MELCHERS /1973/ magas Ca^{++} - magas pH /0,05 M CaCl_2 - pH 10,5/ oldattal 37°C-on indukált fúziót. A módszert sikeresen alkalmazták dohány szomatikus hibridek előállítása során /MELCHERS és LABIB, 1974/. BINDING /1974/ Petunia protoplasztok fúzióját tengervízzel és kalcium-nitráttal /pH 8/ indukálta.

A fúziós munkák új fejezetét nyitotta meg a poli-etilén-glikol /PEG/ alkalmazása /KAO és MICHAYLUK, 1974; WALLIN és mtsai, 1974/. A protoplasztok előinkubálása 0,01 és 0,001 mg/l lizozim oldatban a PEG-gel indukált

fúzió gyakoriságának növekedését eredményezte, míg a tripszin, papain, glutáraldehid és lizolecitin hatástalan volt /CONSTABEL és KAO, 1974/. A fúziós módszer hatékonysága nőtt, ha a protoplaszt izoláló enzim oldat Driselaze enzimkészítményt is tartalmazott, s nagyobb gyakorisággal következett be a fúzió, ha a PEG oldatot magas Ca^{++} - magas pH oldattal mosták ki /KAO és mtsai, 1974/.

A polietilén-glikolt baktérium /FODOR és ALFÖLDI, 1976; SCHAEFFER, 1976/ és gomba protoplasztok /FERENCZY és mtsai, 1975/, emlős sejtek /PONTECORVO, 1975/, élesztő protoplaszt-csirke vörösvérsejt /AHKONG és mtsai, 1975/, valamint növényi protoplaszt - emlős sejt /DUDITS és mtsai, 1976c/ esetében is eredményesen alkalmazták fúzió indukálására. Humán sejtek PEG-gel indukált fúziója dimetil-szulfoxid /DMSO/ jelenlétében nagyobb gyakorisággal következett be /NORWOOD és mtsai, 1976/.

3. A fúziós termékek azonosítása és szelekciója

A paraszexuális hibridek előállítása szempontjából döntő jelentőségű, hogy a fúziót követően a heterokariotok és hibridek a fejlődés valamely stádiumában elkülöníthetők legyenek a szülői protoplasztokból fejlődő sejtektől, kalluszoktól vagy növényektől. A fuzionált proto-

plasztok korai fejlődésének vizsgálatát vizuálisan felismerhető marker tulajdonságok teszik lehetővé. POTRYKUS /1971, 1973a,b/ a növényekben előforduló színanyagok, kromoplasztok és kloroplasztok alapján azonosította a fuzionált protoplasztokat. Brassica fajok fuziók gyakoriságát a gyökér és levél protoplasztok morfológiai különbségei alapján határozták meg /KAMEYA és TAKAHASHI, 1972/. Rutinszerű vizsgálatokra igen alkalmasnak bizonyult a szuszpenzió eredetű jellegzetes citoplazma strukturát mutató protoplasztok fuziója zöld kloroplasztokat tartalmazó levél protoplasztokkal /KAO és MICHAYLUK, 1974; CONSTABEL és KAO, 1974; KAO és mtsai, 1974; KARTHA és mtsai, 1974a, CONSTABEL és mtsai, 1975b; 1976; DUDITS és mtsai, 1976a/. A fuzionált sejtek vizuális meghatározhatósága a hibridek mechanikus kiválogatását is lehetővé teszi./KAO, 1977/.

A fuzió utáni citológiai vizsgálatok lehetőséget adnak a heterokarionok azonosítására /KELLER és mtsai, 1973; CONSTABEL és mtsai, 1975a; DUDITS és mtsai, 1976a/, valamint nyomon követhető a partnerek sejtmagjainak és kromoszómáinak sorsa a fuzionált sejtekben /KAO és mtsai, 1974b; CONSTABEL és mtsai, 1975a; KAO, 1977/.

A fuzionált sejtek vizuális azonosítása a tenyészetekben csak fejlődésük korai szakaszában /10-14 nap/ lehetséges, mivel a tenyésztés során a protoplasztok fo-

kozatosanelvesztik zöld színüket, A szomatikus hibridek előállítása szempontjából igen fontos, hogy a partnerek olyan marker tulajdonságokkal rendelkezzenek, amelyek a fuziót követően a hibridek azonosítását lehetővé teszik. Szelekció céljára elsősorban a jól definiálható biokémiai markerek /antibiotikum rezisztencia, auxotrófia, stb./ jöhetnek számításba.

Az emlős sejtgenetikában jól bevált és széles körben elterjedt szelekciós módszer a LITTLEFIELD /1964/ által leírt un."HAT" - rendszer. Ennek lényege, hogy 5-bróm-deoxiuridin /BUdR/ rezisztens timidin-kináz /TK/ hiányos és 8-azaguanin /AG/ rezisztens hipoxantin-foszforibozil-transzferáz /HPRT/ hiányos sejtek hibridjei képesek nőni a hipoxantin, aminopterin, timidin és glicin /HAT/ tartalmul tápfolyadékban, míg a szülői sejtek nem.

Azonos elven alapuló szelekciós rendszer kidolgozására növényeknél is történtek kísérletek. BUdR /MALIGA és mtsai, 1973a; LESCURE, 1973; BRIGHT és NORTHCOTE, 1974; OHYAMA, 1974/ és AG rezisztens /LESCURE, 1973; BRIGHT és NORTHCOTE, 1975/ sejtvonalakokat izoláltak, de ezek rezisztenciájának mechanizmusa eltért az emlős sejtektől. A streptomycin rezisztens petunia /BINDING és mtsai, 1970/ és dohány /MALIGA és mtsai, 1973b/

sejtvonalak és növények szelekciós alkalmazhatóságára nincs adat.

COCKING és munkatársai /1974/ dohány és petunia protoplasztok aminosav analóg, növekedési anyag és antibiotikum szenzitivitásában figyeltek meg különbségeket, de ezek szelekciós alkalmazása sem ismert.

Auxotróf mutánsok hiányzó funkciójának a fuzió partnerek által történő kölcsönös helyreállítása, komplementálása is alapja lehet a hibrid szelekciónak. Ezen az elven alapult a *Sphaerocarpos donnellii* moha nikotinsav és glükóz anyagcserében hibás mutánsok protoplasztjainak fuziójából származó hibrid szelekciója /SCHIEDER, 1974/. A magasabbrendű növényeknél e kézenfekvő szelekciós elv megvalósítását az akadályozta, hogy az eddig leírt auxotróf mutánsokat olyan fajok /*Arabidopsis thaliana* - tiamin hiányos, LANGRIDGE és BROCK, 1961; kukorica - prolin hiányos, GAVAZZI és mtsai; árpa - aszparaginsav illetve leucin hiányos, WALLIS, 1963/ esetében kaptak, amelyek protoplasztjainak növényre regenerálása vagy rutinszerű tenyésztése még nem valósult meg.

Haploid eredetű dohány /*N. tabacum*/ sejttenyészetek esetében az auxotróf mutánsok izolálására irányuló kísérletek nem jártak sikerrel, az izolált sejtvonalak "leaky"

jelleget mutattak. Ennek oka az elégtelen szelekciós technika, a nem-leaky indukciójának hiánya, vagy a dohány alloploid jellege lehet /CARLSON, 1970/. A dohány auxotróf mutánsok in vitro tenyészetben történő izolálása sikertelenségének lehetséges magyarázata lehet az aminosavak szintézisének alternatív utjai /AVIV és GALUN, 1977/.

Lucerna, Caragana és Melilotus protoplasztok kanavaninnal szemben mutatott természetes rezisztenciáját a szenzitív szója protoplasztokkal történő fúzió után a heterokarionoknál nem tapasztalták /CONSTABEL és mtsai, 1975b/. Herbicid enzimatis detoxifikálása és a fajok hőérzékenységében mutatkozó különbségek szelekciós lehetőségét is vizsgálták /DUDITS, 1976/.

A komplementáció elve érvényesült a kukorica vad-típusu és klorofill mutáns protoplasztok fúziójakor. A fúziót követően a mutáns kloroplasztjaiban klorofill szintetizálódott /GILES, 1974/.

Petunia hybrida és Parthenocissus tricuspidata protoplasztok fúziójából eredő kalluszok szelekciója a partnerek eltérő táptalaj igényén alapult /POWER és mtsai, 1975/.

A magasabbrendű növényeknél sikeresen alkalmazott szelekciós rendszerek egy részénél a szelekció alapjául olyan markert választottak, amely korábban a szexuális

hibrideket megkülönböztette a szülőktől /CARLSON és mtsai, 1972; MELCHERS és LABIB, 1974/. *Nicotiana glauca* és *N. langsdorffii* paraszexuális hibridjeit a szexuális hibrideknél tapasztalt auxin autotrófia alapján szelektálták /CARLSON és mtsai, 1972; KAO és mtsai, 1974; SMITH és mtsai, 1976/. Klorofill deficiens fényérzékeny dohány /*N. tabacum*/ mutánsok szexuális keresztezéséből ismert komplementációja a szomatikus hibridizációt követően lehetőséget adott a hibridek szelektálására /MELCHERS és LABIB, 1974/. Dohány klorofill mutánsok protoplasztjainak fúziójából származó hibrideket is a komplementáció alapján lehetett elkülöníteni /GLEBA és mtsai, 1975/. Hasonló módon valósult meg a klorofill deficiens *Datura innoxia* mutánsok intraspecifikus hibridjeinek szelekciója is /SCHIEDER, 1977/.

Petunia hybrida és *P. parodii* szomatikus hibridjeinek szelektálása azok eltérő táptalaj igényén és aktinomicin D szenzitivitásán alapult /POWER és mtsai, 1976/. A szexuális hibrid protoplasztjaiból indított tenyészetek hormon igényének és aktinomycin D érzékenységének tanulmányozása során kapott eredmények ismeretében tökéletesítették a szelekciós rendszert /POWER és mtsai, 1977/. *Petunia hybrida* albinó mutáns protoplasztok és *P. paro-*

dii vadtipusu levél protoplasztok fuzióját követően a táptalaj által biztosított szelekciós hatás és az albinó tulajdonság komplementálása alapján jutottak hibridekhez /COCKING és mtsai, 1977/.

Nicotiana sylvestris és *N. knightiana* szomatikus hibridjét a *N. sylvestris* canamycin rezisztenciáját és a partnerek morfogenetikus képességének hiányát felhasználva szelektálták /MALIGA és mtsai, 1977/. SCHIEDER /1978/ a *Datura stramonium* és *D. discolor* morfogenetikus képességének hiánya, valamint a *D. innoxia* klorofill deficienciája alapján szelektált szomatikus hibrideket.

Az itt ismertetett eredményekből kitűnik, hogy a virágos növények intra- és interspecifikus szomatikus hibridjeit Solanaceae családba tartozó fajok esetében hozták létre. Az első, nem Solanaceae családba tartozó szomatikus hibridet a *Daucus carota* albinó mutáns és *D. capillifolius* vadtipusu sejtszuszpenzió eredetű protoplasztjainak fuziójából állították elő /DUDITS és mtsai, 1977a/.

III.

A N Y A G É S M Ó D S Z E R

A kísérleteket sejtszuszpénzió és levél eredetű protoplasztok felhasználásával végeztük.

1. Sárgarépa és szója sejtek tenyésztése

Sárgarépa /*Daucus carota* L. cv. Nantaise Slendero/ vadtipusu és A_1 albinó mutáns szuszpenzió tenyésztéseit kallusz tenyészetből kiindulva hoztuk létre. Az A_1 albinó mutáns a vadtipusu sárgarépa magvak etil-metán-szulfonátos /EMS/ mutagén kezelését követően az M_2 nemzedékben jelent meg /DUDITS és mtsai, 1977a/. A sejtszuszpénziókat B_5 /Gamborg és mtsai, 1968/, C_8I /DUDITS és mtsai, 1977a/, EB_5 /Médium $_1$, KAO, 1975a/ és C_5I tápfolyadékban tenyésztettük. A C_5I tápfolyadék összetétele hasonló a C_8I összetételéhez, s attól a következő komponensekben tér el /mg/l/: NH_4 -citrát - 500; makroelemek: KNO_3 - 1500, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 250, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ - 400, KH_2PO_4 - 250, és nátrium-bikarbonátot nem tartalmaz. A sejteket $25^\circ C$ -on 120-150 fordulat/perc sebességgel rázatva, 2-3 naponként passzálvá tenyésztettük. A protoplaszt izolálást megelőző napon a tenyészeteket passzáltuk.

A szója /*Glycine max* (L) Merr. cv. Mandarin/ sejtszuszpénzió a Dr. Oluf L. Gamborg /Prairie Regional

Laboratory, Saskatoon, Kanada/ által kifejlesztett sejtvonalból ered, melyet 1975 óta tartunk fenn laboratóriummunkban. Tenyésztését a sárgarépa sejtvonalakhoz hasonlóan végeztük EB₅ tápfolyadékban.

2. Protoplaszt izolálás sejtszuspenzióból

A protoplasztok izolálása sárgarépa esetében 1 ml enzim oldat /DUDITS és mtsai, 1976b/ és 1 ml sejtszuspenzió, szója esetében 0,5 ml enzim oldat és 1,5 ml sejtszuspenzió összekeverésével 25°C-on 50 fordulat/perc sebességgel rázatva történt. Az izolálás hossza sárgarépánál 5-7 óra, szójánál 15-20 óra volt.

3. Protoplaszt izolálás levélből

Levél protoplasztot a II. táblázatban felsorolt fajokból izoláltunk. A levelek sterilitását steril csiráztatással, vagy felszinsterilizéssel biztosítottuk. Steril csiráztatáskor a magvakat 70 %-os etanollal nedvesítettük /30 mp/, 0,1 %-os higány/II/-kloriddal sterilizáltuk /2 perc/, steril desztillált vízzel 4-5-ször mostuk és csiráztató táptalajra /makro- és mikroelemek, 0,8 % Bacto agar/ helyeztük. A levelek felszinsterilizése 70 %-os etanolos nedvesítés /30 mp/ után a kereskedelmi Hypo 4-5-szörösen higitott oldatával /2-4 perc/ történt, melyet 4-5-szöri steril desztillált vizes öblítés követett.

II. táblázat: Levél protoplasztok izolálásának körülményei

Faj magyar neve /Latin név és cv./	ST		Növény kora /nap/	IS	LSF		R	Izolálás hossza / h /
	CS	F			NY	V		
Petrezselyem /Petroselinum hortense L. cv. Korai cukor/		+	25 - 30	+	+		-	5-7
Podagrafü /Aegopodium podagraria L./		+	idős /30-/	+		+	+	4-5
Orvosi angyalgyökér /Angelica archangelica L./		+	idős /30-/	+		+	+	4-5
Ebszőlő csucsor /Solanum dulcamara L./		+	idős /30-/	±		+	-	6-8
Borsó /Pisum sativum L. cv. IP I/	+		10 - 14	+	+		-	6-8
Árpa /Hordeum vulgare L. cv. Tápláni tavaszi/		+	6 - 8	-	+		-	4-6
Rozs /Secale cereale L. cv. Kecskeméti H/		+	6 - 8	-	+		-	3-5

Rövidítések: ST - sterilizálás módja: Cs - mag steril csiráztatása, F - levél felszinsterilizése;
IS - 12 óra inkubálás sötétben; LSF - levél struktúra fellazítása: NY - nyuzással,
V - felvagdossássel; R - rázás sötétben /50 rpm/.

Kétszikű fajok esetében hatékonyabb volt az izolálás, ha a leveleket az izolálást megelőzően 12 óráig sötétben inkubáltuk. A levélstruktúra fellazítása céljából a steril leveleket 0,5-1 mm-es csikokra vágtuk, vagy fonák epidermiszüket eltávolítva helyeztük az izoláló oldatba. Az izolálást Driselase enzimkészítményt nem tartalmazó enzim oldat /DUDITS és mtsai, 1976a/ és protoplaszt tenyésztő oldat 1-1 ml-ének keverékével végeztük. Az izolálás egyéb körülményeit a II. táblázatban foglaltuk össze.

4. Protoplaszt fuzió indukálása polietilén-glikollal

Az izolálás befejeztével a protoplasztokat tartalmazó enzim oldatot 60 μ pórusméretű szitán szűrtük és a protoplasztokat centrifugálással ülepitettük /100 g, 5 perc/. A centrifugálást követően az enzim oldatot leszivattuk, a protoplasztokat C-oldatban /KAO és MICHAYLUK, 1974/ reszuszendáltuk és ismét centrifugáltuk. A felülszó eltávolítása után a protoplasztokat C-oldatban reszuszendáltuk úgy, hogy koncentrációjuk kb. $4-6 \times 10^5$ protoplaszt/ml legyen. A szuszpenzió és levél eredetű protoplasztokat kb. 1:1 arányban kevertük, s a protoplaszt keveréket 60 mm átmérőjű steril plasztik

Petri csészébe cseppentettük. 10 perc elteltével, mi-
alatt a protoplasztok leülepedtek a Petri csésze aljá-
ra, adtuk a polietilén-glikol /PEG/ oldat /KAO és MI-
CHAYLUK, 1974/ 4-5-szörös térfogatát a protoplaszt
szuszpenzióhoz. A kísérletekhez használt dimetil-szul-
foxidot /DMSO/ az alapoldatba mértük be úgy, hogy az
oldatban a DMSO koncentrációja 5, 10, 15 és 20 térfogat
% legyen. A PEG-DMSO oldatokat ezek felhasználásával
készítettük /NORWOOD és mtsai, 1976/.

