

Tudományos Tevékenységet Összefoglaló Tézisek

Organogenezis indukciója cukorrépa (*Beta vulgaris* L.) szerv és szövetpreparátumokon

Készítette:

dr. Toldi Ottó

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont

Növénybiotechnológiai Intézet

Gödöllő

1997

1. Tudományos előzmények: az *in vitro* növényregenerációs rendszerek hasznosítása a cukorrépa biotechnológiájában

A betegségellenálló (cerkosporózis, peronoszpóra, rhizománia, lisztharmat, stb.), magas cukortartalmú (legalább 17.5-19.0%) és biomassza produkciójú, az öntözéses gazdálkodás miatti növekvő talaj-sótartalmat elviselő, lehetőleg herbicidrezisztens, szinkronizáltan virágzó és monogerm, valamint magas csírázási erélyű (legalább 90-95%) ideális cukorrépa genotípus előállítására hagyományos nemesítési módszerekkel csaknem lehetetlen, vagy csak nagyon hosszú idő alatt megoldható feladat. Ez köszönhető részben az inproductív *in vivo* szaporítási technikáknak, a cukorrépa nemesítésben felhasználható hasznos génkészlet szűkös voltának, a faj- és nemzetségkeresztezések limitált lehetőségének és az indukált mutagenézis (besugárzás) alacsony hatékonyságának.

Az alábbiakban egy összefoglaló következik arról, hogy az *in vitro* biotechnológiai módszerek milyen segítséget tudnak nyújtani a cukorrépa nemesítéséhez.

A kallusz- és sejtszuspenziós kultúrák hasznosítása

Az *in vitro* tenyésztés már önmagában is mutagén hatású lehet a genetikailag instabil, dedifferenciálódott sejtekből álló kallusz- és szuszpenziós kultúrákra, különösen ha a táptalajt még valamilyen mutagén ágenssel is kiegészítjük. A cukorrépa kallusz és szuszpenziós kultúráiban, a folyamatos szelekciós nyomás fentartásával *in vitro* szelekciós rendszereket fejlesztettek ki herbicidekkel (glifozát és paraquat), *Cercospora beticola* -val, NaCl-al és antibiotikumokkal szembeni tolerancia szintjének meghatározására. A kallusz szinten herbicid-, *Cercospora* - és sórezisztens vonalak a növényregeneráció után is többé-kevésbé megőrizték ezen tulajdonságukat, így nemesítési programok résztvevőivé váltak. A genetikai transzformációs kísérletekben szelekciós markerként használt különböző antibiotikum rezisztencia gének jelenléte és expressziós volumene (tehát a genetikai transzformáció sikeressége) az adott antibiotikummal szembeni rezisztencia szintjén mérhető le. Ez a mesterséges rezisztencia azonban relatív, értékeléséhez ismernünk kell a nem transzgénikus kontroll

explantumok antibiotikum toleranciáját. Ezért volt jelentős eredmény az, hogy Catlin (1990) meghatározta a nem transzgénikus cukorrépa explantumok szubletális és letális dózisát az e célra leggyakrabban használt antibiotikumok tekintetében (geneticin, gentamycin, hygromycin, kanamycin és phleomycin).

Eredeti haploid klónozási technikáról számolt be Potyondi és Németh (1994), amikor a nem megporzott ovulum eredetű haploid növényeken kalluszt indukálva izoláltak egy vonalat, amely még másfél év múltán is 80%-ban haploid növényeket regenerált.

Végül, de nem utolsó sorban nagyon fontos alkalmazási területe a kallusz/szuszpenziós kultúráknak a genetikai transzformáció. Kallerhoff és mtsi. (1990) cukorrépa sejtuszuszpenziót transzformáltak sikeresen *Agrobacterium tumefaciens*-sel amely tartalmazta a répa nekrotikus érsárgulás vírus (*BNYVV*) burokfehérje génjét. A *BNYVV* burokfehérje gén vírusrezisztenciát okozó hatását szántóföldi teszt során igazolták. E terület másik fontos eredménye volt a D. Halluin és mtsi. (1992) által létrehozott glüfozinát-ammónium (herbicide) rezisztens cukorrépa, melyet embriogén kalluszból regeneráltak *Agrobacterium tumefaciens* közvetítette transzformáció után.

A protoplaszt-növény rendszerek, a protoplaszt fúziós technikák és az ún. "embryo-rescue" módszer hasznosítása

A növényi protoplasztok alkalmazásának célja kettős. Egyrészt olyan növényélettani kutatások vizsgálati objektumai, melyekben a sejtmembrán permeabilitás változásainak, a membránpotenciál változásainak, valamint az izolált tonoplasztok és egyéb vezikulumok transzportfehérjéinek vizsgálata a cél, természetesen különös tekintettel a szacharóztranszportra és akkumulációra. Másrészt az izolált protoplasztok objektumai lehetnek genetikai transzformációs kísérleteknek is. Protoplasztokat transzformálhatnak tranziens génexpressziós vizsgálatok céljából amikor a molekuláris genetikusok arra kíváncsiak, hogy egy adott génkonstrukció működik-e és hogyan a cukorrépában. Ilyenkor a bejuttatott génkonstrukció nem integrálódik a recipiens sejt genomjába. Ha a mesterséges génkonstrukció integrálódik a recipiens genomba és expresszálódik is, ún. stabil transzformációról

beszélünk. Cukorrépa protoplasztot PEG-módszerrel, ultrahangos szonikálással és elektroporálással transzformáltak, azonban ezekkel a módszerekkel ezidáig nem sikerült transzgénikus cukorrépa növényt előállítani.

Már említettük, hogy a cukorrépánál a faj- és nemzetség keresztezések lehetősége rendkívül kicsi, ami akadályozza a cukorrépa nemesítési génkészletének szélesítését. E probléma megoldására nyújtanak lehetőséget a különböző szimmetrikus és asszimmetrikus protoplaszt fúziós módszerek, valamint az ún. "embryo-rescue" technika. A szimmetrikus protoplasztfúzió eredményeként a két "szülői" genom 1:1 arányban fuzionál, azonban a további osztódások során ez az arány legtöbbször megváltozik. Az asszimmetrikus fúziók esetén szabályozható, hogy a donor genom hány százaléka épüljön be a recipiens genomba. E módszereket a nagy nemzetközi hibridvetőmag előállító cégek fejlesztették ki és használják abból a célból, hogy a cukorrépa vad rokonaiból és őseiből hasznos - gyakran poligénes - tulajdonságokat vigyenek át a termesztett répa szülői vonalaiba.

Az "embryo-rescue" technikát a protoplaszt fúzióval megegyező célra használják abban az esetben, ha a cukorrépa x vad rokon keresztezéskor a megtermékenyített petesejt embrióvá fejlődik, amely embrió csak egy későbbi fejlődési stádiumban abortálódik a két szülő genetikai összeférhetetlensége miatt. Ha az embriót az abortáció előtt megfelelő stádiumban izoláljuk és *in vitro* tenyésztjük, legtöbbször regenerálni lehet az értékes hibrid növényt.

