Diss. B 815

Haploid Nicotiana tabacum L. előállitása portok kultúrában és a haploid szövetek vizsgálata szövet és sejttenyészetben

Maliga Pál
tudományos segédmunkatárs

Doktori értekezés

MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézete
Szeged, 1972.

JATE KÖZPONTI KÖNYVTÁRA
Szegedi Tudományegyetem
Diss. B 815

TARTALOMJEGYZÉK

Bevezetés ..1.

I.Haploidok előállitása portokkulturában ..3.

II.Szövettenyésztés, növények regenerációja kalluszтenyészetből ..7.

III.Sejttenyésztés és sejtszélesztés .13.

Anyag és Módszer

I.Kisérleti növények 14

II.Táptalajok 14

III.Szövettenyésutés során felhasznált eljárások és körülmények 14

a./ Sterilizálás 14

b./ Kallusz tenyészetek 15

c./ Sejttenyésztés 15

d./ Sejtszélesztés 16

e./ Hőmérséklet, fény 16

IV.Citológiai módszerek 16

V.Eredmények közlése 16

VI.Rövidités jegyzéke 17

Eredmények

I.Haploid Nicotiana tabacum előállitása és a növények citológiai vizsgálata

a./ Haploid N. tabacum előállitása portok kulturában és a növények felnevelése 18

b./ Haploid növények morfológiája 19

c./ Mitózis vizsgálata 21

d./ Meiózis vizsgálata .... 22.
e./ Pollensterilitás vizsgálata .... 23.
f./ Tenyészedényben fenntartott haploidok citológiai vizsgálata .... 23.
II.Haploid szövettenyészetek és növények regenerációja .... 23.
a./ Különböző szerkezetű auxinok és citokininek hatása a haploid eredetü szövettenyészetek növekedésére .... 23.
b./ Hajtásképződés vizsgálata haploid eredetü kalluszteny észetben .... 29.
c./ Haploid szövetből növények regenerációja, és a regenerált növények citológiai vizsgálata .... 31.
III.Sejttenyésztés és sejtszelesztés
a./ Sejttenyésztés .... 33.
b./ Sejtszelesztés .... 34.
Eredmények megvitatása
I.Haploid növények, haploidia a szövettenyészetben .... 35.
II.Haploid szövettenyészetek .... 38.
a./ Auxinok és citokininek hatása a haploid eredetü szövettenyészetek növekedésére .... 38.
b./ Hajtásindukció haploid kalluszteny észetben; növények regenerációja .... 44.
III.Sejttenyésztés és sejtszelesztés .... 45.
Összefoglalás .... 47.
Irodalomjegyzék .... 49.
Köszönetnyilvánitás .... 60.

B e v e z e t é s

A bactériális és emlős sejt genetika eredményeinek hatására növényi objektumon is tanulmányozni kezdték a sejt fuzió és sejt transzformáció /DNS-sel történő információ átvitel/ lehetőségét. A sejt fuzió és transzformáció az ujszerü módszertani megközelités következtében ugrásszerü fejlődést tesz lehetővé a növénygenetikában.

A sejt fuziót a növényeknél a protoplasztok tanulmányozása alapozta meg. Vizsgálták a protoplasztok előállitását és sajátosságait /76, 50, 9, 23, 55/, a protoplasztban folyó DNS, RNS és fehérjeszintézist /57/, virus szaporodást /2, 77, 8/ és a sejtfal regenerációját /38, 78, 22/.

Több szerző már eredményes fuziós kisérletekről is beszámolt /51, 33, 52, 49/. Fuzióval létrehozott hibrid sejteket eddig nem sikerült életben tartani. Ez annak a következménye, hogy a kisérletekben olyan protoplasztokat fuzionáltattak, amelyből sejtet különben sem tudtak regenerálni.

Nehézséget okoz továbbá a fuzionált sejtek megkülönböztetése a "szülői sejtektől".
A fuzió növény genetikában történő felhasználásának ezek szerint két feltételesvan; mutánsokat kell alkalmazni a fuzionált sejtek "szülői" populációból történő

szelekciójához, másrészt a kisérleti objektumnál ismerni kell a sejtek protoplasztból történő regenerálásának, és tenyésztésének feltételeit.

Idegen DNS növényi sejtben történő replikációjának ésmörökletes átvitelének kimutatása /28, 67, 16/, a tumoros transzformáció /crown gall/ /1/ és auxotróf növény, idegen DNS-sel történő funkcionális komplementációja /29/ a genetikai információ átvitel egy-egy példája. A transzformációval történő információ átvitelből adódó lehetőségek kiaknázásának is az a feltétele, hogy megfelelő mutációkkal jelölt nukleinsav álljon rendelkezésre, és a kisérleteket ne növényekkel hanem sejtes szinten lehessen végezni.

A mutánsok előállitása szempontjából előnyös, ha haploid sejtekből indulunk ki. Ha pl. egy auxotrof /recessziv/ mutánst akarunk izolálni egy haploid sejt populációból lényegesen kevesebb sejtet kell megvizsgálnunk ahhoz, hogy a kérdéses tulajdonságban megváltozott sejtvonalat izolálhassuk. Domináns mutánsok előállitásánál is előnyös a haploidok felhasználása, mivel igy a mutáns sejtvonalaknál a genomok közötti kölcsönhatás kiküszöbölödik, és nincs szomatikus hasadás. A haploidok előnyeit a tapasztalat is igazolta. P.CARISON haploid növényi anyagból egyedül több auxotrof mutáns sejtvonalat izolált, mint az összes kutató, aki diploid állati sejtekkel dolgozott /38 kontra kevesebb, mint

10; lásd 6, 7 és 48/.

A sejttenyészetek felhasználása, a sejtfuzió /és transzformáció/ a legközelebbi jövőben átütő eredményeket hozhat. A téma fontossága és lehetőségeinek figyelembevételével három területen inditottuk meg a munkát annak érdekében, hogy eredményesen dolgozhassunk a növényi sejtgenetika területén;

I. Haploidok előállitása antherakulturában

II. Haploid szövetek növekedésének vizsgálata kalluszteny észetben és növények regenerációja

III. Sejt tenyésztés és sejt szélesztés

Választott kisérleti objektumunk a dohány, Nicotiana tabacum L. A disszertáció az a három területen eddig elért eredményekről számol be.

I. Haploidok előállitása antherakulturában

A haploid szövetek és növények előállitása azon a felismerésen alapszik, hogy ha egy adott táptalajon egy növényi rész növekedésnek indul, akkor a ploidiaszinttől függetlenül minden sejt osztódni kezd. Igy, ha olyan szövetből indulunk ki, amelyben haploid sejtek is vannak, abból haploid szövetet lehet izolálni, illetve haploid növényeket nevelni, ha a haploid sejtekben vagy szövetekben morfogenezist indukálunk.

Haploid kalluszt Ginko pollenből először TULECKEnek sikerült előállitani /1953; 80/. Minthogy e fajnál

a morfogenezis feltételei nem voltak ismertek, a kalluszból nem lehetett haploid növényt előállitani.

A zárvatermő fajok közül először Datura anthera kulturában sikerült haploid szövetet, majd növényt indukálni /GUHA, MAHESHWARI; 1964 /14/ 1966 /15/. Ezek után több, rendszertanilag távoleső fajjal kapcsolatban számoltak be haploid növények előállitásáról antherakulturában, igy NITZSKI, és OONO az Oryza /1968; 41/, NITSCH és NITSCH majd NAKATA és TANAKA a Nicotiana /69, 43/, illetve 1968; 39, KAMEJA és HINTA a Brassica /1969; 18/ esetében. Az uttörők tapasztalatainak felhasználásával azóta több gazdaságilag fontos genusból pl. Triticum, Hordeum, Lycopersicon - is sikerült haploidot létrehozni /71/.

A haploid növények előállitásának két alaptipusa ismert. Számos genusznál mint pl. Oryza és Brassica a pollenből haploid kalluszt hoznak létre, majd ebből növényt regenerálnak. A Nicotiana és Datura genusz egyes fajainál elérhető, hogy az antérában soksejtü pollen majd a pollenből közvetlenül embrió jön létre, amely növénnyé fejlődik. Ez utóbbi módszer csak bizonyos, meghatározott genotipus esetében alkalmazható /44/. Megfelelő genotipusu növénynél mindkét módszerrel elő lehet állitani haploidokat.

A portokból történő haploid kallusz indukció olyan táptalajon valósitható meg, amelyen az adott faj szöveti egyébként is tenyészthetők. Növények regenerálása a

haploid kalluszból ugyanugy történik, mint a magasabb ploidiaszintü tenyészetekben. A leggyakrabban alkalmazott eljárás szerint a hormon koncentrációk változtatásával szilárd táptalajon hajtást indukálnak, amelyet aztán meggyökereztetnek. Az eredmény egy életképes növényke.

A Nicotiana genus egyes fajai a haploid indukció szempontjából kitüntetett helyzetben vannak, mert haploid növények /a fenti második módszerrel/ közvetlenül előállithatók. Ehhez auxinok, citokininek, és gibberelin jelenlétére nincs szükség /45/. Ilyen körülmények között a portok állandósult diploid szövetének sejtjei nem kezdenek osztódni, viszont a meiozisban levő haploid sejtek osztódási aktivitása megmarad. Az embriogenezis során igy csak haploid növény fejlődik.

A haploid indukció szempontjából azonos körülmények között különböző Nicotiana fajok eltérően viselkednek. Nehézséget okozhat, hogy a diploid sejtek is intenziven osztódnak /N.alata, N. Langsdorfi/ vagy a portok sejtjei egyáltalán nem indulnak osztódásnak /N.Clevelandii 71/. A korábban leirt "ideális" viselkedés csak a N. tabacumra és a N. silvestrisre jellemző /44/. A N. tabacum fajon belül, az egyes varietaszok között is lényeges különbség van; a N. tabacum var Xanthi-ből pl. eddig még nem sikerült haploidot előállitani /44/.

Azoknál a fajoknál, ahol még nem tudtak az antherából kalluszt indukálni, vagy a haploid kalluszból növényt létrehozni, megfelelő hormon kombinációk és tápanyagok alkal-

mazásával bizonyára sikerül majd áthidalni a nehézségeket.

A megfelelő koru antéra kiválasztása minden esetben kritikusnak bizonyult. Ez fajonként változott. A szerzők esetenként a tetrád /39/, az egymagvu mikrospóra /43/ az első pollen mitozis /70/ és az érett pollen /45, 19/ stádiumban levő portokot találták megfelelőnek. A N. tabacumnál csak a szabad mikrospóra stádiumban levő antérákból fejlődtek növények. Sem a fiatalabb, meiozisban levő, sem az idősebb, érett pollent tartalmazó portok tenyésztése nem vezetett eredményre /43/. Ugy látszik tehát, hogy az indukciós folyamat az első mitózis után következik be /72/.

Az indukció citológiailag követhető eseményeit csak a dohánynál ismerjük. A normális pollenfejlődéstől eltérően a mikrospóráben a vegetativ sejtmag osztódása nem áll meg. A sejt osztódva kitölti a spóra üregét és a sejttömegből egy embrió, majd növényke fejlődik. A generativ sejtmag az embrióképzésben nem vesz részt /71/.

A Nicotiana tabacum haploidok előállításáról viszonylag sok adat áll rendelkezésünkre.
Feladatunk ezért az volt, hogy a közölt eljárások segítségével a rendelkezésünkre álló beltenyésztett vonalból haploid növényeket állitsunk elő.

II. Szövettenyésztés, növények regenerációja kallusztenyészetből

A szövettenyésztés és a szövettenyészetből történő regeneráció problémáinak megértéséhez a sejtek in vitro tenyésztéséhez szükséges feltételekből kell kiindulnunk.

Izolált sejtek, szövetek és szervek növekedéséhez táptalajra van szükség. Ez ásványi sókat, cukrót vitaminokat és növényi hormonokat tartalmaz. Különböző fajok szöveteinek tápigénye eltérő; a táptalajt empirikusan állitják össze. Egy ismert rendszerben a tápfolyadék összetételének változtatásával tetszés szerint organizált vagy organizálatlan növekedést indukálhatunk.

Az organizált növekedés megindítása rendkivül lényeges, ha a tenyészetből növényeket akarunk regenerálni. A tapasztalat szerint, ha egy differenciálatlan kallusztenyészetben sikerült gyökér vagy hajtásképződést indukálni, akkor nincs akadálya teljes szervezet regenerációjának.

A növekedés tipusának megszabásában elsődleges szerepet tulajdonitanak az auxinok és citokininek mennyiségének, minőségének és arányának. A tapasztalat szerint az auxinok tulsulya a gyökérképződésnek e citokinineké a hajtásképződésnek kedvez. Hangsulyozni kell, hogy hormonokkal csak abban az esetben váltható ki morfogenezis, ha a rendszerben a növekedési anyagok koncentrációja a limitáló faktor /65/.