A PEG kezelés ideje 3-5 perc volt, a protoplasztok
állapotától függően. A kezelést követően a fúziós elegy-
hez PEG kimosó oldat /CONSTABEL és mtsai, 1975a/ 4-5-
-szörös térfogatát adtuk, majd 7 perc elteltével az
oldatot leszivattuk és az öblítést megismételtük az
előbbi oldattal. Ezt követően háromszor UM I. utómo-
só oldattal /összetétele 1000ml-re: glükóz - Reanal:
73,2 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 200 mg, pH 6,0/ és kétszer proto-
plaszt tenyésztő oldattal mostuk a fúziós populációt.
Végül kb. 1,5-2 ml tenyésztő oldatot cseppentettünk a
Petri csészékbe és parafilmmel lezárva sötétbe helyez-
tük azokat.

5. Protoplasztok tenyésztése

Tenyésztés céljára a sárgarépa sejtszuszenzióból

izolált protoplasztokat szűrtük , majd négyszer UM I. utómosó oldattal, kétszer protoplaszt tenyésztő oldattal mostuk, a protoplaszt szuszpenziók koncentrációját beállítottuk $5 \cdot 10^5$ protoplaszt/ml/ és 60 mm átmérőjű plastik Petri csészébe 2 ml szuszpenziót mértünk ki. A Petri csészéket parafilmmel zártuk le. A sárgarépa protoplasztokat és a fuziók populációkat sötétben 25-27°C-on tenyésztettük.

A korábban ismertetett szuszpenzió tenyésztő tápfolyadékokat ozmotikummal /0,38 M glükóz/ és szerves komponensekkel kiegészítve kaptuk a protoplaszt tenyésztő oldatokat. Sárgarépa protoplasztok esetében C₈ /DUDITS és mtsai, 1977a/, B₅ /GAMBORG, és mtsai, 1968/ és C₅ tápfolyadékokra alapozott oldatokat állítottunk össze, és a hormon komponensektől függően a II. /naftilecetsav - 0,18 mg/l, 2,4-diklórfenoxiecetsav - 0,11 mg/l, zeatin - 0,11 mg/l/ és IV. /naftilecetsav - 0,18 mg/l, zeatin - 0,11 mg/l/ jelölést alkalmaztunk. A szója protoplasztokat C₂VII. tápfolyadékban /Médium 2, KAO, 1975a/ tenyésztettük.

A protoplaszt izolálás, fuzió és tenyésztés valamennyi lépését steril körülmények között Laminar Air Flow /Gelman/ fülkében végeztük. Az eszközöket, valamint az UM I. utómosó oldatot és a szuszpenzió tenyészetek tápfolyadékait autoklávoztuk /110°C, 60, ill. 30 perc/,

a protoplaszt izoláló, az enzim kimosó, a PEG kimosó és protoplaszt tenyésztő oldatokat G5-ös üvegszűrőn, vagy Millipore membrán szűrőn / Φ 0,45 μ / szűrtük sterilre.

6. A tenyészetek vizsgálata

A protoplasztok fúzióját vizuálisan és citológiai módszerrel vizsgáltuk. A vizuális megfigyelés Wild M 40 fordítós mikroszkóppal történt. A citológiai vizsgálatokhoz az anyagot 24 órával a fúzió után protoplaszt rögzítőben /KAO, 1975b/ fixáltuk, a sejtmagvak differenciál festését a módosított Sumner-féle módszerrel /DUDITS és mtsai, 1976c/ végeztük. A protoplasztból regenerált sejtek fejlődését vizuálisan követtük.

A heteroplazmikus fúzió és sejtosztódás gyakoriságát a tenyészetek 5-12 véletlenszerűen kiválasztott területén / $n=5-12$ / vizsgáltuk, a kapott adatokból az átlagot / $\bar{X}$ /, az adatok szórását / s / és a középérték szórását / $s_{\bar{X}}$ / számoltuk ki /SVÁB, 1973/.

IV.

E R E D M É N Y E K I S M E R T E T É S E

1. Sárgarépa növény regenerálása protoplasztból

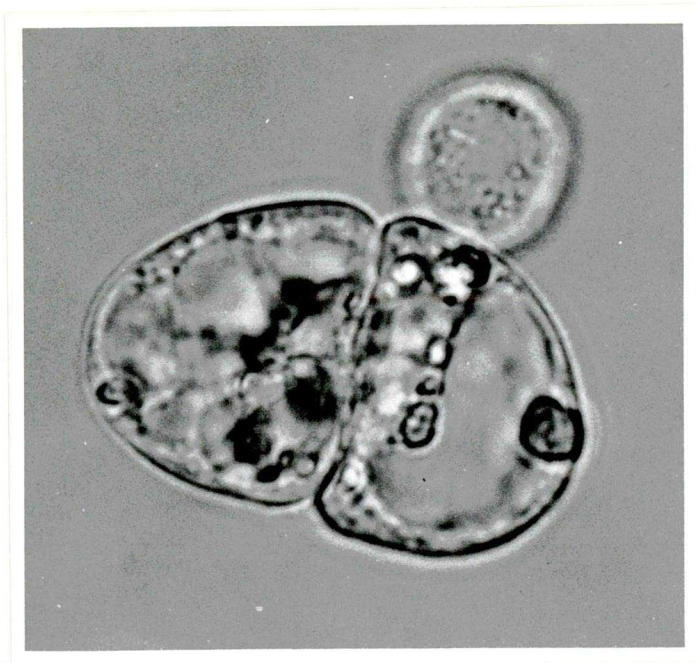
Sárgarépa sejtszuszpénzió és protoplaszt izoláló enzim oldat 1:1 arányu keverékét 50 fordulat/perc sebességgel rázatva az első protoplasztok már fél óra múlva megjelentek. A protoplaszt tenyésztéshez és fúzióhoz nagyobb mennyiségű protoplaszt szükséges, amelyet sárgarépa esetében 5-7 órás izolálással nyertünk. A sárgarépa sejtekből az izolálás során képződött protoplasztokban jól megfigyelhetők a keményítő szemcsék és a citoplazma jellegzetes strukturáltsága /1. kép/.

Az embriogenezis indukálása és teljes növény nevelése céljából a protoplasztokat alacsony hormon koncentrációt tartalmazó - C_8IV és C_5IV - protoplaszt tenyésztő tápfolyadékban tenyésztettük.

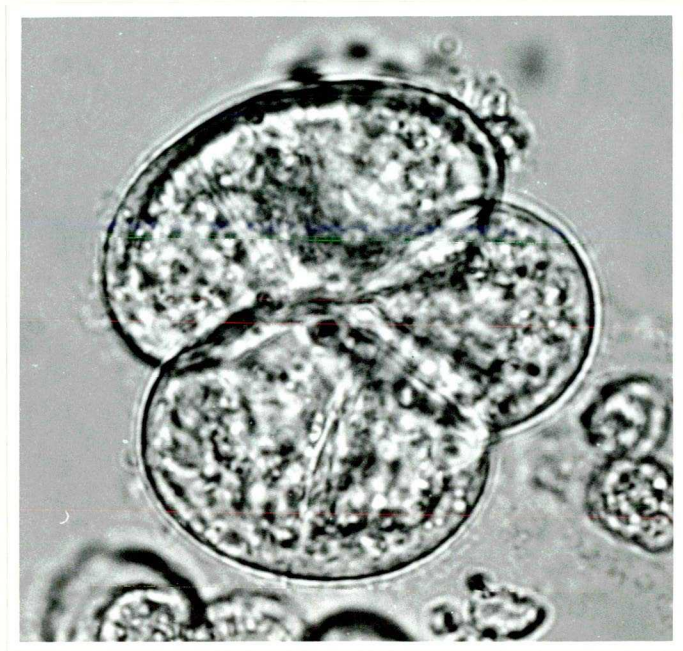
A tenyésztés során a protoplasztok sejtfalat regeneráltak, majd osztódtak /2. kép/. A többszörösen osztódó sejtek /3. kép/ kolóniákat hoztak létre /4. kép/. A tenyésztés 7-10. napján 1-2 ml hormon-mentes szuszpenzió tenyésztő tápfolyadékot adtunk a tenyészetekhez, s a friss tápfolyadék adagolását hetenként megismételtük.



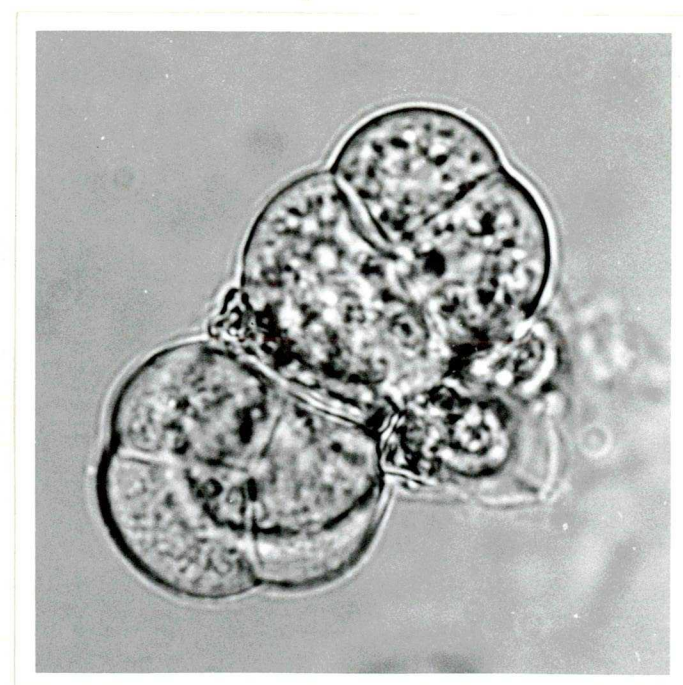
1. kép: Sárgarépa sejtszuspenzióból izolált protoplasztok. /Nagyítás: 1100x/



2. kép: Sárgarépa szuszenzió protoplasztból regenerált sejt osztódása. /Nagyítás: 1400x/.

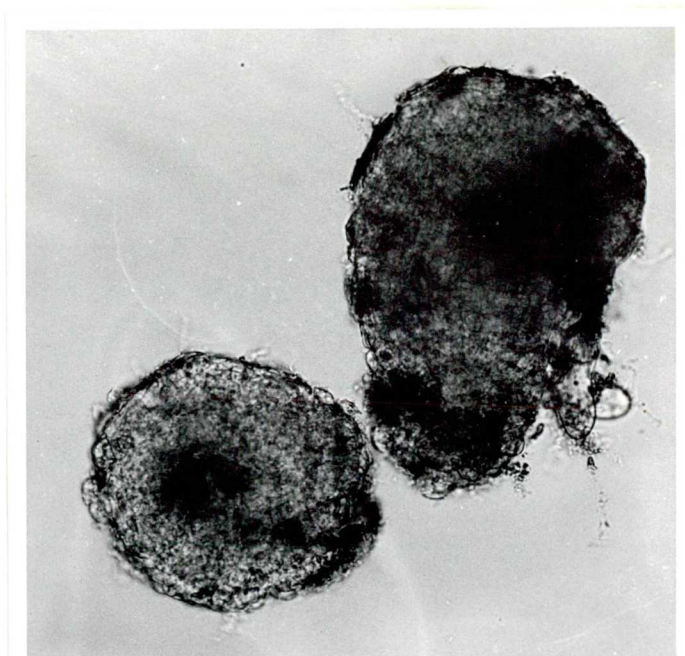


3. kép: Sárgarépa protoplasztból regenerált sejt többszöri osztódása. /Nagyítás: 1050x/.

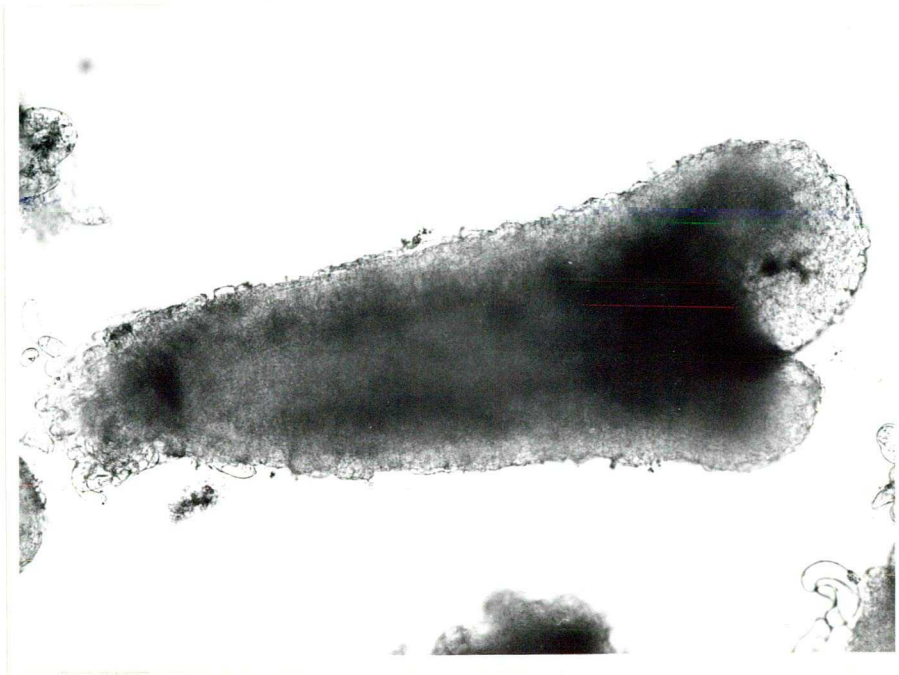


4. kép: Sárgarépa protoplaszt tenyészetben képződött sejtkolónia. /Nagyítás: 1300x/.

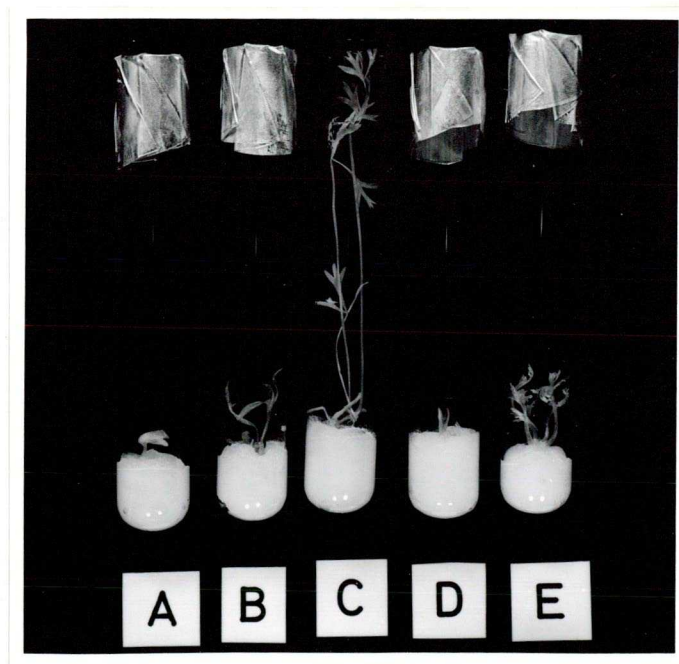
Ily módon a tápfolyadék ozmotikus értéke egyre alacsonyabb lett, és a hormon koncentráció is csökkent. A tenyészetekben kialakult több sejtből álló kolóniák fejlődése a hormon-mentes tápfolyadékban az embriogenezis irányába tolódott el. A tenyészetekben megjelentek a globuláris, a sziv /5. kép/, majd a torpedó stádiumu embriók /6. kép/. A fejlődés különböző stádiumában levő embriókat a hormonmentes tápfolyadékkal átitatott vattát tartalmazó tenyésztő edényekben helyezve növények képződtek /7. kép/.



5. kép: Globuláris és sziv stádiumu sárgarépa embriók.
/Nagyítás: 220x/.



6. kép: Torpedó stádiumu répa embrió. /Nagyítás: 130x/



7. kép: Protoplasztból regenerált vadtipusu /A-C/ és A_1 mutáns /D-E/ növények.

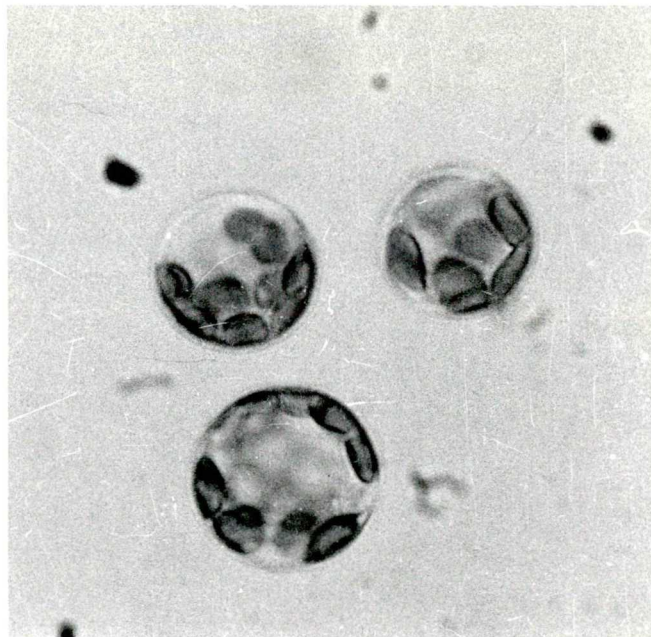
2. Növényi protoplasztok fúziós gyakoriságának növelése

A növényi szomatikus hibridek előállítása szempontjából igen fontos, hogy a különböző fajok protoplasztjainak fúziója minél nagyobb gyakorisággal következzen be. Szója szuszpenzió + petrezselyem, borsó és árpa levél protoplasztok esetében laboratóriumunkban is jó fúziós gyakoriságot értünk el. A sárgarépa szuszpenzió protoplasztok viszont kevésbé jó fúziós partnernek bizonyultak. Kísérleteinkben 2-5 %-os fúziós gyakorisággal kaptunk fúziót.

