B3485

Solanum tuberosum + *Solanum brevidens* szomatikus hibridek létrehozása és jellemzése

Egyetemi doktori értekezés

Írta: Preiszner Johanna

Készült: MTA SZBK Növénytani Intézet
Témavezetõ: Dudits Dénes és Fehér Attila

1. BEVEZETÉS 2

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 4

2.1. Növényregenerálás protoplasztokból 4

2.2. Protoplasztok fúziója és a hibridek azonosítása 6

2.3. A hibridek citológiai jellemzői 8

2.4. A morfológiai bélyegek megnyilvánulása szomatikus hibridekben 9

2.5. *Solanum* fajokkal végzett szomatikus hibridizáció főbb eredményei 10

2.6. A szomatikus hibridek növénynemesítési felhasználásának lehetőségei 11

3. ANYAG ÉS MÓDSZER 13

3.1. Sejt- és szövettenyésztési módszerek 13

3.1.1. Növényi anyag 13

3.1.2. Protoplasztok izolálása, tenyésztése és növényregeneráció a tenyésztett sejtekből 13

3.1.3. Protoplaszt fúzió és a fúziós termékek azonosítása 14

3.2. Molekuláris genetikai módszerek 14

3.2.1. Plazmid molekulák, DNS fragmentumok izolálása 14

3.2.2. *S. brevidens* klóntár készítése és fajspecifikus szekvencia izolálása 14

3.2.3. Növényi DNS tisztítása 15

3.2.4. DNS-DNS hibridizáció ("Southern" analízis) 15

3.2.5. A fajspecifikus fragmentum bázissorrendjének meghatározása és elemzése 16

3.3. A szomatikus hibridek jellemzése 17

3.3.1. Morfológiai bélyegek felmérése és sokváltozós analízis használata a morfológiai adatok értelmezésében 17

3.3.2. Izoenzim mintázat analízis 18

3.3.3. RFLP analízis 18

3.3.4. Kromoszómaszám meghatározása 18

3.3.5. Levélsodródási vírus (PLRV) rezisztencia 18

3.3.6. Fagytűrés kifejeződésének vizsgálata 19
4. EREDMÉNYEK 20
4.1. A szomatikus hibridek előállítása és szelekciója 20
4.2. A hibriditás bizonyítása 20
4.2.1. Restrikciós fragment hossz polimorfizmus (RFLP) 20
4.2.2. Izoenzim mintázat vizsgálata 23
4.2.3. A hibridek kromoszómaszáma 23
4.3. A szomatikus hibridek morfológiája 25
4.3.1. Általános jellemzők 25
4.3.2. A morfológiai adatok többváltozós analízise 31
4.4. A *S. brevidens*-ből származó rezisztencia tulajdonságok megnyilvánulása a hibridekben 34
4.5. *S. brevidens*-specifikus DNS szekvencia jellemzése 37
5. MEGVITATÁS 45
5.1. A szomatikus hibridek létrehozása és szelekciója 45
5.2. A hibridek genetikai állományának variabilitása 46
5.3. Genetikai sokféleség - morfológiai diverzitás 48
5.4. A *S. brevidens* rezisztencia tulajdonságainak kifejeződése a hibrid populációban 49
5.5. Az előállított szomatikus hibridek lehetséges növénynemesítési jelentősége 50
6. ÖSSZEFOGLALÁS 51
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 52
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 53
FELHASZNÁLT IRODALOM 54

1. BEVEZETÉS

Növénygenetikai ismereteink nagy része mutáns genotípusok analíziséből és ivaros keresztezésekből származik. Az ivarsejtek egyesülésével hibrid növények jönnek létre és vizsgálatukkal a tulajdonságok determináltságáról információt nyerhetünk. A klasszikus genetikai módszerek kibővítése a szomatikus sejtek kutatásával csak akkor vált lehetővé, amikor kidolgozásra kerültek a növényi sejttenyésztés módszerei. Különösen új helyzetet teremtett a növényi sejtek totipotenciájának felismerése. Ezáltal lehetővé vált teljes növények felnevelése tenyésztett sejtekből. Így hidat lehetett kialakítani a klasszikus genetikai és a szomatikus sejtgenetikai vizsgálatok között. A növényi sejtgenetikai kutatások esetében széles körben használt objektumokká váltak a sejtfaluktól megfosztott növényi sejtek az ún. protoplasztok. A sejtfal eltávolításával lehetővé vált a sejtek hibridizációja, illetve DNS molekulák bevitele a sejtbe. A kilencvenes évek elejére mintegy százötven növényfajra dolgozták ki a protoplasztból való organo- vagy embriogenezisen keresztül történő növényregenerálást. A genetikai transzformáció megvalósításához szükség volt a molekuláris genetika fejlődésére. A génizolációs technika kidolgozásával lehetővé vált ismert vagy ismeretlen funkciójú gének klónozása illetve beépítése a növényi genomba. Bizonyos tulajdonságok esetében, melyeket sok gén kölcsönhatása határoz meg, a rekombináns DNS technika lehetőségei is korlátozottak. Az izolált gének hiányában a protoplasztok fúziója illetve a szomatikus hibridek előállítása adhat lehetőséget a genetikai állomány megváltoztatására és új tulajdonságokkal rendelkező növények előállítására.

A termesztett növényfajok vadon élő rokonai gazdag rezisztenciaforrásnak bizonyultak a növénynemesítés évszázadai során, azonban távoli fajok esetében az ivarsejtek összeférhetetlensége, illetve az embrió és az endospermium fejlődési zavarai gátat szabnak a hagyományos módszerek alkalmazásának. A mesterséges keresztezéssel létrehozott fajhibridek fontos objektumai a növénygenetikai kutatásoknak, használható forrást jelentenek a genetikai variabilitás növeléséhez és nemesítési alapanyag létrehozásához. A testi sejtek fúziója, a szomatikus hibridizáció alkalmas az egyes növényfajok közti evolúciós szakadék bizonyos mértékű áthidalására. Alkalmazásával olyan, genetikailag módosított egyedeket hozhatunk létre, melyek egyedülálló lehetőséget nyújtanak a növénynemesítés, valamint az elméleti genetikai és növényfiziológiai kutatások számára.

A keresztezéssel előállított faj- és nemzetséghibridekhez hasonlóan a sejtek fúziójával létrehozott szomatikus hibridekben is a szülői tulajdonságok a legkülönbözőbb kombinációkban nyilvánulhatnak meg. Ez egyaránt érinti a növénynemesítési szempontból hasznos és nemkívánatos tulajdonságokat. Éppen ezért úgy mint a hagyományos nemesítés "áthidaló" hibridjei esetében szükség van

további visszakeresztezési lépésekre. A hibridek csak e keresztezések és a megfelelő szelekció után jelenthetnek megfelelő nemesítési alapanyagot. A visszakeresztezések során várható, hogy mind az ivaros, mind a szomatikus fajhibridek citológiai rendellenességei mérséklődnek. A szomatikus hibridizáció módot ad a keresztezés során megnyilvánuló összeférhetetlenségi tünetek egyes típusainak kizárására, távoli fajkombinációk esetében azonban számolni kell a szomatikus inkompabilitás megnyilvánulásával. Ezért ez a módszer is csak meghatározott feltételrendszer mellett ad módot új hibrid populációk létrehozására és azok növénynemesítési felhasználására.

Jelen dolgozat *S. tuberosum* + *S. brevidens* szomatikus fajhibridek létrehozásáról számol be. Célunk az volt, hogy olyan hibrideket hozzunk létre, melyek hordozzák a *S. brevidens*-re jellemző agronómiai szempontból értékes rezisztencia tulajdonságokat. A fúzióval kívántunk egy olyan hibrid populációt létrehozni, melynek bizonyos egyedei a két faj közti keresztezési akadályokat áthidaló szerepet töltenek be a burgonyanemesítésben. A növénynemesítésben való távlati hasznosítás lehetősége miatt olyan szelekciós rendszert alkalmaztunk, melynek nem volt előfeltétele a szülői sejtek morfológiai vagy biokémiai különbsége. Megvizsgáltuk a hibridek levélsodródási vírussal szembeni ellenállóképességét, illetve elsőként teszteltük a *S. brevidens* fagytoleranciájának megnyilvánulását. A szomatikus hibridek molekuláris jellemzése során izoláltunk és felhasználtunk a *S. brevidens* genomjára fajspecifikus repetitív DNS szekvenciát. E szekvencia szerveződését elemezve feltételezhetjük a szekvenciacsalád evolúciós divergenciáját. A molekuláris genetikai jellemzésen túl értékeltük a létrehozott hibridek kromoszómaszámát, morfológiai tulajdonságok variabilitását. A hibridek komplex jellemzésével kívántunk új ismereteket szerezni illetve alapot szolgáltatni a nemesítési felhasználáshoz.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Növényregenerálás protoplasztokból.

A növényi protoplasztok speciális, sejtfaluktól megfosztott sejtek, melyek plazmamembránja közvetlenül érintkezik a sejt külső környezetével, e tekintetben alapvetően különböznek az eredeti szövet sejtjeitől. Egy regenerációs folyamat során a protoplasztok megfelelő körülmények között sejtfal újraképzésére és sejtosztódásra képessé válhatnak. A növényi protoplasztok a növényfiziológia, genetika és biotechnológia számára egyedülálló lehetőséget teremtettek s felhasználásukkal az említett tudományágak metodológiai skálája is szélesedett. Protoplasztokat először 1892-ben Klercker nyert plazmolizált sejtekből a sejtfal mechanikus sértése után. E módszer azonban csak bizonyos fajoknál s alacsony hatékonysággal alkalmazható. A protoplasztokkal kapcsolatos kutatásoknak nagy lendületet adott a sejtfalbontó enzimek első alkalmazása (Cocking 1960), mely nyomán számos, gyárilag készült cellulázt, hemicellulázt és pektinázt tartalmazó készítmény használata vált a protoplasztizolálás kizárólagos módjává.

Az eddigi igen gazdag tapasztalatok alapján úgy tűnik, hogy a kiindulási szövet típusa gyakorlatilag bármilyen lehet (lásd Maheshwari és mtsai 1986 áttekintését). Általános irányelv, hogy juvenilis állapotú és ezért aktívan osztódó sejtekből álló szövetek (csíranövény, gyökércsúcs, szuszpenzió vagy fiatal levél) biztosítanak megfelelő mennyiségű olyan protoplasztot, amelyek a további tenyésztés során osztódásra képes sejtekké regenerálnak. A protoplasztok tenyésztési igényei alapjaiban nem különböznek *az in vitro* tenyésztett sejtekétől, azonban speciális állapotuk miatt számos kiegészítésre van szükség. A protoplasztok tápközegében biztosítani kell a megfelelő kezdeti ozmotikus nyomást, s a táptalaj gyakran gazdag vitaminokban, szerves vegyületekben (pl. kazein hidrolizátum). Az új anyagcserefolyamatok beindulását, ezen keresztül a sejtfalképződést és a sejtosztódás megindulását és fenntartását a táptalaj hormonjai, mint az auxinok és citokininek biztosítják. A sejtfal szintézisét követően az egymás utáni sejtosztódások sorozata struktúrálisan nem szervezett szövetet eredményez, mely a sérült növényi szöveteken képződő kalluszszövethez hasonló. E szövet sejtjeinek differenciálódása két úton indítható el. Számos esetben, elsősorban a forrásként használt növényfaj genotípusától függően, auxinkezelés hatására szomatikus embriók képződnek (lásd Dudits és mtsai 1991 áttekintését). Az egyszikűek, nyitvatermők és néhány kétszikű faj esetében a növényregeneráció egyetlen ismert útja az embriogenezis.

Egy gyakoribb növényregenerációs mód az organogenezisen keresztül vezet. E folyamat első lépéseként a kalluszszövet bizonyos sejtjei merisztematikus struktúrákat képeznek. A külső közeg citokinin/auxin arányától függően jön létre hajtás-, vagy gyökérmerisztéma, majd további fejlődési lépések során teljes növény kialakulására kerül sor. A protoplaszt izoláció, tenyésztés és növényregeneráció különböző szakaszai erősen meghatározottak nemcsak a növény faja, hanem az adott faj genotípusa által is. Ezért az alkalmazott módszerek, táptalajok és hormonok együttes optimalizálása sok esetben tapasztalati úton történik.

Az első sikeres növényregenerációt dohány levél eredetű protoplasztok felhasználásával sikerült elérni (Takabe 1971). A *Solanaceae* család fajai a protoplaszt tenyésztés azóta is viszonylag könnyen kezelhető tagjai. Ezzel szemben a tenyésztési próbálkozásoknak hoszzú ideig erőteljesen ellenálló fajok, főként a pillangósok, gabonafélék és a különböző évelő növények esetében, csak az utóbbi évek intenzív kutatásai nyomán sikerült a tenyésztési körülményeket optomalizálni (Fehér és Dudits 1993 áttekintése).

A burgonya (*S. tuberosum* L.) a fent említett *Solanaceae* család tagja, így nem meglepő, hogy az esetében alkalmazható sejt- és szövettenyésztési eljárások már régóta ismertek. Elsőként Shepard és Totten (1977) számoltak be a Russet Burbank fajta levélprotoplasztjainak tenyésztéséről és növényregenerációról. Azóta regenerációra képes burgonya protoplasztokat sikeresen izoláltak a legkülönfélébb szövetekből, így gyökércsúcsból (Laine és Ducreaux 1987), hipokotilból és sziklevélből (Dai és mtsai 1987), gumószövetből (Jones és mtsai 1989) és tenyésztett sejtekből (de Vries és Bokelman 1986). Legelterjedtebben azonban az *in vitro* (pl. Creissen és Karp 1985) illetve üvegházi növények leveleit (pl. Shepard és Totten 1977) használják protoplasztforrásként. A burgonya protoplasztok tenyésztésének és a növényregeneráció alapelvei lényegében nem különböznek a más növényfajokra alkalmazottaktól. Néhány új körülményt azonban szükséges volt megváltoztatni a hatékonyság növelésének érdekében. A levélprotoplasztok létrehozásakor a növények előkezelése javíthatja a protoplasztálási és osztódási gyakoriságot. A növények rövidnappalos körülmények között tartása (Shepard és Totten 1977) és a levelek 4^{o}C-on történő "kondícionáló" folyadékban való néhány napos inkubálása általában jótékony hatású a protoplasztok életképességére (Shepard és Totten 1977, Haberlach és mtsai 1985). Az *in vitro* hajtáskultúrák esetében az etilén felhalmozódás hatására kis levelű növények, vastag sejtfallal rendelkező mezofillum sejtek fejlődnek. Az ilyen növényekből származó protoplaszt eredetű sejtek igen rosszul osztódnak. Az etilén káros hatásának csökkentése a kultúrák megfelelő ventillációjával (pl. Fehér és mtsai, 1989) vagy a táptalaj etilén-antagonistákkal (pl. ezüst-ionok) történő kiegészítésével érhető el (Perl és mtsai 1988). A tenyésztett

protoplasztokra a médium NH_4^+ ionjai szintén káros hatásúak (Shepard és Totten 1977, Bokelman és Roest 1983), így a táptalajból általában hiányoznak az ezt tartalmazó vegyületek.

A *Solanum* fajok és így a különböző burgonyafajták esetében a növényregeneráció organogenezisen keresztül történik. Eddig mintegy huszonöt *Solanum tuberosum* fajta és genotípus, valamint hasonló számú vad *Solanum* faj esetében dolgoztak ki hatékony növényregenerációs rendszert (Zuba és Binding 1989 áttekintése).