A szervképződéshez szükséges regulációs változások bekövetkezéséhez a hormonokon kivül meghatározott összetételü ásványi táptalajra is szükség van. Jó példa erre, hogy dohány kallusz tenyészetben az ion koncentráció megváltoztatása változatlan egyéb feltételek mellett hajtásképződést eredményezett /81/. A morfogenetikus folyamatban fontos reguláció szerepet tulajdonitanak a hasznositható nitrogén mennyiségnek. A tapasztalat szerint a viszonylag gyengébb nitrogén ellátás kedvez a gyökérképződésnek. A táptalajban növelve a felhasználható nitrogén mennyiségét változatlan egyéb feltételek mellett hajtásorganizáció jühet létre. Ha egy ilyen táptalajba a növekedési anyagok közül csak viszonylag kis mennyiségü auxint teszünk, szabadon uszó sejtekből, mint a megtermékenyitett petesejtből, embriogenezis indulhat meg /63/.

Ismerünk olyan eseteket, mikor a táptalajban levő hormonok és inorganikus komponensek mennyiségének megváltoztatása nem elég az organizált növekedés megindításához. Eredményesnek bizonyult viszont különböző hormonok /62/ vagy fény /32/ meghatározott sorrendben történő alkalmazása. Ez a kezelés a tenyészetek számára a környezetből a növényre ható információ periodicitását utánozza, és az epigenetikus kanalizáció eredményeként létrejött determináció megváltozásához vezethet.

Az organizált növekedés megindítására a fenti sémák nem mindig alkalmazhatók. Ilyenkor arra kell gondolnunk, hogy a tenyésztés során a sejtek elveszitették a morfogenezishez szükséges genetikai információt. Ez a jelenség nemcsak a hosszabb ideje fenntartott tenyészetekben lép fel. NICKELL és mts. pl. kimutatták; ha a cukornád szövettenyészeteket RM táptalajon tenyésztik, a sejtek már az első passzázs után elveszitik a hajtás organizációra való képességüket, jóllehet az más táptalajon hosszu ideig fenntartható és kiváltható /3/. Ez a kisérlet kizárja ezt a lehetőséget, hogy a regenerációs képesség elvesztését az aneuploidizáció okozná.

A szövettenyészetek tápigénye és a tenyészetből történő regeneráció módja fajonként változik. A továbbiakban csak a dohány szövetek tenyésztéséről, a dohány növények regenerációjának problémájáról és az ezzel kapcsolatos feladatokról lesz szó.

MURASHIGE és SKOOG /35/ a N. tabacum szövet speciális igényeit kielégitő ásványi táptalaj összeállitását sikeresen megoldotta. Az RM táptalaj lehetővé teszi a szövetek gyors növekedését, és biztositja a morfogenezis indukálhatóságának fennmaradását. Azóta a korábban használt WHITE /84/ és HILDEBRANDT /17/ féle ásványi alapoldatok teljesen kiszorultak a gyakorlatból.

LINSMAYER és SKOOG tisztázták a N. tabacum vitamin

és növekedési faktor igényét is. Kimutatták, hogy a kallusz szövetek jól nőnek és organizálódnak IES-t, kinetint, inozitot és B_1 vitamint tartalmazó szintetikus táptalajon is /30/.

Nem tisztázott viszont, hogy a tenyészetekben milyen auxinok, milyen citokininek, milyen kombinációban és milyen koncentrációban használhatók. A szerzők speciális célokra többféle megoldást használnak.

Néhány példa;

HILDEBRANDT és mts. /17/ kallusz tenyészetben; 2,4-D, IES /+ kókusztej/

MURASHIGE és SKOOG /35/ kallusz tenyészetben; IES és K

CARLSON /7/ kallusz és szuszpenzió tenyészetben IES és K

SYONO és FURUYA /73/ - " - 2,4-D /+ élesztő kivonat/

PINER /10/ - " - 2,4-D /kazein hidr. és maláta kivonat/

VENKENTESWARAN /82/ - " - 2,4-D és IES

NUDRL és BAMBERGER /46/ suspenzio tenyészetben; NAA és K

NAGATA és TAKEBE /38/ protoplaszt szélesztéshez; NAA és BA

MURAKISHI és mts. /34/ TMV szaporításhoz; 2,4-D IES és K /+ kókusztej/

/4/ TMV lokális lézio kimutatáshoz; 2,4-D, IES /+ kókusztej/

Az idézett munkákban mindenütt az RM inorganikus táptalajt használták /kivéve 17, 10-t/. Minden esetben auxin és citokinin aktivitásu anyag is volt a rendszerben. A citokinint esetenként valamilyen természetes frakcióban juttatták a táptalajba. Kivételt képez a VENKENTESWARAN /82/ által alkalmazott kombináció. Mivel azonban egy klorofil mutánssal dolgozott, nem zárhatjuk ki a lehetőséget, hogy a habituáció - a hormonigény megszünésének - egy esetéről van szó.

Mivel a hormonok alkalmazása dohány tenyészetekben nem kellően tisztázott, szükségesnek láttuk a különböző auxinok és citokininek egymás melletti használhatóságának tanulmányozását kisérleti rendszerünkben. Az auxinok közül a IES-t, NES-t és 2,4-D-t, a citokininek közül a K-t, BA-t, DPU-t, BIA-t és MU-t vizsgáltuk.

A K-ről és a 2,4-D-ről kimutatták, hogy a tenyészetekben elősegiti a ploidiaszint megváltozását /44, 21/, ezért előnyben részesitettük a IES-t, NES-t és BA-t. A DPU a kókusztej citokinin aktivitásu komponense /59/.
A BIA citokinin aktivitására vonatkozóan csak kevés adat áll rendelkezésre /74, 75/. Azért tartottuk érdemesnek a két anyag vizsgálatát, mivel a többi citokinintől alapvetően eltérő szerkezetü vegyületekről van szó.

A N. tabacumnál ismertek a morfogenetikus indukció feltételei. Megfelelő hormonkoncentrációk alkalmazásával

a tenyészetekben hajtás, gyökér vagy embriogenezis indukálható. Növények regenerációjához elegendő hajtás indukciója; a kalluszból fejlődött fiatal hajtás hormon mentes táptalajon könnyen meggyökeresedik, és életképes növényt kapunk. Az in vitro regenerációs képesség genetikailag megszabott sajátság. Ez azt jelenti, hogy a hajtásindukció a genotipus által megszabott körülmények között váltható ki. A feltételek fajon belül is változnak, igy pl. nem minden N. tabacum alfajra nézve azonosak. Növények regenerációja miatt szükségesnek tartottuk a hajtásindukció vizsgálatát a rendelkezésre álló beltenyésztett vonalnál.

KOCHAR, SABHARVAL és mts. kimutatták, hogy kaláló ágensek és néhány dohányfüst komponens /24/ hatására haploid dohány tenyészetben hajtás indukálódott. A diploid kalluszra a kezelés nem hatott. Mivel mi is haploid növényből származó kalluszal dolgoztunk, a regenerált növények citológiai vizsgálatával akartunk meggyőződni arról, hogy valóban tenyészet haploid részéből indult e hajtásképződés. Az endopoliploidizáció következtében létrejött heteroploidia miatt fennállt a lehetőség, hogy a kezelés a hajtásképződést mindig csak valamelyik ploidiaszintü komponensből indukálta.

A dohány szövettenyésztéssel kapcsolatban elmondottak a N. tabacumra vonatkoznak. Más fajokat igy a N.langsdorffii-t N.rustica-t és N.suaveolens-t /58, 83/ is eredményesen

tenyésztettek, többé-kevésbé eltérő viszonyok között. Ezek tárgyalására most nem térek ki.

III. Sejttenyésztés és sejtszélesztés

Szuszpenziótenyészetben és agaron a sejtek osztódásához szükséges feltételek nem különböznek a kallusztenyészetek igényeitől, ha kellően magas sejtszámmal dolgozunk. Az egyedüli eltérés, hogy folyadéktenyészethez általában valamelyik lassan inaktiválódó auxint, 2,4-D-t vagy NES-t is kell adni / 17, 82, 73/, bár ellenpéldát is ismerünk /7/. Alacsony sejtszámnál a táptalaj további organikus komponensekkel történő kiegészitése is szükséges /68, 69/. A jó hatásfoku szélesztés alacsony sejtszámnál nagyon lényeges, mert csak igy valósitható meg a baktériumgenetikában alkalmazott hatékony szelekciós rendszer. Első feladatunk egy olyan táptalaj összeállitása volt, amelyik izolált dohánysejtek osztódását alacsony sejtszámnál is biztositja. Ebben az esetben is szintetikus táptalaj és alacsony hormonkoncentrációk használatára törekedtünk. A gyors növekedés nemcsak az időfaktor miatt volt lényeges; a növekedés gyorsulásával nő a sejtszuszpenzió diszperzitása is.

A táptalaj összeállitásánál a kallusztenyészetekkel kapott eredményekre és az irodalomra támaszkodtunk.

ANYAG ÉS MÓDSZER

I. Kisérleti növények

Nicotiana tabacum L. var. Petit Havana /n=24/ diploid és haploid alakja. A diploid növények az időközben megszünt MTA Genetikai Intézet beltenyésztett anyagából származnak.

II. Táptalajok

1. A NITSCH és NITSCH által leirt H és T táptalaj /43/.
2. LINSMAYER és SKOOG féle RM inorganikus táptalaj /30/. Ezt az alábbi kombinációkban használtuk fel;

- RMI; RM ásványi só oldat + 0,5 mg/l B_1 100 mg/l inozit
  A növekedési görbék felvételénél penicillines fiolákban 0,5 helyett 1 mg/l B_1-et használtunk
- RM; RMI + 2 mg/l IES + 0,2 mg/l kinetin
- RMNO; RMI + 2 mg/l IES + 0,04 mg/l kinetin
- RMC; RM + 50 mg/l Oxoid trypton

3. A FOX /11/ féle táptalaj egy KOMÁCS /27/ által módositott változata, F táptalaj.

III. Szövettenyésztés során felhasznált eljárások és körülmények

a. Sterilizálás A sterilizálandó növényi részeket 70 %-os etilalkohollal lemostuk /30 sec./ majd 2 %-os NaOCl oldattal 3 percig sterilizáltuk. A NaOCl-t a művelet után steril

desztillált vizes öblitéssel / 5x / távolitottuk el. A virágok szárát a sterilizálást megelőzően folyékony paraffinba mártottuk.

b. Kallusz tenyésztés

Törzstenyésztéshez az agart, cukrot és ásványi sókat tartalmazó oldatot 20 percig főztük 1 atm nyomáson. Mikor az oldat kb. 60°C-ra hült, hozzáadtuk a táptalaj hiányzó komponenseit, /hormonok, vitaminok/ és szétmértük a tenyészedényekbe /50 ml/ 100 ml Erlenmayer lombik/. A táptalaj megdermedése után a lombikokat papirvattával ledugóztuk, majd 15 percig 1 atm. nyomáson sterilizáltuk. Az inokulum egy 250 mg-os kallusz darab volt.

A növekedés szabályozó anyagok hatásának tesztelését penicillines üvegben végeztük. Ez esetben a táptalaj minden komponensét összemértük, lesterileztük, majd sterilen szétpipettáztuk. /5 ml/ 10 ml penicillines fiola/. Az inokulum egy 40-50 mg-os kallusz darab volt.

A növények laboratóriumi körülmények között történő fenntartása 100 ml Erlenmayer lombikban történt. A táptalajt ugyanugy készitettük, mint a törzstenyésztéshez. Passzálásnál a hajtáscsucsot két levélkével levágtuk, és az uj táptalajba vittük át.

c. Sejttenyésztés A sejttenyésztés folyékony táptalajban történt. A tenyészeteket levegőztetés céljából 15 rpm-el forgattuk a 250 ml gömblombik nyakának hossztengelye körül, ugy, hogy az vizszintes helyzetben volt. Az áramlás

elősegitése céljából a lombik középvonalában, a forgási tengelyre merőlegesen 6 db, 15 mm-re kiálló, 7 mm átmérőjü üvegcsövet forrasztattunk. A tenyészedények 30 ml táptalajt tartalmaztak.

d. Sejt_szélesztés A szélesztés - pontosabban lemez öntés - ugy történt, hogy 5 ml 45°C, 1,2 %-os agar-agart tartalmazó táptalajt 5 ml sejt szuszpenzióval összekevertünk, majd egy 9 cm átmérőjü Petri csészébe öntöttünk. A táptalaj kiszáradásának megelőzésére az edényeket ragtapasszal, vagy müanyag szigetelő szallaggal ragasztottuk le /38/.

e. Hőmérséklet, fény A szövettenyészeteket, és a szélesztett sejteket 27°C-os termosztátban, sötétben tartottuk. A haploidok előállitása, a növények fenntartása és a folyadéktenyésztés laboratóriumi fényviszonyok között, szobahőn /25 ± 3°C/ történt.

IV. Citológiai módszerek

A vizsgálandó növényi részt - levélkezdeményt, gyökércsucsot vagy virágot - 12 órán át fixáltuk abs. aethanol jégecet / 3:1 / elegyében, majd 3 napig mostuk 70 %-os aethanollal. A festés a szokásos acetokarmin technikával történt. A kromoszóma számolást dörzspreparátumokon végeztük. A mikroszkópos fényképek friss preparátumokról, Zeiss Nfpk 2 kutató mikroszkóppal készültek.