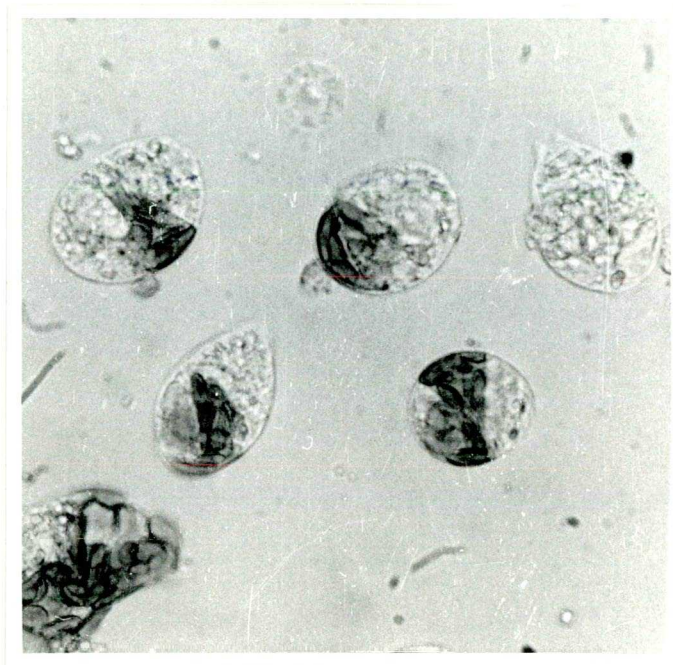
Humán sejtek fúziós gyakoriságának növekedését tapasztalták, ha a PEG oldat dimetil-szulfoxidot /DMSO/ tartalmazott. Ugyanakkor a DMSO magasabb koncentrációban toxikus volt a sejtekre. Sárgarépa szuszpenzió + levél protoplasztok magasabb fúziós gyakoriságának elérése céljából megvizsgáltuk a polietilén-glikol - dimetil-szulfoxid /PEG - DMSO/ kombinált kezelés hatékonyságát. Az előkísérletekben 10 % DMSO-t tartalmazó PEG oldattal indukált fúziókban 2-3-szoros növekedést tapasztaltunk. A továbbiakban célul tűztük ki a DMSO különböző koncentrációinak a fúziós gyakoriságra, valamint a protoplasztból regenerált sejtek tovább tenyészthetőségére gyakorolt hatásának módszeres vizsgá-

latát és kvantitatív értékelését.

A fúzió céljára izolált szuszpenzió és levél eredetű protoplasztokat - amennyiben azok megfelelő mennyiségben állnak rendelkezésre - célszerű 1:1 arányban keverni. A keveréket steril plastik Petri csészébe csepegtjük, majd a protoplasztok leülepedése /5-10 perc/ után a PEG oldat óvatos hozzáadásával indukáljuk a fúziót. A fúzió folyamatának lépéseit sárgarépa szuszpenzió és podagrafü /*Aegopodium podagraria*/ levél protoplasztokon /8. kép/ mutatjuk be. A protoplasztok keverékéhez PEG oldatot adva jól megfigyelhető az agglu-



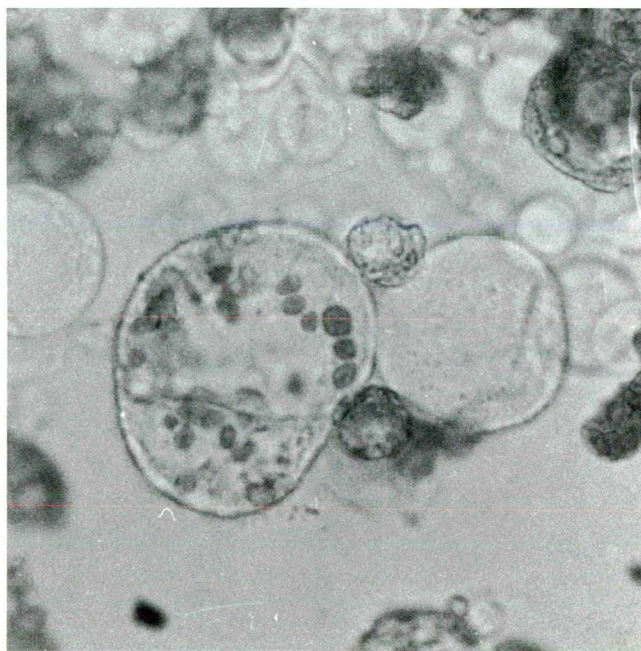
8. kép: Podagrafü /*Aegopodium podagraria*/ levél protoplasztok. /Nagyítás: 1000x/.



9. kép: Sárgarépa szuszpenzió és podagrafü levél protoplasztok polietilén-glikol /PEG/ kezelés hatására bekövetkező agglutinációja és fúziója.
/Nagyítás: 750x/.

tináció és fúzió folyamata /9. kép/. A fúziós kezelést követő tenyésztés során a kezdetben többé-kevésbé polárosan elhelyezkedő citoplazmák keverednek, s a kloroplasztok egyenletesen oszlanak el a citoplazmában, miközben a protoplasztok sejtfalat regenerálnak. A fúzióból eredő sejtek a répa protoplasztokból származó keményítő szemcsék és jellegzetes citoplazma strukturáltság, valamint a levél protoplasztok zöld kloroplasztjai jelenléte alapján a tenyésztés 6-8. napjáig megbízhatóan azonosíthatók és osztódásuk is nyomon követhető /10. és 11. kép/.





10. kép: Sárgarépa szuszpenzió + podagrafü levél protoplaszt fúzióból eredő sejt osztódása. /Nagyítás: 1200x/.



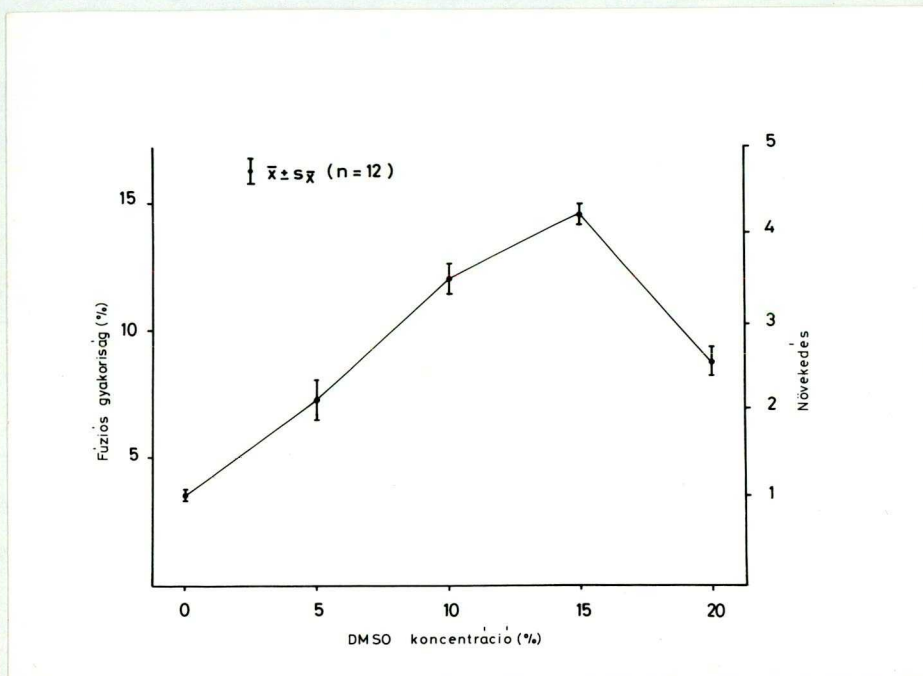
11. kép: Sárgarépa szuszpenzió + podagrafü levél protoplaszt fúzióból eredő sejt többszöri osztódása. /Nagyítás: 1300x/

A hosszabb idejű tenyésztés során a kloroplasztok fokozatosan elvesztik zöld színüket, s így a kvantitatív értékelés már nem lehetséges.

A kombinált PEG - DMSO kezelés hatásának vizsgálata céljából sárgarépa szuszpenzió és árpa levél protoplasztok kb. 1:1 arányu keverékének fúzióját 0, 5, 10, 15 és 20 % DMSO-t tartalmazó PEG oldattal indukáltuk. A fúziós gyakoriságot a kezelést követő napon határoztuk meg úgy, hogy a különböző DMSO koncentrációt tartalmazó PEG oldattal kezelt tenyészetek mindegyikében 12 véletlenszerűen kiválasztott területen megszámoltuk a fuzionált és nem-fuzionált répa sejtek számát. Kezelésként összesen 4-5000 sejtet számoltunk meg, s a heteroplazmikus fúzió gyakoriságát az összes sárgarépa sejt százalékában fejeztük ki.

A DMSO koncentrációjának emelkedése a fúziós gyakoriság jelentős növekedését eredményezte. 5, 10 és 15 % DMSO-t tartalmazó PEG oldat hatására 2,2-, 3,5- és 4,2-szeresére nőtt a fuzionált protoplasztok száma a kontrollhoz viszonyítva /1. ábra/. A PEG, valamint a kombinált PEG-DMSO kezelés a levél protoplasztokat károsította, s a membrán felszakadását eredményezte. A magasabb DMSO koncentrációknál erősebb károsító hatást észleltünk, s valószínűleg ezzel magyarázható a fúziós

gyakoriság 20 %-os DMSO koncentrációnál tapasztalt csökkenése /1. ábra/.



1. ábra: DMSO hatása sárgarépa szuszpenzió + árpa levél protoplasztok PEG-gel indukált fúziójára

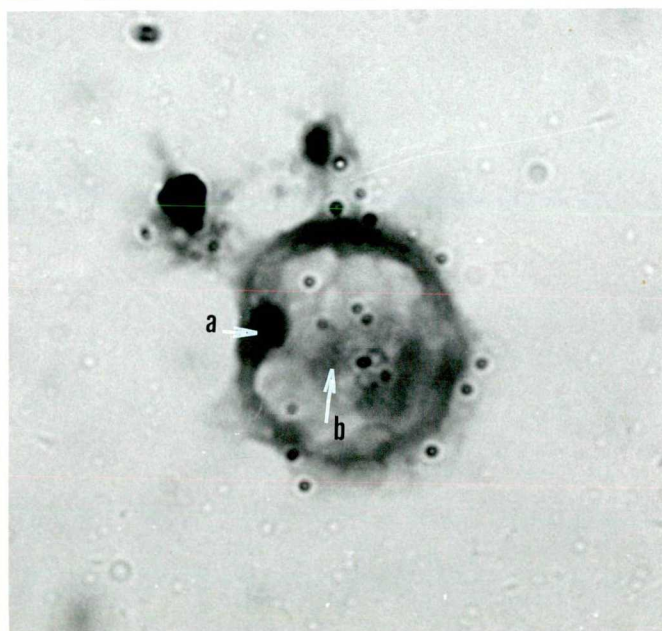
A PEG - DMSO kezelés hatását a protoplasztból regenerált sejtek tenyésztetőségére a répa és fuzionált sejtek osztódási gyakoriságával jellemeztük. A fúziót követő második napont 1800-2500 répa sejtet /n=6/, a hatodik napon 350-500 fuzionált sejtet /n=6/ vizsgáltunk és ezek osztódási gyakoriságát a III. táblázatban foglaltuk össze. Az adatok azt mutatják, hogy a csak PEG-

-gel, valamint a különböző DMSO koncentrációt tartalmazó PEG oldattal indukált fuziót követően a fuzionált és nem-fuzionált sejtek azonos mértékben osztódtak.

III. táblázat: Répa és répa + árpa fuzionált sejtek osztódási gyakorisága a PEG és PEG + DMSO kezelést követően.

DMSO koncentráció / % /	Osztódási gyakoriság / % /	
	Répa sejt, /2. nap/ $\bar{X} \pm s$	Fuzionált sejt, /6. nap/ $\bar{X} \pm s$
0	11,4 $\pm$ 2,0	12,7 $\pm$ 3,7
5	13,5 $\pm$ 2,5	9,5 $\pm$ 2,9
10	12,1 $\pm$ 1,4	11,5 $\pm$ 2,7
15	12,4 $\pm$ 2,5	9,0 $\pm$ 3,3
20	15,4 $\pm$ 1,4	10,9 $\pm$ 4,5

Az árpa protoplasztok PEG és PEG + DMSO jelenlétében bekövetkezett roncsolódása felvetheti azt a lehetőséget is, hogy a vizuálisan heteroplazmikus fuziót mutató répa sejtek nem a protoplasztok teljes citoplazmájának fuziójával jöttek létre, hanem a szétroncsolódott árpa protoplasztok kloroplasztjai a PEG és PEG + DMSO kezelés hatására bekövetkezett agglutináció során kerültek a répa protoplasztokba. E kérdés tisztázására egy újabb kísérletben répa és árpa protoplasztok PEG és PEG + DMSO oldat hatására bekövetkezett fuzióját citológiaiilag vizsgáltuk.



12. kép: Répa szuszpenzió és árpa levél protoplaszt fúziójából eredő sejt citológiai képe.

/a = árpa sejtmag; b = répa sejtmag; Nagyítás: 1300x/.

A módosított Sumner-féle módszer alkalmazásával a sötétén festődő kisebb árpa és világosan festődő nagyobb répa sejtmagok a heterokarionokban jól felismerhetők /12. kép/. A IV. táblázatban összefoglalt adatok szerint a PEG + 10 % DMSO kezelés 3,4-szeresére növelte a heterokarionok gyakoriságát a kontrollhoz viszonyítva.

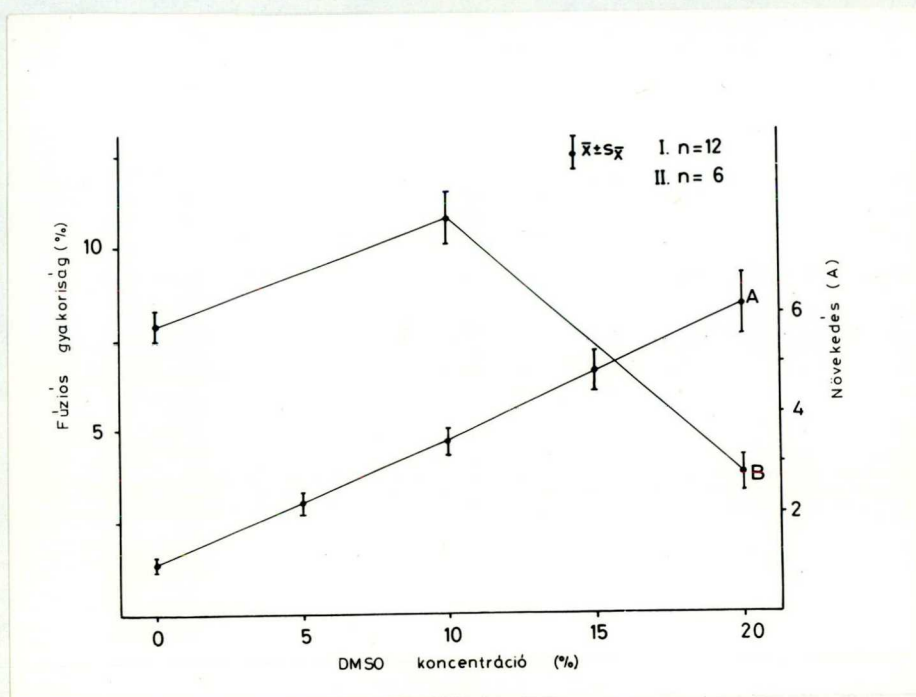
A szója protoplasztok kísérleteinkben általában jó fúziós partnernek bizonyultak, viszont rozs levél protoplasztokkal fuzionáltatva csak alacsony, 1-3 %-os fúziós gyakoriságot értünk el. A kombinált kezelés hatását ebben

IV. táblázat: A PEG és PEG + 10 % DMSO kezelés hatása a heterokarion képződés gyakoriságára répa szuszpenzió + árpa levél protoplaszt fúziós kombinációban.

Kezelés	Répa sejtek száma	Hetero- karionok	Összes	Heterokarion gyakoriság /%/	Növekedés
PEG	1099	28	1127	2,5	1
PEG + 10 % DMSO	735	67	802	8,4	3,4

a fúziós kombinációban is megvizsgáltuk. A 0, 5, 10, 15 és 20 % DMSO-t tartalmazó PEG oldattal indukált fúziót követő napon kezelésenként 3000-3500 sejtet számoltunk meg. A DMSO növekvő koncentrációjával lineárisan emelkedett a fúziós gyakoriság 2,3; 3,4; 4,9 és 6,2-szeres kontrollhoz viszonyított növekedést eredményezve /2. ábra, A -I. vonal/. A szója protoplasztból regenerált sejtek osztódási gyakoriságát a fúziót követő első és harmadik napon 1000-1300 /n=4/, a fuzionált sejtekét a negyedik napon 100-200 sejt vizsgálattából számítottuk és az adatokat az V. táblázatban foglaltuk össze.