2.2. Protoplasztok fúziója és a hibridek azonosítása

A protoplasztok membránja negatív töltésű, ezért a sejthártyák spontán összeolvadásának előfordulása ritka esemény. Az izolált protoplasztok nagy gyakoriságú fúziója speciális körülményeket igényel. Első lépésként a sejtmembránok szoros érintkezését kell előidézni, ennek következtében a szomszédos sejthártyák egyesülnek, lehetővé téve a citoplazmák elkeveredését, a különböző sejtorganellumok egyetlen sejtbe kerülését. A fuzogén (membránfúziót indukáló) vegyületek és ionok széles skálája ismert mint pl. $NaNO_3$ (Carlson és mtsai 1972), polivinil-alkohol (Nagata 1978), Ca^{2+} ionok (Keller és Melchers 1973). A legelterjedtebben használt polietilén-glikol (PEG) alacsony toxikus hatása mellett hatékonyan képes fúziót indukálni (Kao és Michayluk 1974, Wallin és mtsai 1974). A magas pH és Ca^{2+} ion koncentráció tovább fokozza a membránok összeolvadásának gyakoriságát (Kao és Michayluk 1974). A protoplasztok elektromos impulzussal indukált fúziójához egy váltakozó áramot biztosító és egyáramú impulzus létrehozására képes áramforrásra van szükség, használatával több esetben igen nagy fúziós gyakoriságot értek el (Zimmermann és Scheurich 1981). Mikroelektródákat alkalmazva előre kiválasztott, meghatározott protoplaszt párokat egyesíthetünk, mely lehetővé teszi a hibrid sejtek egyedi elkülönítését és tenyésztését (Schweiger és mtsai 1987).

A protoplasztok nagy tömegben végzett fúziója után a nem fúzionált, nagy számú szülői sejt jelenléte szükségessé teszi a hibrid sejtek minél korábbi szelekcióját. Ennek érdekében a szülői sejteknek jól definiálható fiziológiai vagy biokémiai különbséggel kell rendelkezniük. Domináns vagy recesszív mutációk pl. auxotrófia, enzimdeficiencia, spontán rezisztencia illetve mesterségesen beépített rezisztenciamarkerek lehetővé teszik, hogy legalább az egyik partnert eliminálni tudjuk a sejttenyészetből. Ha mindkét szülői vonal rendelkezik szelektálható tulajdonsággal, a hibrid sejtek mindkét jelleget hordozni fogják és kettős szelekciót alkalmazva a szülői sejtek, mikrokolóniák elpusztulnak. Antimetabolitokkal és/vagy

ionizáló sugárzással inaktivált sejtekből a fúzió után életképes hibrid sejtek hozhatók létre. A komplementáción alapuló módszerek különböző variációs lehetőségeiről gazdag áttekintést nyújt Gleba és Shlumukov (1990). A hibrid sejtek egyedi szelekcióját teszi lehetővé a különböző fluoereszcens festékkel jelölt szülői sejtekből létrejött, kettős fluoreszcenciát kibocsátó heteroplazmás sejtek automatizált kiválogatása (Galbraith és mtsai 1984).

A szövettenyésztés későbbi fázisaiban lehetséges a hibrid mikrokolóniák illetve regenerált növények azonosítása morfológiájuk vagy növekedési tulajdonságaik alapján. Mivel tökéletesen működő szelekciós rendszer nincs, minden esetben a hibriditást szükséges valamilyen további bizonyítékkal is alátámasztani. A sejtfúzióból származó kolóniák szülőkétől eltérő növekedési üteme (pl. Schieder 1978) illetve pigmentációja (pl. Dudits és mtsai 1977) alapul szolgálhat a feltételezett hibridek kiválogatására. A regenerált növények hibrid morfológiája a habitusban és bizonyos speciális struktúrák (pl. trichómák) megléteként vagy hiányaként nyilvánulhat meg (lásd Evans 1984 áttekintését).

Molekuláris biológiai módszerekkel nem csak a hibriditás bizonyítható, hanem a hibridek közti genetikai különbségekre is fény derülhet. Mind a DNS, mind a fehérjemarkerek esetében fontos, hogy az alkalmazott technikával a két szülői genotípus között jól meghatározható különbségeket lehessen kimutatni. A sejtszervecskék DNS állománya restrikciós mintázatukon keresztül közvetlenül vizsgálható (pl. Scowcroft és Larkin 1981, Schiller és mtsai 1982, Spangenberg és mtsai 1990). A sejtmagi DNS vizsgálata molekuláris hibridizációval bármilyen, polimorfizmust detektáló próbával lehetséges, tekintet nélkül arra, hogy az adott DNS szakasz funkciója ismert-e. Interspecifikus hibridek esetében a hibriditás igazolására alkalmasak a riboszómális DNS próbák (pl. Pehu és mtsai 1989). A haszonnövények esetében előzetesen kidolgozott RFLP markerek a szomatikus hibridek genetikai összetételének analízisében nagy segítséget nyújtanak (Williams és mtsai 1990, Fehér és mtsai 1992). Az ismétlődő (repetitív) DNS szakaszok előfordulása a közeli rokonságban álló fajokban is eltérő lehet, így bizonyos szekvenciák puszta jelenléte bizonyítékként szolgálhat a hibriditásra (Saul és Potrykus 1984, Schweizer és mtsai 1988). A genomban egyenletesen szétszórt (diszperz) repetitív elemek felhasználásával végzett *in situ* molekuláris hibridizáció több esetben rávilágított a szülői kromoszómák közötti transzlokációk létére (Piastuch és Bates 1990, Itoh és mtsai 1991).

Fehérjék szintjén a citoplazmában oldott illetve a sejtszervecskékben található különböző proteinek vizsgálatával végezhető el a feltételezett hibriditás bizonyítása. A fehérjék funkciójának ismerete nélkül, pusztán a két dimenziós elektroforetikus elválasztási mintázatuk analízise alapján lehetőség van a szülői fajokra jellemző

fehérjék kimutatására (Imai és mtsai 1992). Az azonos aktivitású, de különböző elektroforetikus tulajdonságot mutató enzimek (izoenzimek) vizsgálata a szomatikus hibridek esetében már az úttörő protoplaszt hibridizációs kísérleteknél bevezetésre került (Carlson és mtsai 1972, Dudits és mtsai 1977), és azóta is a hibriditás biokémiai bizonyításának egyik legegyszerűbb módszere. A ribulóz-1,5-bifoszfát karboxiláz-oxigenáz enzim ("fraction-1-protein") a növényi sejt fehérjeállományának mintegy negyven százalékát alkotja. Az izoelektromos fókuszálás során létrejött fehérjemintázat nem csak a hibriditás igazolására alkalmas. Az enzim különböző alegységei a nukleuszban és a zöld színtestben kódoltak. Széles körben alkalmazott a sejtmagi és kloroplasztisz gének működésének és bizonyos tulajdonságok szegregációjának vizsgálatában (pl. Melchers és mtsai 1978, Douglas és mtsai 1981).

2.3. A hibridek citológiai jellemzői.

A tenyésztett sejtekből regenerált növények a szomaklonális variáció eredményeképpen sok esetben eleve citológiailag heterogén populációt alkotnak (Larkin és Scowcroft 1981). Ezen kívül a fúzionált sejtekben a kétféle citoplazma illetve sejtmag kölcsönhatásai révén lényeges kromoszomális változások játszódhatnak le. A szomatikus inkompatibilitás eredményeként az evolúciósan távoli fajok sejthibridjeinek genetikai állománya általában instabil (Harms 1983). Pontosan nem ismert kölcsönhatások mitotikus zavarokat, az egyik partner kromoszómáinak részleges vagy teljes elvesztését illetve poliploiditást okoznak. A spontán vagy indukált kromoszómavesztés eredményeként ún. "aszimmetrikus" hibrid sejtek illetve szomatikus hibrid növények jönnek létre (Dudits és mtsai 1979, 1980). A sejtciklus különböző fázisaiban levő sejtek fúziójakor az osztódás során az egyik parner kromoszómáinak fragmentálódása figyelhető meg (Szabados és Dudits 1980). A szülői sejtek eltérő hosszúságú sejtciklusa a fúzió után az egyik faj genetikai állományának bizonyos mértékű elvesztését eredményezheti (Kao 1977, Gleba és Hoffmann 1978). A szülői kromoszómák elvesztésének mértéke és iránya befolyásolható az egyik szülői partner sejtjeinek magas dózisú besugárzásával. Ily módon elérhető, hogy a besugárzott partnerből akár csak néhány kromoszómafragment illetve az ezen levő gének maradjanak meg a hibridekben (pl. Dudits és mtsai 1980, Gupta és mtsai 1984).

Az közelebbi rokonságban álló (nemzetségen belüli) fajok szomatikus hibridjei esetében a szülői sejtek és sejtorganellumok az osztódásban és a metabolikus folyamatokban általában jobban együttműködnek. A hibridek kromoszómaszáma stabilabb, mint a távoli hibrideké és kevésbé tér el a szülői fajok összegétől ("szimmetrikus" hibridek) (pl. Melchers és mtsai 1978, Ehlenfeldt és Helgeson 1987,

Glimelius és mtsai 1991). A lokuszok illetve kromoszómák végleges elvesztése tehát előre nem megjósolható folyamat. Közeli rokon fajok hibridjeiben a kromoszómavesztés az anaeuploidia érintheti mindkét, vagy csak az egyik szülő kromoszómaállományát (de Vries és mtsai 1987, Pijnacker és mtsai 1987). A veszteség mértéke is igen változó lehet, még azonos fajkombináció esetében is (pl. *S. tuberosum* + *S. brevidens*: Fish és mtsai 1987, 1988a, Austin és mtsai 1985b, 1986, Preiszner és mtsai 1991).

2.4. A morfológiai bélyegek megnyilvánulása szomatikus hibridekben

A szomaklonális variabilitás eredményeképpen a szülői klónok mutathatnak morfológiai variabilitást, a hibridek külső megjelenése még változatosabb lehet. A hibrid populációk esetében a genetikai heterogenitás egyaránt kifejezésre jut ploidiaszint változásokban, kromoszóma-vesztésben, transzlokációkban illetve gén szintű változásokban. A magas ploidiafokú vagy aneuploid kolóniákból gyakran nehézségekbe ütközik normális növényt regenerálni (Evans 1984). A regenerált aszimmetrikus hibridek általában a genetikailag dominálló szülőre hasonlítanak jobban (pl. Dudits és mtsai 1987). Az aszimmetrikus hibrideknél a kromoszómavesztés a hibrid növények *in vitro* fenntartása során is folytatódhat, mely során új fenotípusú egyedek jelennek meg (Fehér és mtsai 1992).

A rendszertanilag közeli szülők sejtjeinek fúzióját követően genetikailag stabil hibridek általában hatékonyan regenerálhatók növényekké (Melchers és mtsai 1978, Dudits és mtsai 1979, Austin és mtsai 1985b, Spangenberg és mtsai 1990). A növények általános morfológiáját számos gén határozza meg, ezért a szülői genetikai állomány hatását követni bonyolultabb, mint az egygénes tulajdonságok esetében. Néhány intra- és interspecifikus hibridnél a megnövekedett ploidiaszint a hibridek erőteljesebb fejlődését okozta (Schieder 1977, Austin és mtsai 1985a). A hibrid növények különböző szerveinek fejlődésének mértéke nagyon változó lehet. Az egymástól függetlenül regenerált hibrid klónok jelentősen különbözhetnek egymástól méretben, a levelek alakjában (Gleba és Hoffmann 1979), a virágok színében és alakjában (Melchers és mtsai 1978) illetve a járulékos szervek fejlődésében. Ezzel kapcsolatosan legjellemzőbb példák a burgonya szomatikus hibridek esetében találhatók. A *S. tuberosum* és más, gumót nem képző fajok hibridjei között előfordulnak gumótlanok illetve olyanok is melyek sok gumót képeznek, s a gumók színezettsége és alakja is nagyon változatos (Melchers és mtsai 1978, Austin és mtsai 1986, Fish és mtsai 1988b, Preiszner és mtsai 1991).

2.5. *Solanum* fajokkal végzett szomatikus hibridizáció főbb eredményei.

A burgonyát számos inter- és intraspecifikus hibridizációs kombinációban használták, alap- és alkalmazott kutatás céljaira. A következő táblázat a főbb kísérletekről nyújt áttekintést:

Intraspecifikus hibridek *S. tuberosum*-mal:

1x	(+)	1x:	Uijtewaal és mtsai 1987
2x	(+)	2x:	Austin és mtsai 1985a; Debnath és Wenzel 1987; Deimling és mtsai 1988; Masson és mtsai 1989; Waara és mtsai 1989

Interspecifikus, intragenerikus hibridek *S. tuberosum*-mal:

(+) *S. brevidens*:	Barsby és mtsai 1984; Austin és mtsai 1985b, 1986; Fish és mtsai 1987, 1988; Preiszner és mtsai 1991; Fehér és mtsai 1992
(+) *S. bulbocastanum*:	Helgeson és mtsai 1987
(+) *S. chacoense*:	Butenko és Kuchko 1980
(+) *S. nigrum*:	Binding és mtsai 1982
(+) *S. phureja*:	Puite és mtsai 1986
(+) *S. pinnatisectum*:	Sidorov és mtsai 1987
(+) S. *berthaultii*:	Serraf és mtsai 1991
(+) *S. circaeifolium*:	Mattheij és mtsai 1992

Intergenerikus hibridek *S. tuberosum*-mal:

(+) *Lycopersicon esculentum*:	Melchers és mtsai 1978
(+) *Lycopersicon pimpinellifolium*:	Okamura 1987
(+) *Nicotiana plumbaginifolia*:	De Vries és mtsai 1987

A burgonya szomatikus hibridek létrehozása során főként a PEG-indukált fúziós módszert alkalmazták (pl. Barsby és mtsai 1984, Austin és mtsai 1985a,b). Magas Ca^{2+} koncentráció és pH jelenlétében fúzionáltak burgonya és paradicsom (Melchers és mtsai 1978) valamint *S. brevidens* protoplasztokat (Fish és mtsai 1987). Az elekrofúzió is sikeres módszernek bizonyult a hibridek előállítása során (pl. Puite és mtsai 1986, de Vries és mtsai 1987, Fish és mtsai 1987). A hibridek

azonosítása az általánosan használt módszerekkel történt: mutánsok komplentációjával (Barsby és mtsai 1984), fiziológiai komplementáción (Austin 1985b), vigoros növekedésen alapuló szelekcióval (Debnath és Wenzel 1987). Felhasználták a hibridek izoenzim mintázatának vizsgálatának eredményeit a jellemzés során (Sidorov és mtsai 1987). A hibriditást citológiai (pl. Pehu és mtsai 1989, Pijnacker és mtsai 1987), morfológiai (Austin és mtsai 1986, Pehu és mtsai 1989) valamint molekuláris biológiai bizonyítékok támasztották alá (Williams és mtsai 1990, Pehu és mtsai 1990, Fehér és mtsai 1992).