V. Eredmények közlése

Tapasztalatunk szerint a növekedési értékek egy ujabb

sorozatban igen nehezen reprodukálhatók. Állandóak viszont a kvalitativ összefüggések; hormonoknál a serkentő és gátló tartomány, az optimum helye. A számszerü eredményközlés helyett ezért a szemléletes grafikus ábrázolást választottuk. A közölt görbék minden pontját legalább hat, a sorozaton belül független minta átlagából számitottuk. Egy sorozaton belül a standard hiba 1-5 % között változott. Minden sorozatot legalább kétszer ismételtünk. Esetenként csak egy görbét közlünk, kivéve, ha egy független kisérlet kontroljáról van szó. Azokat az ábrákat, amelyekben egy összemérésből származó alaptáptalajt, és azonos koru, eredetü inokulumot használtunk, közös római számmal jelöljük.

VI. Rövidités jegyzéke

BA	benziladenin
BIA	benzimidazol
2,4-D	2,4-diklór-fenoxi-ecetsav
DPU	difenilurea
F^+	
IES	indolil-3-ecetsav
K	kinetin /6-furfuril aminopurin/
MU	6-metiluracil
NES	naftil-ecetsav
PAS	pollenanyasejt
RM, RMI, $RMNC^+$	

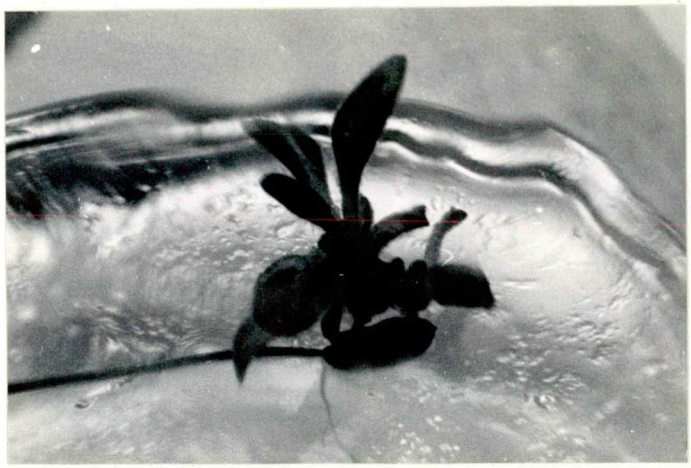
A / +-el/ jelölt röviditéseket lásd a táptalajok között.

EREDMÉNYEK

I. Haploid Nicotiana tabacum előállitása, és a növények citológiai vizsgálata

a./ Haploid Nicotiana tabacum előállitása, és a növények felnevelése

A haploid növények előállitása NITSCH és NITSCH /43/ módszerével történt. A kisérlethez a virágokat a kettes stádiumban gyüjtöttük be, mikor a sziromlevelek kb. olyan hosszuak, mint a csészelevelek. A N.tabacum virágja ilyen fejlettségi stádiumban tartalmaz embriogenezisre képes szabad mikrospóra sejteket. Begyüjtés után az egész virágot fertőtlenitettük. Ezt követően a porzószálat a portokkal együtt kimeltük, és a H táptalaj felszinére helyeztük. A táptalaj 0,1 mg/l IES-t és 0,2 mg/l kinetint tartalmazott. Az antérák először megbarmultak, majd négy hét mulva megjelentek a kis növénykék /1. ábra/.



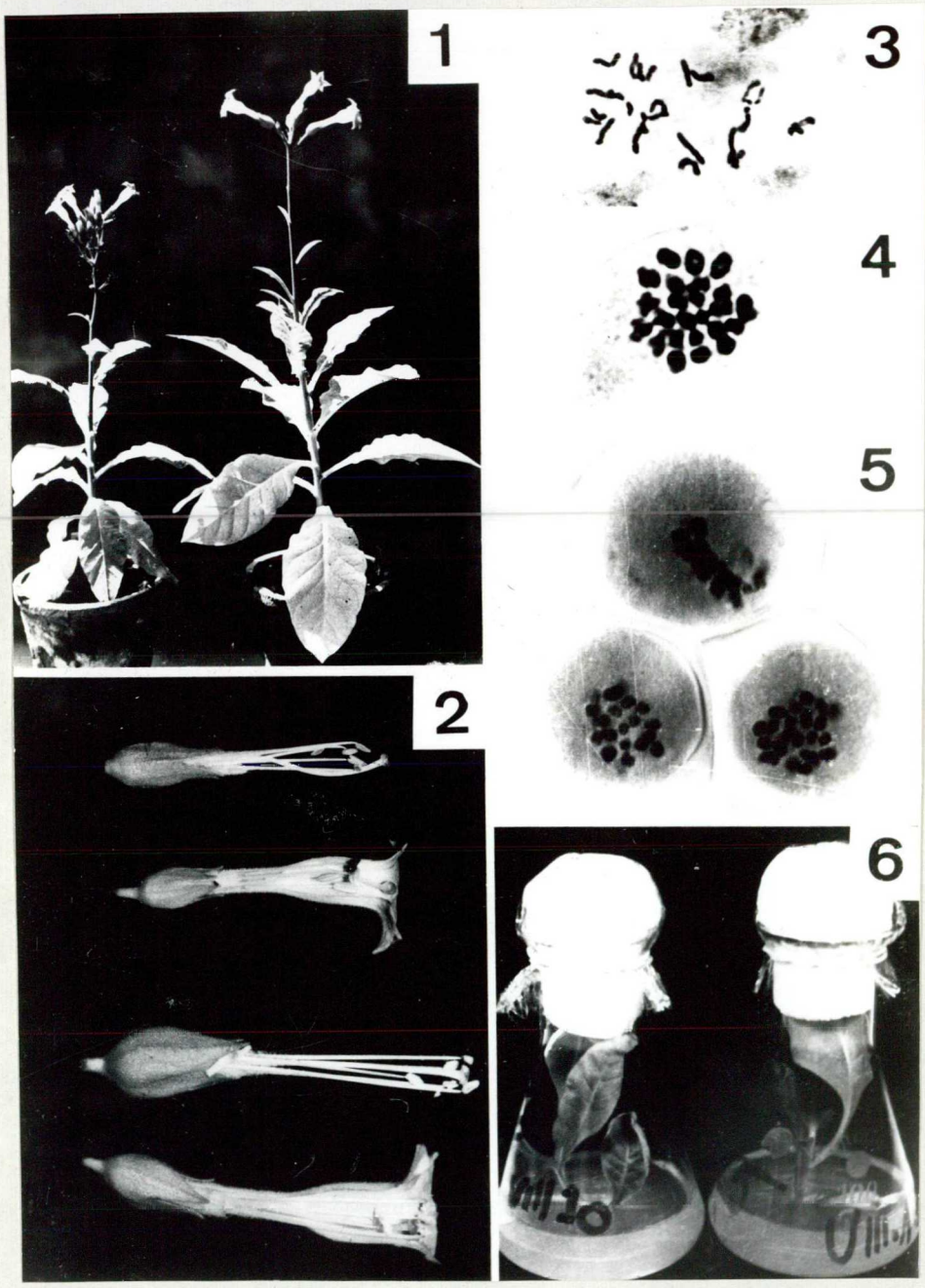
1. ábra Portokkulturában fejlődő haploid növények négy héttel a tenyészet beállitása után.

Hat hét mulva a növényeket T táptalajra vittük át. Miután megerősödtek, perlit-tőzeg 1:1 keverékben cserépben kiültetésre kerültek. Az üvegházban a növényeket egy ideig cukor nélküli tápoldattal öntöztük. Három hét mulva a növényeket kerti földbe ültettük át, és a továbbiakban ugy kezeltük őket, mint a magról kelt növényeket. Kiültetés előtt minden növényről levágtuk a hajtás tetejét két levéllel, és átvittük egy uj T táptalajra. Ilyen módon minden növényből egy másodpéldányt kaptunk.

Három anthéráből összesen 115 növény fejlődött. Ezek közül kettő deformált volt, és nem gyökeresedett meg T táptalajon. Ezeket a további vizsgálatból kizártuk. A 113 növényből 92-t virágzásig felneveltünk.

b./ Haploid növények morfológiája

A haploid növények külső megjelenésük alapján jól elkülönültek a diploidoktól /2/1 ábra/ Termetük valamivel alacsonyabb, levelük keskenyebb, virágjuk kisebb volt. A haploid virágban a porzószálak a bibénél rövidebbek, mig a diploidnál a portokok a bibecsucsával egy magasságban találhatók /2/2 ábra/. A haploid növények morfológiailag egységes képet mutattak. Sem a levél alakjában, sem a virág szerkezetében vagy színében nem találtunk variabilitást.



2. ábra

1./ Portokkultúrából felnevelt haploid növény /balról/ és a diploid szülő 2./ Haploid /balról/ és diploid /jobbról/ növényről származó virágok 3./ Haploid sejt mitózisban n=24 /x1000/ 4./ Diploid N.tabacum metafázis 24 bivalenssel /x1000/ 5./ Haploid N. tabacum metafázis 10 univalenssel és 7 bivalenssel /x1000/ 6./ Portokkultúrából

felnevel haploid /balról/ és haploid szövettenyészetből regenerált diploid növény tenyészedényben.

c./ Mitózis vizsgálata

Először a növények levélkezdeményeit és gyökércsucsát vizsgáltuk abból a célból, hogy megállapitsuk, valóban haploidok e az antérákból fejlődött növények. Az eredményeket az 1. Táblázatban foglaljuk össze.

1. Táblázat Portok kulturából felnevelt növények vizsgálata mitózisban

a. Növények megoszlása a kromoszómaszám alapján

	kromoszóma szám				
	24	24,12	24,12,48	24,48	vizsg.növ.
levél kezdemény	30	2	1	5	38
gyökér csucs	11				11

b. Sejtek megoszlása ploidia szerint

	n/2	n	2n	összes sejt
levélben	4	213	7	224
gyökércsucsban	120			120

38 növény levélkezdeményében végeztünk kromoszóma számolást. Esetenként legalább öt, jól elkülönithető kromoszómákkal rendelkező sejtet értékeltünk. Mind a 38 vizsgált

növény haploidnak bizonyult. Ezek közül 30-ban csak haploid sejteket találtunk. /2/3 ábra/. A többi nyolcban a haploidon kivül /24 kromoszóma /12 és 48 kromoszómás sejteket is találtunk. /1/a Táblázat/. A rendelkezésre álló adatokat a kromoszómaszám alapján csoportositva azt találjuk, hogy az összes vizsgált sejtnek kb. 5 %-a nem volt haploid. /1/b Táblázat/.

A ploidiasszintet ellenőriztük az üvegházban nevelt növények gyökércsucsának vizsgálatával is. Mind a 11 növénynél esetenként legalább 10 sejtben számoltunk kromoszómát. A levélkezdeményben kapott eredménytől függetlenül mind a 120 sejt haploidnak bizonyult.

d./ Meiózis vizsgálata

Az első metafázis citológiai képét is vizsgáltuk a haploid növények pollen anyasejtjeiben /PAS/. Mint várható volt, a meiózisban sok univalenst találtunk. A párosodási zavarok következtében a kromoszómák esetenként több csoportban helyezkedtek el /2/5 ábra/. A bivalensek számát és gyakoriságát 20 növény vizsgálata alapján a 2. Táblázatban tüntetjük fel.

2. Táblázat: A bivalensek száma és gyakorisága a haploid növények pollen anyasejtjeiben

	0	1	2	3	4	5	6	7	9	...	24	Összes
PAS	69		69		27			7	2		11	184
%	37,5		37,5		14,2			3,8	1,0		6,0	100

e./ Pollensterilitás vizsgálata

15 növényt ellenőriztünk pollenfestéssel is esetenként, 1500 pollent vizsgálva. Minden esetben 100 %-os sterilitást kaptunk. Az eredményt megerősiti, hogy sem az önbeporzás, sem haploid növény diploidról származó, sem diploid haploid virágból származó pollennel történő beporzása nem eredményezett életképes magot.

f./ Tenyészedényben fenntartott haploidok citológiai vizsgálata

10 növény duplikátumát tartjuk fenn Erlenmayer lombikban több mint egy éve. Hat-nyolc hetenként levágjuk a hajtáscsucsot és egy uj T táptalajra visszük át. Az ilyen módon fenntartott növénykék most is jól nőnek, és ploidiaszintjük változatlan /2/6 ábra/. A tény jelentőségéről a diszkusszióban lesz szó.