A direkt regenerációs módszerek hasznosítása

A cukorrépa heterózisnemesítéséhez egyidejűleg szükséges fentartani diploid-, triploid-, tetraploid és hímsteril szülői vonalakat, amelynek költségei szántóföldi termesztés esetén, felülmúlják ezen szülői vonalak *in vitro* mikroszaporításának költségeit. A szántóföldi termesztés és a konvencionális nemesítés további technikai nehézsége, hogy a cukorrépa csírázási erélye alacsony, ami az újravetések és a későbbi egyelések miatt jelentősen növeli az amúgy is magas költségeket. Ezen kívül, - mivel a cukorrépa idegen-termékenyülő - a beltenyésztéshez nélkülözhetetlen önbeporzás nagyon kis hatékonyságú. A fentiekből is látszik, hogy a

cukorrépa azon növények közé tartozik, amelyeknél az elit F1 vonalak *in vitro* mikroszaporítása már most rentábilis. Éppen ezért, a genotípus identikus regeneránsokat eredményező, hatékony direkt regenerációs módszereknek közvetlen gazdasági jelentősége van. Nem véletlen, hogy a legnagyobb cukorrépa hibridvetőmag előállító cég a svéd Hilleberg AG. foglalkozik a cukorrépa *in vitro* szomatikus embriogenezisére alapozott mesterséges mag technológia kifejlesztésével.

A direkt regenerációs rendszerek csakúgy mint az indirektek használatosak *in vitro* szelekciós rendszerek kifejlesztésére. Freytag és mtsi. (1990) sőtűró növényeket regeneráltak levéllyél eredetű járulékos rügyekből, 7.6 g l^{-1} koncentrációjú sókeveréket (NaHCO_3 , NaCl , CaCl_2 , MgSO_4 , CaSO_4) tartalmazó RV táptalajon. Direkt organogenezisen alapuló sikeres cukorrépa transzformációs eredményt még nem publikáltak de ez nem jelenti azt, hogy ez a jövőben - a módszer további finomításával - nem lesz lehetséges.

A cukorrépa haploidia hasznosítása

Az utóbbi időkig a termesztett cukorrépa fajták rendszerint tetraploid ($2n = 4x = 36$) és diploid ($2n = 2x = 18$) tenyészanyagok hibridjei voltak. A cukorrépa alapvetően idegentermékenyülő növény, így csak korlátozott számú öntermékenyülés fordulhat elő, ami azonban ha előfordul erős beltenyésztéses leromlást okoz. Az új fajták létrehozásához használt tenyészanyagokat gyakran néhány generáción át tartó ún. teljes testvér vagy féltestvér keresztezésekkel nyerik, következésképpen a kereskedelmi fajták viszonylag heterozigóták.

Homozigóta vonalak létrehozása a kétéves fejlődési ciklusú répánál, beltenyésztéssel nagyon hosszú ideig tart. Ezért van nagy jelentőségük az olyan módszereknek, amelyekkel a homozigótaság gyorsabban elérhető. A fajták kiegyenlítetttségéhez nagyban hozzájárulhat a rediploidizálódott haploid (doubled haploid) növények előállítása. Ez az eljárás legalább 2-3 évvel lerövidítheti az új fajták létrehozásához szükséges időt az allogám növényeknél. A tenyészvonalakat *in vitro* vegetatív mikroszaporítással fenn lehet tartani és így azok folyamatosan a nemesítő rendelkezésére állhatnak. A haploid növények másik fontos előnye, a recesszív allélek kifejeződése, ami növelheti a nemesítés

szempontjából hasznos genetikai tulajdonságok számát. A dihaploid homozigóta növények előállításának jelentősége valójában a heterózisnemesítésben történő felhasználásukon keresztül realizálható.

Az Agrobacterium rhizogenessel transzformált cukorrépa "hairy-root" kultúrák felhasználása

Az *A. rhizogenessel* transzformált cukorrépa "hairy root" kultúráit 3 fő kutatási területen hasznosították. Egyrészt - mivel a transzformáns szövetek/szervek hormonélettani szempontból mutánsnak számítanak - az auxinok és a citokininek hatásmechanizmusát vizsgálták a segítségükkel. Másodsorban, a cukorrépa raktározószerve energiadús objektuma a különféle paraziták támadásának. Ezen paraziták elleni védekezés előfeltétele, hogy megismerjük életmódjukat, ezen belül is a parazitálás mechanizmusát. Ehhez kínál *in vitro* modellrendszert a cukorrépa "hairy root" kultúra, amelyet eddig a *Polymyxa betae* Keskin., a *Heterodera schachtii* Smidt., a *Meloidogyne javanica* Neal., valamint a *Polymyxa betae* nyálkagomba vektorral a gyökéren át bejutó répa nekrotikus érsárgulás vírus /BNYVV/ parazitálási mechanizmusának, illetve az ellenük kiépített rezisztencia fokának a vizsgálatára használták. A cukorrépa "hairy root" kultúrák harmadik felhasználási területe élelmiszer-biotechnológiai. Az ún. táptalaj-köd típusú (nem kevert) bioreaktorokban, a nagy volumenben szaporított járulékos gyökerek jelentős mennyiségű betacianint és betaxanthint termelnek, amelyeket természetes élelmiszeripari adalékként és színezőanyagként hasznosítanak.

2. Célkitűzés

Intézetünkben a cukorrépa molekuláris nemesítésének iránya kettős:

- A. téma:** Egygénes rezisztenciák kialakítása:
- vírusburokfehérje gén mediálta vírusrezisztencia,
 - mannitol-foszfát-dehidrogenáz gén (mtlD) közvetítette szárazság-, só-, fagyűrész

Szövettenyésztési szempontból ez azt jelentette, hogy egy olyan növényregenerációs rendszert kellett létrehozunk, amely alkalmas lehet génpuskás és/vagy *Agrobacterium* közvetítette génbevitelre. Ez mind az **A. téma**, mind a **B. téma** végrehajthatósága szempontjából elsődleges fontossággal bír.

B. téma: A raktározószerv kialakulásának és szacharózákkumulációjának molekuláris élettani vizsgálata, majd módosítása (metabolic engineering) nagyobb cukortermés érdekében.

Szövettenyésztési szempontból ez azt jelentette, hogy a cukorrépa cukoranyagcseréjére ható környezeti és molekuláris élettani folyamatok tanulmányozásához *in vitro* modellrendszert kellett létrehozunk.

Az értekezésben az új növényregenerációs rendszer (**A. téma**) leírását a **3. fejezet** tartalmazza, amely a Toldi O., Gyulai G., Kiss J., Tamás A.I. and Balázs E. (1996): Antiauxin enhanced microshoot initiation and plant regeneration from epicotyl-originated thin-layer explants of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). **Plant Cell Reports** 15:851-854 publikáció kibővített változata.

Az *in vitro* minirépa indukciós rendszer leírását az értekezés (**B. téma**) **4. fejezete** tartalmazza, amely a Toldi O., Gyulai G., Preininger É., Várallyay É., Fári M. and Balázs E. (1994): Minibeet initiation from derooted sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) seedlings *in vitro*. **Plant Science** 97:217-224; valamint a Toldi O., Preininger É., Várallyay É. and Fári M. (1994): *In vitro* minibeet induction system in sugarbeet and redbeet (*Beta vulgaris* L.). In: Rognli O.A., Solberg E. and Schjelderup I. (eds.) Breeding Fodder Crops for Marginal Conditions, pp 311-312. (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht-Boston-London. Printed in the Netherlands) publikációk kibővített változata.

Ennek megfelelően a dolgozat két egymástól független részre tagolódik (3. és 4. fejezet), melyet az kapcsol össze, hogy mind a három indukált szerv (hajtás, adventív gyökér, minirépa) direkt organogenezisen át differenciálódik. Ez a tárgyalási mód azért vált szükségessé, mert két össze nem függő kísérlet sor egységes formai rendszerbe foglalalása több hátránnyal járhat mint előnnyel.