A *S. brevidens* tekinthető különböző rezisztencia tulajdonságokban az egyik leggazdagabb vad fajnak, azonban a nemesítésbe még "áthidaló" fajokkal való ivaros keresztezéssel is csak csekély sikerrel volt bevonható (Johnston és Hannemann 1982). Ez a Andokban őshonos vad *Solanum* faj bakteriális gumórothadás (*Erwinia* sp.), burgonya X és Y vírus fertőzés elleni rezisztencián kívül a levélsodródási vírussal szemben is ellenálló (Jones 1979). Főként ez utóbbi értékes tulajdonságát kívánták átvinni a termesztett burgonyafajtákba, ezért a sejtfúziós kísérletekben mint fúziós partnert többször alkalmazták. Diploid (Fish és mtsai 1987, 1988a, Austin és mtsai 1985b) valamint tetraploid (Barsby és mtsai 1984, Austin és mtsai 1986) burgonyafajták protoplasztjait egyaránt fúzionáltatták *S. brevidens* protoplasztokkal. A hibridek mindegyik esetben morfológiai sajátságaikat tekintve igen változatos populációt alkottak, azonban mindkét szülői fajra jellemző bélyegekkel egyaránt rendelkeztek (Fish és mtsai 1988b, Austin és mtsai 1986). A hibridek esetében kisebb-nagyobb genetikai instabilitást állapítottak meg, ennek mértéke függött a létrehozott hibridek ploidiafokától (Fish és mtsai 1988b, Pehu és mtsai 1989). A hibridekben a szülői rezisztencia tulajdonságok is megnyilvánultak, a vad fajra jellemző *Erwinia* (Austin és mtsai 1988), levélsodródási vírus (Helgeson és mtsai 1986, Gibson és mtsai 1988, Pehu és mtsai 1990), X és Y vírus (Gibson és mtsai 1988, Pehu és mtsai 1990) ellen, csakúgy mint a *S. tuberosum* ellenállóképessége *Phytophtora* fertőzéssel szemben (Helgeson és mtsai 1986). Az euploid hibridek mint termős partner megfelelően kiválasztott burgonyafajtával keresztezhetők lehetnek (Ehlenfeldt és Helgeson 1987, Williams és mtsai 1990), így a szomatikus hibridek a további nemesítési folyamatba bevonhatók.

2.6. A szomatikus hibridek növénynemesítési felhasználásának lehetőségei

A fajok közti keresztezés a haszonnövények genetikai változatosságának növelésében, a jobb tulajdonságokkal rendelkező genotípusok kialakításában alapvető módszer. Az ivaros keresztezésnek azonban határt szab a fajok közti evolúciós távolság, mely a megtermékenyítést vagy a hibrid embrió fejlődését

lehetetlenné teszi. Protoplaszt fúzióval olyan új fajok vonhatók be a nemesítésbe, melyek értékes tulajdonságai más módon nem építhetők be a termesztett faj genetikai állományába. A szomatikus hibrideket azonban nem végterméknek kell tekintenünk, hanem mint egy hasznos kiindulási tenyészanyagot a további nemesítés számára. Lényeges azonban hangsúlyozni, hogy további keresztezésekkel szükséges az esetleges káros tulajdonságokat eliminálása. Így a szomatikus hibridek szerepe mint "áthidaló" genotípusoké jelentős. Nemesítési célt szolgáltak azok a kísérletek, melyekben protoplasztfúzióval az egyébként nehezen keresztezhető burgonya fajták hibridjeit állították elő pl. Uijtewaal és mtsai (1987), Austin és mtsai (1985a). A módszer gyakorlati jelentőségét nagy mértékben növeli az a tény, hogy a több gén által kódolt tulajdonságok sikeresen transzferálhatók a szomatikus hibridizáció segítségével. Az utóbbi években e módszerrel vírusfertőzésekkel (Gibson és mtsai 1988, Pehu és mtsai 1990, Helgeson 1989), *Erwinia* okozta rothadással (Austin és mtsai 1988), fagyhatással (Preiszner és mtsai 1991) valamint *Globodera* fertőzéssel (Mattheij és mtsai 1992) szemben fokozott ellenállóképességű burgonya hibrideket hoztak létre. Figyelmet érdemel, hogy a szülői anyagcsere folyamatok kölcsönhatásának eredményeként a szülőkre nem jellemző alkaloidok szintetizálódhatnak a hibridekben (Roddick és Melchers 1985, Mattheij és mtsai 1992), melyek a rovarkártevők elleni biológiai védekezésben hasznosak lehetnek. Nem csak a sejtmagi DNS által, hanem a sejtszervecskékben kódolt tulajdonságok genetikai módosítására is lehetőséget nyújt a sejhibridizáció. Elérhető a mitokondriumok által meghatározott citoplazmatikus hímsterilitás (Zelcer és mtsai 1978, Menczel és mtsai 1983) illetve a kloroplasztiszokban kódolt herbicidrezisztencia (Binding és mtsai 1982) átvitele különböző fajok közt. Az eddigi eredmények alapján a szomatikus hibridek agronómiai felhasználása új távlatokat nyithat a növénynemesítésben.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Sejt- és szövettenyésztési módszerek

3.1.1. Növényi anyag

Az *in vitro* fenntartott *S. tuberosum* L. cv. Grácia (2n=4x=48) növényeket az azóta megszűnt Meriklón Gazdasági Társulástól szereztük be. A levélsodródási vírusrezisztenciára ellenőrzött *S. brevidens* Phil. (PI. 218228) (2n=2x=24) genotípust Dr. Horváth József (Pannon Agrártudományi Egyetem, Keszthely) bocsátotta rendelkezésünkre (Horváth és mtsai 1987). A felhasznált növények fenntartása és szaporítása *in vitro* hajtáskultúrában, steril körülmények között történt hormonmentes MS táptalajon, (Murashige és Skoog 1962) mely 0.8% agart tartalmazott. A növényeket fitotronban neveltük, melyben 12 órás fényperiódus (52-120 $\mu molm^{-2}s^{-1}$ fényintenzitás) és 20 ^{o}C (sötétben 15 ^{o}C) hőmérsékletet biztosítottunk a növények fejlődéséhez.

3.1.2. Protoplasztok izolálása, tenyésztése és növényregeneráció a tenyésztett sejtekből

A protoplaszt izolációt megelőzően a fiatal (3-4 hetes) növényeket két napra sötétbe helyeztük, mert előzetes megfigyeléseink alapján a sötétkezelésen átesett növényekből származó protoplasztok jobban tolerálták a protoplasztálással járó stresszt, így nagyobb osztódási gyakoriságot kaphattunk (Fehér és mtsai., 1989). A leveleket vékony csíkokra vágtuk, és 10-12 órán át V-KM táptalajban inkubáltuk (Bokelman és Roest, 1983), mely ozmotikumként 0.42 M glükózt, valamint sejtfalbontó enzimeket: 1% Cellulázt (Onozuka R-10) és 0.5% Macerozyme-ot (Onozuka R-10) tartalmazott. Az izolált protoplasztokat 0.45 M glükózzal kiegészített V-KM táptalajban tenyésztettük. A sejtek első néhány osztódása után a mikrokolóniákat 0.6% agarózba ágyaztuk, az agarózblokkokat folyékony táptalajban tartottuk, melyet hetente frissre cseréltünk, miközben a tápoldat ozmotikus nyomását fokozatosan csökkentettük. A protoplaszt eredetű kolóniákból való hajtásindukció Shepard és Totten (1977) szerint: C, D (2 mgl^{-1} zeatin-riboziddal 0.5 mgl^{-1} zeatin helyett) és E táptalajon történt, a regenerációs módszer előzetes optimalizációja nyomán (Fehér és mtsai 1989). Minden protoplaszt-eredetű kolóniáról egy hajtást vágtunk le és ezeket hormonmentes MS táptalajon tartottuk fenn.

3.1.3. Protoplaszt fúzió és a fúziós termékek azonosítása

A két fajból izolált protoplasztokat 1:1 arányban összekevertük, 10^5 sejt/ml denzitás mellett 40%-os PEG oldat hozzáadásával indukáltuk a fúziót, melyet 20 perc után magas Ca^{2+}-ion koncentrációjú, magas pH-jú, dimetil-szulfoxidot tartalmazó oldattal való kihigítás követett (Kao és Salem 1986, Dudits és mtsai 1987). A kísérletben kontrollként a kezeletlen szülői protoplasztokat használtuk. Az erőteljes növekedésű kezelt és kontroll protoplaszt-eredetű kolóniákat szelektáltuk a szövettenyésztési periódus korai szakaszában. Ennél a szelkciós módszernél feltételeztük, hogy a hibrid kolóniák fokozott növekedési erélyt (hibrid vigort) mutatnak. Ily módon kétszáz, C táptalajon leggyorsabban növő kolónia kiválogatására került sor a kezelt, és kb. száz a kontroll *S. tuberosum* populációból.

3.2. Molekuláris genetikai módszerek

3.2.1. Plazmid molekulák, DNS fragmentumok izolálása

A DNS-DNS hibridizációhoz használt plazmidokat az RFLP mintázat megállapításához paradicsom genomikus klóntárból (Tanksley és mtsai 1987) kaptuk. A fragmentumok pUC18 plazmidba voltak klónozva, a rekombináns plazmidokat Martin és Burke (1989) módszerével juttattuk be HB 101 ill. XL1-Blue baktérium törzsekbe (Sambrook és mtsai 1989). A transzformáns baktériumokat LB táptalajon, a megfelelő antibiotikum jelenlétben szelektáltuk és tartottuk fenn. A rekombináns plazmidokat a megfelelő restrikciós enzimmel emésztettük, majd 1%-os agaróz gélen elekroforetikusan elválasztottuk. A megfelelő méretű fragmentumot a géllel együtt kivágva, dialízis membránt alkalmazva izoláltuk (Sambrook és mtsai 1989). 50-100 ng fragmentumot radioaktívan jelöltünk Feinberg és Vogelstein (1983) módszerével. Az α-^{32}P-dATP-t vagy α-^{32}P-dCTP-t (3000Ci/mmol) az Amersham cégtól szereztük be. A jelölt DNS fragmentumok specifikus aktivitása elérte a 10^9 cpm/μg DNS értéket.

3.2.2. *S. brevidens* klóntár készítése és fajspecifikus szekvencia izolálása.

S. brevidens-ből tisztított sejtmagi DNS-t részlegesen emésztettük Mbo I restrikciós enzimmel a célból, hogy maximális számú 10-20 kilobázis nagyságú fragmentet kapjunk. A DNS fragmenteket λpGY97 klónozó vektorba (Vincze és Kiss 1990) építettük be. A ligálás a következö körülmények között történt: a vektor

DNS-t foszfatázzal kezeltük, majd a klónozandó DNS szakasz beépítését 0.1 μg/μl DNS koncentrációjú oldatban végeztük, melyben a vektor:inszert arány 2:1 volt, BRL Biochemicals ligáz pufferben, amely 12% PEG6000-et és 1-2 U T4 DNS ligázt/μg DNS tartalmazott. A reakció 16 ^{o}C-on 4 órás inkubációs periódus alatt ment végbe. A ligátum *in vitro* fágfejbe csomagolása és a fágok *E. coli* K-1400 törzsbe való juttatása során Sambrook és mtsai (1989) módszerét követtük azzal az eltéréssel, hogy a sejteket 32 ^{o}C-on növesztettük. Fajspecifikus szekvencia keresésekor a klóntárból származó 1200 rekombináns konstrukciót tartalmazó bakérium klónt vittünk át hibridizációs membránra, majd a sejtek feltárása után (Sambrook és mtsai 1989) a filtereket radioaktívan jelölt *S. brevidens* illetve *S. tuberosum* növényi DNS-sel hibridizáltuk. Azokat a klónokat választottuk ki további analízisre, melyek a *S. tuberosum* próbával nem vagy igen gyengén hibridizáltak, ugyanakkor a *S. brevidens*-sel erős jelet adtak. A kiválasztott konstrukciókból 24-et Eco RI restrikciós enzimmel emésztettünk és elekroforetikus elválasztás után hasonló módon differenciál hibridizációval teszteltünk, majd kiválasztottuk a fajspecifitást mutató *S. brevidens* fragmenteket. A pSb4 jelű plazmidból egy fragmentum (Sb4/1) szerkezetét és eloszlását elemeztünk részletesen, illetve ezt használtuk a szomatikus hibridek jellemzésére.

3.2.3. Növényi DNS tisztítása

Üvegházban fenntartott növények fiatal leveleiből Gill és mtsai (1991) módszerével tisztítottunk DNS-t. E módszer Murray és Thompson (1980) eljárásának módosítása, a CTAB-t mint poliszacharid kicsapó ágenst tartalmazó extrakciós puffert 1mM o-fenantrolinnal egészítik ki. Két gram kiindulási anyagból általában 100-150 μg-nyi DNS-t nyertünk.

3.2.4. DNS-DNS hibridizáció ("Southern" analízis)

7-10 μg tisztított növényi DNS-t a kísérlet céljától függően Dra I, Eco RI, Hae III illetve Taq I restrikciós enzimekkel emésztettünk, a gyártó cég (BRL ill. New England Biolabs) által előírt körülmények között. Az enzimeket a javasolt koncentrációnál nagyobb mennyiségben (6-8 U/μg DNS) használtuk, hogy biztosítsuk a DNS tökéletes emésztését. A DNS fragmentumok méret szerinti elektroforetikus elválasztása 0.8%-os agaróz gélben történt TEB puffer (90mM Tris/bórsav, 2 mM EDTA) alkalmazásával. A gélből a DNS-t nylon hibridizációs membránra (Hybond-N, Amersham) vittük át Sambrook és mtsai (1989) módszerével. A DNS-t a membránhoz 60 másodperc UV besugárzással kötöttük.

A DNS-DNS hibridizációt a TG46 jelű, paradicsomból származó RFLP markerrel illetve a fajspecifikus szekvenciából izolált "A" és "B" fragmenttel (8. ábra) 15 ml hibridizáló oldatban (6xSSC, 0.1% SDS, 10 mM Tris/HCl puffer pH: 8.0, 1 mM EDTA, 0.25% zsírszegény tejpor) 6-12 óráig 65°C-on végeztük. A filtereket 2xSSC, 0.1% SDS oldatban kétszer tíz percig szobahőmérsékleten, 0.1xSSC, 0.1% SDS oldatban 65°C-on kétszer harminc percig mostuk. Az autoradiogram készítése Forte Medifort RP diagnosztikai röntgenfilmre történt, egy erősítő ernyő (Cronex Lightning Plus, DuPont) segítségével.

3.2.5. A fajspecifikus fragment lokalizációjának meghatározása *in situ* hibridizációval.

Az *in situ* hibridizációban és a jel detektálásában Pinkel és mtsai (1986) módszerét követtük. A 3.3.4. alpontban leírt módon citológiai preparátumot készítettünk. A fajspecifikus Sb4/1 fragmentet "nick transzlációs" módszerrel jelöltük biotinilált dUTP beépítésével, a jelölő készlet (Amersham cég, "Nick translation kit" No. 5500) utasításait követve. A jelölt próbát hibridizációs oldatban (25 ng próba DNS, 50% formamid, 10% dextrán szulfát, 0.5 mg/ml tRNS, végtérfogat 40 µl preparátumonként) denaturáltuk, majd a preparátumra helyeztük és 12 óráig 37°C-on inkubáltuk. A nem specifikusan kötődő próba DNS-t sorozatos mosással távolítottuk el, a Southern hibridizációhoz hasonlóan. A hibridizációs jel detektálása 3 µg/ml koncentrációjú floureszcein-avidinnel történt. Ennek során az avidin a DNS próbába épült biotin molekulához kötődik, a fluoreszcein-diacetát megfelelő hullámhosszú fénnyel megvilágítva sárgán floureszkál, s a fluoreszencia helye mikroszkópos vizsgálattal azonosítható. A kromoszómák DNS állományát propidium-jodiddal festettük, mely a DNS-hez kötődve vörösen fluoreszkál. A preparátumokat fluoreszens mikroszkóppal vizsgáltuk, 450-490 nm-es gerjesztési tartományban a fluoreszcein-diacetátra és 530-560 nm-nél propidium-jodidra.