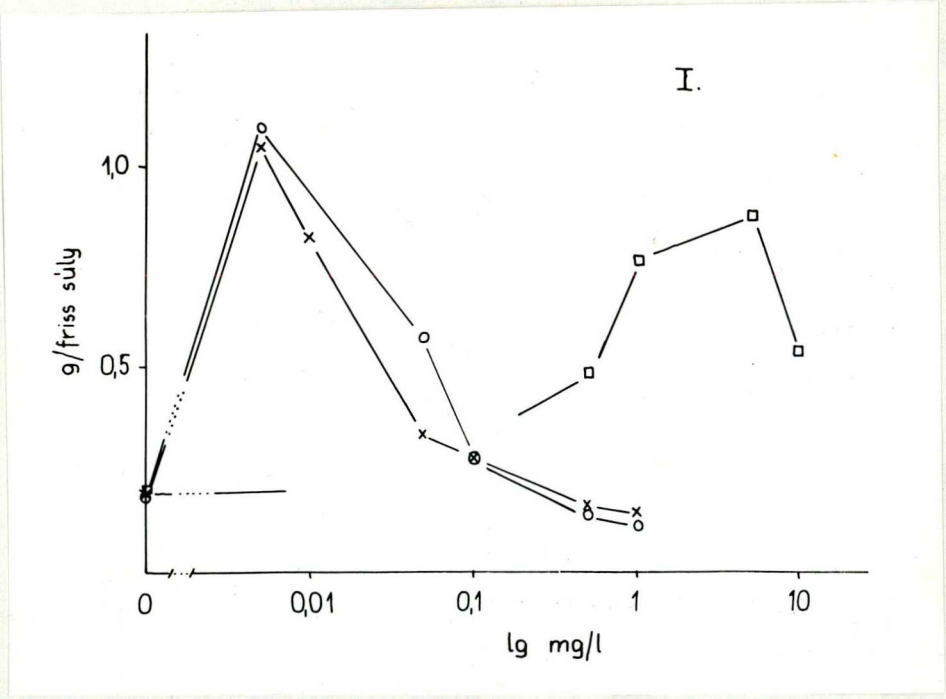
II. Haploid szövettenyészetek, és növények regenerációja

a. Különböző szerkezetü auxinok és citokininek hatása a haploid eredetü szövettenyészetek növekedésére.

A növényi hormonok növekedési sebességre gyakorolt hatását RMI táptalajon, különböző auxin és citokinin koncentráció mellett vizsgáltuk. A hormon hatást a friss suly gyarapodással jellemeztük, a sulyegységre eső sejtek számát figyelmen kivül hagyva. A tesztelésnél azt az eljárást követtük, hogy az auxinok és citokininek közül is kiválasz-

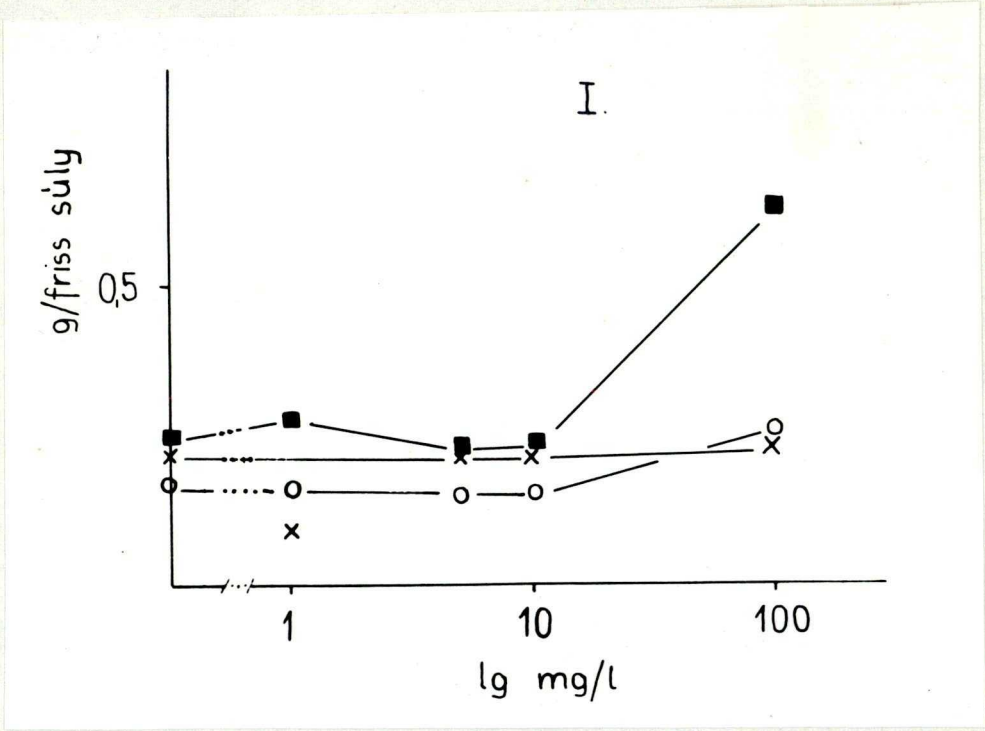
tottunk egy - egy anyagot, annak is egy bizonyos koncentrációját, és ennél az értéknél a másik csoportba tartozó összes anyagból egy koncentráció görbét vettünk fel. A citokininek közül a K, BA, DPU, MU, BIA, az auxinok közül az IES, NES és 2,4-D hatását vizsgáltuk. Az értékelés három hét után történt.

A citokinineket 3 mg/l IES mellett teszteltük. Azért esett az IES-re a választás, mert természetes anyag, citológiai aberrációt előidéző hatása nem ismert, és ez legjobban ismert auxin. 3 mg/l IES mellett felvett K, BA, DPU növekedési görbéket a 3. ábrán tüntetjük fel.



3. ábra Kinetin /o/, Benziladenin /x/ és Difenilurea / / hatása a dohány kallusz növekedésére 3 mg/l IES mellett, RMI táptalajon. Növekedési periódus három hét. Inokulum 39 napos, RMC táptalajról.

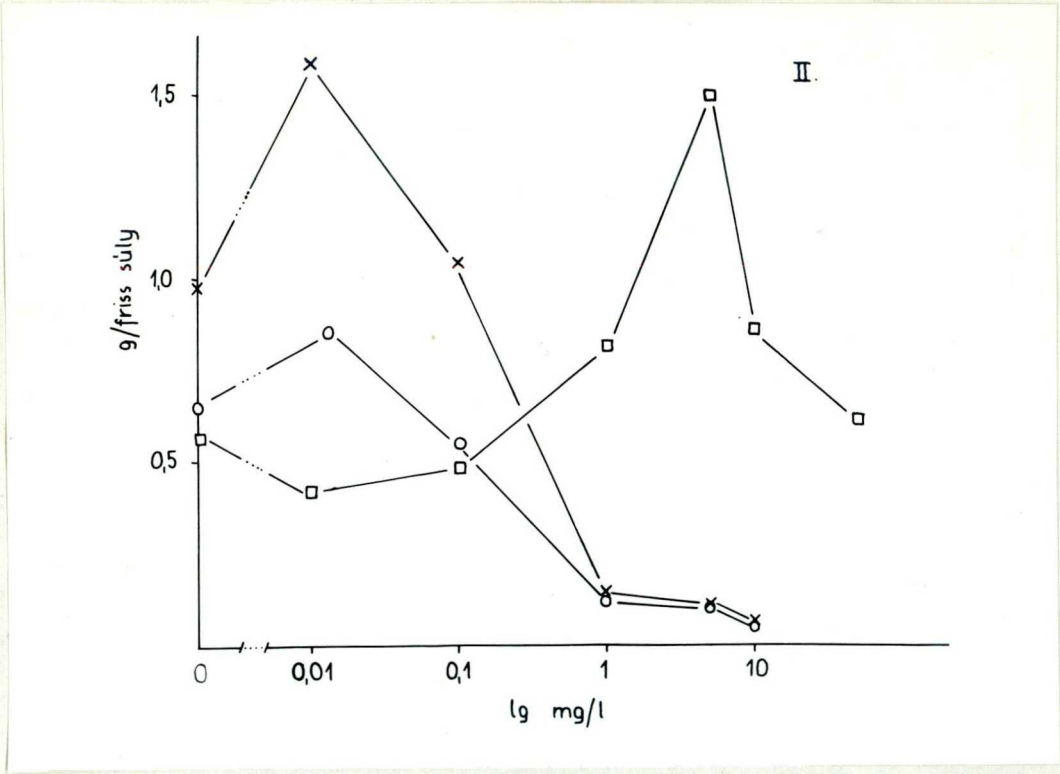
A K-t és BA-t 0,005-1 mg/l, a DPU-t 0,5-10 mg/l tartományban vizsgáltuk. A citokinin koncentrációt a friss suly függvényében ábrázolva mindhárom esetben optimum görbét kaptunk. A K és BA volt a legaktivabb vizsgált citokinin. A maximális sulygyarapodást mindkét esetben a tesztelt legalacsonyabb koncentrációnál, 0,005 mg/l-nél kaptuk. A DPU lényegesen kisebb aktivitást mutatott; a legnagyobb serkentést 5 mg/l-nél találtunk.
A 4. ábrán a BIA, MU és U görbéket ábrázoltuk az előbbivel azonos módon.



4. ábra Benzilamidazol / / 6-Metiluracil /x/ és Uracil /o/ hatása a dohány kallusz növekedésére 3 mg/l IES mellett RMI táptalajon. Növekedési periódus három hét. Inokulum 39 napos, RMC táptalajról.

Az uracil görbe a MU kontrolja. A tesztelést 1-100 mg/l-es koncentráció tartományban végeztük. Az ismert citokininek közül a BIA volt a legkevésbé aktiv. Ez az anyag csak 100 mg/l-nél mutatott szignifikáns növekedés serkentést. Teszt rendszerünkben három ismétlés alapján a MU nem mutatott citokinin aktivitást.

Megvizsgáltuk két alapvetően eltérő szerkezetü citokinin a K és DPU együttes felhasználásának lehetőségét is. Három növekedési görbét vettünk fel; egy K, DPU és 1 mg/l DPU mellett egy K koncentrációs sort. /lásd 5. ábra/



5. ábra Kinetin és Difenilurea kölcsönhatása dohány kallusztenyészetben RMI táptalajon 3 mg/l IES mellett. Növekedési periódus három hét. Inokulum 43 napos, RMC táptalajról. Jelölések: K /x/, DPU / /, K sor 1 mg/l

DPU mellett /o/.

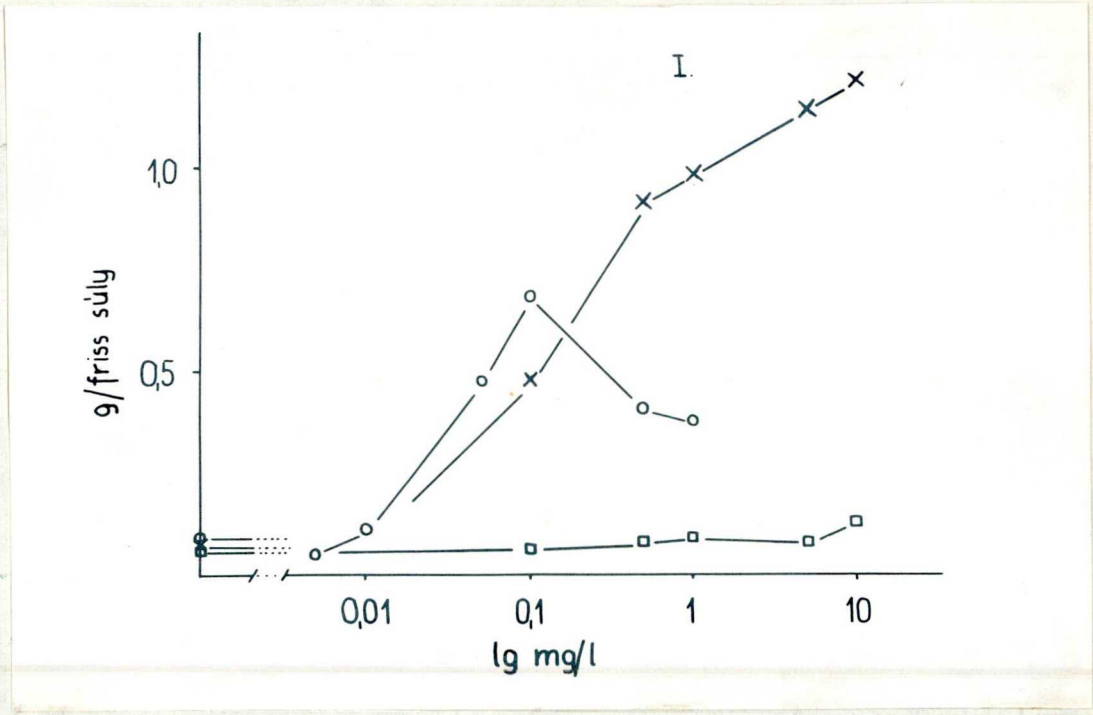
A K és DPU a már ismert friss suly - koncentráció összefüggést adta /3. ábra/. Az 1 mg/l DPU mellett felvett K görbe szerint a DPU-t is tartalmazó táptalajon nevelt szövetek növekedése minden vizsgált pontban elmaradt a csak K-en levő kalluszhoz képest. 0,01 mg/l K-nél a DPU mennyiségének megfelelő, 1 mg/l K-nél pedig a K-re jellemző növekedési értéket kaptuk.