3. Bevezetés

A növényregenerációs rendszer létrehozása (A. téma)

A cukorrépa (*Beta vulgaris* L.) *in vitro* szövettanyészetében direkt organogenezisen át, azaz a szervexplantumon való közvetlen hajtás- és gyökér indukcióval lehet a leghatékonyabban és a legreprodukálhatóbban fertilis, intakt növényt regenerálni mert az indirekt, kallusz fázison keresztüli növényregeneráció nem hatékony. A reprodukálhatóság szempontjából fontos, hogy a direkt organogenezis hatékonysága kevésbé genotípusfüggő. További előnye, hogy a regeneránsok genotípus identikusak, miközben az indirekt úton regeneráltak között magas az aneuploidok aránya, különösen az idősebb kalluszkultúrák esetében. Sikeresen indukáltak járulékos hajtásrügyeket direkt organogenezisen át levélnyélen, levélkorongon és levélfőéren, valamint a levéllemez-levélnyel átmeneti zóna eredetű ún. "thin layer" explantumokon. Szintén járulékos hajtásrügyek differenciációját figyelték meg hajtás-, virágrügy-, vacok- és virágzati tengely szegment explantumokon, amelyek aztán oldalhajtásokká fejlődtek. Ezen módszerek nagy részét felhasználták genetikai transzformáció céljára, de mivel a regenerált hajtások inaktív merisztémákból, alvó rügyekből, egyszóval predeterminált, merisztematikus sejtekből differenciálódtak, ezek a kísérletek nem voltak eredményesek. Ebből a szempontból sikereesebbnek bizonyultak az indirekt regenerációs módszerek, ahol a transzgenikus szövetek ill. növények egyetlen totipotens sejtéből *de novo* differenciálódnak. *Agrobacterium tumefaciens*-el sejtszuszpenziót, hipokotil szegmenteket és embriogén kalluszt transzformáltak sikeresen, de alacsony hatékonyságú növényregenerálásról csak az utóbbi módszer esetében tettek említést. Detrez és mtsi. (1988) olyan direkt organogenezisen alapuló regenerációs rendszert fejlesztettek ki, amely továbbfejlesztés esetén egyesítheti a direkt és az indirekt módszer előnyeit. A levéllemez-levélnyel átmeneti zóna epidermális-szubepidermális régiójából izolált, predeterminált merisztémákat nem tartalmazó "thin layer" explantumokon járulékos rügyeket indukáltak, melyekből kis hatékonysággal genotípus identikus növényeket regeneráltak. Mivel a járulékos rügyek merisztémákat nem tartalmazó

explantumokon, *de novo* differenciálódtak, a módszer alapjává válhat egy új transzformációs eljárásnak, amennyiben hatékonysága növelhető lesz. Kísérletünk fő céljaként olyan explantumforrás lokalizálását tűztük ki, amelyből nagy számban lehet morfogenetikailag rezponzív TLE-ket nyerni.

A növényházi kiültetés szempontjából döntő lépés az effektív gyökereztetés, amely legtöbbször nem részletezett a szerzők által. A regenerált hajtásokon való járulékos gyökér-differenciációt többnyire exogén indol-3-ajsavval indukálták. Exogén auxinok hatására hajtáskultúráink jelentős része gyökeresedés helyett másodlagosan dedifferenciálódott, rontva ezzel a növényregeneráció hatásfokát. Kísérleteink során kifejlesztettünk egy exogén auxin mentes gyökereztetési módszert, melyel szignifikánsan növelni tudtuk növényregenerációs rendszerünk hatékonyságát.

Minirépa indukció (B. téma)

A raktározásra és/vagy vegetatív szaporodásra módosult szervek direkt organogenezissel történő *in vitro* indukciója és kultúrálása, a szövettenyésztés speciális területe.

Hajtáseredetű szervmódosulatokat elsősorban különféle dísz- és ipari növényeknél indukáltak szövettenyészetekben; a liliumféléknél hagymákat, a *Gladiolus* -nál hajtás gumókat, az orchidea féléknél protokormokat, a yam és a burgonya esetében minigumókat. Gyökér eredetű raktározószervet a cukorrépánál (Toldi és mtsi. 1993, 1994abc), a céklánál (Toldi és mtsi. 1993, 1994ac) és a reteknel indukáltak *in vitro* (Fári és Andrásfalvy 1994).

A minirépa indukció jelentősége a modellnek tekintett burgonya minigumó indukciós rendszer segítségével demonstrálható, amely új lehetőségeket nyitott a burgonya biotechnológiájában. Vírusmentes vonalakat hoztak létre a minigumó vegetatív szaporítószervként való felhasználásával. Lehetővé vált *in vitro* modellen tanulmányozni a raktározásra ható környezeti, élettani tényezőket és a gumófejlődés molekuláris genetikai regulációját. Az *in vitro* gumóindukció felhasználásával új biotechnológiai módszereket fejlesztettek ki. Transzgénikus burgonyát állítottak elő minigumó szeletek

Agrobacterium tumefaciens közvetítette transzformációjával, valamint protoplaszt-növény rendszer hoztak létre minigumó eredetű protoplasztból való növényregenerálással. Az általunk kifejlesztett *in vitro* minirépa indukciós rendszer hasonló eredmények kezdeti lépésévé válhat a cukorrépa esetében.

4. A kísérletek anyaga és módszere

Kísérleteinkhez az alábbi cukorrépa genotípusokat használtuk: DM.8803+ (diploid, monogerm szülői vonal), SZM.2+ (diploid, monogerm szülői vonal), TMI.8049+ (tetraploid, monogerm szülői vonal), TM.8714+ (tetraploid, monogerm szülői vonal), K.1002++ (diploid, monogerm F1 hibrid), K.1047++ (diploid, monogerm F1 hibrid). A kísérletben szereplő szülői vonalak nem szülei a K.1002 és a K.1047 F1 hibrideknek. A fajták eredete: + Cukorrépatermesztési Kutatóintézet, Sopronhorpács; ++ Danisco Seed Co., Holeby, Dánia

A cukorrépa termések felszín-sterilizálását, *in vitro* csiráztatását és a hajtáskultúrák mikroszaporítását általunk optimalizált rendszerekben végeztük. A terméseket detergens oldattal átöblítettük, egy éjszakán át desztillált vízben áztattuk, majd 70%-os (w/v) etilalkoholban 1 percig- és 0.05%-os Hg(II)Cl₂ (w/v) oldatban 10 percig kevertetve felszín-sterilizáltuk. A termések felületéről a fertőtlenítőszereket steril desztillált vízzel való többszöri öblítéssel távolítottuk el. Az *in vitro* csiráztatás céljára cukormentes GM táptalajt használtunk (Toldi és mtsi. 1994abc). A csiráztatást sötétben, 9 cm átmérőjű üveg petri csészében (10 db termés/petri csésze), 25±2°C-on végeztük.

A cukorrépa csiranövény-epikotilok internodális szárrészeinek megnyújtása céljából új módszert fejlesztettünk ki, az etioláció és különböző exogén hormonok (gibberellinsav, indol-3-ecetsav, 6-benziladenin) morfogenetikai hatásának felhasználásával.

A sötétben csiráztatott 2-4 lombszevelésű, gyökeres csiranövényekről izoláltuk az epikotilokat, melyeket PG₀B makro-, mikroelemeket, vitaminokat, 30 gl⁻¹ szacharózt, 7.0 gl⁻¹ agart (Difco, Oxoid), szűrve

sterilizált BAP-t (0.2 mg l^{-1}), 0.1 mg l^{-1} IAA-t és 0.2 mg l^{-1} GA₃-t tartalmazó táptalajra helyeztünk. A pH-t 5.8-ra állítottuk KOH-val (0.1M) és 10mM MES puffer hozzáadásával stabilizáltuk. Az epikotilok internodális szárrészeinek hosszanti megnyújtását három hétig $28\pm 2^\circ\text{C}$ -os termosztátban, teljes sötétségben végeztük, VegBox műanyag konténerekben (Kontaplant KFT, Szentes).