3.2.6. A fajspecifikus fragmentum bázissorrendjének meghatározása és elemzése.

A fragmentumokat M13mp18 fágba klónoztuk, ezután a szekvenciát Sanger és mtsai módszerét (1977) alkalmazva USB Sequenase Kit-et használva határoztuk meg. A bázissorrend elemzését, térképezését a MICROGENIE és MULTALIN (Corpet 1989) számítógépes programok segítségével vittük véghez. Homológ szekvenciákat az EMBL/Genebank adatbankból illetve publikációkból ismert növényi ismétlődő szekvenciákkal összehasonlítva kerestünk.

3.3. A szomatikus hibridek jellemzése.

3.3.1. Morfológiai bélyegek felmérése és sokváltozós analízis használata a morfológiai adatok értelmezésében.

A szülői és hibrid vonalakat üvegházban neveltük, 12 órás fotoperiódus mellett, 23 ^{o}C hőmérsékleten. Négy hónappal a kiültetés után huszonegy hibrid klón és a két szülői vonal növényein kilenc hajtásjellemzőt felvételeztünk. A vizsgált sajátosságokban a két szülői faj bizonyos mértékben különbözött. A következő adatokat vettük fel: növény magasság, szár átmérő, nodusszám, egy középső levél és egy terminális levélke hossza és szélessége, a levélkék és másodlagos levélkék száma. Mindegyik klón esetében legalább három növényen történt a mérés és az analízisbe a mérések átlagát vontuk be. Mesterséges változókat is alkottunk az egyes mért adatokból, így a követező hányadosokat képeztük: levélhossz/növény magasság ("növény alak"), véglevélke hossz/szélesség ("véglevélke alak"), növény magasság/nódusszám ("internódium hossz"). A gumó és inda adatokat szabadtéren nevelt növényeken mértük, a vegetációs periódus végén, legalább két növényen klónonként. Az indák és gumók számát és hosszát, a gumók átlagos és bokronkénti összsúlyát, a gumó alakját (hossz/szélesség) vizsgáltuk. A minőségi jellemzőket önkényesen felállított numerikus skála segítségével vettük fel. Egytől ötig terjedő skálával jellemeztük a gumószínt (1: sárga, 3: rózsás, 5: lila), valamint a gumókon található rügyek típusát (1: 'Gracia' fajtára jellemző rügyek, 3: domborodó rügyek, 5: erősen "babás" gumók). Huszonkét valós illetve mesterséges morfológiai jellemzőt vontunk be a főkomponens analízisbe (PCA). Ez a sokváltozós módszer lehetővé teszi a különböző vizsgálati objektumok (esetünkben a klónok) elhelyezését egy multidimenzionális térben, miután lineárisan nem-korreláló faktorokat képez (főkomponensek). Ezeket a faktorokat a változók (mért adatok) által alkotott korrelációs mátrixokból számítottuk ki (centrált és standardizált PCA) és ezek a faktorok szolgáltak a multidimenzionális tér tengelyéül. A számítógépes analízisre Podani SYN-TAX III. programcsomagját használtuk (Podani 1988) IBM kompatibilis személyi számítógépen. Megvizsgáltuk, hogy az objektumok genetikai összetétele megfelel-e elhelyezkedésüknek a faktortérben, azaz a klónok morfológiája és kromoszómaszáma összefüggésbe hozható-e.

3.3.2. Izoenzim mintázat analízis

Tizenkét, véletlenszerűen kiválasztott feltételezetten hibrid klón bevonásával vizsgáltuk az izoenzim mintázatot két enzim esetében. Ezek izoenzimjei alapvető különbséget mutattak a két szülői genotípus összehasonlításakor. Mindkét enzim vizsgálatakor 150 μg összfehérjét tartalmazó levél kivonatot szeparáltunk poliakrilamid gélen. Glutaminsav-oxálacetát transzamináz (GOT) enzimnél az elválasztás 7.5%-os gélen történt, az enzimaktivitás detektálásakor Yagi és mtsai (1981) módszerét követtük. 10%-os gélt használtunk a szuperoxid dizmutáz (SOD) enzim szeparálásakor, s a gélek festését Beauchamp és Fridovich (1971) nyomán végeztük el.

3.3.3. RFLP analízis

Az RFLP mintázat megállapítását a TG46 jelü klónnal végeztük, mely a paradicsom és a burgonya 11-es kapcsoltsági csoportjába tarozik (Tanksley és mtsai 1987, Bonierbale és mtsai 1988). Az adott próba alkalmas *S. tuberosum* és *S. brevidens* közötti DNS szintű polimorfizmus detektálására (Williams és mtsai 1990). A tisztított növényi DNS-t a Southern analízishez Dra I restrikciós enzimmel emésztettük, majd a 3.2.4. alpontban leírtak szerint állapítottuk meg a hibridizációs mintázatot.

3.3.4. Kromoszómaszám meghatározása

Fiatal hajtásdugványok gyökereit 0.002 M hidroxiquinolin oldatban kezeltük 3-4 órán keresztül és Carnoy reagensben (absz. etanol:ecetsav=3:1) fixáltuk. A gyökércsúcsokat 10% pektinázt és 1.5% cellulázt tartalmazó 0.1M citrát pufferben puhítottuk 37 ^{O}C-on 30-60 percig. Az ily módon előkezelt gyökércsúcsokat karbol-fuxinnal festettük (Kao 1975), és fagyasztva szárításos módszerrel tartós preparátumot készítettünk. Harmincegy klón esetében határoztuk meg a kromoszómaszámot, klónonként legalább két független preparátumon.

3.3.5. Levélsodródási vírus (PLRV) rezisztencia

Az általunk használt *S. brevidens* genotípus és a szomatikus hibridek levélsodródási vírussal szembeni rezisztenciáját Dr Horváth József (Pannon Agrártuományi Egyetem, Keszthely) és Dr Gáborjányi Richárd (MTA Növényvédelmi Kutatóintézete, Budapest) határozták meg. Fertőzésre érzékeny és

a vírust hordozó beteg növényeken (Desirèe fajta) levéltetvekkel (*Myzus persicae*) 24-48 órás felvételi szívást végeztettek. 15-20 vírushordozó tetvet helyeztek a *S. brevidens*-re, *S. tuberosum*-ra és szomatikus hibridekre illetve a kontroll *Datura stramonium* növényekre 48 órára. A rezisztencia meglétére vagy hiányára a fertőzést követően a tünetek alapján illetve immunológiai vizsgálat (ELISA teszt) nyomán következtettünk.

3.3.6. Fagytűrés kifejeződésének vizsgálata

A hat hetes, hajtáskultúrából származó növényeket 220 $\mu molm^{-2}s^{-1}$ fényintenzitáson tartva a hőmérsékletet fokozatosan csökkentettük (5/2 ^{o}C nappali/éjszakai hőmérséklet). Egy hetes akklimatizálás után a fagyasztási hőmérsékletre hűtöttük a növényeket. A fagyasztás -2, -3, és -4 ^{o}C-on történt két óra hosszat, majd a növényeket 17/16 ^{o}C-os nappali/éjszakai hőmérséklet és 175 $\mu molm^{-2}s^{-1}$ intenzitású 14 órás megvilágítás mellett neveltük három hétig. A fagykárosodás mértéke illetve az oldalrügyekből kihajtó új hajtások minősége és zöld tömege került kiértékelésre.

4. EREDMÉNYEK

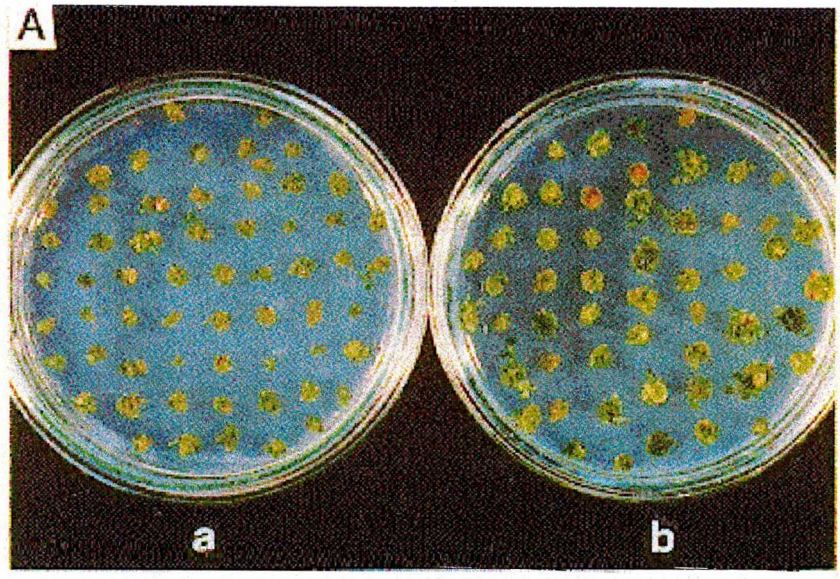
4.1. A szomatikus hibridek előállítása és szelekciója

A szülői fajok levélprotoplasztjai a fúzió körülményeit (ozmotikus sokk, membránkárosító hatások) jól tolerálták. A két faj levélprotoplasztjai morfológiailag hasonlóak, ezért a heteroplazmás sejtek aránya (s ezen keresztül a fúziós gyakoriság) nem volt megállapítható. Az általunk alkalmazott táptalajban a *S. brevidens* sejtek osztódásra képtelenek voltak, a *S. tuberosum* jó regenerációs képessége a heterofúziós sejtekben ezt ellensúlyozhatja. A növekvő kolóniák szelekcióját korábbi megfigyelésekre támaszkodva arra alapoztuk, hogy a hibrid kolóniák erőteljesebb fejlődésűek lehetnek, mint a szülői egyedek. A kontroll *S. tuberosum* és a fúziós kezelésből származó mikrokallusz populációból a legintenzívebben növekvő kolóniákat választottuk ki további tenyésztésre és regenerációra. A fúziós populációból származó szelektált kolóniák méretben és regenerációs képességben felülmúlták a burgonya protoklónokat (1/a ábra). Ez a különbség a tenyésztés további fázisaiban is fennmaradt, bár nem minden hibrid növényre volt jellemző, mint azt a részletes morfológiai felméréskor tapasztaltuk. Hatvankét feltételezetten hibrid klón ültettünk ki üvegházba, ahol a hibridek erőteljes fejlődésnek indultak (1/b ábra).

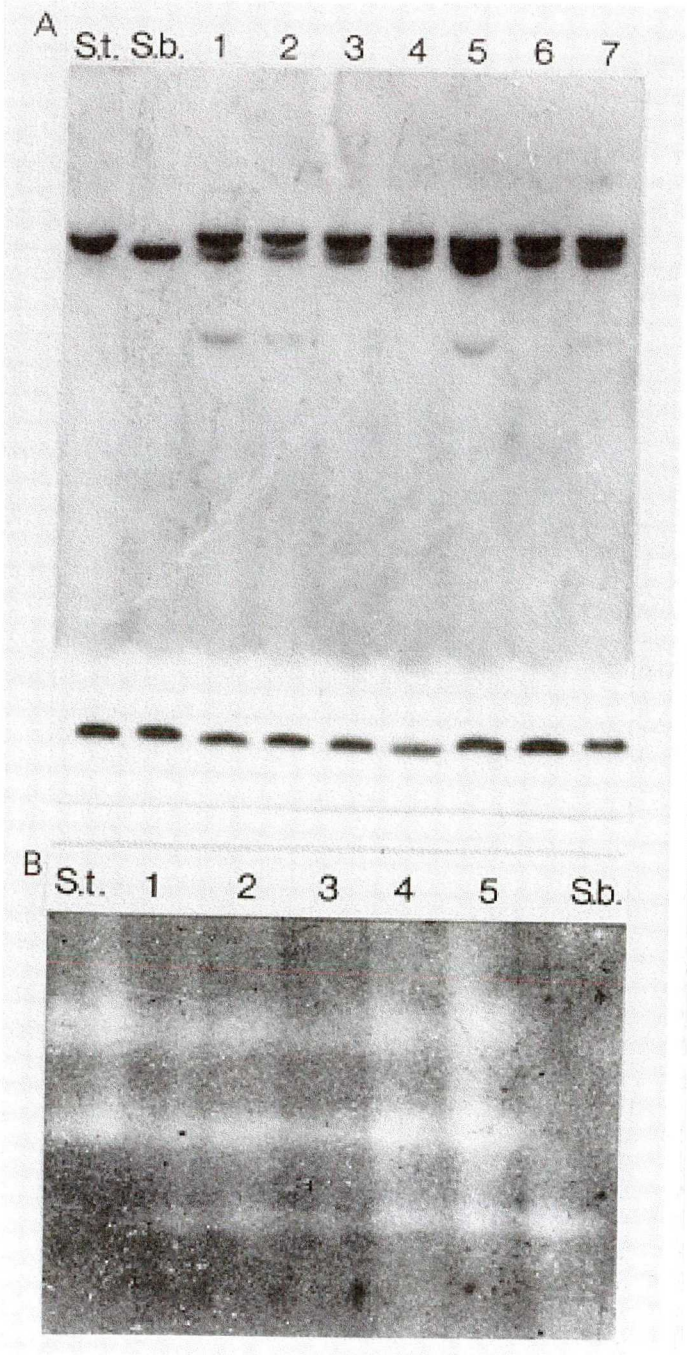
4.2. A hibriditás bizonyítása

4.2.1. Restrikciós fragment hossz polimorfizmus (RFLP)

Az RFLP analízishez az előzetes hibridizációs kísérletek alapján kiválasztott próbát használtunk, mely a burgonya 11-es kapcsoltsági csoportjához tartozik, s *S. brevidens*-ben is e helyen lokalizált (Williams és mtsai 1990). A *S. tuberosum*-ra jellemző hibridizáló fragmentumok mérete 9.4 és 1.5 kilobázis. A kisebb fragmetum megtalálható a *S. brevidens*-ben is, emellett egy 8.8 kilobázis hosszúságú fargmentum jellemző a vad fajra. A vizsgált hét, különböző kromoszómaszámú hibridben a szülők RFLP mintázatának addíciója volt megfigyelhető (2/a ábra). Ez DNS szinten is megerősíti a vizsgált klónok hibrid voltát, valamint rámutat, hogy mindkét faj adott kromoszómája legalább egy példányban előfordul a hibridekben. A DNS-DNS hibridizáció eredményeként néhány esteben új fragmentumok is megjelentek (5.6 kilobázis nagyságú), de ugyanezt a hibridizációt azonos vagy más próbával megismételve nem tudtuk újból észleni őket.



1. ábra. A hibrid vigorra alapuló szelekció során a kontroll burgonya (A/a) és a feltételezett hibrid kolóniák (A/b) között jelentős növekedésbeli különbség volt. (B) Az üvegházba kiültetett hibrid növények.