Az auxinokat, 0,04 mg/l K mellett teszteltük. Ez az anyag a szövettenyésztésben leggyakrabban használt citokinin. Szintetikus vegyület, a növényekben nem keletkezik. A kiválasztott koncentrációnál a kallusz szövet rendkivül gyorsan proliferál, bár ilyen alacsony K mennyiségnél a tenyészetek növekedése hosszu ideig nem tartható fenn /35 és saját tapasztalat./

RMI táptalajon az IES, 2,4-D, és NES növekedésre gyakorolt hatását a 6. ábrán tüntetjük fel.

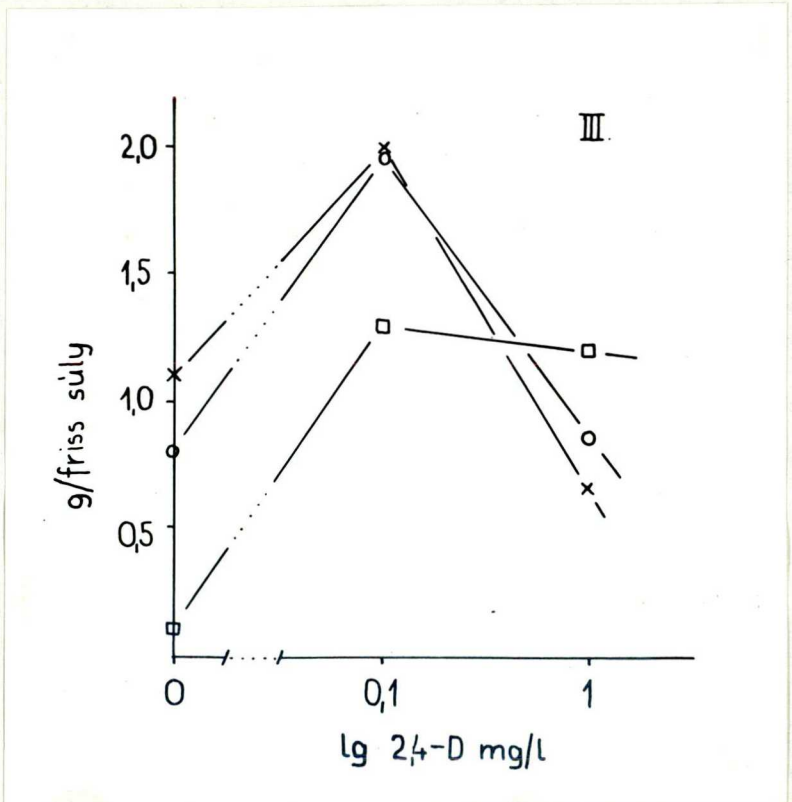
Az IES-nél a növekedés üteme a vizsgált tartományban /0,1-10,0 mg/l / az IES mennyiség növelésével emelkedett. 10 mg/l-nél kaptuk a maximális sulygyarapodást. A 2,4-D koncentrációja 0,1 mg/l-nél volt optimális; a sulynövekedés alacsonyabb és magasabb értékeknél is csökkent.

A NES a vizsgált tartományban /0,1-10,0 mg/l / nem mutatott auxin aktivitást.



6. ábra Naftilecetsav /□/, 2,4-Diklórfenoxiecetsav /o/ és Indolecetsav /x/ hatása a dohány kallusz növekedésére 0,04 mg/l kinetin mellett RMI táptalajon. Növekedési periódus három hét. Inokulum 39 napos, RMC táptalajról.

Vizsgáltuk a 2,4-D és IES együttes hatását is /7. ábra/



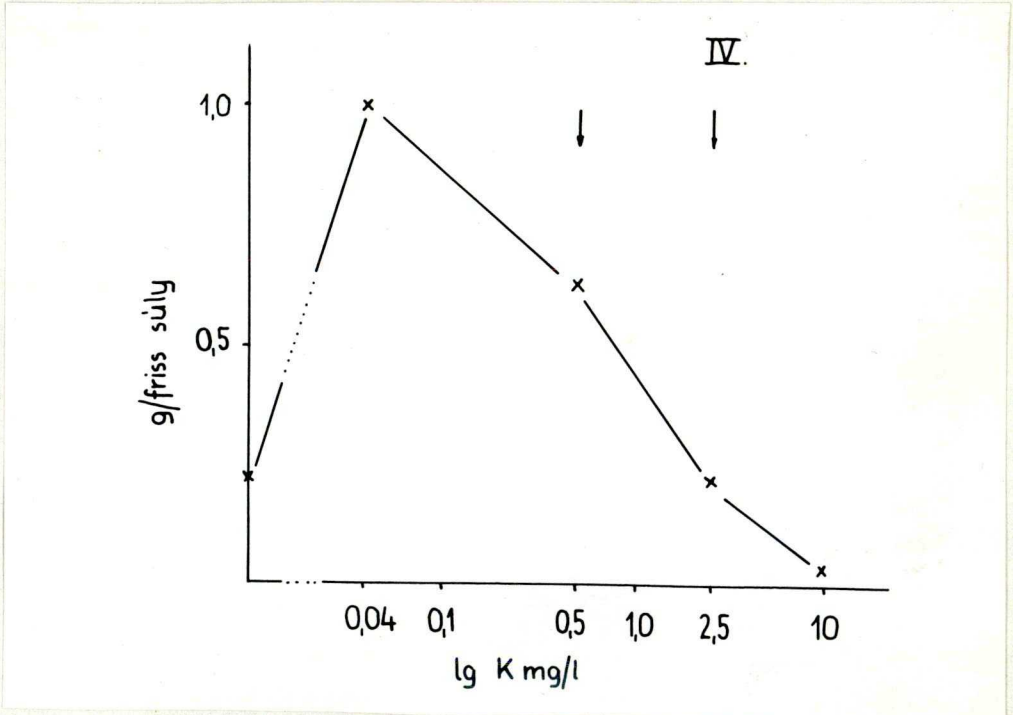
7. ábra 2,4-D és IES kölcsönhatása dohány kallusztenyészet-

ben 0,04 mg/l kinetin mellett RMI táptalajon. Növekedési periódus három hét. Jelölések: IES 0 mg/l /□/, 1 mg/l /o/, 5 mg/l /x/.

Erre azért került sor, mivel IES + K-en nem sikerült folyamatos szuszpenzió kulturát létrehozni, igy szükségessé vált a 2,4-D használata is. 0,04 mg/l K mellett 0, 1, és 5 mg/l IES és 0, 0,1 és 1,0 mg/l 2,4-D minden lehetséges kombinációját beállitottuk. Az eredmények szerint 1 vagy 5 mg/l IES és 0,1 mg/l 2,4-D együttesen gyorsabb növekedést biztositott, mint akár az IES akár a 2,4-D.

b. Hajtásképződés vizsgálata haploid eredetü kallusztenyészetben

A hajtásképződést vizsgálva először a klasszikus állandó IES mennyiség / 2 mg/l / mellett kinetin görbét vettük fel. Fényben és sötétben azonos értékeknél 0,5 és 2,5 esetenként 10 mg/l K-nél tapasztaltuk a hajtásképződést. /8. ábra/.



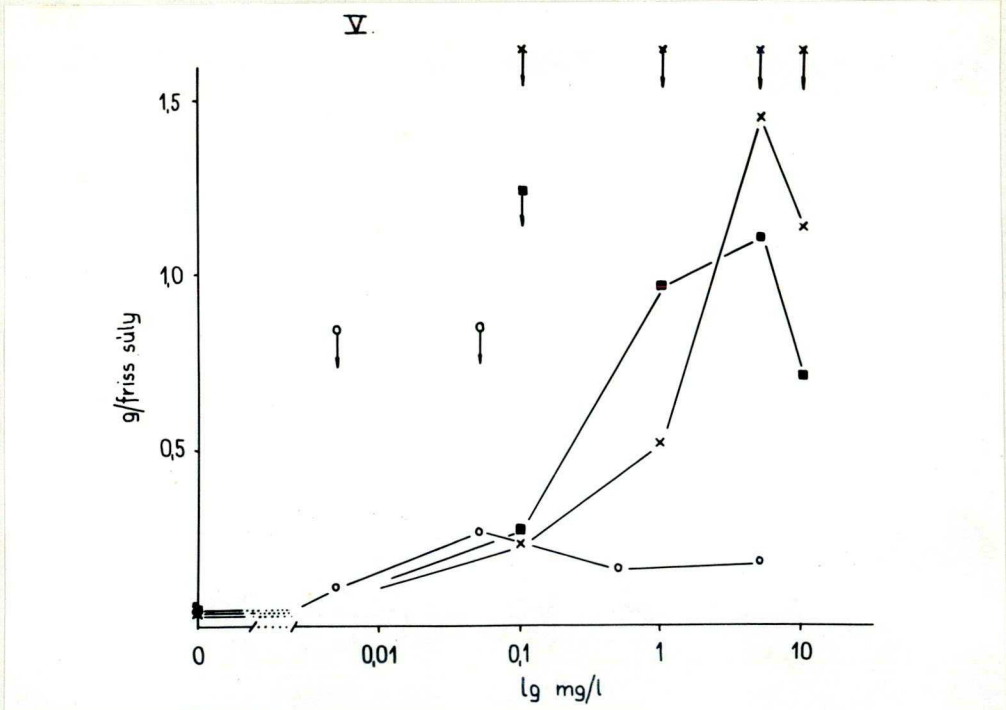
8. ábra Hajtásindukció kinetinnel RMI táptalajon 3 mg/l

IES mellett. A nyilak az organizálódó mintákat jelzik. Értékelés 32 nap után. Inokulum 45 napos, RMNO táptalajról.

A hajtások megjelenéséhez kisérlettől függően 3-8 hétre volt szükség. A fényen és sötétben növő minták között nem volt lényeg és különbség, ezért a továbbiakban csak sötétben dolgoztunk.

A citokininek közül a K-nen kivül csak a BA indukált hajtásképződést, a K-nál megegyező koncentráció tartományban. A BA által indukált hajtásoknál a K-re jellemző torz növekedés elmaradt. A DPU, BIA és MU 2 mg/l IES mellett nyolc hét után sem indukált hajtásképződést. A koncentrációk azonosak voltak az I. kisérletben vizsgált értékekkel.

Az auxinok hajtásképződésre és szöveti növekedésre gyakorolt hatását is megvizsgáltuk 2,5 és 10 mg/l K mellett. Az értékelés nyolc hót mulva történt. A 9. ábrán az IES 2,4-D és NES 2,5 mg/l K-nél mutatott aktivitását tüntetjük fel



9. ábra 2,4-D /o/, NES /□/ és IES /x/ hajtásindukcióra

és szöveti növekedésre gyakorolt hatása 2,5 mg/l kinetin mellett RMI táptalajon. A nyilak az organizálódó mintákat jelzik. Értékelés nyolc hét után. Inokulum 27 napos, RMNO táptalajról.

A 2,4-D 0,005 és 5 mg/l között magas K koncentrációnál csak nagyon gyengén serkentette a növekedést. Hajtás csak 0,005 és 0,05 mg/l-nél indukálódott. A NES koncentrációtól függően jó növekedést biztositott. A maximumot 5 mg/l-nél kaptuk; az optimum ilyen körülmények között 3 mg/l körül lehet. Hajtás ebben az esetben is csak alacsony koncentrációnál 0,1 mg/l-nél fejlődött. Az IES a vizsgált tartományban / 0,1 - 10 mg/l / szintén optimum görbét adott. A leggyorsabb növekedést 5 mg/l-nél találtuk. A kontrol kivételével minden mintában találtunk hajtásképződést.
Az IES, 2,4-D és NES görbéket felvettük 10 mg/l K mellett is. Ilyen magas K koncentrációnál a szövetek megbarnultak, nem fejlődtek, és hajtásképződést is csak elvétve tapasztaltunk.

c. Haploid szövetből növények regenerációja, és a regenerált növények citológiai vizsgálata

A haploid szövetből történő regenerációs vizsgálatánál ismert ploidiaszintü anyagból akartunk kiindulni. Már a másodlagos és harmadlagos tenyészetekben is jelentős mértékü aneuploidiát és jelentős számu diploid sejtet találtunk,

ezért a primer tenyészetből történő regeneráció mellett döntöttünk.

Haploid növénykék levél és szárdarabkáiból RM táptalajon organizálódó szövettenyészetet hoztunk létre. A fejlődő fiatal hajtásokat levágtuk, és T táptalajra vittük át. A hajtások a táptalajon meggyökeresedtek, fejlődésnek indultak, és így a kalluszból teljes növénykéket sikerült felnevelni; az elsődleges levél tenyészetből 18, a szárból 13, összesen 30 darabot. A növényeken végzett citológiai vizsgálatok adatait a 3. Táblázatban foglaltuk össze.