A megnyújtott epikotilok epidermális-szubepidermális régiójából preparált explantumokon járulékos hajtásrügyeket, azokból pedig növényeket regeneráltunk exogén citokinin (BAP: 6-benziladenin) és antiauxin (TIBA: 2,3,5-trijód-benzoészav) alkalmazásával. A megnyújtott epikotilokat apikális (as) és bazális (bs) félre tagoltuk, melyekről eltávolítottuk a leveleket. Az epikotilok epidermális-szubepidermális régiójából Detrez és mtsi. (1988) módszerével "thin layer" explantumokat (TLE) preparáltunk, melyeket tizesével indukáló táptalajt tartalmazó 9 cm-es petri csészékben inkubáltunk. A TLE-k átlagosan 5-8 mm hosszúak, 2-3 mm szélesek és 0.8-1.0 mm vastagok voltak. A hajtásrügy indukáló táptalaj PG_{0B} elemeket és vitaminokat, 25 g l^{-1} szacharózt, 7.0 g l^{-1} agart (Difco, Oxoid), sterilen szűrt BAP-t és TIBA-t tartalmazott egyaránt 1.0 mg l^{-1} koncentrációban. A pH-t 5.8-ra állítottuk KOH-val (0.1M) és 10mM MES puffer hozzáadásával stabilizáltuk. A kéthetes inkubáció 16 ó fény / 8 ó sötét fotoperiódus mellett (2000 Lux , Osram L. 36W/77 Fluora), $25\pm 2^\circ\text{C}$ -on történt. A hajtásrügy indukáció után a hajtásprimordiumokat szeparáltuk, majd tizesével 0.5 mg l^{-1} kinetinnel kiegészített PG_{0B} táptalajt tartalmazó VegBox konténerekbe passzáltuk. A hajtáskultúrát négyhetenkénti tőosztással mikroszaporítottuk.

A regenerált hajtásokat hormonmentes PG_{0B} táptalajon gyökerezettük, mely 20 g l^{-1} szacharózt, 7.0 g l^{-1} agart (Difco, Oxoid), 100 mg l^{-1} NaCl-t és 100 mg l^{-1} aktív szenet (AC) tartalmazott. A pH-t 5.8-ra állítottuk KOH-val (0.1M) és 10mM MES puffer hozzáadásával stabilizáltuk. Az inkubáció 16 ó fény / 8 ó sötét fotoperiódus mellett

(2000 Lux, Osram L. 36W/77 Fluora), $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ -on történt, VegBox műanyag konténerekben.

Kihhasználva az abszcizin sav (ABA) azon hatását, hogy serkenti a raktározószerv differenciációt valamint a raktározószervbe való anyagtranszportot és akkumulációt, minirépakat indukáltunk cukorrépa csiranövény explantumokon *in vitro*. A csiranövényekről eltávolítottuk gyökérzetük gyökércsúcs felé eső felét, azaz a felszívási és az elágazási zónát. Az így előkészített explantumokat IM táptalajra helyeztük, amely kétszeres koncentrációjú MS makro- és mikroelemeket, B₅ vitaminokat, 100 mg l^{-1} aktív szenet, $30\text{-}40\text{ g l}^{-1}$ D-glükózt, 5 g l^{-1} agart (Difco, Oxoid), 0.2 mg l^{-1} BAP-t és 0.2 mg l^{-1} ABA-t tartalmazott. A hormonokat autoklávozás után sterilen szűrve adtuk a táptalajhoz. A pH-t KOH-val 5.8-ra állítottuk majd 10 mM MES puffer hozzáadásával stabilizáltuk. Az explantumokat szubkultúrálás nélkül 90-120 napig inkubáltuk folyamatos szórt fényben, $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ -on, műanyag VegBox konténerekben (10 explantum/Vegbox konténer, genotípusonként 12 ismétlésben). A TLF-ek differenciációját 0.2 mg l^{-1} BAP-val kiegészített IM táptalajon figyeltük meg mikroszaporított cukorrépa hajtáskultúrákban.

Összehasonlító szövettani vizsgálattal igazoltuk a szántóföldi cukorrépak és a "lombikrépak" raktározószervének anatómiai azonosságát. A szövettani vizsgálat céljára a szövetmintákat 24 óráig 30%-os ethanolban fixáltuk majd ethanol, ethanol-xylol oldatsorozatban víztelenítettük, oldatonkénti 30 perces inkubálással (ethanol sorozat: 50-70-96-100%; ethanol/xylol sorozat: 2:1, 1:1, 1:2). A fixált és víztelenített mintákat paraffinba ágyasztuk majd 15-20 μm vastagságúra metszettük. A metszeteket 50%-os ethanolban oldott 2%-os toulidin-kékkel festettük meg, majd 16.5-25.0 X nagyítás mellett fénymikroszkóppal vizsgáltuk.

A minirépak relatív szacharóz akkumulációját egy indirekt módszerrel a D-glükóz tartalomból határoztuk meg. A cukorrépa hajtás, TLF, minirépa és szántóföldi répa mintákat (mindegyikből 1 g-ot) 2 ml

deszillált vízzel homogenizáltuk. Ezután feltöltöttük a mintákat 6.0 ml-re majd egyenként 200 µl Carrez I (3.60 g kálium-hexacianoferrát/100 ml dv) és 200 µl Carrez II (7.20 g cink-szulfát/100 ml dv) oldatot adtunk hozzájuk erőteljes keverés mellett. A reakcióelegyek pH-ját 7.5-re állítottuk. Oktanol (10 µl) hozzáadása után 10 ml-re töltöttük fel a mintákat majd szűrőpapíron leszűrtük. A D-glükóz koncentrációt GOD (glükóz-oxidáz) - POD (peroxidáz) módszerrel mértük a mintákhoz való élesztő invertáz hozzáadása előtt és után. Az első méréssorozattal meghatároztuk a minták primer D-glükóz koncentrációját, a másodikkal - a minták szacharóz-tartalmának enzimátikus hidrolízise után - a hidrolizált szacharózból származó többlet D-glükóz koncentrációját. A minták szacharózkoncentrációit ezen két adatsorból közvetve kaptuk. A mérésekhez analitikai tisztaságú reagenseket használtunk (GOD - Sigma, POD - Reanal, o-dianizidin - Fluka, invertáz - Sigma).

A kísérleteket minden esetben 6 ismétlésben végeztük, 2 ismétlésenként külön időpontban. Az adatokat középérték-analízissel értékeltük, a szórásokat a középértékek eltéréséből számoltuk.

5. Eredmények

A növényregenerációs rendszer létrehozása (A. téma)

A mi kísérleti körülményeink között és az általunk használt genotípusok esetében, a levéllemezzel-levélnyél átmeneti zónájából preparált "thin-layer" explantumok (TL explantumok) regenerációs rátája nem bizonyult elégségesnek egy hatékony transzformációs rendszer kialakításához, ezért fő célként megfelelőbb TL explantum forrás lokalizálását tűztük ki. Mivel a levél különböző részei mellett főként hajtásszegment explantumokat használtak fel direkt organogenezisen keresztüli növényregenerálás céljára, ezért mi a fiatal cukorrépák izolált epikotiljaiból preparáltunk Detrez és mtsi. (1988) módszere szerint TL explantumokat (TLE). Az átlagos hosszúságú epikotilokból korlátozott számban (2.37 db TLE/epikotil) tudtunk TLE-eket nyerni, ezért etiolációval és exogén hormonok alkalmazásával megnyújtottuk azokat. Az epikotilok megnyújtásakor az *in vivo* nevelt cukorrépák genetikailag

determinált virágzati tengely képzésére ható környezeti és hormonális faktorokat modelleztük *in vitro*.