2. ábra. A feltételezett hibridek a két szülői fajra jellemző RFLP (A) és SOD izoenzim (B) mintázat addícióját mutatják. S.t.: *Solanum tuberosum*, **S.b.:***Solanum brevidens*, **1-7: feltételezett hibrid klónok.**

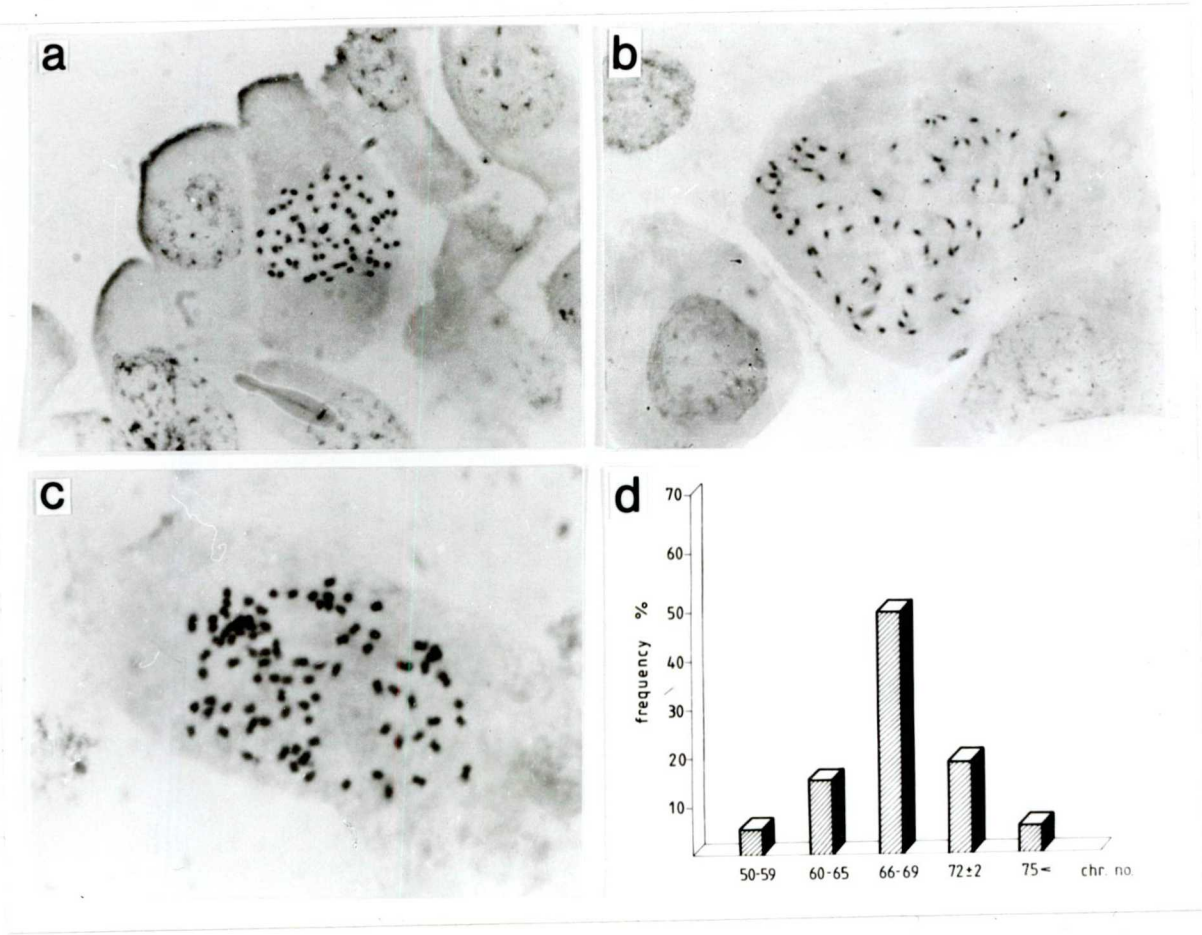
Valószínűleg a DNS nem tökéletes emésztéséből származó DNS szakaszok jelentek meg a hibridizáció során. A *S. brevidens*-re és a *S. tuberosum*-ra jellemző fragmentumok mennyiségi aránya (melyre a hibridizációs jel erősségéből következtethetünk) a legtöbb hibridben megközelítőleg 1:2, mely megfelel a közel hexaploid hibridek genetikai összetételének.

4.2.2. Izoenzim mintázat vizsgálata

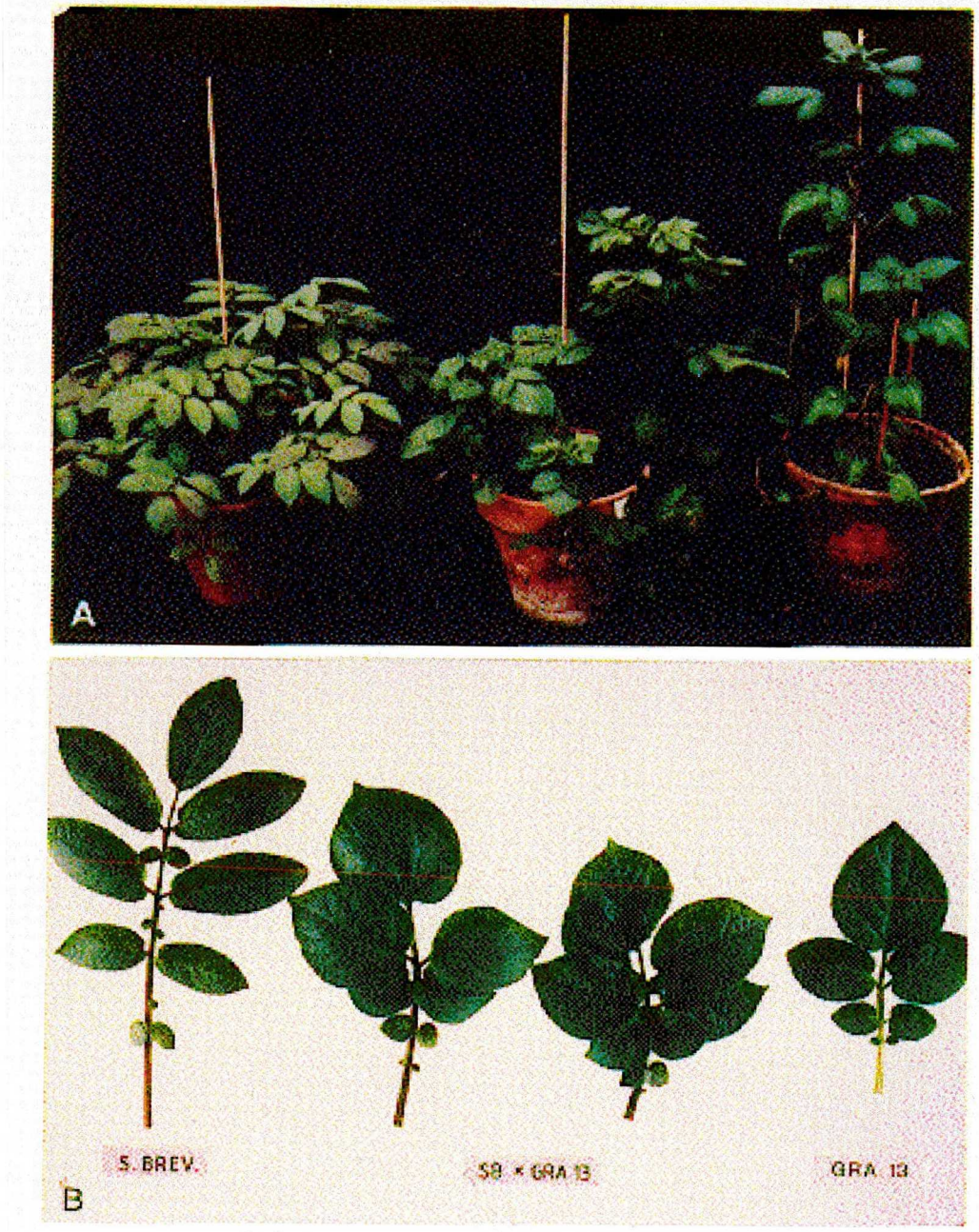
A glutamát-oxálacetát transzamináz és a szuperoxid dizmutáz enzimek által adott mintázatot huszonhárom klónnál vizsgáltuk. A feltételezett hibridek mindegyikénél megfigyelhető volt a szülőkre jellemző enzimformák egyidejű jelenléte. A mintázat minden vizsgált hibridnél azonos volt, ennek egy példáját ábrázolja a 2/b ábra a szuperoxid-dizmutáz enzim esetében. Az RFLP analízis eredményéhez hasonlóan a hibridekben a vizsgált markerek (enzimek) mindegyik lókusza legalább egy példányban megtalálható a hibridekben.

4.2.3. A hibridek kromoszómaszáma

Fúziós sejtpopulációból származó harmincegy regeneráns, *S. tuberosum* protoklónok illetve *S. brevidens* esetében határoztuk meg gyökércsúcsban a kromoszómaszámot. A két szülői faj eltérő ploidiaszintje (*S. brevidens*: $2n=2x=24$; *S. tuberosum*: $2n=4x=48$) lehetővé tette a hibridek azonosítását additív kromoszómaszámuk alapján. A hibridek kromoszómaszáma visszavezethető volt a várt hexaploid szintre, s ez a tény az RFLP és izoenzim mintázatokkal együtt bizonyítékként szolgálhat arra, hogy a szelektált szövetek illetve növények fúzióból származnak. A *S. brevidens* és a protoplaszt eredetű *S. tuberosum* növényeknél csak igen kis eltérés volt tapasztalható a várt értéktől. A szomatikus hibrideknél azonban nagy kromoszómaszámbeli variabilitást találtunk, s a hibrideket eszerint csoportosítottuk (3/d ábra). A vizsgált klónok 19%-a rendelkezett a hexaploid szinthez közeli kromoszómagarnitúrával (maximum 1-2 elvesztett kromoszóma). A hibridek mintegy felénél (52%) fordult elő kissé nagyobb mértékű kromoszómavesztés (3-6 kromoszóma) míg 16%-nál a genetikai állomány 8-12 kromoszómával csökkent. Az ennél nagyobb számú kromoszóma vesztést, csakúgy mint a hexaploid szintet meghaladó értéket (>75) csak morfológiailag abnormális növényekben megfigyelhettünk meg.



3. ábra. A hibrid növények kromoszómaszámának változatossága. (a), (b), (c): metafázisos sejtek 62, 71, 84 kromoszómával. (d): A 32 vizsgált hibrid kromoszómaszámának gyakorisági eloszlása.



4. ábra. (a) A *Solanum brevidens* (balra) és a *Solanum tuberosum* (jobbra) hajtás morfológiája közti átmeneti fenotípusúak a hibridek (középen). (b) A hibrid levelek alakja a burgonyáéra hasonlít, a levélnyél lila pigmentációja a *Solanum brevidens*-re jellemző.

Bizonyos mértékü kromoszómaeliminációt a hibridek -valószínüleg magas ploidiaszintjüknek köszönhetően- morfológiai aberráció megjelenése nélkül toleráltak. A hibrid növények a vegetatív szaporítás és fenntartás mintegy másfél éve alatt megőrizték a megfigyelt citológiai jellemzőiket.

4.3. A szomatikus hibridek morfológiája

4.3.1. Általános jellemzők

A szomatikus hibridek két, a *Solanum* nemzetségbe tartozó, de ezen belül távol álló faj hibridjei. A két szülői faj egymástól számos tulajdonságban különbözik, ezek közül a leglényegesebb, hogy a *S. brevidens* gumót nem képez. A hajtások föld feletti része jól megkülönböztethető a levelek eltérő alakja alapján. A hibridek általános megjelenése a burgonyára hasonlított (4/a ábra), a különböző szervek (szár, gumó, párta) fokozott anthociános pigmentáltsága jelezte a *S. brevidens*-ből származó genetikai hatások jelenlétét.

Néhány, a hajtásokra jellemző metrikus morfológiai adat az 1. táblázatban került összefoglalásra. A levelek mérete és a szár átmérője a két faj közti átmeneti értéket mutatott. A levelek és levélkék alakja a *S. tuberosum*-hoz állt közelebb (4/b ábra). Ugyanez jellemző az általunk "növény alak"-ként definiált tulajdonságra, melyet a növény magasságának és a levelek hosszának arányával fejeztünk ki. A hibrid növények hajtásai több esetben magasabbak és fejlettebbek voltak, ha ezeket a burgonyára jellemző értékekkel hasonlítottuk össze. A fokozott növekedési erély azonban nem minden klónra volt jellemző.

Igen jelentős variációt lehetett megfigyelni a klónok gumóképzési sajátosságaiban (5. ábra). A vizsgált 21 klón közül öt nem termett gumót. A *S. brevidens* genetikai hatásának tudható be a hibridek közti nagy változatosság a gumóhéj színében, a gumók számában és alakjában. A gumók számát és összsúlyát tekintve a hibridek mindegyike elmaradt a *S. tuberosum* protoklónok mögött.

A hibridek több mint 70%-a virágzott szabadföldi körülmények között. A jelenleg is folyó keresztezési kísérletek több ízben bizonyították egyes hibridek, mint termős szülők fertilitását (Mándi Lajosné Dr személyes közlése), a létrejött magvak életképességének vizsgálata folyamatban van.

	magasság cm	levél hossz mm	levél szélesség mm	levélke hossz mm	levélke szélesség mm	növény alak	levélke alak	szártag átlaghossz cm
S.tuberosum	91.8 ±7.8	122.8 ±23.6	74.8 ±16.9	46.0 ±8.4	38.8 ±7.6	7.46	1.19	2.92
S.brevidens	25 ±6.1	199.3 ±10.7	104.7 ±9.8	48.0 ±3.5	25.0 ±1.0	1.27	1.92	1.45
A_5	33.5 ±5.6	116.1 ±15.7	65.3 ±8.2	41.3 ±4.2	31.0 ±2.7	2.90	1.35	2.05
A_6	90.8 ±18.2	164.0 ±17.9	96.5 ±10.7	47.5 ±4.5	38.5 ±8.1	5.80	1.23	3.58
A_8	41.3 ±14.8	109.3 ±19.3	62.7 ±7.6	62.7 ±8.6	33.6 ±4.2	3.7	1.28	2.10
A_{11}	56.5 ±7.8	121.5 ±31.2	69.5 ±11.8	53.7 ±6.9	41.8 ±9.5	4.78	1.28	2.35
A_{12}	62.6 ±14.3	153.2 ±31.8	86.0 ±9.6	53.2 ±7.5	39.3 ±6.7	4.5	1.35	3.14