A levél protoplasztok optimális izolálási idejét a II. táblázatban tüntettük fel. Amennyiben hosszabb ideig izoláljuk a protoplasztokat, csökkent stabilitásu, un. tulizolált protoplasztokat kapunk.



2. ábra: DMSO hatása szója szuszpenzió + levél protoplasztok fuziójára.

A - I. vonal: szója + rozs;

B - II. vonal: szója + tulizolált borsó.

Szója szuszpenzió és borsó tulizolált levél protoplasztok fuzióját 0, 10, és 20 % DMSO-t tartalmazó PEG oldattal indukálva azt tapasztaltuk, hogy 10 % DMSO jelenlétében a fuziók gyakoriság csak kismértékben emelkedett, 20 %-nál viszont a kontroll szintje alá csökkent /2. ábra, B - II. vonal/.

Figyelembe véve azt a tényt, hogy a levél partner stabilitása csökken a DMSO koncentrációjának növekedésével, a további fuziók kísérletekhez 10 % DMSO-t tartal-

V. táblázat: Szója és szója + rozs fuzionált sejtek osztódási gyakorisága a PEG és PEG + DMSO kezelést követően

DMSO koncentráció / % /	Osztódási gyakoriság / % /		
	Szója sejt, 1. napon, $\bar{X} \pm s$	Szója sejt, 3. napon, $\bar{X} \pm s$	Fuzionált sejt, 4. napon, $\bar{X}$
0	22,2 $\pm$ 5,1	79,1 $\pm$ 3,3	50,7
5	26,9 $\pm$ 6,1	83,8 $\pm$ 3,5	58,8
10	20,4 $\pm$ 1,9	77,6 $\pm$ 3,1	53,2
15	22,6 $\pm$ 4,4	77,6 $\pm$ 3,8	58,4
20	22,0 $\pm$ 3,0	80,8 $\pm$ 4,8	57,0

mazó PEG oldatot használtunk. A kombinált PEG - DMSO kezelés fuzió gyakoriságot növelő hatása más fuzió kombinációkban is megfigyelhető /VI. táblázat/. A szója +

VI. táblázat: Szuszpenzió és levél protoplasztok fuzió gyakoriságának alakulása DMSO hatására

Fuzió kombináció	Fuzió gyakoriság / % /		Növekedés
	PEG,	PEG + 10% DMSO,	
Szója + petrezselyem	1,9	6,8	3,6
Répa + rozs	4,8	13,5	2,8
Répa + borsó	4,2	9,0	2,1
Répa + podagrafü	0,3	1,1	3,7

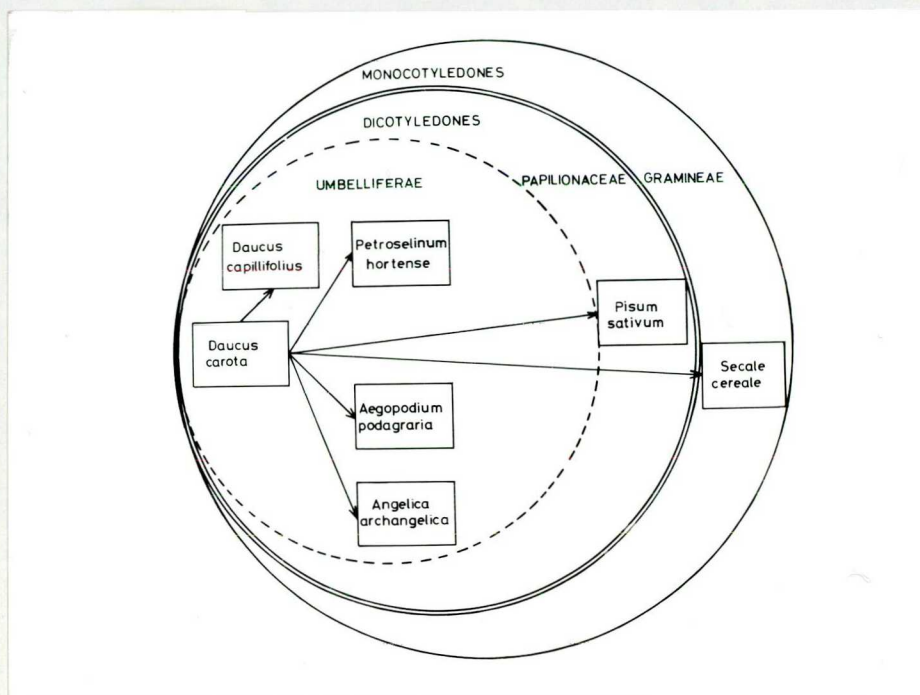
+ petrezselyem és répa + podagrafü kombinációk esetében a kontroll alacsony fuzió gyakorisága a levél partner

szuszpenzió protoplasztához viszonyított kis száma miatt adott alacsony értéket.

Solanum dulcamara és borsó levél protoplasztok és sárgarépa szuszpenzió protoplasztok fúzióját PEG + 10 % DMSO oldattal indukálva 8,5 /Solanum/, 8,4 és 8,5 % /borsó/ volt a heteroplazmikus fúzió gyakorisága.

3. A szomatikus kompatibilitás vizsgálata a protoplaszt fúzióból eredő sejtek fejlődésének korai szakaszában

Annak tanulmányozására, hogy a különböző fajok protoplasztjainak fúzióját követően a fúziós produktumok hogyan fejlődnek, illetve tapasztalható-e inkompatibilitás a fúzióból eredő sejtek esetében, sárgarépa A_1 albinó mutáns szuszpenzió protoplasztokat fuzionáltattunk levél protoplasztokkal. A levél partnereket úgy választottuk meg, hogy azok között rokon - Umbelliferae családba tartozó - és más egy- és kétszikű faj szerepeljen. A fúziós kísérletekhez felhasznált fajokat a 3. ábrán foglaltuk össze. /Az ábrán feltüntetett Daucus capillifolius levél protoplasztjaival fúziós kísérleteket nem végeztünk, mivel e faj kacs-szerű leveleiből hatékonyan nem izolálható protoplaszt./



3. ábra: A szomatikus kompatibilitás vizsgálata céljából a sárgarépa A_1 albinó mutáns + levél protoplaszt fúziós kísérletekbe bevont fajok

A fúzió indukálására az előző fejezetben ismertett PEG - 10 % DMSO kezelést alkalmaztuk, majd a protoplasztokat tenyésztettük. Az összehasonlító vizsgálatok céljából a répa és fuzionált protoplasztokból eredő sejtek osztódását a fúziót követő hatodik napon számoltuk vizuális értékeléssel, s az eredményeket a VII. táblázatban foglaltuk össze. A fuzionált és répa sejtek osztódási gyakoriságának arányát - F/A_1 - azért tüntettük fel, mert egy kísérleten belül ez az érték adhat a

VII. táblázat: Sárgarépa A_1 albinó mutáns + levél protoplaszt fúziós kombinációból regenerált sejtek osztódási gyakorisága

Fúziós partner	Kísérlet	Osztódási gyakoriság %/ A_1 répa sejt	Fuzionált	F/ A_1 arány
Petroselinum hortense	1.	5,2	19,0	3,65
	2.	4,1	13,9	3,39
Aegopodium podagraria	1.	10,4	37,1	3,56
	2.	3,5	11,7	3,34
Angelica archangelica	1.	3,5	12,8	3,65
Pisum sativum	1.	3,3	12,7	3,84
	2.	2,9	10,2	3,51
Secale cereale	1.	3,3	9,4	3,03
	2.	2,3	6,9	3,00

a répa protoplasztok kondíciójától független viszonyítási alapot. Az F/A_1 arány a különböző fúziós kombinációk tenyészetében közel azonos volt, értéke 3,0 és 3,8 között változott.

A tenyésztés hatodik napja után a fuzionált sejtekben levő kloroplasztok fokozatosan elvesztették zöld színüket, s így a pontos kvantitatív értékelés már nem volt lehetséges. Valamennyi fúziós kombinációban többszörösen osztódó fuzionált sejteket figyeltünk meg, s ezek a 10.-12. napon a 4-10 sejtes stádiumot is elérték.



4. Albinó mutáns és vadtipusu sárgarépa sejtek tápanyag igényének összehasonlító vizsgálata

Az előző fejezetben ismertetett A_1 répa és fuzionált sejt osztódási adatokat összevetve a vadtipusu /V/ répa sejtek osztódási adataival, érdekes jelenségekre figyeltünk fel. Az A_1 répa + levél protoplaszt fuzióból eredő sejtek mindig magasabb osztódási gyakoriságot adtak, mint az A_1 répa sejtjei /VII. táblázat/. Ugyanakkor a vadtipusu répa protoplasztból regenerált sejtjei jobban osztódtak, mint a fuzionált sejtek. A jelenséget számszerűen kifejezve:

$$F/A_1 > 1 \text{ /3,2 - 3,8/ ,}$$

$$F/V < 1 \text{ /0,5 - 0,8/ .}$$

Kísérleteinkben azt is megfigyeltük, hogy a vadtipusu sárgarépa sejtszuszpénzióból izolált protoplasztok a sejtfa regenerációt követően sokkal nagyobb gyakorisággal osztódtak, mint az A_1 sejtek. Az A_1 sejtek a hatodik napon sem érték el a vadtipusu sejtek második napon megfigyelt osztódási gyakoriságát /III. és VII. táblázat/. Ez a tény is indokoltá tette az A_1 mutáns vizsgálatát.

Feltételezésünk szerint az A_1 sejtek alacsony és a fuzionált sejtek A_1 -nél magasabb osztódási gyakorisá-

gának oka lehet: a/ Az A_1 mutáns auxotrófiája vagy "leaky" jellege, melyet a fuzionált sejtben a levél partner komplementál; b/ a tápfolyadék valamely komponense gátolja az A_1 mutáns sejtjeinek osztódását. Ezt a gátlást a fuzionált sejtben a levél partner megszüntetné.

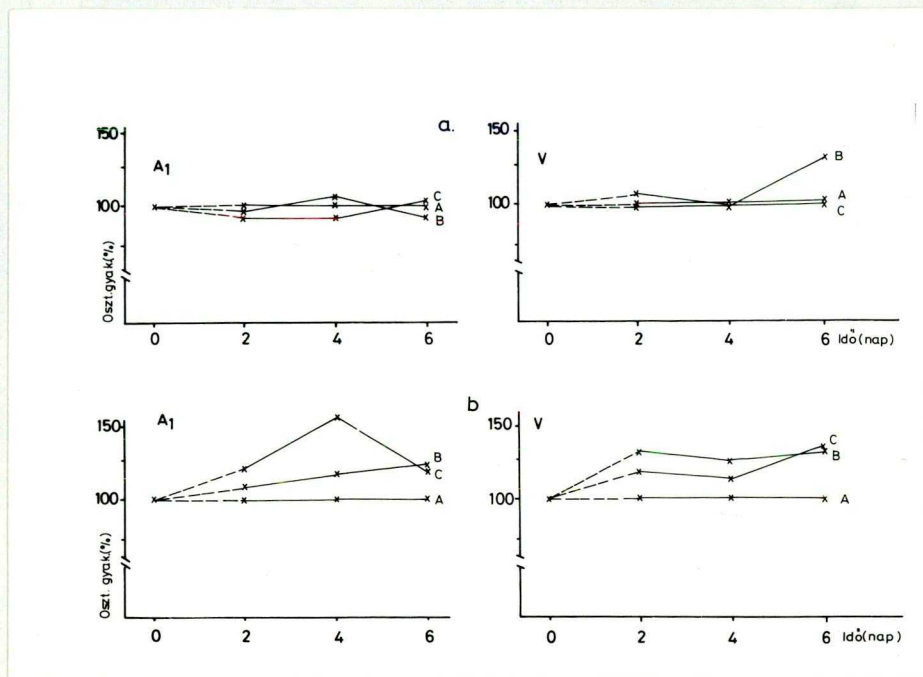
Az a/ pontban megfogalmazott lehetőség akkor birna különös jelentőséggel, ha a mutánsnak egy jól definiálható auxotrófiája lenne, mert ilyen esetben a már említett módon lehetne a hibrid szelekciót végezni. Amennyiben a b/ pontban feltételezett gátlásról lenne szó, a pontos mechanizmus tisztázása után szintén lehetőség nyílhatna a szelekciós alkalmazásra. A kérdés eldöntésére irányuló kísérleteket az alábbiakban ismertetjük.

A probléma megközelítésénél abból indultunk ki, hogy akár auxotróf jellegről, akár pedig gátlás megnyilvánulásáról van szó, a vadtypusu és A_1 mutáns protoplaszt tenyészetekinek összehasonlító vizsgálata felfedheti az okot.

Az első kísérletben az A_1 sejt vonalat vitamin auxotrófiára vizsgáltuk. Az izolált A_1 és vadtypusu protoplasztokat vitamin nélküli, 1/10 vitamint és teljes vitamint tartalmazó /komplett/ C_8IV . tápfolyadékban te-

nyésztettük és az osztódási gyakoriságot a 2., 4. és 6. napon számoltuk. Az A_1 sejtek esetében a sejtosztódás gyakorisága 7,3 % és 12,6 %, a vadtipusu sejteknél 11,2 % és 18,6 % között változott. Az összehasonlítás céljából a 4/a. ábrán a teljes vitamint tartalmazó oldatban kapott osztódási értékeket 100 %-nak számítva /A/ ábrázoltuk a vitamin nélküli /C/ és 1/10 vitamint /B/ tartalmazó tápfolyadékban kapott értékeket. Tendenciájában hasonló értékeket kaptunk akkor is, ha a protoplaszt tenyésztést megelőzően a sejteket egy hétig vitamint nem tartalmazó tápfolyadékban tenyésztettük. A különbség csak az volt, hogy az A_1 sejtek osztódási gyakorisága 1,1 % és 1,5 %, a vadtipusuaké 9,2 % és 12,9 % között változott. Mivel jelentős gátlást vagy stimulálást egyik kombinációban sem tapasztaltunk, kísérleteinket más irányba folytattuk.

Felvetődött az az elképzelés, hogy az A_1 és vadtipusu sejtvonalak közti eltérést a protoplaszt tenyésztő tápfolyadékban ozmotikumként és szénforrásként használt glükóz okozhatja. A glükóz hatást 0,1; 0,38 és 0,6 M-os glükózt tartalmazó tápfolyadékban vizsgáltuk. A végső ozmotikum minden esetben 0,6 M volt, s a hiányzó molaritás értéket az első két kombinációban mannittal pótoltuk. 100 %-nak véve a 0,1 M glükózon növe



4. ábra: A₁ és vadtipusu /V/ protoplasztból regenerált sejtek osztódása vitamin /a/ és glükóz /b/ különböző koncentrációit tartalmazó tápfolyadékban:

a/ Vitamin koncentrációk: A - komplett; B - 1/10; C - vitamin nélküli;

b/ Glükóz koncentrációk: A - 0,1 M; B - 0,38 M; C - 0,6 M.

tenyészetek osztódási gyakoriságát ábrázoltuk az adatokat /4/b. ábra/. Bár a negyedik napon a 0,38 M glükózon növvő A₁ tenyészet osztódási gyakorisága nagyobb emelkedést mutatott a kontrollhoz viszonyítva, de ez-figyelembe véve a vadtipusu sejtvonalnál is megfigyelhető emelkedést - nem jelentős, s a kísérletben gátló hatást nem észlel-

tünk.

Mivel a különböző időben C_5 és C_8 tápfolyadékokban tenyésztett szuszpenziókból izolált protoplasztok osztódási gyakorisága eltérő értékeket mutatott, felvetődött az a gondolat, hogy az A_1 és vadtipusu osztódásában tapasztalt különbség oka a táptalaj anorganikus komponensei által okozott gátlás. A C_5 és C_8 tápfolyadékok a következő makroelemekben különböznek:

Vegyület /mg/l/	C_5	C_8
NH_4NO_3	-	400
KH_2PO_4	250	1000
Na_2HPO_4	-	100
$NaHCO_3$	-	150

A kísérlethez azonos eredetű sejttenyészetekre volt szükség, melyet úgy biztosítottunk, hogy az A_1 és V sejtvonalakat 1 mg/l 2,4-diklórfenoxiecetsavat tartalmazó tápfolyadékról / B_5 / C_5I és C_8I oldatra paszszáltuk, majd két hétig azon tenyésztettük. A protoplaszt izolálást követően a protoplasztokat C_5 , illetve C_8 komponensekre alapozott tenyésztő folyadékba vittük és számoltuk az osztódási gyakoriságot a 3. és 7. napon /VIII. táblázat/. Itt jegyezzük meg, hogy kísérletünkben a C_5 protoplaszt tenyésztő tápfolyadékot

VIII. táblázat: Vadtipusu és A_1 mutáns répa protoplasztból regenerált sejtek osztódási gyakoriságának alakulása C_5 és C_8 tápfolyadékban

			Osztódási gyakoriság ^a	
Répa			3. napon, $\bar{X} \pm s$	7. napon, $\bar{X} \pm s$
Tápfolyadék	C_5	A_1	3,1 $\pm$ 1,1	4,7 $\pm$ 1,1
		V	11,3 $\pm$ 2,4	12,2 $\pm$ 2,0
	C_8	A_1	3,5 $\pm$ 0,8	8,0 $\pm$ 2,4
		V	13,4 $\pm$ 1,7	22,2 $\pm$ 2,7
Osztódások aránya	C_8/C_5	A_1	1,1	1,7
		V	1,2	1,8
	V/A_1	C_5	3,6	2,6
		C_8	3,8	2,8

nem egészítettük ki a C_8 szokásos aminosav komponenseivel, csupán 50 mg/l szerint és 10 mg/l glicint mértünk be.