Ismeretes, hogy etiolációval önmagában is elérhető az intakt csiranövények és/vagy izolált szervek abnormálisan nagymértékű megnyúlása. A mi kísérletünkben is az etioláció játszotta a kulcsszerepet, hiszen hatására az epikotilok átlagos hosszúsága több mint duplájára (0.83 cm-ről 1.71 cm-re) nőtt a hormonmentes PGOB táptalajon. A sejtosztódásban és a sejtmeignyulásban döntő szerepet játszó hormonok - citokininek, gibberellinsav, auxinok - és az etioláció együttes alkalmazásával értük el a maximális eredményt. Ekkor az epikotilok hossza 0.83 cm-ről 4.57 cm-re, több mint 5.5-szörösére növekedett. Ez tette lehetővé, hogy az epikotilonkénti 2 db TLE helyett, 13 db-ot használhattunk fel a hajtásrügy indukcióra.

A direkt organogenezis hatékonysága az endogén indol-ecetsav (IAA) és/vagy etilén közvetítette apikális dominancia hatástalanításának a függvénye. Ugyanis az aktívan osztódó hajtásmerisztémák által termelt endogén IAA/etilén, egy adott koncentrációban gátolja az oldalrügyek kihajtását és a már specializálódott sejtek osztódási képességének másodlagos visszanyerését. Az apikális dominanciát kezdetben az exogén citokininek és auxinok együttes alkalmazásával gátolták, majd az auxinokat elhagyva csak 0.1-0.5 mg/l 6-benziladeninnel (BAP). A direkt regenerációs módszerek hatékonysága jelentősen javult, amikor az apikális dominancia hatását tovább sikerült csökkenteni antiauxinok alkalmazásával - nevezetesen trijód-benzooesavval (TIBA) - ami inhibítora a poláris auxin transzportnak.

Kísérleteinkben a BAP és a TIBA (mindkettő 1.0 mg^l-1 koncentrációban) együttes használatával átlagosan 2.42-ször több hajtásrügyet kaptunk TL explantumonként mint a BAP egyedüli alkalmazásával. Még nagyobb különbség adódott a BAP+TIBA, valamint a BAP+IAA (mindegyik 1.0 mg^l-1 koncentrációban) kezelések összehasonlítása során. Citokinin-antiauxin kezelés hatására átlagosan 4.21-szer több hajtásrügy differenciálódott TL explantumonként, mint a citokinin-auxin kezelés hatására. A fenti eredmények is alátámasztják azt a feltevést, hogy a cukorrépa esetében szoros korreláció van a különböző explantumok magas endogén auxin koncentrációja és az alacsony regenerációs frekvencia között. Hooker és Nabors (1977)

figyelte meg először a TIBA cukorrépa szövettenyészetekre gyakorolt pozitív hatását, ami esetükben kis hatékonyságú hajtásregenerációban nyilvánult meg. Detrez és mtsi. (1988, 1989) hatékonyan regeneráltak BAP, NAA (α -naftilecetsav) és TIBA segítségével növényeket levélnyél explantumokon de a levéllemez-levélnyél átmeneti zóna eredetű TL explantumokon a TIBA erős nekrotikus-vitrifikációs hatása miatt, csak a BAP (5.0 mg l^{-1}) NAA (0.5 mg l^{-1}) kombináció volt eredményes. A mi kísérletünkben a kéthetes indukciós kezelés alatt nem tapasztaltunk nekrotikus-vitrifikációs tüneteket az epikotil eredetű TLE-ken. Ha explantumainkat több mint 3-4 hétig inkubáltuk a TIBA-t (1.0 mg l^{-1}) tartalmazó indukciós táptalajon, akkor olyan reverzibilis morfológiai aberrációkat figyeltünk meg, amelyek a mikroszaporító táptalajra ($\text{PG}_{\text{OB}} 0.5 \text{ mg l}^{-1}$ kinetinnel kiegészítve) való passzálás után megszűntek oly módon, hogy az újonnan növekvő levelek már normális fenotípusúak voltak. Ha tovább inkubáltuk (6-7 hétig) a TLE eredetű hajtásrügyeket a TIBA tartalmú táptalajon, akkor a morfológiai aberrációk irreverzibilissé váltak, az aberráns hajtásokból nem tudtunk gyökeres növényt regenerálni. Ha a TIBA koncentrációt magasabbra emeltük (magasabbra mint 1.5 mg l^{-1}) egyre nagyobb számban figyelhettük meg a Detrez és mtsi. (1988, 1989) által leírt ún. "leafy plants"-ek differenciációját, melyekből szintén nem tudtunk normális habitusú növényeket regenerálni. Valószínűleg szintén az endogén auxinszint különbségei játszanak szerepet abban, hogy a megnyújtott internódusú epikotilok bazális (bs), ill. apikális (as) feléből származó TL explantumok eltérő morfogenetikai tulajdonságokkal rendelkeztek. Amíg a bazális szegment eredetű TL explantumokon (bsTLE) hormonmentes táptalajon is erős adventív gyökér differenciációt figyeltünk meg, addig az apikális szegment eredetű TL explantumokon (asTLE) még 1.0 mg l^{-1} IAA-t tartalmazó táptalajon sem tapasztaltunk hasonlót. Annak ellenére, hogy az asTLE-ken a hajtásdifferenciáció hatékonysága 1.31-szerese volt a bsTLE-ken tapasztaltak, az intakt növények regenerálásának szempontjából mégis a bsTLE-k bizonyultak megfelelőbbnek. Egy, a későbbiekben részletezendő számítás szerint a regenerációs ciklus végén 1.12-szer több bsTLE eredetű növényt ültethettünk üvegházba, mint asTLE eredetűt. Az epikotilok bazális (bs),

illetve apikális (as) feléből preparált TLE-k megőrizték az intakt epikotilra jellemző longitudinális morfogenetikai polaritást amelyet molekuláris genetikai módszerekkel is bizonyítottan az endogén IAA poláros transzportja és non-random akkumulációja eredményez. Előkísérleteink során a hajtásrügy indukció és szeparáció után a hajtásokat folyamatosan BAP-t tartalmazó táptalajon mikroszaporítottuk. Eközben az egymást követő szubkulturálások során a leveles hajtások egyre fokozódó vitrifikációját figyeltük meg, más szerzőkhöz hasonlóan. Eredményesen gátolták a vitrifikációt más citokininek, így a ZEA (zeatin), 2iP (izopentenil-adenin) alkalmazásával. A mi rendszerünkben a PG_{0B} táptalaj+0.5 mg l⁻¹ KIN (kinetin) kombináció eredményezte a fenotipikusan legmegfelelőbb növényeket.