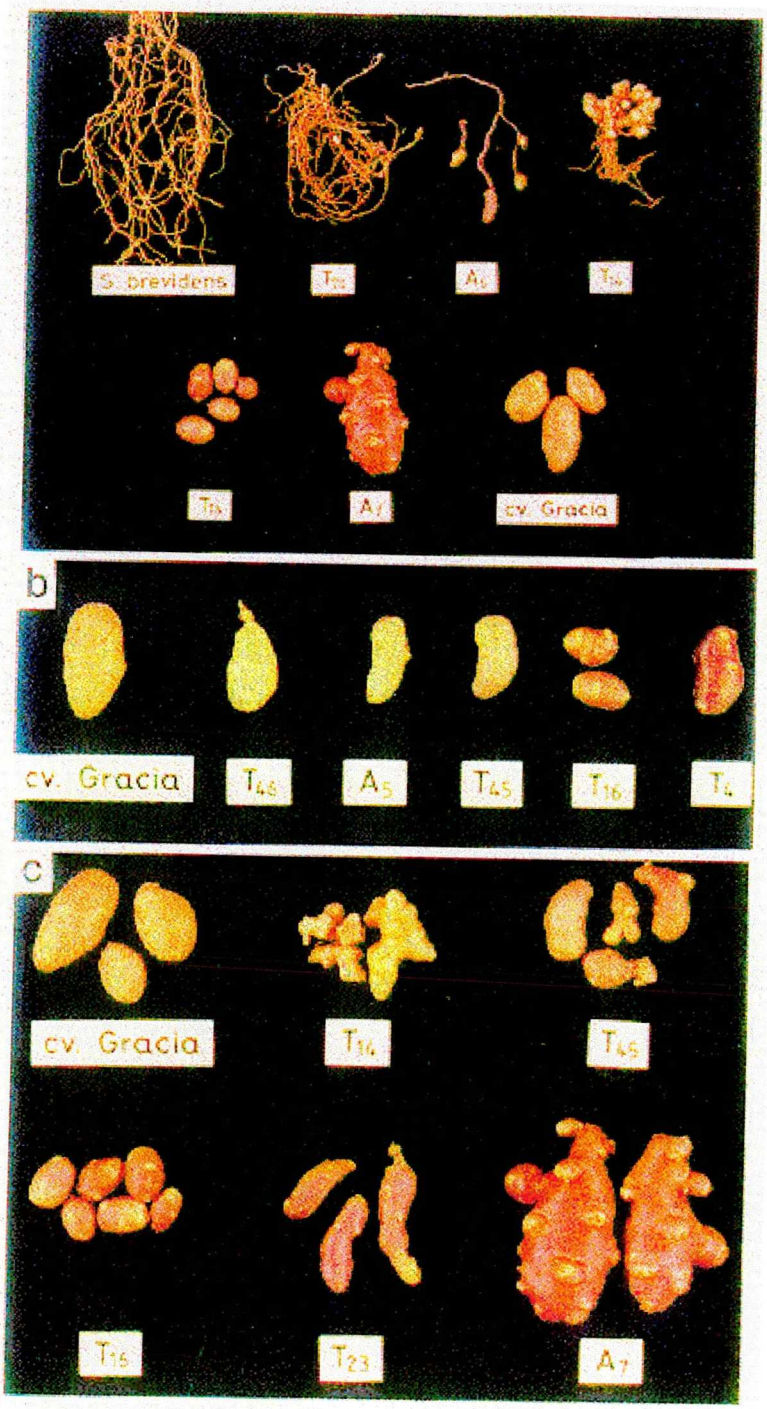
1. táblázat. A szomatikus hibridek és a szülői fajok néhány metrikus jellemzője. A táblázatban legalább három mérés átlaga és a szórás van feltüntetve. A származtatott adatok (növény alak, levélke alak, szártag hossz) részletes jellemzését az "Anyagok és módszerek" fejezet tartalmazza. A Táblázat a következő két oldalon folytatódik.

	magasság cm	levél hossz mm	levél szélesség mm	levélke hossz mm	levélke szélesség mm	növény alak	levélke alak	szártag átlaghossz cm
T_{16}	87.1 ±12.8	122.6 ±13.7	60.8 ±5.7	33.8 ±4.7	27.0 ±3.1	7.22	1.24	3.37
T_{28}	55.2 ±12.2	112.2 ±11.4	65.4 ±5.8	43.2 ±3.6	34.4 ±2.5	4.92	1.26	2.17
T_{30}	53.5 ±8.5	147.0 ±23.2	77.7 ±9.5	49.3 ±6.7	40.7 ±7.1	3.58	1.18	1.99
T_{45}	75.8 ±14.9	159.8 ±11.8	88.5 ±9.9	47.5 ±11.4	36.8 ±8.5	5.03	1.28	3.05
T_{52}	33.0 ±8.4	103.4 ±21.1	70.4 ±11.5	37.6 ±5.18	33.8 ±4.2	3.24	1.12	2.44
T_{69}	55.4 ±3.9	144.0 ±19.8	82.0 ±17.7	43.4 ±6.3	38.2 ±5.3	3.92	1.27	2.29
T_{70}	20.1 ±3.4	82.5 ±12.5	46.8 ±9.7	30.5 ±5.4	29.3 ±4.7	2.48	1.07	1.19
T_{110}	89.7 ±17.2	94.3 ±11.8	53.0 ±15.6	30.0 ±5.0	22.3 ±4.2	9.80	1.36	4.0

1. táblázat (folyatás).

	magasság cm	levél hossz mm	levél szélesség mm	levélke hossz mm	levélke szélesség mm	növény alak	levélke alak	szártag átlaghossz cm
A_{14}	36.5 ±2.7	133.3 ±14.8	89 ±8.2	56.3 ±10.1	41.8 ±6.2	2.73	1.34	2.48
A_{19}	19.8 ±1.9	69.7 ±4.2	44.3 ±5.2	27.7 ±3.1	23.7 ±2.6	2.80	1.19	1.36
A_{20}	62.3 ±15.2	88.7 ±5.1	51.7 ±9.5	37.3 ±3.1	31.3 ±7.8	7.06	1.22	3.23
A_{25}	66.2 ±5.2	137.3 ±22.1	58.3 ±4.2	35.0 ±4.4	27.3 ±6.4	4.87	1.3	3.15
A_{26}	59.0 ±12.4	124.0 ±0.6	65.0 ±5.8	40.0 ±2.8	32.0 ±1.9	4.75	1.25	2.41
A_{31}	54.4 ±11.6	157.0 ±15.1	83.8 ±5.9	50.5 ±7.6	35.0 ±7.4	3.45	1.46	2.57
T_2	28.5 ±5.2	100.7 ±6.0	72.0 ±11.9	35.7 ±2.5	30.0 ±1.7	2.83	1.19	1.94
T_4	79.9 ±12.1	131.5 ±17.1	78.7 ±6.5	47.5 ±6.1	51.7 ±7.8	6.4	0.93	3.29

1. táblázat (folytatás).



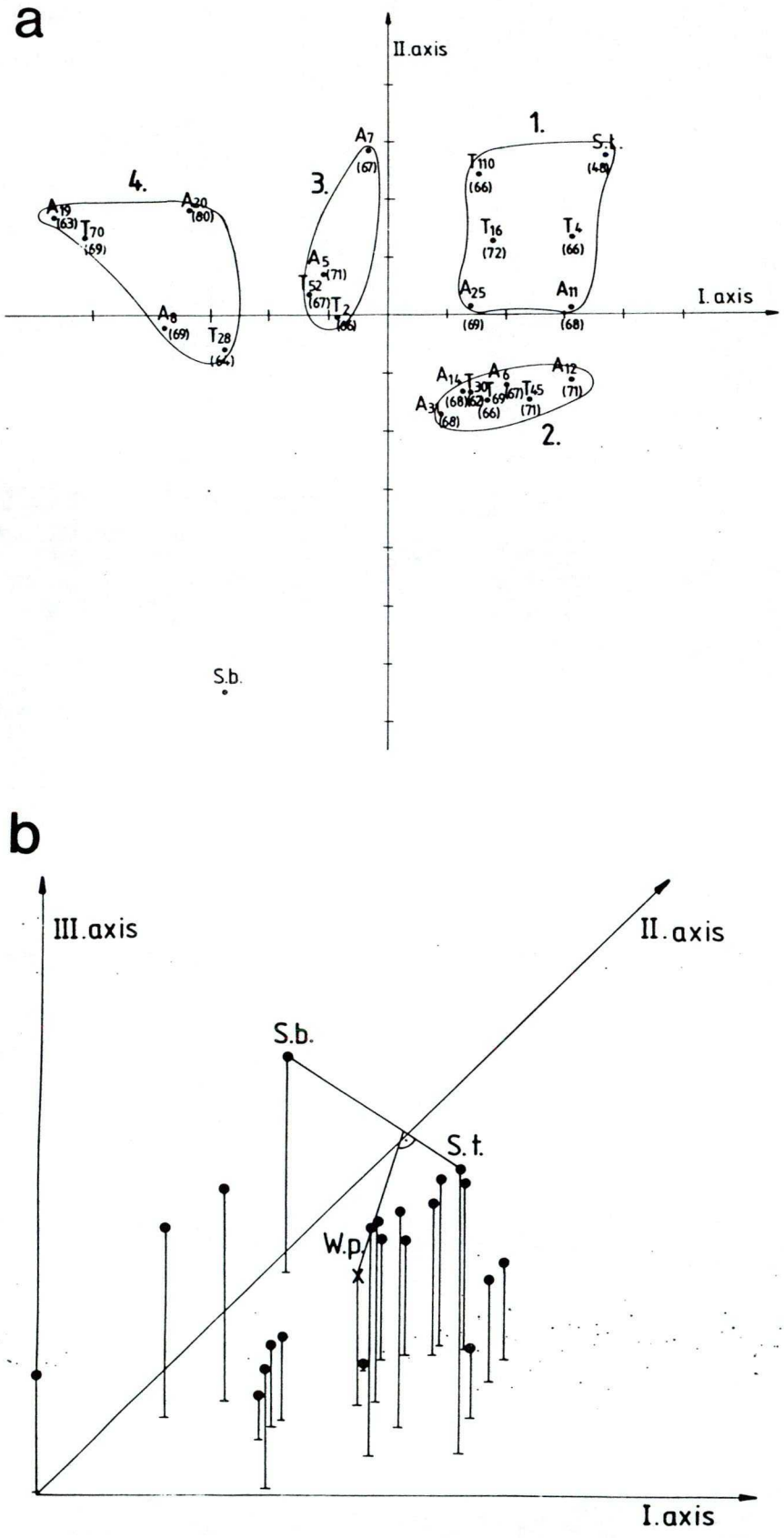
5. ábra. A hibridek által termett gumók mennyiségükben (a), színükben (b) és alakjukban (c) igen változatosak.

4.3.2. A morfológiai adatok többváltozós analízise

A hibrid populáció nagy morfológiai variabilitása miatt szükségesnek láttuk egy olyan statisztikai módszer alkalmazását, mely a mért paramétereket valamilyen kiértékelhető rendszerbe foglalja. A sokváltozós analitikai módszerek közül a főkomponens analízis (angolból rövidítve: PCA) a mért változókat (azaz a 21 morfológiai bélyeget) független változókká, ún. főkomponensekké vonja össze. A főkomponensek csökkenő fontossági sorrendbe rendezettek az össz-varianciából való részesedésük alapján. Az első három fő komponens sorrendben az összvarianciából 37.0, 19.6, és 13.1 százalékban részesült. Az első fő komponenst a gumóhéj színe, a gumó hossza és az indahossz adta, csaknem azonos arányban alkotva azt (2. táblázat). A második fő komponenst főként a levelek szélessége, hosszúsága és a véglevélke alakja adta. A noduszok és a másodlagos levélkék számának volt a legnagyobb korrelációja a harmadik fő komponessel. Az első három fő komponens szolgált tengelyül az eredmények grafikus ábrázolásánál. A PCA térben a hibridek és a szülői klónok csoportosításában az első két komponens (és az őket alkotó változók) játszották a fő szerepet. A *S. tuberosum* és a *S. brevidens* egymástól igen távol helyezkedik el, eltérő morfológiájuknak megfelelően. A hibridek alakbeli diverzitását a klónok széles tartományban való szóródása is jelzi (6/a ábra). Négy hibrid csoport elkülönülése figyelhető meg, s ez a hibridek valós morfológiájára visszavezethető. Az első csoportot a közepes levélméretű és normális gumójú klónok alkotják, egyben a legjobban megközelítve a burgonya fenotípusát. A jól elkülönülő második csoport tagjai nagyobb levelűek és hasonló gumókkal bírnak. Két további csoport különböztethető meg, melynek tagjai közepes levelekkel rendelkeznek és nem (4. csoport) vagy csak kevés (3. csoport) gumót képeznek. Bár az analízisbe csak behatárolt számú hibridet vontunk be, valós morfológiájuk és a PCA térben való elhelyezkedésük igen jó egyezést mutatott. A klónok relatív és abszolút helye azonban nem volt összefüggésben a kromoszómaszámukkal. A morfológiai jellegek sok génes meghatározottságát, a szülői génkészletek esetleges kölcsönhatásait figyelembe véve az egyed fenotípusa nem köthető szorosan a kromoszómavesztés mértékéhez.

2. tábázat. A főkomponens analízisben az első három tengelyt meghatározó értékek

Mért változók	Tengelyek		
	I	II	III
1. Szár átmérő	0.593	-0.623	0.177
2. Növény magasság	0.710	0.231	0.491
3. Nóduszok száma	0.585	0.202	0.623
4. Levél hossz	0.446	-0.855	0.074
5. Levél szélesség	0.412	0.843	-0.141
6. Véglevélke hossza	0.537	-0.614	-0.305
7. Véglevélke szélessége	0.565	-0.161	-0.466
8. Levélkék száma	0.358	-0.346	0.527
9. Másodlagos levélkék száma	0.184	-0.614	0.608
10. Növény alak (4/2)	0.482	0.579	0.530
11. Véglevélke alak (6/7)	-0.070	-0.749	0.298
12. Átlagos szárköz hossz (2/3)	0.636	0.210	0.235
13. Indák száma	0.691	0.030	-0.321
14. Inda hossz (átlag)	0.845	0.134	-0.032
15. Gumók száma	0.684	0.105	-0.236
16. Gumók hossza (átlag)	0.860	0.272	-0.162
17. Gumó szín	0.854	0.133	-0.071
18. Gumó alak (hossz/szélesség)	0.799	0.122	-0.414
19. Gumók összsúlya	0.534	0.380	0.284
20. Átlagos gumósúly	0.566	0.247	0.087
21. Gumórügy típusa	0.649	0.023	-0.479



6. ábra. A morfológiai felmérés alapján végzett főkomponens analízis nyomán a hibridek és a szülői klónok eloszlása a faktortérben. (a) Az első két főkomponens által meghatározott eloszlás. Zárójelben a hibridek kromoszómaszáma látható. (b) A hibridek eloszlása a három dimenziós térben. W.p.: a pontok által meghatározott felhő súlypontja.

Amikor a hexaploid szinten levő populációt, mint egészet vizsgáltuk, összefüggést kíséreltünk meg kimutatni a genetikai összetétel (a szülői kromoszómaszámok aránya) és a PCA térben elfoglalt hely között. A térben a szülői klónok közti szakaszra vetítve a hibrid populáció súlypontját, a vetületi pontnak a *S. tuberosum-S. brevidens* szakaszt olyan arányban kell metszenie, mely megfelel a szülői génkészletek arányának a hibridekben (6/b ábra). Amennyiben feltételezésünk helyes, e metszéspontnak két egységnyire a *S. brevidens*-től és egy egységnyire a *S. tuberosum*-tól kell elhelyezkednie, mivel a hexaploid szinten levő hibridek a tetraploid burgonya és a diploid *S. brevidens* genetikai készletét tartalmazzák. Esetünkben a metszéspont 1:1.87 arányban osztja a *S. tuberosum-S. brevidens* távolságot. Ez igen jó közelítése az elméletileg várt értéknek, annak ellenére, hogy mind a hibridek, mind a PCA tengelyek száma korlátozott.

4.4. A *S. brevidens*-ből származó rezisztencia tulajdonságok megnyilvánulása a hibridekben

Burgonya levélsodródási vírus elleni rezisztenciát tizennégy hibrid klón bevonásával vizsgáltuk. A biológiai és immunológiai tesztekkel vírus érzékeny egy klón volt, hétnél pedig az eredmények a két mérési módszer esetében ellentmondóak voltak. Hét klón növényein vírusfertőzöttség egyik módon sem volt kimutatható, ezek a vonalak a *S. brevidens*-hez hasonlóan rezisztenciát mutattak, míg a kontroll burgonya a vártnak megfelelően érzékeny volt a vírusfertőzésre.