3. Táblázat Elsődleges tenyészetből regenerált növények citológiai vizsgálata

a./ Növények megoszlása ploidiaszint szerint

tenyészet	haploid	diploid	mixploid	összes
levél	6	1	10	17
szár	4	1	8	13
Összes	10	2	18	30

b./ A sejtek megoszlása ploidiaszint szerint /+ lásd a szövegben/

	haploid	diploid	aneuploid+	összesen
sejt	102	30	34	166
%	61,6	18,1	20,4	100

A citológiai vizsgálat szerint a növények között 10 haploid, 2 diploid, és 18 mixoploid volt /3/a Táblázat/. A ploidiaszint eldöntéséhez átlagosan 5 sejtet vizsgálunk meg. 116 sejt között 102 haploid, 30 diploid, és 34 aneuploid sejtet találtunk /3/b Táblázat/. Az aneuploidok felében 48-nál több, a másik felében 48-nál kevesebb kromoszómát találtunk. Irodalmi adatok alapján azt sem zárhatjuk ki, hogy néhány, az aneuploid kategóriában szereplő sejt tetraploid volt /20/. 12 kromoszómás sejtet 2 esetben a regenerált növényekben is találtunk.

III. Sejttenyésztés és sejtszélesztés

a. Sejttenyésztés

Alább közöljük azt a táptalajt, amelyet az irodalom alapján állitottunk össze. A /+/-al jelölt komponensek jelenléte biztositotta a tenyészet növekedését és passzálhatóságát magas sejtszámnál. Ha a tenyészetet 10^3/ml sejtszámról inditottuk a teljes táptalajra szükség volt.

/T5 vagy RMS táptalaj/
+ RM vagy F inorganikus sóoldat
+ 3 % szacharóz
+ 0,1 mg/l 2,4-D /73, 82/
+ 1 mg/l IES
+ 0,1 mg/l K
  1 mg/l Gibberelin sav /73/
  0,25 mg/l Ca-pantotenát /17/
  100 mg/l karbamid /60/
+ 1 mg/l B_1
  50 mg/l kazein hidrolizátum

b. Sejtszélesztés

A szélesztést NAGATA és TAKEBE módszere szerint végeztük /lásd Anyag és Módszer/. A szélesztéshez használt FS táptalaj 800 mg/l kazein hidrolizátumot és 400 mg/l élesztő kivonatot is tartalmazott /23/. A sejteket kallusz-ból rázatással nyertük / 100 rpm, 20 perc /.
A nagyobb kalluszdarabokat steril gézen történő szűrés-sel távolítottuk el, így nagyrészt / 90 % / izolált sej-teket, és két-három sejtből álló sejtcsoportokat tartal-mazó szuszpenziót nyertünk. A szélesztés hatékonysága és a sejtszám összefüggését vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy 10^3 sejt/ml alatt egyáltalán nem kaptunk telepeket.
A küszöbérték feletti sejtszámnál három-négy hét alatt az eredeti sejtek néhány százalékából fejlődött jól lát-ható telep. /10. ábra/. A sejtek 20-30 százalékából csak néhány sejtből álló sejtcsoport jött létre.

10. ábra Kiszélesztett dohány sejtek a szélesztés után

/belről/ és hat héttel később.

EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A diszkussziőban nem követem szigorusn az eredmények közlésénél alkalmazott csoportositást, hanem az alábbi témakörök szerint tárgyalom az eredményeket;

I. Haploid növények, haploidia a szövettenyészetben

II. Haploid szövettenyészetek

III. Sejttenyészetek és sejtszélesztés

I. Haploid növények, haploidia a szövettenyészetben

N. tabacum var. Petit Havana antéra kulturában sikerült növényeket indukálnunk, melyek közül 92-t virágzásig felnevelttünk. A növények között fenotipikus variabilitást nem tudtunk kimutatni. Ez természetes, mivel beltenyésztett anyagból indultunk ki. Minden esetben ugyanis csak annyi féle haploid növényt várhatunk, ahány féle gaméta a meiózis során létrejöhet.

A mi beltenyésztett anyagunkból tehát csak egy félét.

Morfológiájuk alapján a haploid növényeket jól el lehet különiteni a diplidoktól. Az eltérő morfológia nem a szövettenyésztés vagy mutáció, hanem génózis következménye, mivel diploidizáció után az eredeti morfológia helyreáll /79/.

A portok kulturából felnevelt növények szomás sejt-

jeinek citológiai vizsgálata azt mutatta, hogy a növények haploidok voltak, mivel bennük 24, a N. tabacum iversejtjeire jellemző számu kromoszómát találtunk. Meiózisében a kromoszómák nőme, mint univalens volt jelen, csak néhány bivalenst találtunk. Ez az általánosan elfogadott magyarázat szerint a N. tabacum alloploiploid eredetének következménye /13/. A bivalensek jelenléte a progenitor fajok citológiai rokonságát mutatja. A mi növényeinkben a bivalensek száma 0-8-ig változott. Ezt figyelembe véve a kromoszómák magon belüli elhelyezkedéséből, és fiziológiás viszonyokat meghatározó tényezők különbözőségéből eredő variabilitást, jól egyezőnek tekinthető, de NEITAGOURT és STOKES /40/ valamint TANAKA és NAKATA /73/ adataival, akik 2-5, illetve 0-4-ig változó számu bivalenst találtak.

Az a tény, hogy a növények olyannak látszotte /morfológia/ és ugy viselkedtek /sterilitás, meiózis/ mint a haploidok, nem jelentette azt, hogy a növények csak haploid sejtekből épültek fel. A pliszomatiszmus vagy mixoploidia meglehetősen általános a dohány növényekben /61, 37/. Haploid növényekről eddig nem közöltek adatot. Mint kimutattuk, ez alól a szabály alól a haploidok sem kivételek. A növényekben a megnövekedett ploidiaszintü és aneuploid sejtek száma a szövet korával nő. Citológiailag csak a hajtástenyészőcsucs és a gyökércsucs homogén. Egyértelmüen igy csak ez a két szerv mutatja a növény ploidiaszintjét /37/.

Ezért találtunk csak haploid sejteket a gyökércsucsban, és kismértékü mixoploidiát a levélkezdeményekben.

A növényekben fellépő poliszomatizmusnak megfelelő aneuploidia és pöliploidizálódás a szövettenyészetekre is jellemző /64/. MURASHIGE és NAKANO /36/ hívta fel elöször a figyelmet, hogy a mixoploidizálódott szövettenyészet lehetőséget nyujt pdiploid és aneuploid formák előállitására, ha a kalluszból növényeket regenerálunk. Hogy ez a gyakorlatban is lehetséges, rajtuk kivül SACRISTÁN és MELCHERS /56/és BUTENKO és mts. /37/ is igazolták. Ugyanez a jelenség teszi lehetővé diploid és tetraploid növények regenerálását haploid eredetü szövettenyészetből /20, 44, 26 és 3/a Táblázat/. A pdiploid egyedek gyakorisága a regenerált növények között egyuttal felhivja a figyelmet a haploid sejteknél mutatkozó rendkivül erős endoploiploidizációs tendenciára is.

E tények ismeretében haploid sejttenyészetben a ploidiaszint növekedése, és aneuploid sejtek megjelenése várható. Igy ha egy tulnyomórészt haploid sejtekből álló sejtpopulációval akarunk dolgozni, akkor a tenyészetet meg kell tisztitani a nem kivánatos sejtektől, vagy haploid növényből egy uj tenyészetet kell inditani. A probléma megoldható lenne egy olyan táptalaj kidolgozásával is, amelyik szelekciós előnyt biztositana a haploid sejtek számára. Jelen pillanatban az uj tenyészet inditása látszik a legjárhatóbb utnak.

Uj tenyészetek inditása egyszerü feladat, ha megfelelő haploid anyag, haploid növények állnak rendelkezésre. A haploidok, sterilek lévén, magról nem szaporithatók. Az egynyári növények / mint pl. a dohány üvegházban a generációs időn tul nem tartható fenn. Mi a haploidok antérából történő ismételt előállitását a hajtáscsucs passzálásával küszöböltük ki. Lombikban nevelt juvenilis növénykéink egy év után is jól nőnek, és stabilan haploidok maradtak. Igy állandóan megfelelő steril inokulum áll a rendelkezésünkre. Ez a módszer hasznos lehet mutáns sejtvonalak fenntartására is.

II. Haploid szövettenyészetek

a./ Auxinok és citokininek hatása a haploid eredetü szövettenyészetek növekedésére

Az auxinok és citokininek hatásának vizsgálatával célunk az volt, hogy a természetes frakciók használata nélkül a lehető legalacsonyabb hormonkoncentráció mellett gyors növekedést érjünk el. A citokinineket 3 mg/l IES, az auxinokat 0,04 mg/l kinetin mellett teszteltük. A kalluszból történő indukció kapcsán az auxinok magas kinetin koncentrációk / 2,5 és 10 mg/l / melletti alkalmazhatóságát is vizsgáltuk. A hormonok hatása az alkalmazott koncentrációtól függött. Ha elég széles volt a vizsgált tartomány, a növekvő koncentráció irányában hatástalan, serkentő és gátló értékeket is találtunk.

A citokininek közül a K, BA, DPU, BIA és Mu hatását vizsgáltuk / 3. ábra /.

A K a vizsgált legalacsonyabb koncentrációnál 5 ug/l-nél adta az adott sorozaton belüli maximális növekedést. SKOOG és mts. /54/ valamint MILLER /31/ citokinin tesztben 10 illetve 5 ug/l-nél kapták a növekedési optimumot. Ezek alapján szövetünk citokinin igénye megegyezik a Wisconsin 38 törzsével. A citokinin tesztben megállapitott optimális koncentráció a gyakorlatban nem használható. A szövetek hosszabb időn keresztül csak ennél magasabb K mennyiségnél tarthatók fenn; a tapasztalat szerint legalább 100 ug/l-re van szükség /35 és saját/.

A BA a K-hez hasonló szerkezetü, annál aktivabb citokinin /85/. Mi a két anyag között nem találtunk lényeges aktivitásbeli különbséget. A BA nagyobb hatékonysága abban nyilvánult meg, hogy azonos moláris koncentrációnál a szövetek valamivel lassabban nőttek. Ez abból adódott, hogy mi az aktivitást a gátló tartományban mértük.

A DPU-ból a K-hez és BA-hoz képest két nagyságrenddel nagyobb mennyiséget / molokban/ kellett alkalmazni a növekedési optimum eléréséhez. Ez megfelel a DPU gyenge citokinin aktivitásáról szóló közlésnek /66/. Bár a DPU citokinin aktivitása régen ismert, a dohány szövettenyésztésben mégsem alkalmazzák. Ezt a legegyszerübben ugy magyarázhatjuk, hogy a kutatók továbbra is a kókusztejet használják.

Megvizsgáltuk a DPU és K együttes felhasználásának a lehetőségét is / 5. ábra /. Szuboptimális, 1 mg/l DPU-nál K koncentráció görbét vettünk fel. 10 ug/l K nem befolyásolta a növekedés ütemét, az 1 mg/l DPU-nak megfelelő értéket kaptuk. 1 mg/l K kifejezetten gátolta a növekedést, ugyanugy mintha nem lett volna DPU a táptalajban. Az eredmény jól értelmezhető, ha elfogadjuk BRUCE és mts. /23/ levél szeneszcencia retardáció alapján levont következtetését. E szerint a DPU és K citokinin aktivitását azonos mechanizmus utján fejti ki, függetlenül az eltérő szerkezettől. E szerint 10 ug/l K jelenlétében a DPU nagyobb koncentrációja következtében kiszoritaná a K-t a citokinin aktivitásához szükséges aktiv komplexből, és igy a DPU-ra jellemző növekedési értéket kapjuk. 1 mg/l-nél ennek az ellenkezője történne. Valószinünek látszik, hogy a két citokinin együttes alkalmazásával nem lehet szinergisztikus/additiv/ hatást elérni. A kérdés egyértelmü tisztázásához további kisérletekre lenne szükség.

A BIA csak igen magas koncentrációban, 100 mg/l-nél / 10^{-3} M / mutatott citokinin aktivitást / 4. ábra / Alkalmazása semmilyen előnyt nem igér, ezért a továbbiakban nem vizsgáltuk.

A MU tesztrendszerünkben nem mutatott citokinin aktivitást / 4. ábra /. Ez a megállapitás ellentétes

SZIRÁKI és KIRÁLY közlésével /75/, akik dohány szövettenyészetben 5-100 mg/l koncentráció tartományban gyenge citokinin aktivitást találtak.

A gyakorlatban elterjedt auxinok, IES, 2,4-D és NES alkalmazhatóságát alacsony /0,04 mg/l / és magas / 2,5 és 10,0 mg/l / K mellett is megvizsgáltuk.

Az IES alacsony és magas K koncentráció mellett is jól használható. /6. ábra/ Alacsony K koncentrációnál a vizsgált tartományban /0,1-10 mg/l / a szövetek súlya arányosan nőtt az alkalmazott IES mennyiséggel. Magasabb K koncentrációnál /2,5 mg/l / 5 mg/l körül a görbe optimumot mutatott. 10 mg/l K mellett a szövetek gyakorlatilag nem nőttek.

A NES alkalmazása alacsony K koncentrációnál nem biztositja a sejtosztódáshoz szükséges feltételeket /6. ábra/. 2,5 mg/l K-nél a szövetek jól nőnek, az optimum 3 mg/l körül van /9. ábra/. 10 mg/l-nél súlygyarapodást nem tapasztaltunk. A NES-K kölcsönhatásra vonatkozóan adat hiján dohány kallusztenyészettel nincs összehasonlitási lehetőség. MILLER szója tenyészetben a NES mellett szintén magas K mennyiség használatát tartja szükségesnek /31/. Az optimum egy nagyságrenddel alacsonyabban volt.