Az exogén IBA (indol-3-vaajsav) indukálta adventív gyökér-differenciáció végére a regenerált növények 30%-a a szekunder dedifferenciáció tüneteit mutatta. A dedifferenciálódott hajtásokból - mégha meg is gyökeresedtek - nem tudunk üvegházi körülmények között életképes növényeket regenerálni. Ezzel szemben a dedifferenciáció nélkül gyökeresedett hajtásokból normál fertilis növényeket neveltünk az üvegházban. James és Thurbon (1979) alma-, Kusey és mtsi. (1980) *Gypsophila* hajtáskultúrák gyökereztetésénél találtak hasonló problémával, amelyet úgy oldottak meg, hogy rövid idejű auxinindukció után auxinmentes gyökereztető táptalajra helyezték a hajtásokat, gátolva ezzel a kalluszosodást. Számunkra az exogén auxinok teljes elhagyása jelentett megoldást. Közismert, hogy a *Chenopodiaceae* családba tartozó növényfajok jelentős része sóturó, köztük a cukorrépa is. Hagége és mtsi. (1990) a táptalajhoz adagolt NaCl-al növelni tudta a cukorrépa habituált- (1.0 g l⁻¹ NaCl) és normál kalluszainak (1.0-4.0 g l⁻¹ NaCl) növekedési rátáját. Eközben az etilén koncentráció és a peroxidáz aktivitás csökkent a tenyészetekben. Milford és mtsi. (1977) szabadföldi NaCl trágyázással növelni tudták a cukorrépa gyökérzetének hosszát és száraz tömegét *in vivo*. Kísérleteinkben a NaCl hormonszerű reguláló hatását használtuk fel a hajtások gyökereztetésére. A regeneránsok 55%-a gyökeresedett szekunder dedifferenciáció nélkül a 100 mg l⁻¹ NaCl-t és aktív szén (AC) tartalmazó PG_{0B} táptalajon. Ez azt jelentette, hogy módszerünkkel 26%-al több intakt fertilis növényt

kaptunk végeredményként, mint az exogén auxin-alapú technikával (PG_{OB}+1.0 mg l⁻¹ IBA). A gyökereztető táptalajba adagolt aktiv szén (AC) a számszerű eredményeket nem befolyásolta, viszont jelenlétében a fejlődő gyökerek gyorsan növekedtek és friss-fehérek voltak.

A megnyújtott epikotilokból preparált TL explantumok (TLE) élettörténetét nyomon követve detektáltuk a teljes növényregenerációs rendszer hatékonyságát. Egy előkezelt epikotilból átlagosan 13 db TLE-t preparáltunk. Ezek mindegyikén 5-6 hajtásrügy fejlődött, tehát epikotilonként több mint 72 db, melyeknek 86.6%-a (63 db) fejlődött normál leveles hajtássá. A ciklusban ezután egy mikroszaporítási lépés következett a TIBA hatásainak eliminációja céljából, melynek során töosztást hajtottunk végre. Egyetlen megnyújtott epikotilból így 126 db növény került gyökereztető táptalajra, amelyen átlagosan 56%-uk (70 db) gyökeresedett meg szekunder dedifferenciáció nélkül. Az üvegházi körülmények között ezen növénykéek 96%-a normál fertilis növénygé fejlődött. Ha a számítást megismételjük az epikotil apikális, illetve bazális szegmentjére vonatkozó adatokkal, akkor azt kapjuk, hogy az epikotilonkénti 68 db fertilis üvegházi növényből 36 db volt bazális szegment-, 32 db pedig apikális szegment eredetű. A regenerációs ciklus *in vitro* szakasza átlagosan 90 napot vett igénybe.

Minirépa indukció (B. téma)

Az *in vitro* minirépa indukció két lépésből álló új szövettenyésztési módszer, amely magába foglalja a csiranövény explantumok gibberellinsavas előkezelését és magát a minirépa indukciót.

A GM (GMH⁻ és GM+GA₃) csiráztató táptalaj minimál-táptalajnak tekinthető, összeállításakor abból indultunk ki, hogy a termés rendelkezik a csirázáshoz szükséges tápanyagokkal. Az MS táptalaj minden olyan összetevőjét elhagytuk, amelynek nem volt egyértelműen pozitív hatása a csirázásra. Gibberellinsavat (GA₃) azért alkalmaztunk az előinkubáció során, mert egyrészt kísérleteinkben szignifikánsan növelte a csirázás hatékonyságát és csökkentette az első gyököcské megjelenéséig eltelt időt. Másrészt az *in vivo* kísérletek eredményei szerint, serkenti a korai polikambiális pászták kialakulását a fiatal cukorrépa gyökerében és hipokotiljában. Palmer (1966) és Ricardo

(1976) kísérleteiben a GA₃ növelte a savas invertáz aktivitását a hipokotilban és a gyökérben a csirázás utáni néhány hetes periódusban. A savas invertáz bontja a fotoszintetizáló levelek felől transzportálódó szacharózt a fiatal abszorbeáló gyökérben, D-glükóz monomereket szolgáltatva a fokozott sejtfalképzés miatti megnövelt volumenű cellulózsintézishez.

Az abszcizinsavról (ABA) ismert, hogy serkenti a raktározószervekbe történő kiválasztást, a tápanyagtranszportot és hatással van a cukorakkumulációra. Például szőlőnél fokozza a cukorfelhalmozást a bogyókban oly módon, hogy serkenti a szacharóz citoszolbeli transzlokációját a tonoplastba a mezokarpium parenchymatikus raktározósejteiben. *In vitro* kísérletekben megfigyeltek ABA indukálta minigumókat yam hajtástenyészetekben, ahol a hatékony hormonkoncentráció 0.3 mg l⁻¹ volt. Burgonyánál az 1.5 mg l⁻¹ ABA-t tartalmazó MS táptalajon háromszor annyi minigumó fejlődött, mint a hormonmentes kontrollon. A mi kísérleteink során is egyértelmű volt az ABA elsődleges szerepe a minirépa indukcióban. Az aktív szén pozitívan hatott a répatestképzésre. Feltételezésünk szerint, egyrészt adszorbensként raktározta az indukciós táptalaj tápanyagait, lehetővé téve azok időben egyenletes felvehetőségét. Másrészt, a minirépa indukció szempontjából káros explantum dedifferenciációs folyamatok sokkal kisebb mértékben jelentkeztek a 100 mg l⁻¹ aktív szenet tartalmazó indukciós táptalajon, mint az aktív szén nélkülin. Az aktív szén dedifferenciációt gátló hatását néhány esetben már bizonyították.

A cukorrépa raktározószerve epikotil, hipokotil és gyökér eredetű. A hipokotilból differenciálódott répanyak keresztmetszetének átnézeti képén látható a *Beta vulgaris* L. fajkörbe tartozó, raktározó gyökerű növényekre jellemző polikambiális vaszkuláris rendszer. Fénymikroszkópos vizsgálataink során, a polikambiális gyűrűk megléte vagy hiánya alapján igazoltuk a mini- és a normál cukorrépák raktározószervének szövetszerkezeti azonosságát.

A cukorrépa szacharóz formájában akumulálja a cukrot a répatest szállítóyalábokat övező parenchymatikus rétegeiben. Ezért először megmértük és összehasonlítottuk a minirépák és a szántóföldi répák raktározószervének szacharóz tartalmát. Másodsorban a répatestekben mért szacharóz koncentrációt vetettük össze a leveles hajtásokban és a

TL-formációkban (gumószerű, szacharózt nem raktározó neomorf) mérttel. Ezek alapján igazoltuk a minirépak relatív szacharóz akkumulációját, amely közel azonos volumenű volt mint az ugyanazon genotípusba tartozó szántóföldi cukorrépak esetében. A hajtáseredetű TL-formációk nem akkumuláltak szacharózt.

6. Az új tudományos eredmények összefoglalása

A cukorrépa szövettenyésztése során a növény ontogenezisének két fontos lépését nem modellezték ezidáig *in vitro*; a hosszú szártagú virágzati tengely/szár (**A. téma**) és a raktározó répatest (**B. téma**) differenciációját.