A fagytűrési vizsgálatok céljára két hibrid vonalat választottunk ki. Alacsony hőmérsékletű edzés után a fagyasztás -2,-3 és -4 ^{o}C-on történt. A Grácia fajta növényei már -2 ^{o}C-on teljesen elfagytak, s a további, üvegházi körülmények között sem regenerálódtak. A *S. brevidens* növények -3 ^{o}C-on szintén elfagytak, azonban a három héttel későbbi vizsgálat idejére a túlélő alsó oldalrügyekből új hajtásokat képeztek (7. ábra). A hibridek viselkedése a *S. brevidens*-éhez hasonló volt , bár az új hajtások száma és minősége nem érte el a vad fajra jellemző értéket (3. táblázat).

3. Táblázat. A két szülő és hibrid klónok ellenállóképessége fagyhatásra. A hidegkezelt növények illetve a túlélő oldalrügyekből származó hajtások vizuális kiértékelése a fagyasztás után két héttel történt.

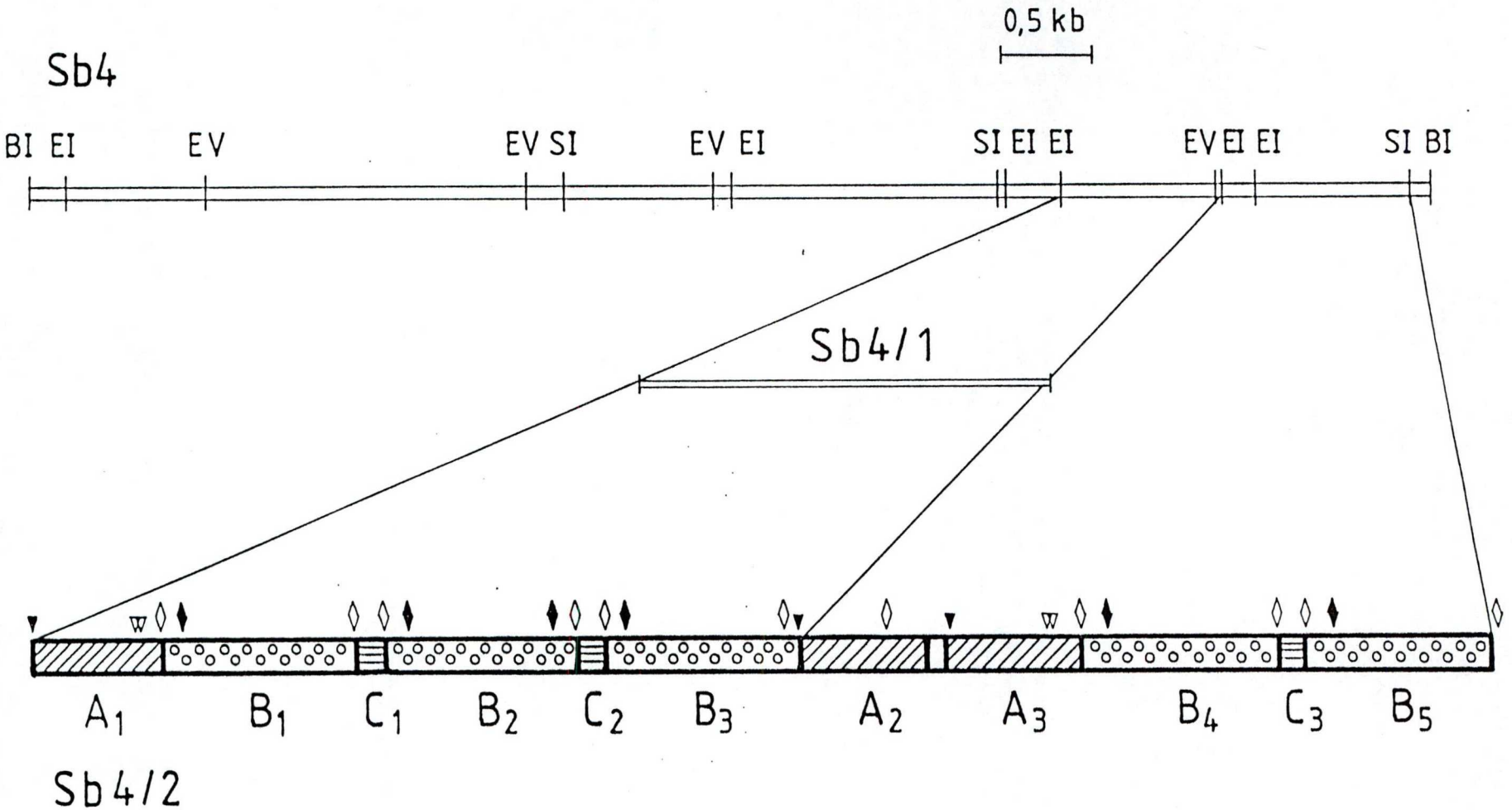
Fagyasztási hőmérséklet	Klónok:	S.t.	T_{28}	A_{12}	S.b.
	Elhalt%	100	4.0	15.0	0
-2 °C	Minőség[a]	0	2.1	1.9	4.6
	Zöld tömeg(gr)	0	3.29	1.94	7.67
	Elhalt %	100	44	54	38
-3 °C	Minőség[a]	0	1.1	1.4	3.4
	Zöld tömeg(gr)	0	0.48	0.40	4.28
-4 °C	Minden növény megfagyott és elhalt				

minőség[a]: A növények fiziológiai állapota egy önkényes skála alapján:
5 (optimális) - 0 (elpusztult).

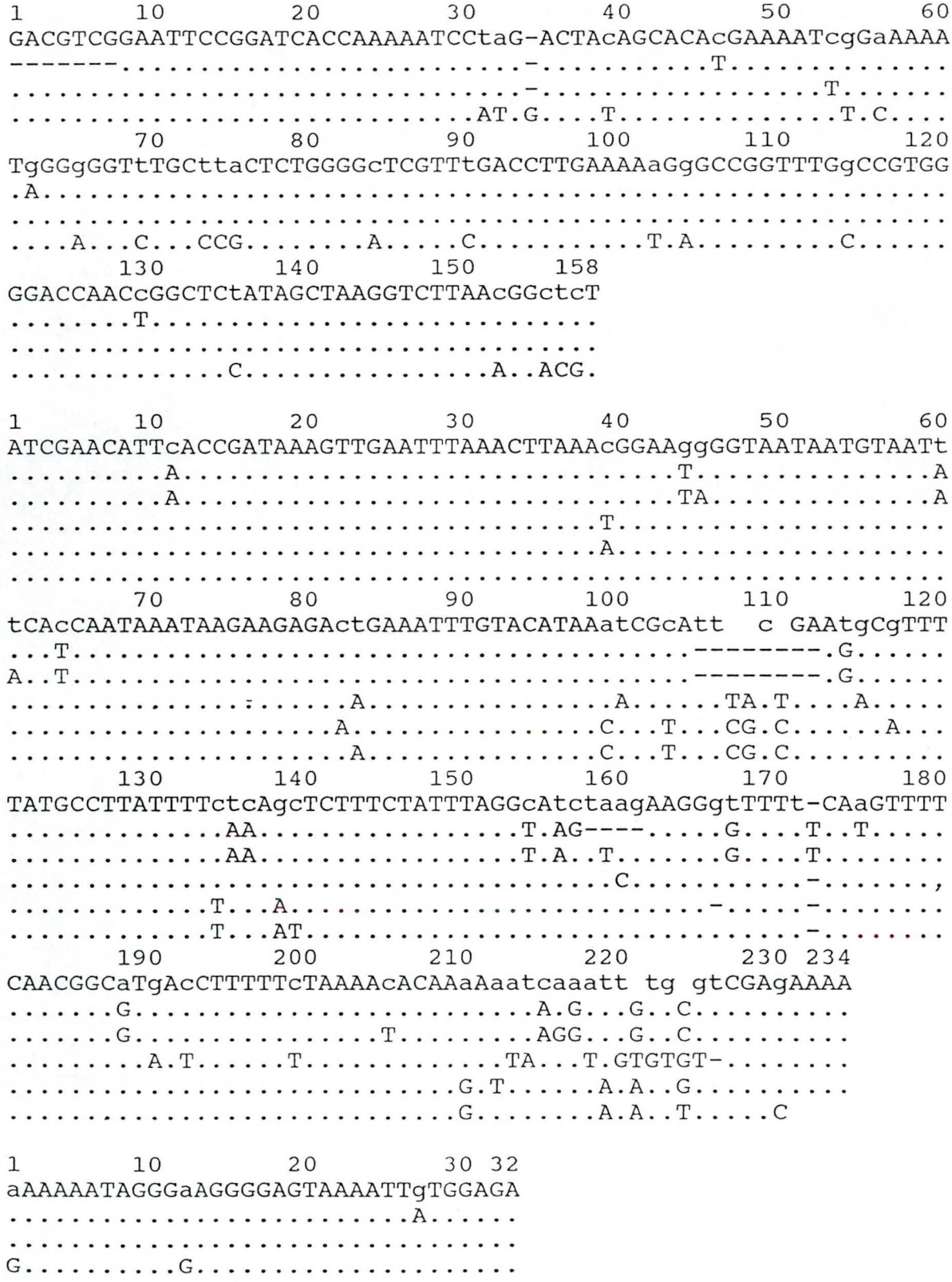
7. ábra. Hidegkezelés hatására a burgonya (GR) maradandó károsodást szenvedett, míg a *Solanum brevidens* (BR) és a két vizsgált hibrid (A_{12}, T_{28}) képes volt új hajtásokat regenerálni.

4.5. *S. brevidens*-specifikus DNS szekvencia jellemzése

A *S. brevidens* klóntár ezer-kétszáz vizsgált egyedéből huszonkettő mutatott különbséget a hibridizációs szignál erősségében, a két szülői faj genomikus DNS-ével való hibridizáció után. Az így kiválasztott rekombináns plazmidokat Eco RI restrikciós enzimmel emésztve, egy fragmentum bizonyult teljes mértékben fajspecifikusnak (Sb4/1 fragmentum), mely a *S. brevidens*-ben körülbelül tízezer példányban fordul elő (Preiszner és mtsai, előkészületben). Az Sb4/1 szekvencia a klónozott 7.1 kilobázis hosszúságú DNS szakasz 3' végének közelében helyezkedik el (8. ábra). További analízis eredményeként azt találtuk, hogy a szekvencia a 3' irányban folytatódik, így a bázissorrend meghatározását kiterjesztettük a teljes fajspecifitást mutató szakaszra (Sb4/2). A meghatározott szekvencia adenin és timin nukleotidokban viszonylag gazdag (63.5%). Három ismétlődő (A, B és C) és egy nem ismétlődő alegység építi fel (8. ábra), melyek egymáshoz nem hasonlítanak. Az alegységek egymást $A_1B_1C_1B_2C_2B_3A_2A_3B_4C_4B_5$ sorrendben követik, az A_2 és A_3 szakasz között egy 15 bázispár hosszúságú, független szekvenciával. A homológ alegységek összehasonlítása alapján egy konszenzus szekvencia megállapítható volt (9/a ábra). Az azonos típusú alegységek közti homológia változó s nem követi az alegységek ismétlődési sorrendjét (4. táblázat). Az A_1-A_3, B_1-B_4 és B_3-B_5 alegységek között volt a legnagyobb fokú hasonlóság 93.0%, 96.0% és 94.4% értékekkel. A különböző restrikciós enzimekkel emésztett *S. brevidens* DNS-hez való hibridizáció "létrás" mintázatából arra következtethetünk, hogy a szekvencia nem véletlenszerűen elszórva fordul elő a növény magi DNS állományában (10. ábra). Az Sb4/1 szekvencia *S. brevidens* genomban való lokalizációját citológiai preparátumon *in situ* hibridizációval állapítottuk meg. A hibridizációs szignál csaknem mindegyik kromoszóma telomérhez közeli régiójában jelent meg és két - feltehetően homológ- kromoszómán igen erős jelet adott (11. ábra). A fajspecifikus szekvenciát alkotó alegységek tehát jól behatároltan, egymás utáni ismétlődésben, nem pedig a genomban egyenletesen elszórva fordulnak elő. Az "A" és "B" alegységgel végzett Southern hibridizációk eredményeként, a kapott mintázatot (10. ábra) a szekvencia alapján várttal összehasonlítva jelentős különbségeket találtunk. Az Eco RI és Dra I restrikciós enzimmel emésztett DNS mintázata szabályos ismétlődést mutat, mely megfelel az "A" fragmentum 180 bázispáros méretének. A különböző emésztések során a "B" fragmentum alapvetően ugyanazokhoz a genomikus DNS szakaszokhoz hibridizál, azonban a kapott jel erőssége többször különbözik.



8. ábra. A *Solanum brevidens*-re specifikus ismétlődő szekvenciákat tartalmazó DNS vázlatos felépítése. Sb4: a klónozott szakasz. Sb 4/1 és Sb 4 /2: a klónozott DNS-en a fajspecifikus repeatek elhelyezkedése. Restrikciós endonukleázok hasítóhelyei: EV: Eco RV, EI: Eco RI, SI: Sal I, BI: Bam HI, (▾): Eco RI, (◆): Dra I, (▽): Hae III, (◇): Taq I.



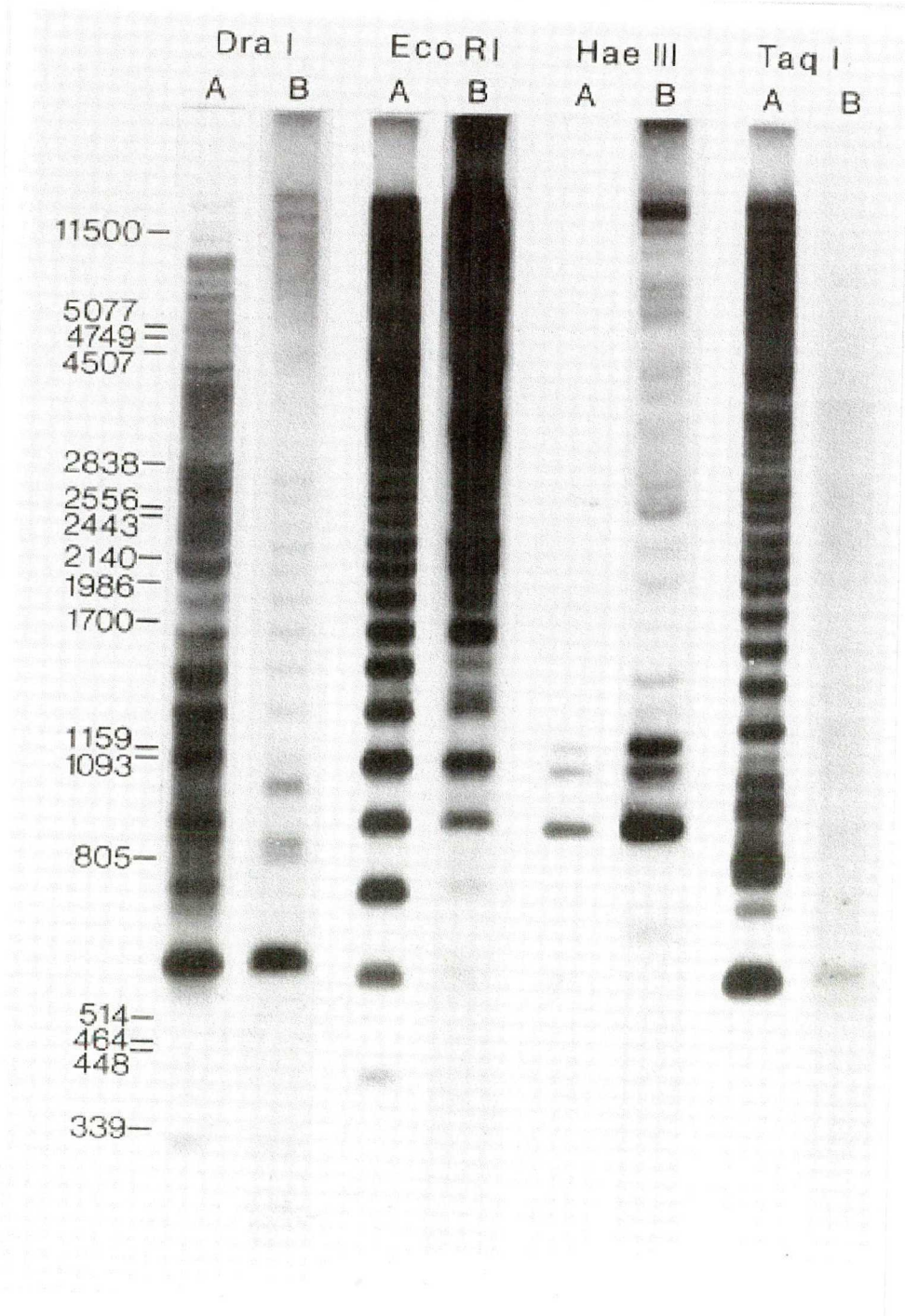
9. ábra. A fajspecifikus szekvencia ismétlődő szakaszainak összehasonlítása bázissorrendjük alapján s a konszenzus szekvencia. A pontok a konszenzus szekvenciával azonos bázisokat jelzik.