A 2,4-D csak alacsony K mennyiség mellett használható /6. ábra/. A magas K koncentrációnál mindenütt igen erős gátlást tapasztaltunk /9. ábra/. WITHAM /86/ szerint

a 2,4-D önmagában is biztositja a dohány kallusz növekedését, azaz ugy viselkedik, mintha a 'citokinin aktivitása' is lenne. Ezt itt nem közölt eredményeink is megerősitik. Nem zárható ki azonban, hogy az erős auxin mellett az inokulummal átvitt kevés kinetin is elegendő a növekedési aktivitás fenntartásához. Ez igen emlékeztet a magas BA-nen növekvő szövetek viselkedésére; a kallusz auxin nélkül is intenziven proliferál és organizálódik jóllehet nem habituálódott / nem közölt eredmény /. Valószinüleg itt is az átvitt hormon rendkivül gazdaságos hasznositásáról, vagy a bioszintézis aktiválódásáról van szó. Hitelt érdemel viszont PILNER /10/ közleménye, aki olyan megváltozott mutáns sejtvonalat izolált, amely nő 2,4-D-n is. Lehetséges, hogy Pilnernél is a citokinin dependencia megszünéséről van szó, mint a FOX /11/ által izolált habituálódott sejtvonalaknál. Ugyanez a kétely merülhet fel VENKENTSWARAN /82/ munkájával kapcsolatban is, aki egy speciális klorofil mutánst tenyésztett eredményesen 2,4-D és IES tartalmu táptalajon.
Más a helyzet, ha természetes frakció is van jelen. SYONO és FURUYA /73/ 1 mg/l 2,4-D + 3 g/l élesztőkivonat; PILNER /10/ 0,5 mg/l 2,4-D + 200 mg/l kasein hidrolizátum és 500 mg/l maláta kivonatot tartalmazó táptalajon eredményesen tenyésztettek N. tabacum szövetet.

A sejttenyészetek beállitása szükségessé tette a 2,4-D - IES kölcsönhatás tanulmányozását, mert a passzálható sejttenyészetekhez szükség volt valamelyik szintetikus auxin alkalmazására /47, 82, 73/.

1 vagy 5 mg/l IES és 0,1 mg/l 2,4-D együttesen nagyobb sulygyarapodást és lazább szerkezetü kalluszt biztositott mint akár IES, akár a 2,4-D, vagy a két anyag más kombinációja /7. ábra/.

Külön szeretnék foglalkozni az eredmények reprodukálhatóságával. Amint ezt a K esetében is láttuk, akkor rossz a reprodukálhatóság, ha olyan anyag átvitelére van lehetőség, amely kis mennyiségben igen hatásos. RM táptalajról /K és IES/ származó inokulummal jól tesztelhetők voltak az auxinok K mellett, a DPU nagyobb koncentrációnál, de bizonytalan volt minden citokinint nem tartalmazó kontrol. A különböző koru szövettenyészetek hormonigénye eltérő, ezért csak három passzázsnál "idősebb, stabilizálódott" kalluszt használtunk a tesztelésre. Ugyancsak számit az inokulumot adó tenyészet kora is. Az abszolut növekedési értékek rendszerint nem reprodukálhatók, a kvalitativ összefüggések viszont meglehetősen állandónak mutatkoznak. A mintavétel időpontját a leggyorsabban növő mintához igazitottuk, nehogy egyes minták növekedésének leállása miatt hamis eredményt kapjunk.

A hormonok hatásának vizsgálatával gyakorlati célt követtük; önkényesen megválasztott szempontok szerint rendszeresen vizsgáltuk a gyakrabban használt auxinok és citokininek kombinációs lehetőségeit. A növekedési görbék ismerete lehetővé teszi a különböző szerkezetü hormonok egymást helyettesitő alkalmazását, és a tenyészet

növekedési sebességének, és a növekedés típusának /organizált, organizálatlan/ megszabását. Eredményeink alapján bizonyosnak látszik, hogy a bevezetésben felsorolt irodalmi hormonkombinációk nincsenek összefüggésben a speciális célkitüzéssel; egy más párosítással azonos eredményt lehetett volna elérni.

b./ Hajtásindukció haploid kallusztenyészetben; növények regenerációja

Haploid kallusztenyészetben vizsgáltuk a citokininekkel történő hajtásindukciót, és az auxinok hajtásképzésére gyakorolt hatását.

A citokininek közül 2 mg/l IES mellett csak a K és BA indukált hatásképződést 0,5 és 2,5 mg/l koncentrációban, a DPU /0,1-10 mg/l / és BIA /1-100 mg/l / hatástalannak bizonyult.

A hajtásindukció szempontjából az auxinok közül az IES-t, NES-t és 2,4-D-t vizsgáltuk. 2,5 mg/l K mellett az IES-nél minden mintában /0,1-10 mg/l / a 2,4-D-nél 0,005 és 0,05 mg/l-nél, a NES-nél 0,1 mg/l-nél találtunk hajtásképződést. 10 mg/l K mellett a kisérletek nem voltak értékelhetők.

Hormonnal történő hajtásindukcióra adatok N. tabacum nem haploid kallusztenyészetben a K-IES /35/, K-NES /56/ és 2,4-D-re vonatkozóan állnak rendelkezésre /86/.

Ezek lényegében megerősítik kisérleti eredményeinket, mely szerint K mellett a 2,4-D alacsony, NES és IES magasabb koncentrációnál is fejlődnek hajtások. A BA, DPU és BIA hajtásképzésre gyakorolt hatására vonatkozóan nem találtunk irodalmi adatot. A hormonnal történő hajtásindukció szempontjából ezek szerint nincs kvalitatív különbség a haploid és magasabb ploidiasszintü tenyészetek között. /Azt a lehetőséget, hogy a hajtásképződés az időközben poliploidizálódott kalluszból indult ki, a regenerált növények citológiai vizsgálatával zártuk ki/. Ez a tétel lényegében már akkor igazolt volt, mikor kiderült, hogy haploid kalluszból hormonokkal lehet haploid hajtást indukálni /20, 44, 26/. A kisérletek megkezdésének időpontjában ezek az eredmények még nem voltak ismertek.

A haploid kalluszból növényeket is regeneráltunk. A hajtásokat T táptalajon meggyökereztettük, majd kiültettük az üvegházba. A növények a haploid "szülőtől" semmiben nem különböztek.

III. Sejttenyésztés és sejtszelesztés

Sejttenyésztés

Az irodalomból három, az RM táptalaj dohány sejttenyésztésre használt változata ismert, mely teljesen szintetikus. Ezek csak a növekedési anyagokban különböznek.

VENKENTESWARAN /82/ 2,4-D-t és IES-t, CARLSON /71/ K-t és IES-t NUDEL és BAMBERGER /46/ K-t és NES-t használ. Az az összeállitás, amit mi a legjobbnak találtunk, lényegében megegyezik a VENKENTESWARAN féle táptalajjal azzal a különbséggel, hogy K-t is tartalmaz. Alacsony sejtszámról inditásánál a táptalaj további kiegészitésére volt szükség. Az anyagok kiválasztásánál SYONO /73/ és STREET és mts. /60/ közleményét vettük figyelembe.

Sejtszélesztés

Sikerként könyveljük el, hogy a kiszélesztett sejtjeink kinőttek, ami a táptalaj és a módszerek helyességét igazolja. Kalluszból rázatással nyert sejtek szélesztésénél jobb effektivitásra az irodalom alapján /5, 12/ sem lehet számitani. A technikai lehetőségek bővülésével első feladatunk az effektivitás növelése lesz standard sejttenyészetekből származó anyag felhasználásával.

ÖSSZEFOGLALÁS

Célkitüzésünk egy olyan sejtes szintü, növénygenetikai problémák megoldására használható kisérleti rendszer létrehozása volt, ahol a sejtek és teljes növényi szervezet közötti átmenet lehetősége is biztositva van. Kisérleti objektum a Nicotiana tabacum L. Az eredményeket az alábbiakban foglalom össze;

1./ Nicotiana tabacum portok kulturából növényeket regeneráltattunk és virágzásig felneveltünk,

2./ A regenerált növények citológiáját mitózisban és meiózisban is vizsgáltuk. Ezek alapján a növények haploidok voltak. Elsőként mutattuk ki, hogy a mixoploidia a haploid növényekben is megtalálható.

3./ Haploid eredetü kallusztenyészetben vizsgáltuk különböző auxinok /IES, NES, 2,4-D/ és citokininek /K, BA, DPU, BIA/ növekedésre és hajtásképződésre gyakorolt hatását RM táptalajon. Meghatároztuk a gyors növekedéshez és hajtás indukcióhoz szükséges hormonkombinációkat és koncentrációkat.

4./ A hormonok kallusz tenyészetek hajtásképzésére gyakorolt hatásának vizsgálata bizonyitékot szolgáltatott arra nézve, hogy - más ágensektől eltérően - a hormonális indukció szempontjából nincs különbség a haploid és poliploid eredetü szövettenyészetek között.

5./ Haploid növényekből létrehozott kallusz tenyészetekből növényeket regeneráltunk. A citológiai vizsgálat szerint ezek haploidok, diploidok illetve mixoploidok voltak.

6./ Szintetikus minimál táptalajt állitottunk össze a folyadékban történő sejttenyésztéshez.

7./ Kallusz tenyészetből származó sejtekből szilárd táptalajon kolóniákat növesztettünk.

IRODALOMJEGYZÉK

1./ ANKER,P., STROUN,M., GAHAN,P., ROSSIER,A., GREPPIN,H.: Natural release of bacterial nucleic acids into plant cells and crown gall induction. - In Informative Molecules in Biological Systems. /Ed. L.Ledoux/ 193-201, North Holland Publishing Co., 1971.

2./ AOKI,S., TAKEBE,I.: Infection of tobacco mesophyll protoplasts by tobacco mosaic virus ribonucleic acid Virology, 39/3/, 439-448, 1969.

3./ BARBA,R., NICKELL,L.G.: Nutrition and organ differentiation in tissue cultures of sugarcane, a monocotyledon Plants /Berlin/ 89, 299-302, 1969.

4./ BEACHY,R.N., MURAKISHI,H.H.: Local lesion formation in tobacco tissue culture. Phytopathology, 61/7/, 877-878, 1971.

5./ BERGMANN,L.: Growth and division of single cells of higher plants in vitro. J.gen.Physiol., 43, 841, 1960.

6./ CARLSON,S.P.: Production of auxotrophic mutants in ferns. Genet.Res. 14, 337-339, 1969.

7./ CARLSON,S.P.: Induction and isolation of auxotrophic mutants in somatic cell cultures of Nicotiana tabacum. Science, 168, 487-489, 1970.

8./ COCKING,E.C.: Virus uptake, cell wall regeneration and virus multiplication in isolated plant protoplasts. Internat. Rev. Cytol. 25, 89-126, 1970.

Jozsef Attila Tudományegyetem Könyvtár SZEGED

9./ ERIKSSON,T., JOHANSSON,K.: Nuclear division in isolated protoplasts from cells of higher plants grown in vitro. Planta /Berlin/ 89, 85-89, 1969.

10./ FILNER,P.: Semi-conservative replication of DNA in a higher plant cell. Exp.Cell Res. 39, 33-39, 1965.

11./ FOX,J.E.: Growth factor requirements and chromosome number in tobacco tissue cultures. Physiol.Plant. 16, 793-803, 1963.

12./ GIBBS,J.L., DOUGALL,D.K.: The growth of single cells from Nicotiana tabacum callus tissue in nutrient medium containing agar. Exp.Cell.Res. 40, 85-89, 1965.

13./ GOODSPEED,R.H., CLAUSEN,R.E.: Interspecific hybridisation in Nicotiana VIII. The Sylvestris-tomentosa-tabacum hybrid triangle and its bearing on the origin of tabacum. Univ.Calif. /Berkeley/ Publ.Botany, 11, 245-256, 1928.

14./ GUHA,S., MAHESHWARI,S.C.: In vitro production of embryos from anthers of Datura. Nature, 204, 497, 1964.

15./ GUHA,S., MAHESHWARI,S.C.: Cell division and differentiation of embryos in the pollen gains of Datura in vitro. Nature, 219, 97, 1966.

16./ HOTTA,Y., STERN,H.: Uptake and distribution of heterologus DNA in living cells. - In Informative Molecules in Biological Systems. /Ed. L.Ledoux/ 176-186, North Holland Publishing Co., 1971.

17./ JONES,L.H., HILDEBRANDT,A.C., RIKER,A.J., WU,J.H.: Growth of tobacco cells in microculture. Amer.J. Bot. 47, 468, 1960.

18./ KAMEJA,T., HINTA,K.: Culture of anthers and pollen in Brassica sp. Jap.J.Breeding, 19, 109, 1969.

19./ KAMEJA,T., HINTA,K.: Induction of haploid plants from pollen grains of Brassica.Jap.J.Breeding, 20, 82-87, 1970.