A növényregenerációs rendszer létrehozása (A. téma)

A cukorrépa kétéves növény ami azt jelenti, hogy az első évben raktározószervet és tőlevélrózsát fejleszt, a második évben pedig a rövid szártagú tőlevélrózsa (répafej) közepén egy hosszú szártagú virágzati tengely (tőszár) differenciálódik amely hordozza a reprodukív szerveket. Az *in vitro* tenyészetekben annyiban hasonló a helyzet, hogy a szövettenyésztett cukorrépa növénykéik is tőlevélrózsás felépítésűek, azaz szemmel látható száruk nincsen.

⇒ A szár internodális szegmentjeinek *in vitro* megnyújtásával olyan új explantum forrást nyertünk, amelynek segítségével hatékony direkt növényregenerációs módszert lehetett kidolgozni a rekalcitráns cukorrépa esetében.

⇒ A megnyújtott hajtások epidermális-szubepidermális régiójából preparált ún. "thin-cell-layer" explantumokon járulékos rügyeket, azokból leveles hajtásokat regeneráltunk.

⇒ Új módszert fejlesztettünk ki a hajtáskultúrák hatékonyabb *in vitro* gyökereztetése érdekében.

Ezen direkt növényregenerációs módszer a konvencionális mikroszaporítás mellett - reményeink szerint - alkalmas lesz *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes* és/vagy génpuska közvetítette genetikai transzformáció céljára.

Minirépa indukció (B. téma)

⇒ A cukorrépa és cékla csiranövények speciális előkezelésével, majd az ezt követő ún. "long-term" indukciójával sikerült - a burgonya minigumó analógiájára - minirépakat indukálni. Ez az eredmény egyben az első nemzetközi publikációkat jelentette a raktározásra módosult gyökerek *in vitro* indukciója területén (Toldi és mtsi. 1993, 1994abc).

⇒ Szövetteni vizsgálatokkal - a polikambiális vaszkuláris rendszer jelenlétének igazolásával - bizonyítottuk, hogy a minirépa anatómiailag valódi répatest. Ráadásul méréseink szerint a minirépa szacharózt is akkumulál, tehát funkcionálisan is raktározószerv.

Mindezek alapján a minirépa lehetőséget kínál a répatestképzés molekuláris hátterének, a répatestképzésre ható környezeti faktoroknak, valamint a raktározószerv szacharóz akkumulációjának - *in vitro* modellrendszerben történő - vizsgálatára. Ezen kívül - mint parenchymatikus sejtekben gazdag, *in vitro* indukálható szerv - potenciális protoplaszt forrásként is szóba jöhet.

7. Az értekezés témaköréhez kapcsolódó közlemények

Lektorált közlemények:

Toldi O., Gyulai G., Preininger É., Várallyay É., Fári M. and Balázs E. (1994): Minibeet initiation from derooted sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) seedlings *in vitro*. **Plant Science** 97/2:217-224

Toldi O., Preininger É., Várallyay É. and Fári M. (1994): *In vitro* minibeet induction system in sugarbeet and redbeet (*Beta vulgaris* L.). In: Rognli O.A., Solberg E. and Schjelderup I. (eds.) **Breeding Fodder Crops for Marginal Conditions**, pp 311-312. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht-Boston-London. Printed in the Netherlands.

Toldi O., Gyulai G., Kiss J., Tamás A.I. and Balázs E. (1996): Antiauxin enhanced microshoot initiation and plant regeneration from epicotyl-originated thin-layer explants of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). **Plant Cell Reports** 15:851-854

Előadás és konferencia összefoglalók:

Toldi O., Gyulai G. and Balázs E. (1991): Antiauxin regulated induction of morphogenesis in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) tissue culture. *Seminar at the Danisco Seed Biotechnology, Holeby, 4th August, Denmark.*

Toldi O., Pedersen H.C. and Madsen P. (1992): Transfer of the *Beta maritima* L. originated CMS character to the sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) by somatic hybridisation and plant regeneration from the hybrid protoplasts. *I. Scientific Days of Agricultural Biotechnology Center, Gödöllő, 10-11th January, Hungary.*

Toldi O., Pedersen H.C. and Madsen P. (1993): Transfer of the chromosome segments and extrachromosomal characters by asymmetrical hybridisation of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) and sea beet (*Beta maritima* L.) protoplasts. *I. Symposia for Cell and Developmental Biology, Debrecen, 24-27th January Hungary. In: Program Book, pp 7*

Toldi O., Preininger É., Várallyay É. and Fári M. (1993): *In vitro* minibeet induction system in sugarbeet and redbeet (*Beta vulgaris* L.). XVIII. EUCARPIA FodderCrops Section Meeting, Loen, 25-28th August, Norway, *In: Abstracts of Posters, pp 68-69*

Toldi O., Gyulai G., Preininger É., Várallyay É., Fári M. and Balázs E. (1994): Minibeet induction on sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) seedlings *in vitro*. *I. Scientific Conference of the Hungarian Plant Breeding, 11-12th January, Budapest, Hungary. In: Proceedings of the Conference, pp 86*

8. Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó közlemények

Lektorált közlemények:

Toldi O., Sorvari S., Mitykó J., Fekete C., Ahanen K. and Hiirsalmi H. (1996): Cell division cycle monitoring by culture-level RAPD and flow cytometry during carrot somatic embryogenesis. **Cell Biology International** Vol. 20, No. 3, pp 232

Sorvari S., Toldi O., Ahanen K., Viinamaki T., Hakonen T. and Tahvonen R. (1997) Polysaccharides and galactomannans as gelling agents in capsule formation of artificial seeds. **Journal of American Society of Horticultural Sciences** (in press)

Jenes B., Toldi O., Bittencourt P., Nagy I., Csányi Á. and Balázs E. (1997) The Genebooster, a novel tool for molecular breeding of plants. **Hungarian Agricultural Research** (in press)

Bakos Á., Fári M., Toldi O. and Lados M. (1995): Plant regeneration from seedling-derived callus of dodder (*Cuscuta trifolii* Bab. et Giggs). **Plant Science** 109:95-101

Jenes B., Bittencourt P.A.L., Csányi Á., Pauk J., Nagy I., Toldi O. and Balázs E. (1996): The Genebooster - a new microparticle bombardment device - for genetic transformation of plants. **Plant Tissue Culture and Biotechnology** 2/1:42-51

Előadás és konferencia összefoglalók:

Toldi O., Várallyay É. and Fári M. (1993): Inducible, extracellular hydrolysis of a starch based gelling complex (Nutrigel) in *in vitro* cultures of higher plants. *II. Scientific Days of Agricultural Biotechnology Center, Gödöllő, 18-19th February, Hungary.*

Fári M., Nagy I., Toldi O., Csányi M. and Andrásfalvy A. (1993): *Agrobacterium* mediated transformation of cotyledon explants in eggplant (*Solanum melongena* L.) and transgenic plant regeneration via somatic embryogenesis. *II. Scientific Days of Agricultural Biotechnology Center, Gödöllő, 18-19th February, Hungary.*

Toldi O., Várallyay É. and Fári M. (1994): Metabolism studies of a Nutrigel-based synthetic endosperm in artificial seed. *II. Symposia for Cell and Developmental Biology, Szeged, 3-5th January, Hungary. In: Proceedings of the Conference, pp 5*

Toldi O., Mitykó J., Nagy I., Szász A., Andrásfalvy A. and Fári M. (1994): Development of plant genetic transformation systems by the methods of plant breeding, tissue culture and molecular genetics. *III. Scientific Days of Agricultural Biotechnology Center, Gödöllő, Hungary.*