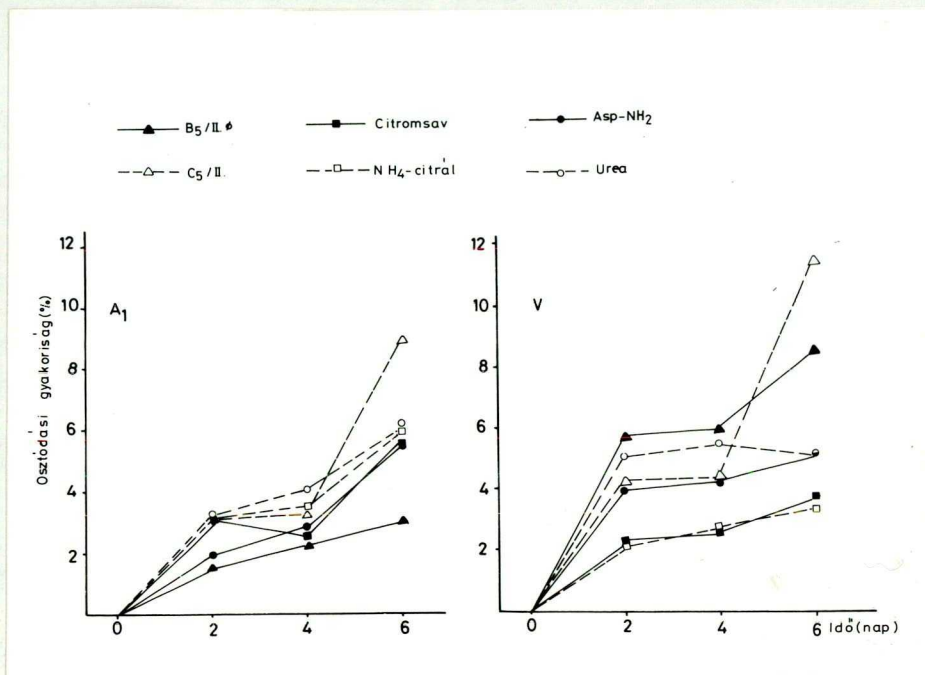
Mivel a táblázatban feltüntetett osztódási adatok önmagukban nem mondanak sokat, kiszámoltuk és összehasonlítottuk az azonos sejtvonalak különböző tápfolyadékban kapott értékeit $/C_8/C_5$ arány/, valamint a V és A_1 sejtvonalak azonos tápfolyadékban kapott értékeit $/V/A_1$ arány/. Ezek az arányok közel azonosak voltak, és azt mutatták, hogy a szervesetlen komponenseknek nincs gátló

hatása /VIII. táblázat/.

A tápfolyadék egyéb komponensei közül az urea hatását vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy 100 mg/l koncentrációban sejtosztódás növekedést eredményezett az A₁ sejtvonalnál, míg azonos koncentráció a V sejtvonal protoplasztból regenerált sejtjeinek osztódását gátolta. Mivel az előkísérletekben az aszparaginsav és N-Z aminosav /enzimatikusan hidrolizált kazein/ is pozitív hatású volt az A₁ sejtek osztódására, ugyanakkor a V sejtvonalra hatástalan volt vagy gátlólag hatott, szisztematikus vizsgálatot kezdtünk el annak megállapítására, hogy az aszparaginsav szintézisével kapcsolatos vegyületek milyen hatással vannak az A₁ és V tenyészetek osztódására.

A kísérleteket B₅II protoplaszt tenyésztő tápfolyadék felhasználásával végeztük, melyet a vizsgálni kívánt szerves komponensekkel egészítettünk ki. A korábban végzett kísérletekben aktívnak mutatózó ureán kívül a többi vizsgált vegyület valamilyen formában a citrát-ciklussal kapcsolatos volt.

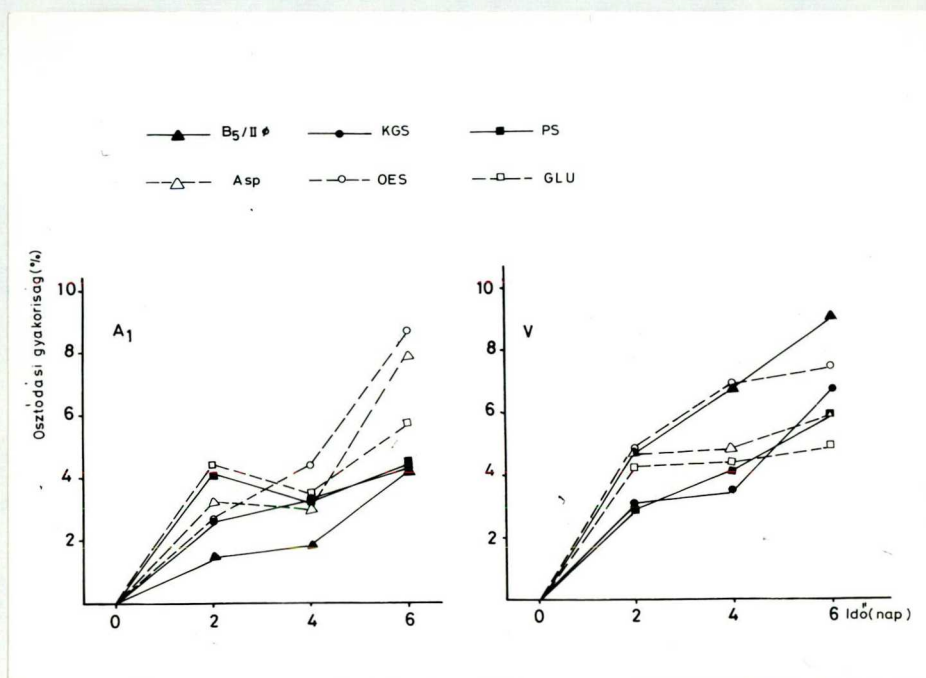
Összehasonlítva a különböző szerves komponensek jelenlétében észlelt sejtosztódási gyakoriságokat, azt tapasztaltuk, hogy az urea, citromsav, ammonium-citrát



5. ábra: A₁ mutáns és vadtypusu /V/ protoplasztból regenerált sejtek osztódási gyakorisága szerves komponenseket tartalmazó tápfolyadékban I. Vegyületek és koncentrációjuk:
citromsav: 500 mg/l ~ 2,4 mM,
ammonium-citrát: 500 mg/l ~ 2,2 mM,
Asp-NH₂ - aszparagin: 200 mg/l ~ 1,3 mM,
urea : 100 mg/l ~ 1,7 mM.

és aszparagin jelenlétében magasabb volt, míg a V sejtek osztódásában gátlás mutatkozott. C₅II komplett tápfolyadék a 2. és 4. napon gátolta a V sejt vonal osztódását, de ez a gátlás a 6. napra megszűnt /5. ábra/.

A citrát-ciklussal kapcsolatos egyéb vegyületek sejtosztódásra gyakorolt hatását foglalja össze a 6.



6. ábra: A₁ mutáns és vadtipusu /V/ protoplasztból regenerált sejtek osztódási gyakorisága szerves komponenseket tartalmazó tápfolyadékban II.

Vegyületek és koncentrációjuk:

Asp - aszparaginsav: 1,5 mM,

KGS - α -ketoglutársav: 2 mM,

OES - oxálecetsav: 2 mM,

PS - piroszőlősav: 2 mM,

GLU - glutaminsav: 1,5 mM.

ábra. Az aszparaginsav, glutaminsav, piroszőlősav, α -ketoglutársav és oxálecetsav szintén a sejtosztódás növekedését eredményezte az A₁ sejtvonalnál, míg a vadtipusu sejtek osztódását gátolta. Az oxálecetsav gátlása csak a 6. napon, az aszparaginsav és glutaminsav

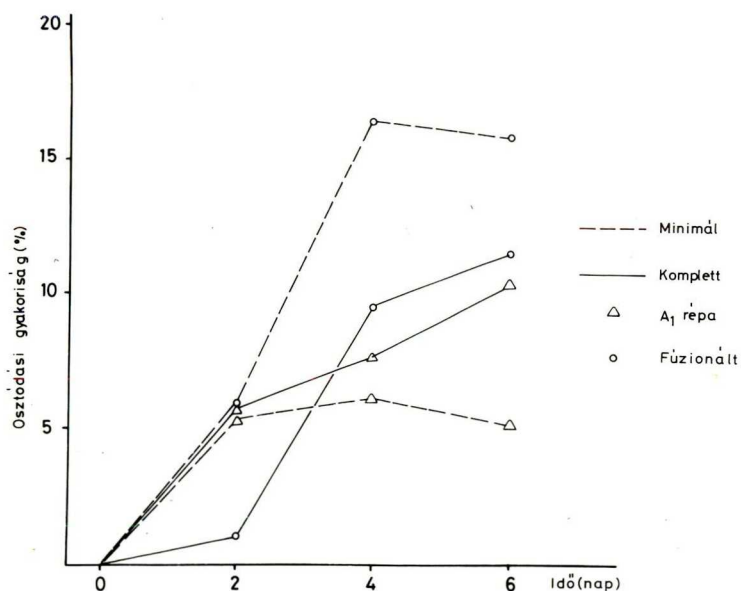
gátlása a 4. naptól, a piroszőlősav és α -ketoglutársav gátlása már a 2. napon tapasztalható.

A sárgarépa A_1 albinó mutáns + levél protoplaszt fuzióból eredő sejtek A_1 -nél magasabb osztódási gyakorisága kapcsán megvizsgáltuk azt is, hogy a protoplaszt tenyésztő tápfolyadék összetétele hogyan befolyásolja az A_1 és fuzionált sejtek osztódását. Az A_1 sejt vonalat két napig minimál - csak makro-, mikroelemeket és hormonokat tartalmazó - tápfolyadékban tenyésztettük, s a sejttenyészetből izolált protoplasztokat árpa levél protoplasztokkal fuzionáltattuk. A fuzió populációt C_5II minimál /makro- és mikroelem, hormon, ozmotikum/ és komplett protoplaszt tenyésztő oldatban tenyésztettük, és vizsgáltuk az A_1 és fuzionált sejtek osztódási gyakoriságát a tenyésztés 2., 4. és 6. napján. A kapott adatokat a 7. ábrán tüntettük fel.

Az eredmények alapján megállapítható, hogy a tenyésztés körülményei nagymértékben befolyásolják az A_1 és fuzionált sejtek osztódását. A minimál tápfolyadék esetében az A_1 és fuzionált sejtek osztódási gyakorisága a 2. napon azonos volt, míg a 4. és 6. napon a fuzionált sejtek osztódási gyakorisága mintegy háromszorosára nőtt az A_1 sejtekéhez viszonyítva. A komplett tápfolyadékban tenyésztett A_1 sejtek osztódási gyakori-

sága számszerűen magasabb értéket mutatott, viszont a fuzionált sejtek 4. és 6. napon megfigyelt osztódási gyakorisága alig haladta meg az A_1 sejtekét.

Tehát a minimál tápfolyadékban az osztódó fuzionált sejtek az A_1 -hez viszonyítva nagyobb számban fordultak elő, másszóval, az osztódó fuzionált sejtek a minimál táptalajon bedusultak az osztódó A_1 sejtekhez viszonyítva.



7. ábra: A_1 mutáns és A_1 + árpa levél fuzionált sejtek osztódási gyakoriságának alakulása minimál és komplett tápfolyadékban.

V.

E R E D M É N Y E K É R T É K E L É S E

1. Növény regenerálás protoplasztból

A protoplasztból történő növény nevelés eddig mintegy 15 fajnál valósult meg, melyeket a II. táblázatban foglaltunk össze. A sárgarépa protoplasztok tenyésztése, regenerálása embrióvá /KAMEYA és UCHIMIYA, 1972/ és növénné /GRAMBOW és mtsai, 1972/ már régóta ismert. A sárgarépa kallusz szövetekből indított sejtszuszpenziók jól tenyészthetők és ezekből a protoplaszt izolálás nagy hatékonysággal valósulhat meg. A répa protoplasztok a rutinszerű tenyésztési és fúziós munkákhoz jól felhasználhatók /DUDITS és mtsai, 1976a, b/. Ezért laboratóriumunk egyik kísérleti objektumává ezt a növényt választottuk.

Munkánk során a sejtszuszpenzióból történő protoplaszt izolálás és tenyésztés módszerét sikeresen alkalmaztuk. A protoplaszt tenyészetekben nyomon követtük a sejtfal regeneráció, sejtosztódás, embriogenezis és növénné fejlődés lépéseit. /2.-7. kép/.

A sárgarépa protoplasztok rutinszerű tenyésztése és növénné regenerálása lehetőséget nyújt arra, hogy

laboratóriumunkban erre a kísérleti objektumra alapozva sejtgenetikai és szomatikus hibridizációs munkákat végezzünk.

2. Fúziós gyakoriság növelése növényi protoplasztoknál

Növényi protoplasztok polietilén-glikollal /PEG/ indukált fúziója /KAO és MICHAYLUK, 1974/ széles körben elterjedt és más objektumoknál is alkalmasnak bizonyult /AHKONG és mtsai, 1975; FERENCZY és mtsai, 1975; PONTECORVO, 1975; DUDITS és mtsai, 1976c, FODOR és ALFÖLDI, 1976; SCHAEFFER, 1976/. A humán sejtek fúziós gyakoriságát növelő PEG - DMSO kezelés /NORWOOD és mtsai, 1976/ a növényi protoplasztok fúziós gyakoriságát is kedvezően befolyásolta kísérleteinkben. A DMSO különböző - 5, 10, 15 és 20 % - koncentrációit tartalmazó PEG oldattal indukált fúzió gyakorisága sárgarépa + árpa esetében 2-4-szeresére /1. ábra/, szója + rozs kombinációban 2-6-szorosára /2. ábra/ nőtt a kontrollhoz viszonyítva. A kombinált PEG - DMSO kezelés más fúziós kombinációkban /répa + podagrafü, répa + rozs, répa + borsó, szója + petrezselyem, VI. táblázat, répa + Solanum dulcamara/ is hatékonynak bizonyult.

A fúzió vizuális értékelésekor a szuszpenzió és le-

vél eredetű protoplasztok morfológiai bélyegei alapján a heteroplazmikus fúzió gyakoriságát határoztuk meg. A kísérleteket citológiai vizsgálattal kiegészítve igazolódott, hogy a kombinált PEG - DMSO kezelés során valódi fúzió következett be, amely heterokarionokat eredményezett. Kísérletünkben a 10 % DMSO-t tartalmazó PEG oldattal indukálva a fúziót a heterokarionok száma 3,4-szeresére nőtt /IV. táblázat/.

A DMSO magasabb koncentrációit tartalmazó PEG oldat hatására jelentősen csökkent a levél protoplasztok stabilitása. Ennek tudható be a répa + árpa protoplasztok fúziós gyakoriságának csökkenése 20 % DMSO jelenlétében /1. ábra/. A DMSO levél protoplaszt stabilitásra gyakorolt hatása különösen drasztikusan érvényesült szója szuszpenzió + tulizolált borsó levél protoplasztok esetében. /2. ábra, B-II. vonal/.

A levél protoplasztok izolálása során döntő fontosságú az izolálás hossza, mivel ennek növelésével nő az izolálás hatékonysága. Ugyanakkor az időben elnyúló izolálás a protoplasztok stabilitásának jelentős csökkenését eredményezi, s ez a fúziós gyakoriság csökkenését vonja maga után. Mivel a PEG-gel indukált protoplaszt fúzió esetében a DMSO koncentrációjának növekedésével a levél partner stabilitásának további csökkenésével kell

számolnunk, a rutinszerű fúziós munkák céljára célszerű olyan DMSO koncentrációt használni, amelynek a fúziós gyakoriságot növelő hatása erősebb, mint a stabilitást csökkentő hatása. Az 1. és 2. ábrán, valamint a VI. táblázatban feltüntetett adatok azt mutatják, hogy erre a célra a 10 % DMSO-t tartalmazó PEG oldat megfelelő. A citológiai vizsgálat is ezt támasztja alá /IV. táblázat/.

A DMSO levél protoplaszt stabilitást csökkentő hatásának bizonyos szelekciós vonatkozása is lehet. Olyan fúziós kombinációkban, ahol a levél partner a tenyésztés során többszöri osztódást követően kallusszá vagy növényké fejlődhet /dohány - TAKEBE és mtsai, 1971, petunia - DURAND és mtsai, 1972, stb./, a DMSO-t megfelelő koncentrációban tartalmazó PEG oldatot alkalmazva a fúzió indukálásával egyidejűleg a nem-fuzionált levél protoplasztok teljes roncsolódása érhető el. Az általunk vizsgált fúziós kombinációkban is számításba kell vennünk ezt a lehetőséget, mivel a borsó levél protoplasztok osztódása és kallusszá fejlődése /CONSTABEL és mtsai, 1973; ARNOLD és ERIKSSON, 1976/, valamint a Solanum dulcamara protoplasztok regenerálódása növényké /BINDING és NEHLS, 1977/ az irodalomból ismert. Tenyészteteinkben a levél partnerből képződő kalluszok vagy növények megzavarnák a kísérletek értékelését, mivel kísérleteink

távolabbi célja a sárgarépa A₁ albinó mutáns + levél protoplaszt fuzióból eredő zöld sárgarépa kalluszkok vagy növények nevelése volt.