20./ KADOTANI,N.: Studies and the haploid method of breeding by anther culture in Tobacco. Iwata,Jap.Tob.Exp.Sta.Bull. /2/ 73-7, dec. 1968.

21./ KALLAK,H., YARVEKYLG,L.: On the cytogenic effects of 2,4-D on pea callus in culture. Acta Biol. Acad. Sci.Hung. 22, 67-73, 1971.

22./ KAO,K.N., GAMBORG,O.L., MILLER,R.A., KELLER,W.A.: Cell division in cells regenerated from protoplasts of soybean, Haplopappus gracilis. Nature-New Biol. 232 , 124, 1971.

23./ KEFFORD,N.P., ZWAR,J.A., BRUCE,M.I.: Antagonism of purine and urea cytokinin activities by derivatives of benzylurea. In Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances /Ed.F.WIGHTMAN and G.SETTERFIELD/, 61-69, The Runge Press Ltd., Ottawa, 1968.

24./ KOCHAR,T.S., BHALLA,P.R., SABHARWAL,P.S.: Effect of tobacco smoke components on organogenesis in plant tissue. Plant and Cell Physiol. 12, 603-608, 1971.

25./ KOCHAR,T.S., BHALLA,P.R., SABHARWAL,D.S.:
In vitro indinction of vegetative buds in tobacco callus by cheleting agents. Can.J.Bot. 49, 391-394, 1971.

26./ KOCHAR,T.S., SABHARWAL,D.S., ENGELBERG,L.:
Production of homozygous diploid plants by tissue culture technique. Am.J.Botany, 26, 163-172, 1939.

27./ KOVÁCS,E.: Uj módositott ásványi tápoldat normális és tumoros dohány szövetek steril tenyésztésre. Bot.Közlem. 58/2/, 107-109, 1971.

28./ LEDOUX,L., HUART,R.: Integretion and replication of DNA of M.lyspodekticus in DNA of germinating barley. Nature, 218, 1256, 1968.

29./ LEDOUX,L.: Fate of exogenous DNA in Arabidopsis thaliana. Eur.J.Biochem., 23, 96, 1971.

30./ LINSMAIER,E.M., SKOOG,F.: Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 18, 100-127, 1965.

31./ MILLER,C.O.: Naturally occuring cytokinins. In Biochemistry and physiology of plant growth substances /Ed.F.WIGHTMAN and G.SETTERFIELD/ 33-46, The Runge Press, Ottawa, 1968.

32./ MILLER,J.H.: Fern gametophytes as experimental material. The Botanical Review, 34/4/, 361-441, 1968.

33./ MILLER,R.A., GAMBORG,O.L., KELLER,W.A., KAO,K.N.:
Fusion and division of nuclei in multinucleated soybean protoplasts. Can.J.Genet.Cytol. 13/2/, 347, 1971.

34./ MURAKISHI,H.H., HARTMANN,J.X., PELCHER,L.E., BEACHY,R.N.: Improoved inoculation of cultured plant cells resulting in high virus titer and crystal formation. Virology, 365-367, 41, 1970.

35./ MURASHIGE,T., SKOOG,F.: A revised medium for rapid growth and bio assys with tobacco tissue cultures. Physiol.Plant. 15, 473-497, 1962.

36./ MURASHIGE,T., NAKANO,R.: Tissue cultures as a potential tool in obtaining polyploid plants. J.Hered., 57, 115-118, 1966.

37./ MURASHIGE,T., NAKANO,R.: Chromosome complement as a determinant of the morphogenetic potential of tobacco cells. Amer.J.Bot., 54/8/, 963-970, 1967.

38./ NAGATA,T., TAKEBE,I.: Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. Planta /Berlin/, 99, 12-20, 1971.

39./ NAKATA,K., TANAKA,M.: Differentiation of embroyids from developing germ cells in anther culture of tobacco. Jap.J.Genet., 43, 65, 1968.

40./ NIIZEKI,H., OONO,K.: Induction of haploid rice plant from anther culture. Proc.Jap.Acad., 44, 554-557, 1968.

41./ DE NETTANCOURT,D., STOKES,G.W.: Haploidy in tobacco J.Hered., 51, 102-104, 1960.

42./ NISHIYAMA,I., TAIRA,T.: The effects of kinetin and indolacetic acid on callus growth and organ formation in two species of Nicotiana. Jap.J.Genet., 41/5/, 457-465, 1966.

43./ NITSCH,J.P., NITSCH,C.: Haploid plants from pollen grains. Science, 162, 85-87, 1969.

44./ NITSCH,J.P.: Experimental androgenesis in Nicotiana. Phytomorphology, 19, 389-408, 1969.

45./ NITZSCHE,W.: Herstellung haploider Pflanzen aus Festuca-Lolium-Bastarden. Naturwissenschaften 57/4/, 199-200, 1970.

46./ NUDEL,U., BAMBERGER,E.S.: Kinetin inhibition of H^3-uracil and C^{14}-leucine incorporation by tobacco cells in suspension culture. Plant Physiol. 47, 400-403, 1971.

47./ OJIMA,K., GAMBORG,O.L.: The metabolism of 2,4-dichlorphenoxyacetic acid in suspension cultures of soybean root.- In Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances /Ed.F.WIGHTMAN and G.SETTERFIELD/, 857-865, The Runge Press, Ottawa, 1968.

48./ POSNER,M., NOVE,J., SATO,G.: Selection procedure for mammalian cells in monolayer culture. In Vitro 6, /4/, 253-256, 1971.

49./ POTRYKUS,I.: Intra and interspecific fusion of protoplasts from petals of Torenia baillonii and Torenia fournieri. Nature-New Biol., 231, 57, 1971.

50./ POWER,J.B., COCKING,E.C.: A simple method for isolation of very large numbers of leaf protoplasts by using mixtures of cellulase and pectinase. Biochem.J. 111, 33, 1969.

51./ POWER,J.B., COCKING,E.C.: Fusion of plant protoplasts. Sci.Prog.Oxf., 59, 181-198, 1971.

52./ POWER,J.B., CUMMINS,S.E., COCKING,E.C.: Fusion of isolated plant protoplasts. Nature, 225, 1016-18, 1970.

53. /REINERT,L., HELLMAN,S.: Mechanism of the formation of polynuclear protoplasts from cells of higher plants. Naturwissenschaften, 58/8/, 419, 1971.

54./ ROGOZINSKA,J.H., HELGELSON,J.P., SKOOG,F.: Tests for kinetin-like growth promoting activities of triacanthine and its isomer 6/J.J-dimethylallylamino/-purine. Physiol. Plant., 17, 165-176, 1964.

55./ RUBSINK,A.W.: The plasma membrane of Avena coleoptile protoplasts. Plant Physiol. 47, 192-195, 1971.

56./ SACRISTÁN,D.M., MELCHERS,G.: The caryological analysis of plants regenerated from tumorous and other callus culture of tobacco. Mol.Gen.Genetics 105, 317-333, 1969.

57./ SAKAI,G., TAKEBE,I.: RNA and protein synthesis in protoplasts isolated from tobacco leaves. Biochem.Biophis. Acta, 224, 531-540, 1971.

58./ SCHAEFFER,G.H., SMITH,H.H.: Auxin-kinetin interaction in tissue cultures of Nicotiana species and tumor conditioned hybrids. Plant Physiol., 38, 291-297, 1963.

59./ SHANTZ,E.M., STEWARD,F.C.: The identification of compound A from coconut milk as 1,3-diphenyl-urea. J.Amer.Chem.Soc., 77, 6351-6353, 1955.

60./ SIMPKINS,I., COLLIN,H.A., STREET,H.E.: The growth of Acer pseudoplatanus cells in a synthetic liquid medium: Response to the carbohydrate, nitrogenous and growth hormone constituents. Physiol. Plant. 23, 385-396, 1970.

61./ SMITH,H.: Recent cytogenetic studies in the genus Nicotiana. - In Advances in Genetics. 14, Academic Press, 1968.

62./ STEWARD,F.C., MAPES,M.O., AMMIRATO,P.V.: Growth and morphogenesis in tissue and free cell cultures. Plant Physiology Vol. V.B. /Ed.F.C.STEWARD/ Academic Press, 1969.

63./ STEWARD,F.C., AMMIRATO,P.V., MAPES,M.O.: Growth and development of totipotent cells. Some problems, procedures and perspectives. Annals of Botany 34, 761-787, 1970.

64./ STREET,H.E.: Plant tissue culture is in an interesting condition. In: Tissue culture, /Ed.C.V.RAMAKRISHAN/, W.Junk Publishers, The Hague, 1969.

65./ STREET,H.E.: Growth, differentiation and organization in plant tissue and organ cultures. In: Cells and tissues in culture /Ed.E.N.WILMER/ vol. 3, 631-681, Academic Press, 1966.

66./ STRONG,F.M.: Topics in Microbial Chemistry, John Wiley and Sons Inc., New York, pp 98-157, 1958.

67./ STROUN,M., ANKER,P.: Bacterial nucleic acid synthesis in plants following bacterial contact. Mol.Gen.Genet. 113, 92-98, 1971.

68./ STUART,R., STREET,H.E.: Studies on the growth in culture of plant cells IV; The initiation of division in suspension of stationary phase cells of Acer pseudoplatanus L. J.exp.Bot., 20, 556-571, 1969.

69./ STUART,R., STREET,H.E.: Studies on the growth in culture of plant cells X. Further studies on the conditioning of culture media by suspensions of Acer pseudoplatanus L. cells. J.exp.Bot., 22, 96-106, 1971.

70./ SUNDERLAND,N., WICKS,F.M.: Cultivation of haploid plants from tobacco pollen. Nature, 224, 1227-1229,1969.

71./ SUNDERLAND,N.: Anther culture. Sci.Prog.Oxf. 59, 527, 1971.

72./ SUNDERLAND,N., WICKS,F.M.: Embryoid formation in pollen grains of Nicotiana tabacum. J.exp.Bot., 22/70/, 213-226, 1971.

73./ SYONO,K., FURUYA,T.: Studies on plant tissue cultures I. Relationship between inocule sizes and growth of calluses in liquid medium. Plant and Cell Physiol. 9, 103-114, 1968.

74./ SZIRÁKI,I.: Auxinok és citokininek hatása a növényi szövetekre. Bot.Közlem. 57, 303-306, 1970.

75./ SZIRÁKI,I., KIRÁLY,Z.: közlés alatt

76./ TAKEBE,I., OTSUKI,Y., AOKI,S.: Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state. Plant and Cell Physiol., 9, 115-124, 1968.

77./ TAKEBE,I., OTSUKI,Y.: Infection of tobacco mesophyll protoplasts by tobacco mosaic virus. Proc.Natl.Acad. Sci.U.S. 64/3/, 843-848, 1969.

78./ TAKEBE,I., LABIB,G., MELCHERS,G.: Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplats of tobacco. Naturwissenschaften, 58, 318, 1971.

79./ TANAKA,M., NAKATA,K.: Tobacco plants obtained by anther culture and the experiment to get diploid seeds from haploids. Jap.J.Genet., 44/1/, 47-54, 1969.

80./ TULECKE,W.E.: A tissue derived from the pollen of Ginkgo biloba. Science 117, 599-600, 1953.

81./ VASIL,I.K., HILDEBRANDT,A.C.: Differentiation of tobacco plants from single isolated cells in micro-culture. Science, 150, 889-892, 1965.

82./ VENKENTESWARAN,S.: Studies on the isolation of green pigmented callus tissue of tobacco and its maintenance in suspension cultures. Physiol.Plant., 18, 776-789, 1965.

83./ VERZÁR-PETRI,G., KOVÁCS,E.I.: Formation of alkaloids in tissue cultures of tobacco. Acta Biol.Acad.Sci. Hung. 19/4/, 407-418, 1968.

84./ WHITE,P.R.: The cultivation of animal and plant cells. The Ronald Press Company, New York, 1963.

85./ WILKINS,M.B.: The physiology of plant growth and development. McGraw-Hill, London, 1969.

86./ WITHAM,F.H.: Effect of 2,4-D on the cytokinin requirement of soybean cotyledon and tobacco pith callus tissue. Plant.Physiol., 43, 1455-1457, 1968.

87./ ZAGORSZKA,N.A., SAMINA,Z.B., BUTENKO,R.G.: Izucsenyie rasztenyij-regeneranzov polucsennih v kulture tkanyej tabaka. Genetika, 7, 23-26, 1971.

Köszönettel tartozom Szilágyi Miklósnénak a citológiai vizsgálat elvégzéséért, és Dr.Vida Gábornak citológiai kérdésekben adott értékes tanácsaiért. Ugyancsak köszönettel tartozom Sz.Breznovits Ágnes kollégámnak és Márton László egyetemi hallgatónak egy-egy kísérletben való közreműködésükért, valamint Szabó Gábornénak és Okos Károlynénak az értékes technikai segítségért.

Külön szeretnék köszönetet mondani néhai Györffy Barna Professzornak, akinek az intézetében az a munka megindult, és jelenlegi igazgatómnak, Dr.Alföldi Lajosnak a téma támogatásáért, mellyel a munka elvégzését lehetővé tette.