Toldi O., Várallyay É., Sorvari S. and Fári M. (1994): Can the embryogenic and non-embryogenic plant cell, tissue cultures be distinguished relying upon their secreted hydrolases? *VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture (IAPTC) Firenze, 12-17th June, Italy. In: Book of Abstracts, pp 182*

Fári M., Szász A., Nagy I., Toldi O., Mitykó J. and Andrásfalvy A. (1994): Development of tissue culture and gene transfer systems in pepper (*Capsicum annum* L.) and eggplant (*Solanum melongena* L.); difficulties and results. *VIII. International Congress of Plant Tissue and Cell Culture (IAPTC) Firenze, 12-17th June, Italy. In: Book of Abstracts, pp 136*

Toldi O. (1994): The scientific and economic bases of the Hungarian biotechnology. *Japan Ministry of Trade and Industry (MITI), Tokyo, 6th June, Japan. In: Proceedings of the Country Report Presentations, pp 113-139*

Toldi O. (1994): Comprehensive evaluation of the Japanese and Hungarian biotechnology. *Japan Bioindustry Association, Nagoya, 28th July, Japan. In: Introduction of Bioindustries in Developing Countries, pp 34-38*

Sorvari S., Toldi O., Mitykó J., Fekete C., Ahanen K. and Fári M. (1994): Artificial seeds and genetic stability of carrot somatic embryos. *In: Annual Reports 1993-94 of MTT Institute of Horticulture, Piikkiö, Finland, pp 19-20*

Sorvari S., Ahanen K., Fári M., Keller W., Pitkäranta T., Robert L. and Toldi O. (1994): Transformation of carrot somatic embryos with insect resistance gene. *In: Annual Reports 1993-94 of MTT Institute of Horticulture, Piikkiö, Finland, pp 20-21.*

Toldi O. and S. Sorvari (1994): Biodegradable synthetic endosperm for artificial seed technology; an embryo- purse- and environmental friendly solution. *Seminar at the Department of Biochemistry, University of Turku, 20th December, Finland.*

Toldi O., Sorvari S., Mitykó J., Fekete C., Ahanen K., Fári M. and Hiirsalmi H (1995): Life-history fingerprinting of carrot (*Daucus carota* L.) somatic embryogenesis by RAPD method. *IV. Scientific Days of Agricultural Biotechnology Center, Gödöllő, 10-11th February, Hungary.*

Toldi O., Sorvari S., Mitykó J., Fekete C., Ahanen K. and Hiirsalmi H. (1995): Circle-like genetic dis- and rearrangement during carrot somatic embryogenesis detected by RAPD technique and flow cytometry. *2nd International Conference of the Hungarian Biochemical Society, Section of Cell Cycle Control, Szeged, 20-23rd August, Hungary. In: Program and Abstract Book, pp 123*

Toldi O., Sorvari S., Mitykó J., Fekete C., Ahanen K. and Hiirsalmi H. (1995): Tissue culture level RAPD and flow cytometry: a tool for optimization of somatic embryo quality and production. *In: Lecture Proceedings and Laboratory Manual of 1. International Training Course on Plant Somatic Embryogenesis and Artificial Seed Technology, pp 6-13. Organized by MTT/Institute of Horticulture, Piikkiö and University of Turku, 30th October-3rd November, Finland*

Toldi O. (1995): An important precondition of large-scale somatic embryo production: on-line biosensor driven bioreactor. *In: Lecture Proceedings and Laboratory Manual of 1. International Training Course on Plant Somatic Embryogenesis and Artificial Seed Technology, pp 23-32. Organized by MTT/Institute of Horticulture, Piikkiö and University of Turku, 30th October-3rd November, Finland*

Toldi O. and Sorvari S. (1995): Future prospects in artificial seed engineering: molecular level tissue culture processing, on-line biosensing, economical prepacking. *Seminar at the Department of Plant Physiology, University of Turku, 3rd November, Finland*

Sorvari S., Toldi O., Mitykó J., Fekete C., Ahanen K., Fári M and Hiirsalmi H (1995): Artificial seeds and genetic stability of carrot (*Daucus carota* L.) somatic embryos. *International Meeting of COST 822 Working Group 5, on Mechanisms and Markers of Regeneration and Genetic Stability, 26-30th April, Prague, Czech Republic.*

Toldi O., Sorvari S., Mitykó J., Fekete C., Ahanen K., Fári M. and Hiirsalmi H. (1995): Controlled amplification of somaclonal variation: a tool for increasing genetic diversity. *XIV. EUCARPIA Conference on Adaptation in Plant Breeding, Jyväskylä, 31st July-4th August, Finland. In: Book of Abstracts, pp 19*

Sorvari S., Ahanen K., Fári M., Keller W., Pitkäranta T., Robert L., Toldi O. and Hiirsalmi H. (1995): Transformation of carrot somatic embryos with insect resistance gene. *XIV. EUCARPIA Conference on Adaptation in Plant Breeding, Jyväskylä, 31st July-4th August, Finland. In: Book of Abstracts, pp 70-71*

Toldi O., Sorvari S., Mitykó J., Fekete C., Ahanen K. and Hiirsalmi H. (1995): Tissue culture level RAPD and flow cytometry: a tool for evaluation of different *in vitro* treatments and methods. *Gotlieb Haberlandt International Commemorative Session and Plant In Vitro Culture Conference, Mosonmagyaróvár, 1-3rd September, Hungary. In: Proceedings of the Conference, pp 122 [P23]*

Jenes B., Bittencourt P.A.L., Csányi Á., Pauk J., Nagy I., Toldi O. and Balázs E. (1995): Application of the Genebooster for higher transformation frequency in recalcitrant plants. *Gotlieb Haberlandt International Commemorative Session and Plant In Vitro Culture Conference, Mosonmagyaróvár, 1-3rd September, Hungary. In: Proceedings of the Conference, pp 46*

Sorvari S., Toldi O., Mitykó J., Fekete C., Ahanen K. and Hiirsalmi H. (1995): Somatic embryogenesis: background and applications. *In: Lecture Proceedings and Laboratory Manual of 1. International Training Course on Plant Somatic Embryogenesis and Artificial Seed Technology, pp 3-5. Organized by MTT/Institute of Horticulture, Piikkiö and University of Turku, 30th October-3rd November, Finland*

Sorvari S. and Toldi O. (1995): From somatic embryos to artificial seeds. In: *Lecture Proceedings and Laboratory Manual of I. International Training Course on Plant Somatic Embryogenesis and Artificial Seed Technology*, pp 33-34. Organized by MTT/Institute of Horticulture, Piikkiö and University of Turku, 30th October-3rd November, Finland

Toldi O., Sorvari S., Mitykó J., Fekete C., Ahanen K. and Hiirsalmi H. (1996): Genotype identity of somatic embryo originated R0 generation of carrot plants (*Daucus carota* L.) evaluated by RAPD technique and flow cytometry. III. *Scientific Conference of the Hungarian Plant Breeding*, 22-23rd January, Budapest, Hungary. In: *Proceedings of the Conference*, pp 94

Sorvari S., Toldi O., Ahanen K., Viinamäki T., Hakonen T. and Tahvonen R. (1996): Encapsulation of somatic embryos by using combinations of gelling agents. *International Meeting of COST 822 Working Group 5, on Mechanisms and Markers of Regeneration and Genetic Stability*, 1-5th May, Turku, Finland. In: *Book of Extended Abstract*, pp 31