A PEG - DMSO kombinált kezelésnek a fuzionált sejtek életképességére gyakorolt hatását értékelve megállapítható, hogy a humán sejtek esetében megfigyelt eredményektől /NORWOOD és mtsai, 1976/ eltérő adatokat kaptunk. Míg a humán sejteknél 15% DMSO már az életképesség jelentős csökkenését eredményezte, melyet a sejtosztódási gyakoriság, valamint a triciált timidin inkorporáció csökkenése mutatott, a növényi protoplasztok fuzióját követően ez a toxikus hatás nem észlelhető. A 15 és 20% DMSO-t tartalmazó PEG kezelés után is jól tenyészthetők a szuszpenzió és fuzionált protoplasztból regenerált sejtek /III. és V. táblázat/.

Annak oka, hogy a répa + levél protoplaszt, valamint a szója + rozs levél protoplaszt fuziók kombinációban a fuzió gyakorisága miért alacsonyabb, mint más partnerek esetében, pontosan nem ismert. Az alacsony fuziók gyakoriságot a protoplasztok belső szerkezete, a vakuolumok pozíciója is okozhatja /COCKING, 1971/, és összefüggésben lehet a protoplasztok méretbeni különbségével /POTRYKUS, 1973b/, mely esetünkben a sárgarépa protoplasztok-

kal kapcsolatban vetődhet fel. Az okok közt számításba jöhet a membrán strukturájának, vagy komponenseinek a jól fuzionáltatható fajokétól való eltérése is.

A DMSO PEG-gel indukált fuziók gyakoriságot növelő hatását értékelve meg kell jegyeznünk, hogy a különböző fuzigén ágensekkel indukált protoplaszt fuziók pontos mechanizmusa nem ismert. A protoplasztok felszínének negatív töltése /RUESINK, 1971/ döntő lehet a fuzió folyamatában, s a mechanizmus magyarázatát is ezzel hozzák kapcsolatba. A nátrium-nitráttal indukált agglutináció és fuzió /POWER és mtsai, 1970/ a protoplaszt felszín negatív töltései nátrium-ion által történő semlegesítésének tulajdonítható /COCKING, 1973/. A magas pH - magas Ca^{++} oldattal 37°C -on indukált fuzió esetében a hőmérséklet hatására bekövetkező membrán összetétel változás /megemelkedik a lizofoszfolipidek - lizolecitin, lizofoszfatidiletanolamin - mennyisége a membránban/, a magas pH hatására bekövetkező egyéb membrán változás és a kalcium-ionok stabilizáló és összekapcsoló hatása érvényesülhet /KELLER és MELCHERS, 1973/. A PEG-gel indukált fuzió esetében a polianionként viselkedő PEG molekulák és a membrán negatív töltései között a kalcium-ionok által létesített hidak létrejöttével magyarázzák az agglutinációt, s ezt követően a membrán - membrán

kapcsolat kialakulása után a protoplaszt membránok pozitív és negatív polaritású részei között kialakult kapcsolattal a fúzió bekövetkeztét /KAO és MICHAYLUK, 1974/. A DMSO hatás lehetséges mechanizmusára NORWOOD és munkatársai /1976/ két magyarázatot ajánlanak: a DMSO megváltoztatja a membrán viz-környezetét, lehetővé téve a PEG molekulák közvetlenebb kapcsolatát a sejt külső felszínével; a DMSO a membrán strukturáját változtatja meg, amely önmagában nem eredményez fúziót, de a sejtet érzékenyebbé teszi a PEG-gel indukált fúzióra.

Az a tény, hogy a PEG-gel indukált fúzió gyakoriságát DMSO jelenlétében növényi protoplasztok esetében is növelni lehet, a fúziós folyamatok mechanizmusának hasonlóságára enged következtetni.

Összegezve a fúziós gyakoriság növelésére irányuló kísérletek eredményeit, megállapítható, hogy a kombinált PEG-DMSO kezelés növényi protoplasztok esetében is hatékonynak bizonyult, és a DMSO jelenléte a fúziós elegyben nem hatott gátlólag a protoplasztból regenerált szuszpenzió és fuzionált sejtek továbbtenyészthetőségére.

3. A szomatikus kompatibilitás vizsgálata a fuzionált sejtek fejlődésének korai szakaszában

A 3. ábrán feltüntetett fuziós program keretében végzett kísérletek osztódási adataiból kiszámítva az A_1 fuzionált sejt/répa sejt - F/A_1 - arányt, megállapítható, hogy ez az arány valamennyi fuziós kombináció esetében közel azonos értéket mutat és 3,0 - 3,8 között változik /VII. táblázat/. Az adatok alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a kísérletekhez használt A_1 + levél protoplaszt fuzióból eredő sejtek esetében a fejlődés korai szakaszában inkompatibilitás nem tapasztalható, a protoplasztból regenerált fuzionált sejtek fejlődésük ezen szakaszában kompatibilisak.

A kísérleti eredmények értékelése során szükséges kitérnünk a kompatibilitás fogalmának tárgyalására. A fogalmak szexuális keresztezésekkel kapcsolatos értelmezése esetén kompatibilitáson - összeférhetőségen - két egyed közti termékeny ivari kapcsolat lehetőségét, inkompatibilitáson az életképes ivarsejtekkel rendelkező egyedek szexuális folyamata valamelyik lépésében bekövetkező gátlást értik. E gátlás végső eredményeként életképes embriót tartalmazó mag nem jön létre. A szexuális inkompatibilitást számos, részleteiben nem minden

esetben ismert tényező okozhatja és befolyásolhatja, s ennek megfelelően az osztályozása is különböző szempontok alapján történhet /FRANKEL és GALUN, 1977; NETTANCOURT, 1977 /. A szexuális folyamat gátlása a megnyilvánulás helyét tekintve bekövetkezhet a bibe felszínén /pollen "csirázás" gátlása/, a bibeszálban /pollentömlő növekedésének gátlása/ és a magházban. A magházban jelentkező gátlás is különböző lehet aszerint, hogy a megtermékenyítés, a zigóta osztódása, vagy az embrió fejlődése gátolt.

A gátlási folyamat hátterében egy vagy több gén aktivitása, speciális fiziológiai folyamatok lejátszódása, morfológiai okok, stb. állhatnak /FRANKEL és GALUN, 1977; NETTANCOURT, 1977/.

Az inkompatibilitás fogalma a vegetatív részek egymásra oltásával kapcsolatban is használatos. Az idevonatkozó irodalmak összevetése arra enged következtetni, hogy az ilyen esetekben jelentkező inkompatibilitás számos esetben táplálkozás-fiziológiai okokra vezethető vissza /PORPÁCZY, 1964/.

Az általunk tanulmányozott kísérleti rendszerhez formailag és célját tekintve a fertilizáció és az azt követő zigóta fejlődés áll legközelebb. Ugyanakkor hangsúlyoznunk kell, hogy lényegét tekintve számos alapvető

eltérés van a két folyamat között. A zigóta kialakulásához és fejlődéséhez viszonyítva eltérés mutatkozik a fuzionált protoplasztok differenciáltsági fokában, genetikai információ tartalmában, citoplazma tartalmában, ploidia szintjében, kromoszóma számában, táplálkozási viszonyaiban, stb.

Mivel a vegetatív ráoltásoknál nem jön létre a fuzióhoz hasonló közvetlen citoplazma - citoplazma kapcsolat, az ekkor jelentkező kompatibilitási folyamat esetében is a paraszexuális hibridizációtól alapvetően eltérő körülményekkel állunk szemben.

A kísérleteinkből levont következtetéssel azonos eredményre jutottak CONSTABEL és munkatársai /1976/ szója szuszpenzió és borsó fajták, dohány fajok /*Nicotiana glauca*, *N. langsdorffii*, *N. tabacum*, *N. rustica*/ és *Colchicum autumnale* levél protoplasztok fuziójából kapott sejtek osztódását vizsgálva. Ugyanakkor BINDING /1976/ Solanaceae családba tartozó fajok, dohány és petunia levél + paradicsom érett bogyó protoplasztok fuziója esetében sejtosztódást csak a sejtmagot nem tartalmazó, kisebb méretű protoplasztoknál tapasztalt. Ezt úgy értelmezte, hogy a sejtmagot tartalmazó nagyobb méretű paradicsom protoplasztok esetében a sejtosztódás elmaradása a fajok közt fennálló inkompatibilitás következménye.

BINDING következtetését értékelve szükségesnek tartjuk megemlíteni, hogy a kisméretű, magot nem tartalmazó paradicsom protoplasztok fúziójából eredő sejtek osztódására vonatkozó adatokat nem közöl, mellyel állítását alátámasztaná. Azt sem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy az általa használt fúziós kombináció a paradicsom partnerben korábban szintetizálódott vegyületek /gátló anyagok, zárványok, stb./ gátolhatják a sejtek osztódását a paradicsom sejtmagot tartalmazó sejtekben. Nyilvánvaló, hogy a sejtmagot tartalmazó nagyméretű paradicsom protoplasztokból több gátló anyag juthat a fúziós produktumokba. Valószínűsíti a BINDING által közölt eredmények ily módon való értelmezését az a tény, hogy - mint azt az albinó sárgarépa + levél protoplaszt fúzióból eredő sejtek osztódásakor tapasztaltuk - a protoplaszt fúziót követően a két citoplazma között aktív, funkcionális kapcsolat alakul ki, amely esetünkben pozitív, az albinó mutáns deficienciájának komplementációjában nyilvánult meg, a BINDING által vizsgált kombinációban viszont negatív lehetett.

A 3. ábrán feltüntetett fajok fúziójából eredő sejtek egy részében a kloroplasztok még 10-12 nap után is felismerhetők, s így a többszöri osztódások is nyo-

mon követhetők. Mivel valamennyi kombinációban megfigyelhetünk fuzióból eredő 4-10 sejtből álló sejtcsoportokat, ezek megjelenése további, a fuzió utáni kompatibilitást alátámasztó bizonyítékot ad.

Az általunk vizsgált kísérleti rendszer - figyelembe véve a sárgarépa spontán embriogenetikus képességét - elvileg magában rejti annak lehetőségét is, hogy a fuzionált sejtek az embriogenetikus folyamat során növényné fejlődjenek, miközben a mutáns répa albinizmusát okozó hibát a partner kijavítja, s így zöld színű szomatikus hibrid növényekhez juthatnánk. Az A_1 és *Daucus capillifolius* szuszpenzió protoplasztok fuziójából nevelt zöld növények vizsgálata igazolta a szelekciós elv helyességét /DUDITS és mtsai, 1977a/. Ugyanakkor a többi fuziós kombinációban zöld növényt nem kaptunk, bár több ezer embrió és növény képződött.

Albinó vagy klorofill deficiens mutánsok komplementációs elven alapuló szelekciós alkalmazása Solanaceae családba tartozó szexuálisan kompatibilis fajok esetében is sikeresen valósult meg /MELCHERS és LABIB, 1974; GLEBA és mtsai, 1975; COCKING és mtsai, 1977; SCHIEDER, 1977/. Ugyanakkor *Datura innoxia* + *Petunia hybrida* és *Nicotiana sylvestris* klorofill deficiens mutáns protoplasztok fuziója komplementációt mutató paraszexuális hibridet nem eredményezett / SCHIEDER,

1977/. SCHIEDER három feltételezhető okot jelöl meg magyarázatként: a/ a hibrid sejtekben nem szintetizálódhat klorofill, mert azok képtelenek egymást komplementálni; b/ a sejtosztódások során egy vagy több kromoszóma elvész; c/ a partnerek protoplasztjai között inkompatibilitás van, melynek következtében a fúziós termékek elpusztulnak.

Az itt felsorolt lehetőségek bármelyike fennállhat az általunk vizsgált fúziós rendszerben, és a szomatikus hibridek kialakulása szempontjából inkompatibilitási tényezőként szerepelhet. A fúziós termékek kromoszóma vesztését több szerző megfigyelte /MELCHERS és LABIB, 1974; SMITH és mtsai, 1976; KAO, 1977/. Amennyiben a partnerben hiányzó funkciókat kijavító géneket hordozó kromoszómák eliminálódnak, a komplementáció nem valósulhat meg. Viszont a kromoszóma vesztés lehetősége még a szexuálisan kompatibilis fajok szomatikus hibridizációja esetében is fennáll /MELCHERS és LABIB, 1974; SMITH és mtsai, 1976; DUDITS és mtsai, 1977a/, a szexuálisan nem keresztezhető fajok esetében pedig sokkal nagyobb gyakorisággal következik be /POWER és mtsai, 1975; KAO, 1977/, s lehetséges, hogy a protoplasztból a differenciáltabb állapot felé haladva az inkompatibilitási folyamat egyik megnyilvánulása.

A kompatibilitás, illetve inkompatibilitás fogalmát a sejtek szomatikus hibridizációjának lépéseire kiterjesztve különbségeket figyelhetünk meg a folyamat érvényesülésében a szervezettség különböző - protoplasztból regenerált sejt, kallusz, növény - szintjén. *Datura innoxia* klorofill deficiens mutánsai fuziójából eredő 33 zöld színű hibrid kallusz képződött, de csak 20 kalluszból lehetett növényt regenerálni /SCHIEDER, 1977/. Fényérzékeny klorofill deficiens dohány mutánsok fuziójából fejlődő hibridek szomatikus kromoszóma számában jelentős variációt tapasztaltak. A diploid és tetraploid növényeken kívül aneuploidokat is megfigyeltek /MELCHERS és LABIB, 1974/. *Nicotiana glauca* és *N. langsdorffii* szomatikus hibridizációja után a szelekciós folyamat során fejlődési rendellenességeket tapasztaltak, míg a felnevelt növények, valamint a belőlük szexuális keresztezéssel nyert utódok kromoszóma száma is változó volt /SMITH és mtsai, 1976/.

A kompatibilitás, illetve inkompatibilitás fogalmát a protoplaszt fuzióból eredő paraszexuális hibridek fejlődésének folyamatára kiterjesztve megállapítható, hogy az a szervezettség különböző szintjein érvényesülhet. Kísérleti eredményeink azt mutatják, hogy a proto-

plaszt fuzióból regenerált sejtek fejlődésének korai stádiumában az inkompatibilitás még nem érvényesül. Mivel esetünkben a szomatikus kompatibilitást a protoplaszt fuzióból eredő sejtek szintjén figyeltük meg, célszerűnek tartjuk a jelenség megjelölésére a celluláris kompatibilitás fogalmának bevezetését /DUDITS és mtsai, 1977b/.

4. Albinó mutáns és vadtipusu sárgarépa sejtek vizsgálata

A sárgarépa A_1 albinó mutáns szuszpenzió protoplasztokat különböző fajok levél protoplasztjaival fuzionálva azt tapasztaltuk, hogy a fuzióból eredő sejtek osztódási gyakorisága mindig magasabb volt az A_1 sejtekénél és így az F/A_1 arány egynél magasabb értéket adott. A VII. táblázatban összefoglalt adatok szerint ez az érték, 3,0 és 3,6 között változott.

Az irodalomból ismert, hogy a szója szuszpenzió + levél protoplaszt fuzióból eredő sejtek osztódási gyakorisága alacsonyabb, mint a szója sejteké /KAO és MICHAYLUK, 1974; KAO és mtsai, 1974; CONSTABEL és mtsai, 1976/. Szója + rozs fuzionált sejtek osztódási gyakoriságát vizsgálva hasonló eredményt kaptunk /V.

táblázat/. A vadtipusu répa protoplaszt + levél protoplaszt fuzióból regenerált sejtek esetében is azt tapasztaltuk, hogy a répa sejtek osztódási gyakorisága magasabb, mint a fuzionált sejteké. Tehát $F/V < 1$ /0,5 - 0,8/.

Ugyanakkor az A_1 és V sejt vonalak között nemcsak a fuzionált, de a répa sejtek osztódásában is különbséget figyeltünk meg. Az A_1 sejtek osztódási gyakorisága 2-7 %, a V sejteké 8-22 % volt a tenyésztés első 6 napjában.

A sárgarépa A_1 albinó mutáns esetében tapasztalt jelenségek okának felderítése céljából végzett kísérletek elkezdésekor feltételeztük, hogy a fuzionált sejtek magasabb osztódása, illetve az A_1 V-hez viszonyított alacsony osztódási gyakoriságának oka vagy az A_1 valamilyen deficienciájában, vagy a tápfolyadék valamely komponense által kiváltott gátlásban keresendő.

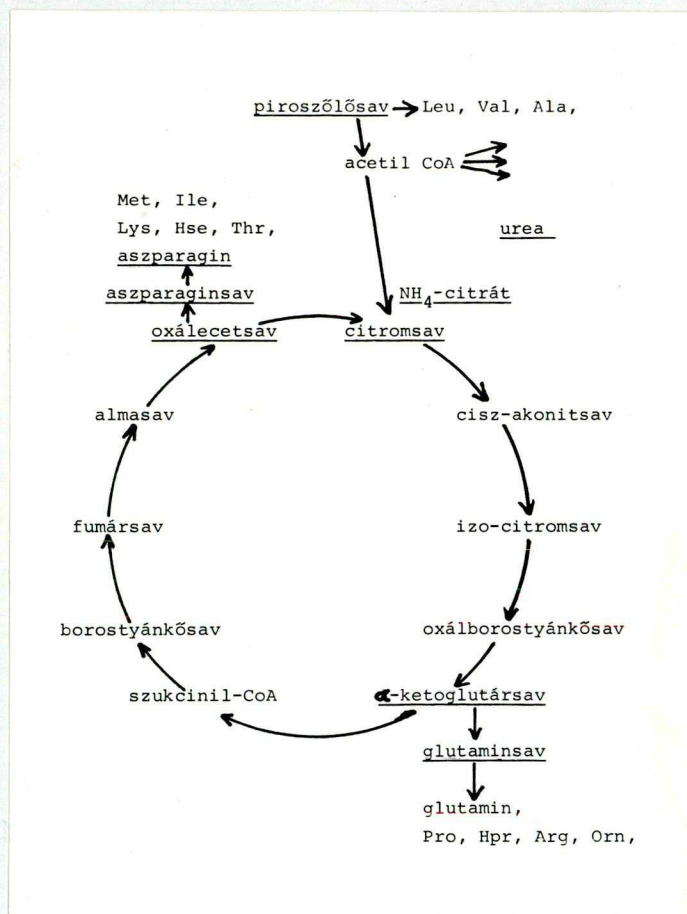
Az Irodalmi Áttekintés c. fejezetben már kitértünk arra, hogy a szomatikus sejtekből izolált protoplasztok fuzióját követően a fuzióból eredő sejtek, szövetek vagy növények szelektálásának praktikus módja lenne, ha az elkülönítés az egyik partnerben meglévő auxotrófia másik partner által történő kijavításán alapulhatna.

Említettük azt is, hogy az auxotróf mutánsokat olyan fajok - Arabidopsis, árpa, kukorica - esetében irták le, melyeknél a protoplaszt - növény rendszer még nem valósult meg. Éppen ezért a szomatikus hibridek szelekciója szempontjából különös jelentőségű lenne, ha a sárgarépa A_1 albinó mutánsnál megfigyelt jelenségek háttérében egy jól definiálható auxotrófia állna.

Az A_1 és V sejtvonalak protoplasztjaiból regenerált sejtek tápanyag igényének összehasonlító vizsgálata során bebizonyosodott, hogy az A_1 sejtek alacsonyabb osztódási gyakorisága nincs összefüggésben a mutáns vitamin anyagcseréjével /4.a ábra/, valamint a tápfolyadék glükóz /4.b ábra/ és anorganikus komponensei /VIII. táblázat/ által okozott gátlásnak sem tulajdonítható.

Az organikus komponensek irányába folytatva kísérleteinket azt tapasztaltuk, hogy bizonyos vegyületek az A_1 sejtek magasabb osztódási gyakoriságát eredményezik, míg a V sejtek osztódását nem befolyásolják, vagy gátolják. A kísérletekben vizsgált pozitív hatást eredményező vegyületek - az urea kivételével - kapcsolatba hozhatók a citrát-ciklussal, mivel vagy az anyagcsere citrát-ciklust megelőző terméke /piroszőlősav/, vagy a ciklusban résztvevő vegyület /citromsav, α -ketoglutar-

sav, oxálecetsav/, vagy szintézisük a ciklusból indul ki /aszparaginsav, aszparagin, glutaminsav/. A vizsgált vegyületek kapcsolatát a citrát-ciklussal a 8. ábrán foglaltuk össze. A kísérletekben megvizsgált vegyületeket aláhúztuk. Megállapítható, hogy ezek közül valamennyi vegyület növelte az A₁ sejtek osztódási gyakoriságát.



8. ábra: Sárgarépa A₁ albinó mutáns sejtek osztódási gyakoriságát növelő szerves savak és aminosavak /aláhuzva/, valamint azok anyagcsere összefüggései.



A 8. ábrán feltüntetett összefüggéseket figyelembe véve magyarázható az A_1 sejteknél tapasztalható osztódás stagnálása a 2. nap után /6. ábra/, piroszőlőssav és α -ketoglutársav esetében, amely e vegyületek gyors mobilizációjával értelmezhető.

A rendelkezésre álló adatok alapján nem sikerült egyértelműen eldönteni, hogy az anyagcsere folyamat mely pontján van az A_1 mutáns hibája. Mivel a piroszőlőssavtól kiinduló és citrát-ciklussal kapcsolatos vegyületekkel az osztódási gyakoriság növekedését tudtuk elérni, egyik feltevés lehet, hogy a piroszőlőssavat megelőző lépések valamelyikében, tehát a glikolizis, vagy pentózfoszfát-ciklus folyamatában kereshető a hiba.

A sterilen nevelt albinó növények levelének elektronmikroszkópos vizsgálata azt mutatta, hogy a mutánsban nem található meg a vadtipusu sárgarépa levél kloroplasztra jellemző struktúra /HADLACZKY, nem közölt/. Ennek alapján a deficiencia lehetséges magyarázata lehet a kloroplaszt struktúrához kötött enzimek hiánya, vagy enzim-aktivitás csökkenés. Az a tény, hogy az urea, amely a tápfolyadékban redukált nitrogénforrásként szerepelhet, egymagában is képes növelni az A_1 sejtek osztódását, arra enged következtetni, hogy esetleg a szénhidrát anyagcsere és nitrát redukció folyamatában

feltételezett összefüggés /SARKISSIAN és FOWLER, 1974/, vagy annak szabályozása a vadtipusétól eltérő módon valósul meg a mutánsban.

A_1 szuszpenzió és árpa fuzionált, valamint A_1 sejtek osztódási gyakoriságát minimál és komplett tápfolyadékban vizsgálva az is bebizonyosodott, hogy egy adott fuzió kombináció esetében a tápfolyadék összetételének alkalmas megválasztásával a fuzionált sejtek magasabb osztódási gyakorisága érhető el, amely az osztódó fuzionált sejtek dusulását eredményezi a tenyészetben /7. ábra/.

Az A_1 + levél fuzionált sejtek A_1 -hez viszonyított magasabb osztódási gyakorisága úgy értelmezhető, mint a komplementáció megnyilvánulása. Ez esetben komplementáción nem a klasszikus genetikai fogalmat /RIEGER és mtsai, 1976/, hanem a fuzionált sejtek protoplazmáinak speciális kölcsönhatását értjük. Az ismert, hogy szuszpenzió és levél protoplasztok fuziójából eredő sejtekben az önmagában osztódásra képtelen levél partner mitózisba lép /KAO és mtsai, 1974; CONSTABEL és mtsai, 1975; DUDITS és mtsai, 1976a/. Az A_1 + levél fuzionált sejtek osztódásának vizsgálata során kapott eredmények azt igazolják, hogy nemcsak a szuszpenzió partner hat a levél partnerre annak mitotikus aktivitását indukálva,

hanem a levél partner is aktivan részt vesz a fuzionált sejt fejlődési folyamatában. Kísérleteinkben ennek konkrét megnyilvánulása az albinó mutáns anyagcsere hibájának valamilyen formában történő kijavitása. Tehát esetünkben komplementáción a partnerekben eredetileg hiányzó, vagy csökkent mértékben jelentkező aktivitásnak a fuzionált sejtben történő megjelenését, illetve kijavitását értjük.

Összegezve a sárgarépa A_1 albinó mutáns vizsgálatával kapcsolatos kísérleteink eredményeit, megállapítható, hogy a mutáns anyagcsere deficienciájának pontos okát nem sikerült felderíteni. A rendelkezésre álló adatok alapján feltételezhető, hogy a tapasztalt alacsony osztódási gyakoriság a szénhidrát anyagcserében bekövetkezett hibával hozható összefüggésbe. Munkánk során azt is kimutattuk, hogy a megfelelő tenyésztési körülmények között az A_1 mutáns deficienciájára alapozva az osztódó fuzionált sejtek dusulása érhető el a tenyészetekben.

VI.

Ö S S Z E F O G L A L Á S

A sárgarépa sejtszuszpénzióból izolált protoplasztok tenyésztésével, a szuszpenzió és levél eredetű protoplasztok fuziós gyakoriságának növelésével, a protoplaszt fuzióból eredő sejtek fejlődésének, valamint a sárgarépa vadtipusu és A_1 albinó mutáns protoplaszt tenyészetek vizsgálatával kapcsolatos kísérletek eredményei az alábbiakban foglalhatók össze:

1. Munkánk során rutinszerűen végeztük a sárgarépa sejtszuszpénzióból izolált protoplasztok tenyésztését és regenerálását növényre.
2. a/ Sejtszuszpénzió és levél eredetű protoplasztok polietilén-glikollal /PEG/ indukált heteroplazmikus fuziója 2-6-szorosára nőtt dimetil-szulfoxid jelenlétében.
b/ Citológiai vizsgálattal igazoltuk, hogy a PEG-gel indukált fuzió esetén a DMSO jelenlétében nő a heterokarionok gyakorisága.
c/ A kombinált PEG - DMSO kezelés fuziót indukáló hatása nagymértékben függ a levél partner stabilitásától. A rutinszerű fuziós kísérletek céljára a PEG + 10 % DMSO alkalmasnak bizonyult.

- d/ A kombinált PEG- DMSO kezelésnek a protoplasztból regenerált, fuzionált és nem-fuzionált sejtek továbbtenyészthetőségére nem volt hatása.
3. A kompatibilitás ill. inkompatibilitás fogalmát a protoplaszt fuziót követő fejlődési folyamatokra kiterjesztve megállapítható, hogy a sárgarépa szuszpenzió és különböző fajok levél protoplasztjainak fuziójából képződött sejtek a levél partner rendszer-tani helyétől függetlenül osztódtak, tehát a fejlődés korai stádiumában a vizsgált fajok esetében inkompatibilitás nem tapasztalható.
4. A sárgarépa A_1 albinó mutáns protoplasztból regenerált sejtek vadtipushoz viszonyított alacsony osztódási gyakoriságát figyeltük meg a tenyészetekben.
- a/ Az A_1 sejtek alacsony osztódási gyakorisága nem a tápfolyadékban levő glükóz és anorganikus komponensek által okozott gátlás.
- b/ A vitaminok hiánya sem oka az észlelt jelenségnek.
- c/ Az A_1 sejtek magasabb osztódási gyakorisága urea, piroszőlősav, a citrát-ciklusban résztvevő és azokból szintetizálódó vegyületek jelenlétében tapasztalható.

- d/ Az A_1 protoplasztokból regenerált sejtek alacsony osztódási képességét a levél partner komplementálni képes. Ennek eredményeként a heteroplazmikus sejtek magasabb osztódási gyakoriságot mutatnak, mint a nem-fuzionált sejtek.
- e/ A protoplaszt tenyésztő tápfolyadék összetételének változtatásával az A_1 + levél protoplaszt fúzióból eredő osztódó sejtek dusulása érhető el a tenyészetekben.

VII.

I R O D A L O M J E G Y Z É K

- AHKONG, Q.F., HOWELL, J.L., LUCY, J.A., SAFWAT, F.,
DAVEY, M.R., COCKING, E.C., 1975: Fusion of hen
erythrocytes with yeast protoplasts induced by
polyethylene glycol. *Nature*, 255, 66-67.
- ARNOLD, VON, S., ERIKSSON, T., 1976: Factors influencing
the growth and division of pea mesophyll protoplasts.
Physiol. Plant. 36, 193-196.
- AVIV, D., GALUN, E., 1977: An attempt at isolation of
nutritional mutants from cultured tobacco proto-
plasts. *Plant Sci. Lett.* 8, 299-304.
- BINDING, H., BINDING, K., STRAUB, J., 1970: Selection
in Gewebekulturen mit haploid Zellen.
Naturwissenschaften 57, 138-139.
- BINDING, H., NEHLS, R., 1977: Regeneration of isolated
protoplasts to plant in *Solanum dulcamara* L.,
Z. Pflanzenphysiol. 85, 279-280.
- BINDING, H., 1974: Fusionversuche mit isolierten proto-
plasten von *Petunia hybrida* L. *Z. Pflanzenphysiol.*
72, 422-426.
- BINDING, H., 1976: Somatic hybridisation experiments in
solanaceous species. *Molec. gen. Genet.* 144, 171-175.
- BRIGHT, S.W.J., NORTHCOTE, D.H., 1974: Protoplast re-
generation from normal and bromodeoxyuridine-re-
sistant sycamore cells. *J. Cell Sci.* 16, 445-463.

- BRIGHT, S.W.J., NORTHCOTE, D.H., 1975: A deficiency of hypoxanthine phosphoribosyltransferase in sycamore callus resistant to azaguanine. *Planta* 123, 79-89.
- BUI-DANG-HA, D., MACKENZIE, I.A., 1973: The division of protoplasts from *Asparagus officinalis* L. and their growth and redifferentiation. *Protoplasma* 78, 215-221.
- BUTENKO, V.A., KUCHKO, A.A., VITENKO, V.A., 1977: Isolation, culture and plant regeneration studies on protoplasts from two potato species. In: Abst. International Conference on Regulation of Developmental Processes in Plants. Halle /Saale/, 111.
- CARLSON, P.S., 1970: Induction and isolation of auxotrophic mutants in somatic cell cultures of *Nicotiana tabacum*. *Science* 168, 487-489.
- CARLSON, P.S., SMITH, H.H., DEARING, R.D., 1972: Parasexual interspecific hybridization. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69, 2292-2294.
- COCKING, E.C., 1960: A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature* 187, 962-963.
- COCKING, E.C., 1971: Fusion of isolated protoplasts: a first step towards the somatic hybridisation of plants. *Coll. Int. CNRS*, 193, 303-317.
- COCKING, E.C., 1973: Isolation, fusion and development of protoplasts of higher plants. In: *Yeast, Mould and Plant Protoplasts*. ed. J.R. Villanueva, I. Garcia-Acha, S. Gascon, F., URUBURU, Acad. Press, London, New York, 309-317.
- COCKING, E.C., POWER, J.B., EVANS, P.K., SAFWAT, F., FREARSON, E.M., HAYWARD, C., BERRY, S.F., GEORGE, D., 1974: Naturally occurring differential drug sensitivities of cultured protoplasts. *Plant Sci. Lett.* 3, 341-350.

- COCKING, E.C., GEORGE, D., PRICE-JONES, M.J., POWER, J.B., 1977: Selection procedures for the production of inter-species somatic hybrids of *Petunia hybrida* and *Petunia parodii* II. Albino complementation selection. *Plant Sci. Lett.* 10, 7-12.
- CONSTABEL, F., KIRKPATRICK, J.W., GAMBORG, O.L., 1973: Callus formation mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*. *Can. J. Bot.* 51, 2105-2106.
- CONSTABEL, F., KAO, K.N., 1974: Agglutination and fusion of plant protoplasts by polyethylene glycol. *Can. J. Bot.* 52, 1603-1606.
- CONSTABEL, F., DUDITS, D., GAMBORG, O.L., KAO, K.N., 1975a: Nuclear fusion in intergeneric heterokaryons. A note. *Can. J. Bot.* 53, 2092-2095.
- CONSTABEL, F., KIRKPATRICK, J.W., KAO, K.N., KARTHA, K.K., 1975b: The effect of canavanine on the growth of cells from suspension cultures and on intergeneric heterokaryocytes of canavanine sensitive and tolerant plants. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 168, 319-325.
- CONSTABEL, F., WEBER, G., KIRKPATRICK, J.W., PAHL, K., 1976: Cell division of intergeneric protoplast fusion products. *Z. Pflanzenphysiol.* 79, 1-7.
- DUDITS, D., 1976: The effect of selective conditions on the products of plant protoplast fusion. In: *Cell Genetics in Higher Plants, Proc.Int. Training Course, Szeged, Hungary*, ed. D. Dudits, G.L. Farkas, P. Maliga, Budapest, Akadémiai Kiadó, 153-162.
- DUDITS, D., NÉMET, G., 1976: Methods of somatic plant genetics in cereal research In: *Semaine d'Etude Cerealiculture*, ed. P. Martens, Gembloux, 127-139.



- DUDITS, D., KAO, K.N., CONSTABEL, F., GAMBORG, O.L.,
1976a: Fusion of carrot and barley protoplasts and
division of heterokaryocytes. Can. J. Genet. Cytol.
18, 263-269.
- DUDITS, D., KAO, K.N., CONSTABEL, F., GAMBORG, O.L.,
1976b: Embryogenesis and formation of tetraploid
and hexaploid plants from carrot protoplasts. Can.
J. Bot. 54, 1063-1067.
- DUDITS, D., RASKO, I., HADLACZKY, Gy., LIMA-DE-FARIA, A.,
1976c: Fusion of human cells with carrot protoplasts
induced by polyethylene glycol. Hereditas 82,
121-124.
- DUDITS, D., HADLACZKY, Gy., LÉVI, E., FEJÉR, O., HAYDU,
Zs., LÁZÁR, G., 1977a: Somatic hybridisation of
Daucus carota and *D. capillifolius* by protoplast
fusion. Theor. Appl. Genet. 51, 127-132.
- DUDITS, D., LÁZÁR, G., HAYDU, Zs., 1977b: Studies on the
somatic compatibility after the fusion of plant pro-
toplasts. Ergebnisse der experimentellen Medizin
/Berlin/, /in the press/.
- DORION, N., CHUPEAU, Y., BOURGIN, U.P., 1975: Isolation
culture and regeneration into plants of *Ranunculus*
sceleratus L. leaf protoplasts. Plant Sci. Lett. 5,
325-331.
- DURAND, J., POTRYKUS, I., DONN, G., 1973: Plantes issues
de protoplastes de pétunia. Z. Pflanzenphysiol. 69,
26-34.

- ERIKSSON, T., 1971: Isolation and fusion of plant protoplasts. Coll. Int. CNRS, 193, 297-302.
- ERIKSSON, T., JONASSON, K., 1969: Nuclear division in isolated protoplasts from cells of higher plants grown in vitro. Planta, 89, 85-89.
- FERENCZY, L., KEVEI, F., SZEGEDI, M., 1975: High-frequency fusion of fungal protoplasts. Experientia 31, 1028-1030.
- FODOR, K., ALFÖLDI, L., 1976: Fusion of protoplasts of *Bacillus megaterium*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 2147-2150.
- FRANKEL, R., GALUN, E., 1977: Polination mechanisms, reproduction and plant breeding, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg New York, 163-196.
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., OJIMA, K., 1968: Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. Exp. Cell Res. 50, 151-158.
- GAMBORG, O.L., 1976: Plant Protoplast isolation, culture, and fusion. In: Cell Genetics in Higher Plants. Proc. Int. Training Course, Szeged, Hungary, ed. D. Dudits, G.L. Farkas, P. Maliga, Budapest, Akadémiai Kiadó, 106-127.
- GAVAZZI, G., NAVA-RACCHI, M., TONELLI, C., 1975: A mutation causing proline requirement in *Zea mays*. Theor. Appl. Genet. 46, 339-345.
- GILES, K.L., 1974: Complementation by protoplast fusion using mutant strains of maize. Plant Cell Physiol. 15, 281-285.
- GLEBA, Y.Y., BUTENKO, G.R., SYTNIK, K.M., 1975: Protoplast fusion and parasexual hybridization in *Nicotiana tabacum* L. In: Abstr. XII. Int. Bot. Cong. Leningrad, 290.

- GLIMELIUS, K., WALLIN, A., ERIKSSON, T., 1974: Agglutinating effects of Concanavalin A on isolated protoplasts of *Daucus carota*. *Physiol. Plant.* 31, 225-230.
- GOSCH, G., BAJAJ, Y.P.S., REINERT, J., 1975: Isolation, culture, and induction of embryogenesis in protoplasts from cell-suspension of *Atropa belladonna*. *Protoplasma* 86, 405-410.
- GRAMBOW, H.J., KAO, K.N., MILLER, R.A., GAMBORG, O.L., 1972: Cell division and plant development from protoplasts of carrot cell suspension cultures. *Planta* 103, 348-355.
- GUHA, S., MAHESHWARI, S.C., 1964: In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204, 497.
- HARTMANN, J.X., KAO, K.N., GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., 1973: Immunological methods for the agglutination of protoplasts from cell suspension cultures of different genera. *Planta* 112, 45-56.
- HAYWARD, C., POWER, J.B., 1975: Plant production from leaf protoplasts of *Petunia parodii*. *Plant Sci. Lett.* 4, 407-410.
- KAMEYA, T., UCHIMIYA, H., 1972: Embryoids derived from isolated protoplasts of carrot. *Planta* 103, 356-360.
- KAMEYA, T., TAKAHASHI, N., 1972: The effects of inorganic salts on fusion of protoplasts from roots and leaves of *Brassica* species. *Japan. J. Genet.* 47, 215-217.
- KAMEYA, T., 1973: The effects of gelatin on aggregation of protoplasts from higher plants. *Planta* 115, 77-82.

- KAO, K.N., KELLER, W.A., MILLER, R.A., 1970: Cell division in newly formed cells from protoplasts of soybean. *Exp. Cell Res.* 62, 338-340.
- KAO, K.N., GAMBORG, O.L., MILLER, W.A., 1971: Cell divisions in cells regenerated from protoplasts of soybean and *Haplopappus gracilis*. *Nature New Biol.* 232, 124.
- KAO, K.N., CONSTABEL, F., MICHAYLUK, M.R., GAMBORG, O.L. 1974: Plant protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cells. *Planta* 120, 215-227.
- KAO, K.N., MICHAYLUK, M.R., 1974: A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta* 115, 355-367.
- KAO, K.N., 1975a: A method for fusion of plant protoplasts with polyethylene glycol. In: *Plant Tissue Culture Methods*, ed. O.L. Gamborg, L.R. Wetter, National Res. Council of Canada, Prairie Regional Laboratory, Saskatoon, 22-27.
- KAO, K.N., 1975b: A nuclear staining method for plant protoplasts. In: *Plant Tissue Culture Methods*. ed. O.L. Gamborg, I.R. Wetter, National Res. Council of Canada, Prairie Regional Laboratory, Saskatoon. 60-62.
- KAO, K.N., 1977: Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soybean - *Nicotiana glauca*. *Molec. gen. Genet.* 150, 225-230.
- KARTHA, K.K., GAMBORG, O.L. CONSTABEL, F., KAO, K.N., 1974a: Fusion of rapeseed and soybean protoplasts and subsequent division of heterokaryocytes. *C.J.Bot.* 52, 2435-2436.

- KARTHA, K.K., MICHAYLUK, M.R., KAO, K.N., GAMBORG, O.L., CONSTABEL, F., 1974b: Callus formation and plant regeneration from mesophyll protoplasts of rape plants /*Brassica napus* L. cv. Zephyr/. Plant Sci. Lett. 3, 256-271.
- KELLER, W.A., HARVEY, B., GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., EVELEIGH, D.E., 1970: Protoplast fusion for use in somatic cell hybridization. Nature, 226, 280-282.
- KELLER, W.A., HARVEY, B.L., KAO, K.N., MILLER, R.A., GAMBORG, O.L., 1973: Determination of the frequency of interspecific protoplast fusion by differential staining. Colloq. Int. CNRS. 212, 455-463.
- KELLER, W.A., MELRCHERS, G., 1973: The effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion. Z. Naturforschung 28c, 737-741.
- KOBLITZ, H., 1976: Isolierung und Kultivierung von Protoplasten aus Calluskulturen de Gerste. Biochem. Physiol. Pflanzen. 170, 287-293.
- LANGRIDGE, J., 1955: Biochemical mutations in the crucifer *Arabidopsis thaliana* /L./ Heynh. Nature 176, 260-261.
- LANGARIDGE, J., BROCK, R.O., 1961: A thiamin-requiring mutant of the tomato. Austr. J. Biol. Sci. 14, 66-69.
- LESCURE, A.M., 1973: Selection of markers of resistance to base-analogues in somatic cell cultures of *Nicotiana tabacum*. Plant Sci. Lett. 1, 375-383.
- LITTLEFIELD, J.W., 1964: Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. Science 145, 709-710.
- MALIGA, P., MÁRTON, L., BREZNOVITS, A.Sz. 1973a: 5-Bromo-deoxyuridine-resistant cell lines from haploid tobacco. Plant Sci. Lett. 1, 119-121.

- MALIGA, P., SZ.-BREZNOVITS, A., MÁRTON, L., 1973b:
Streptomycin-resistant plants from callus culture
of haploid tobacco. *Nature New Biology* 244, 29-30.
- MALIGA, P., LÁZÁR, G., JOÓ, F., H.-NAGY, A., MENCZEL, L.
1977: Restoration of morphogenetic potential in
Nicotiana by somatic hybridisation. *Molec. gen.
Genet.* 157, 291-296.
- MELCHERS, G., LABIB, G., 1974: Somatic hybridisation of
plants by fusion of protoplasts I. Selection of
light resistant hybrids of "haploid" light sensitive
varieties of tobacco. *Molec. gen. Genet.* 135, 277-294.
- MILLER, R.A., GAMBORG, O.L., KELLER, W.A., KAO, K.N.,
1971: Fusion and division of nuclei in multinucleated
soybean protoplasts. *Can. J. Genet. Cytol.* 13,
347-353.
- MURASHIGE, T., 1974: Plant propagation through tissue
cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25, 135-166.
- NAGATA, T., TAKEBE, I., 1970: Cell wall regeneration
and cell division in isolated tobacco mesophyll
protoplasts. *Planta* 92, 301-308.
- NAGATA, T., TAKEBE, I., 1971: Plating of isolated tobacco
mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta*
99, 12-20.
- NAGY, J.I., MALIGA, P., 1976: Callus induction and plant
regeneration from mesophyll protoplasts of *Nicotiana
sylvestris*. *Z. Pflanzenphysiol.* 78, 453-455.
- NARAYAMASWAMAY, S., 1977: Regeneration of Plant from tissue
cultures. In: *Applied and Fundamental Aspects of
Plant Cell Tissue, and Organ Culture*, ed. J. Reinert,
A.P.S. Bajaj, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg,
New York, 179-206.

- NETTANCOURT DE N., 1977: Incompatibility in Angiosperms. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- NICKELL, L.G., TORREY, J.G., 1969: Crop improvement through plant cell and tissue culture. Science 166, 1068-1070.
- NORWOOD, T.H., ZIEGLER, C.J., MARTIN, G.M., 1976: Dimethyl sulfoxide enhances polyethylene glycol-mediated somatic cell fusion. Somat. Cell Genet. 2, 263-270.
- OHYAMA, K., NITSCH, J.P., 1972: Flowering haploid plants obtained from protoplasts of tobacco leaves. Plant Cell Physiol. 13, 229-236.
- PINTO DA SILVA, P.G., 1969: Isolation of protoplasts from higher plant cells. Naturwissenschaften, 56, 41.
- POJNAR, E., WILLISON, J.H.M., COCKING, E.C., 1976: Cell-wall regeneration by isolated tomato-fruit protoplasts. Protoplasma 64, 460-480.
- PONTECORVO, G., 1975: Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment. Somat. Cell Genet. 1, 397-400.
- PORPÁČZY, A., /szerk./ 1964: A korszerű gyümölcstermesztés elméleti kérdései. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 297-300.
- POTRYKUS, I., 1971: Intra and interspecific fusion of protoplasts from petals of *Torenia baillonii* and *Torenia fournieri*. Nature New Biology, 231. 57-58.
- POTRYKUS, I., 1973a: Fusion of differentiated protoplasts. Phytomorphology, 22, 91-96.

- POTRYKUS, I., 1973b: Isolation, fusion and culture of protoplasts of petunia. In: Yeast, Mould, and Plant protoplasts, ed. J.R. Villanueva, I. Garcia-Acha, S. Gascén, F. Uruburu, Acad. Press, London, New York. 319-330.
- POTRYKUS, I., HARMS, C.T., LÖRZ, H., THOMAS, E., 1977: Callus formation from stem protoplasts of corn /Zea mays L./. Molec. gen. Genet. 156, 347-350.
- POWER, J.B., COCKING, E.C., 1969: A simple method for the isolation of very large numbers of leaf protoplasts by using mixtures of cellulase and pectinase. Biochem. J., 110, 33p.
- POWER, J.B., CUMMINS, S.E., COCKING, E.C., 1970: Fusion of isolated protoplasts. Nature, 225, 1016-1018.
- POWER, J.B., FREARSON, E.M., COCKING, E.C., 1971: The preparation and culture of spontaneously fused tobacco leaf spongy-mesophyll protoplasts. Biochem. J. 123, 29-30.
- POWER, J.B., FREARSON, E.M., HAYWARD, C., COCKING, E.C., 1975: Some consequence of the fusion and selective culture of Petunia and Parthenocissus protoplasts. Plant Sci. Lett. 5, 197-207.
- POWER, J.B., FREARSON, E.M., HAYWARD, C., GEORGE, D., EVANS, P.K., BERRY, S.F., COCKING, E.C., 1976: Somatic hybridisation of Petunia hybrida and P. parodii. Nature, 500-502, 263.
- POWER, J.B., BERRY, S.F., FREARSON, E.M., COCKING, E.C., 1977: Selection procedures for the production of inter-species somatic hybrids of Petunia hybrida and P. parodii I. Nutrient media and drug sensitivity complementation selection. Plant Sci. Lett. 10, 1-6.

- RÉDEI, G.P., 1965: Genetic blocks in the thiamine synthesis of the angiosperm *Arabidopsis*. *Am. J. Bot.* 52, 834-841.
- RIEGER, R., MICHAELIS, A., GREEN, M.M., 1976: Glossary of genetics and cytogenetics. VEB Gustave Fischer Verlag, Jena, 116.
- RUESNIK, A.W., THIMANN, K.V., 1966: Protoplasts: preparation from higher plants. *Science* 154, 280-281.
- RUESINK, A.W., 1971: The plasma membrane of *Avena* coleoptile protoplasts. *Plant Physiol.* 47, 192-195.
- SARKISSIAN, G.S., FOWLER, M.W., 1974: Interrelationship between nitrate assimilation and carbohydrate metabolism in plant roots. *Planta* 119, 335-349.
- SCHAEFFER, P., CAMI, B., HOTCHKISS, R.D., 1976: Fusion of bacterial protoplasts. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 73, 2151-2155.
- SCHENK, R.E., HILDEBRANDT, A.C., 1968: Somatic hybridisation: a new approach to genetic change. *Am. J. Bot.* 55, 731.
- SCHIEDER, O., 1974: Selection einer somatischen Hybride nach Fusion von Protoplasten auxotropher Mutanten von *Sphaerocarpos donellii* Aust. *Z. Pflanzenphysiol.* 74, 357-365.
- SCHIEDER, O., 1975: Regeneration von haploiden und diploiden *Datura innoxia* Mill. Mesophyll-Protoplasten zu Pflanzen. *Z. Pflanzenphysiol.* 76, 462-466.
- SCHIEDER, O., 1977: Hybridisation experiments with protoplasts from chlorophyll-deficient mutants of some Solanaceous species. *Planta* 137, 253-257.

- SCHIEDER, O., 1978: Somatic hybrids of *Datura innoxia* Mill. + *Datura discolor* Bernh. and of *Datura innoxia* Mill. + *Datura stamonium* L. var. *tatula* L. I. Selection and characterisation. Molec. gen. Genet. /in the press/.
- SKOOG, S., TSUI, C., 1948: Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured in vitro. Am. J. Bot. 35, 782-787.
- SKOOG, F., 1971: Aspects of growth factor interactions in morphogenesis of tobacco tissue cultures. Colloq. Int. CNRS, 193, 115-135.
- SMITH, H.H., KAO, K.N., COMBATTI, N.C., 1976: Interspecific hybridisation by protoplast fusion in *Nicotiana*. Confirmation and extension. J. Hered. 67, 123-128.
- STEWART, F.C., MAPES, M.O., KENT, A.E., HOLSTEN, R.D., 1964: Growth and development of cultured plant cells. Science, 143, 20-26.
- STUMM, I., MEYER, Y., ABEL, W.O., 1975: Regeneration of the moss *Physcomitrella patens* /Hedw./ from isolated protoplasts. Plant Sci. Lett. 5, 113-118.
- SVÁB, J., 1973: Biometriai módszerek a kutatásban. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 25-37.
- TAKEBE, I., OTSUKI, Y., AOKI, S., 1968: Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state. Plant Cell Physiol. 9, 115-124.
- TAKEBE, I., LABIB, G., MELCHERS, G., 1971: Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. Naturwissenschaften. 58, 318-320.

- THOMAS, E., HOFFMANN, F., POTRYKUS, I., WENZEL, G.,
1976: Protoplast regeneration and ~~stem~~ embryogenesis
of haploid androgenetic rape. Molec. gen. Genet.
145, 245-247.
- USUI, H., MAEDA, M., ITO, M., 1974: High frequency of
spontaneous fusion in protoplasts from various
plant tissues. Bot. Mag. 87, 179-182.
- VASIL, I.K., NITSCH, C., 1975: Experimental production
of pollen haploids and their use. Z. Pflanzenphysiol.
76, 191-212.
- WALLES, B., 1963: Macromolecular physiology of plastids
IV. On amino acid requirements of lethal chloroplast
mutants in barley. Hereditas 50, 317-344.
- WALLIN, A., GLIMELIUS, K., ERIKSSON, T., 1974: -The induc-
tion of aggregation and fusion of *Daucus carota*
protoplasts by polyethylene glycol. Z. Pflanzen-
physiol. 74, 63-80.
- WENZEL, G., SCHIEDER, O., 1973: Regeneration of isolated
protoplasts from nicotinic acid-deficient mutants
of the liverwort *Sphaerocarpos donellii* Aust.
Plant Sci. Lett. 1, 421-423.
- WITHERS, L.A., 1973: Plant protoplast fusion: methods
and mechanisms, Colloq. Int. CNRS, 212, 517-526.
- ZAPATA, P.J., EVANS, P.K., POWER, J.B., COCKING, E.C.,
1977: The effect of temperature on the division of
leaf protoplasts of *Lycopersicon esculentum* and
Lycopersicon peruvianum. Plant Sci. Lett. 8, 119-124.

VIII.

A DOLGOZATBAN HASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A ₁	sárgarépa albinó mutáns
DMSO	dimetil-szulfoxid
PEG	polietilén-glikol
V	vadtipusu sárgarépa

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezuton mondok köszönetet Dr. Dudits Dénesnek értékes tanácsaiért, munkám során nyújtott elméleti és gyakorlati segítségért.

Köszönetet mondok Dr. Alföldi Lajos egyetemi tanár, intézeti igazgatónak, hogy a vezetése alatt álló intézetben lehetővé tette számomra a dolgozat elkészítését.

Dr. Horváth Imre tanszékvezető egyetemi tanárnak és Szél Juliának az Angelica és Aegopodium növényanyag biztosításáért mondok köszönetet.

A Genetikai Intézet, Növényi Szomatikus Sejtgenetikai Laboratórium kollektívájának az értéke szakmai és technikai segítségét, Dusha Bélának a fotótechnikai munkákban nyújtott segítségét köszönöm.