4.táblázat. A homológ ismétlődő szekvenciák bázissorendjének hasonlósága.

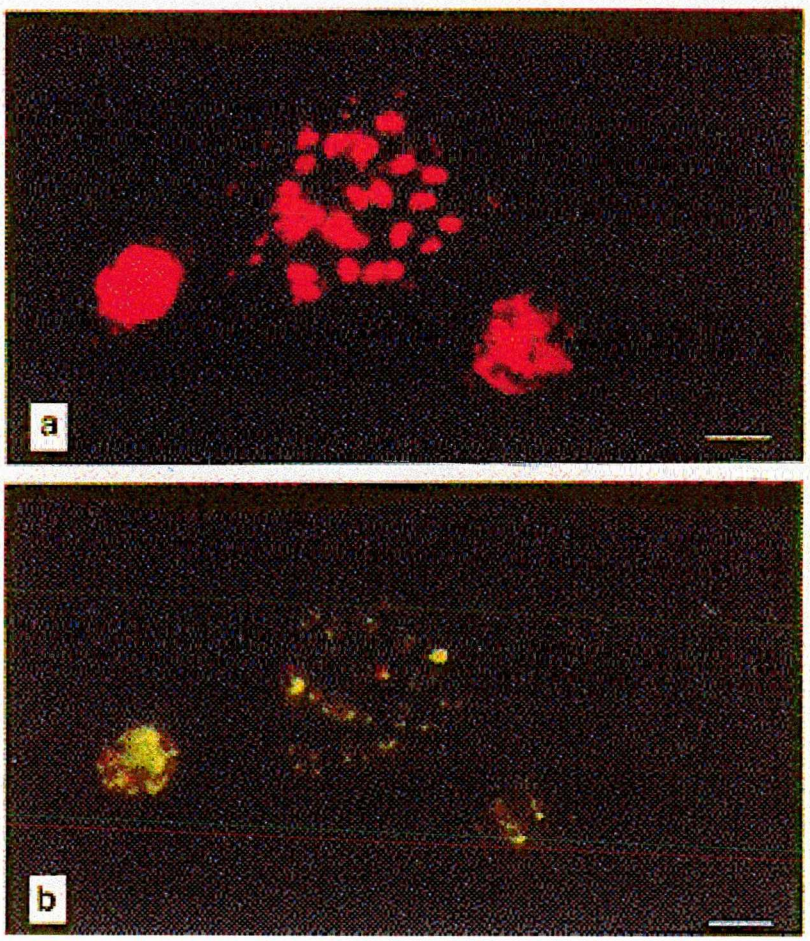
	A_1	A_2	A_3
A_1	-	81%	93%
A_2	-	-	86.7%

	B_1	B_2	B_3	B_4	B_5
B_1	-	85%	84.5%	96%	83.8%
B2	-	-	89.3%	85%	89.3%
B_3	-	-	-	83.8%	94.4%

	C_1	C_2	C_3
C_1	-	90.6%	96.9%
C_2	-	-	93.8%



10. ábra. Az A és B ismétlődő szekvencia hibridizációja különböző restrikciós enzimekkel emésztett *Solanum brevidens* genomikus DNS-hez. Baloldalon a standardként használt molekulaméret skála található.

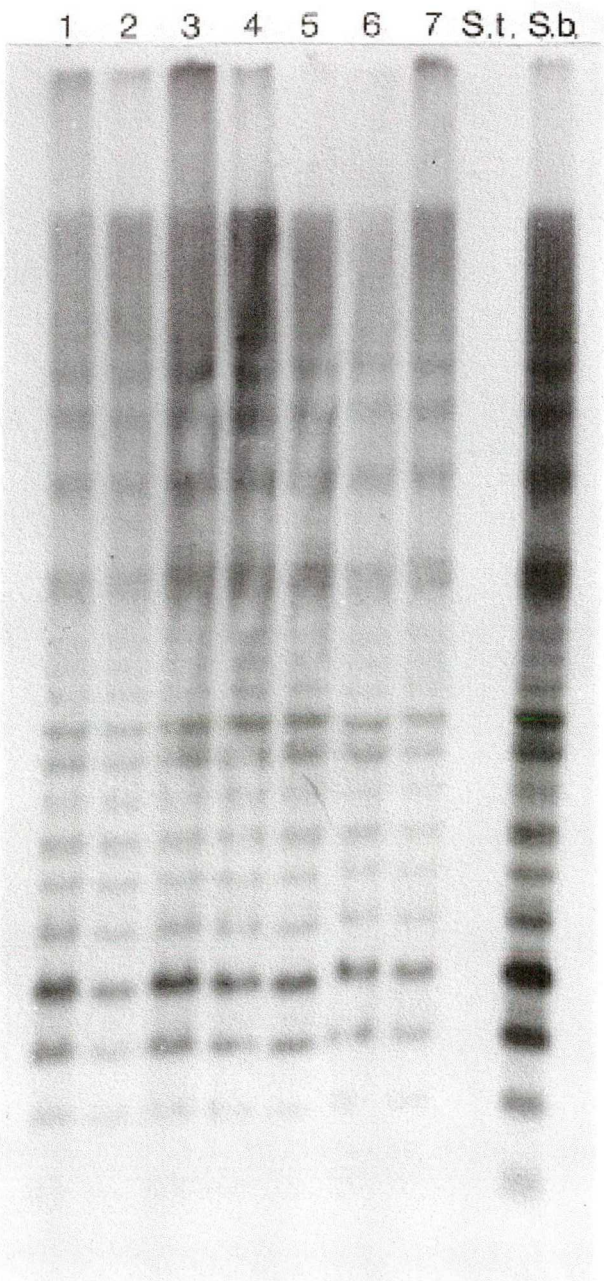


11. ábra. A fajspecifikus Sb 4/1 fragment csakmnem mindegyik kromoszómán megtalálható, két kromoszómán azonban nagyobb példányszámban helyezkedik el. (a) A sejtmag illetve a kromoszómák festése propídium-jodiddal. (b) A hibridizáció helye zöld fluoreszcenciát ad a kromoszómákon illetve a sejtmagokban.

Ez arra utal, hogy az adott genomikus fragmentumon az "A" és a "B" szakasz nem egyforma példányszámban fordul elő. A Dra I emésztésben a legnagyobb gyakorisággal előforduló genomikus fragmentum mérete 580 bázispár, mely megfelel a "BAA" szakasznak. A Hae III emésztési mintázatot az ismert szekvenciával összevetve feltételezhető hogy a "B" szakasz az "A" fragmentumok közé beépülve egy-négy példányban fordul elő. Ennél az emésztésnél a "B" fragmentum nagy molekulasúlyú DNS-hez is hibridizált, ellentétben az "A"-val. Lehetséges tehát, mivel a "B" szakasz nem tartalmaz Hae III hasítóhelyet, hogy az "A" szekvenciától függetlenül is előfordul. Mivel az "A", "B" és "C" egységek bázissorrendje nem konzervatív (9/a ábra) a genom más szakaszain elhelyezkedő, számunkra nem ismert módosulásaik, és/vagy eltérő metiláltságuk eredményeként a várttól eltérő Southern hibridizációs mintázatot kaptunk. Az adatokat összegezve megállapíthatjuk, hogy a szekvenciából ismert elrendeződésen kívül az "A" és "B" fragmentum tandem ismétlődésben is előfordul a genomban, és igen gyakori az $AB_{1-4}A$ struktúra előfordulása.

A bázissorrendet eddig leírt ismétlődő szekvenciákkal öszevetve, 74 %-os hasonlóságot találtunk a szekvencia "A" egységet tartalmazó szakasza és egy *Lycopersicon esculentum*-ból izolált 162 bázispár hosszúságú a paradicsom genomban tandem ismétlődésű DNS szekvencia (TGR I jelű, Ganal és mtsai 1988, Schweizer és mtsai 1988) között, mely a paradicsom kromoszómáinak telomérhez közeli régióiban fordul elő (Broun és mtsai 1992).

A vizsgált hét szomatikus hibrid restrikciós mintázata a fajspecifikus szekvencia tekintetében a *S. brevidens*-évl azonosnak bizonyult s a hibridek között sem tudtunk különbséget kimutathatni (12. ábra).



12. ábra. A hibridekben a fajspecifikus DNS szerveződése változatlan maradt a *Solanum brevidens*-hez képest. A DNS-t Eco RI restrikciós enzimmel emésztettük, s az Sb4/1 próbával hibridizáltuk. S.t.: *Solanum tuberosum*, S.b.:*Solanum brevidens*, 1-7: hibrid klónok.

5. MEGVITATÁS

5.1. A szomatikus hibridek létrehozása és szelekciója

A burgonya+ *S. brevidens* fajkombinációban számos esetben írták le szomatikus hibridek előállítását. Bár a polietilén-glikol, mint fuzogén vegyület káros hatását a burgonya protoplasztokra megfigyelték (Fish és mtsai 1987), a sejtfúziót legtöbbször nagy Ca^{2+} ion koncentrációjú és magas pH-jú PEG oldat alkalmazásával segítették elő (Barsby és mtsai 1984, Austin és mtsai 1985, Austin és mtsai 1986). Elektrofúziót alkalmaztak Fish és munkatársai (1988b), azonban e módszerrel a többszörös sejtfúzió gyakorisága nagyobb volt. Kísérletünkben a kémiai fúzió körülményei a szülői sejtekre nem voltak szélsőségesen káros hatással. A tetraploid burgonyából származó protoplasztok kevésbé érzékenyek a PEG membránkárosító hatására, mint a dihaploid fajokéi (Fish és mtsai 1987). A protoplaszt forrásként használt *in vitro* növények előzetesen kidolgozott optimális fenntartása és a protoplasztizolálás előtti kondícionálása a protoplasztok fiziológiai állapotát jelentős mértékben javította (Fehér és mtsai 1989).

A szomatikus hibridek azonosítását általában már a szövettenyésztés korai fázisában elvégzik, amennyiben különböző biokémiai szelekciós markerekkel rendelkező szülői vonalak állnak rendelkezésre. Alternatív lehetőséget jelent speciális szövettenyésztési körülmények alkalmazása, melyek lehetővé teszik a heterofúziós eredetű sejtek, kolóniák az egyik vagy mindkét szülőtől történő megkülönböztetését. A hibridek azonosítása a regenerált nagy egyedszámú növénypopulációban morfológiai bélyegek alapján is elvégezhető, melynek erdményességét biokémiai és citológiai vizsgálatok is megerősítik (Evans 1984, Harms 1985, Gleba és Shlumukov 1990, Fehér és Dudits 1993 áttekintései). Schieder és munkatársai (1978) javasolták először a szomatikus hibridek fokozott növekedési erélyét (hibrid vigor), mint egy lehetséges szelekciós bélyeget. Ezt a módszert azonban napjainkig csak néhány fajkombinációban alkalmazták (Handley és mtsai 1986, O'Connel és Hanson 1987, Waara és mtsai 1989, Gavrilenko és mtsai 1992). Burgonya intraspecifikus szomatikus hibridek esetében Debnath és Wenzel (1987) hasonló módszerrel a szülőinél magasabb ploidiafokú egyedeket azonosította. Kísérletünkben a leggyorsabban növekvő kolóniák kiválogatásával nagy számú hibrid egyedet tudtunk regenerálni. A fokozott fejlődési képesség legtöbb esetben a hajtások gyorsabb és erőteljesebb növekedésében is megnyilvánult. A *S tuberosum* + *S. brevidens* szomatikus hibridizációs kísérletekben általában a hibrid kolóniák és növények fokozott növekedési erélyét írták le (Austin és mtsai 1985, Fish és mtsai 1988b), bár egy esetben a hibrid vigort mutató növények

rosszul növő kolóniákból regeneráltak (Austin és mtsai 1986). Az általunk végzett kísérletben a hatvankét szelektált, feltételezetten hibrid növény közül összesen harmincnyolcat vizsgáltunk citológiai illetve biokémiai módszerekkel. A jellemzés során mindegyik hibridnek bizonyult. A hibrid vigorra alapuló szelekcióval azonos fajkombinációnál közel száz százalékos hibrid gyakoriság volt elérhető, melyet a hibrid kolóniák fajspecifikus DNS felhasználásával elvégzett jellemzése is igazolt (Polgár és mtsai, közlés alatt).

5.2. A hibridek genetikai állományának variabilitása

Mind a kromoszómaszám-beli, mind a morfológiai diverzitás jól ismert jelenség a szomatikus hibrideknél (Harms 1985, d'Amato 1985 áttekintései). A *Solanaceae* családon belüli interspecifikus hibridek kromoszómaszáma lehet euploid, a szülői készletek összege (Carlson és mtsai 1972, Adams és mtsai 1985, San és mtsai 1990), de számos esetben néhány (Puite és mtsai 1986) vagy több (Handley és mtsai 1986, O'Connel és Hanson 1987, de Vries és mtsai 1987) kromoszóma hiánya figyelhető meg. Az aneuploid hibridekben mindkét (de Vries és mtsai 1987) vagy csak az egyik (Pijnacker és mtsai 1987) szülő genetikai állományának kisebb-nagyobb része eliminálódik. Ez eredhet a szülői fajok genetikai instabilitásából, mely a szövettenyésztés során megnyilvánul, vagy a hibrid sejtekben fellépő negatív kölcsönhatásokból (szomatikus inkompatibilitás). A kis mértékű kromoszómaszám-beli változatosság jellemző a különböző *S. tuberosum* fajták protoplaszt eredetű klónjaira (Karp és mtsai 1982, Thomas és mtsai 1982, Sree Ramulu és mtsai 1983, Creissen és Karp 1985) csakúgy mint a *S. brevidens* tenyésztett sejtjeire (Osifo és mtsai 1989). A *S. tuberosum*+*S. brevidens* szomatikus hibrideknél mindig megfigyelhető volt bizonyos mértékű kromoszómavesztés (Austin és mtsai 1986, Barsby és mtsai 1984, Fish és mtsai 1988), bár az, hogy melyik partner kromoszómái vesznek el, kariotipizálási nehézségek miatt nem lehetett megállapítani. Az általunk végzett sejtfúziós kísérlet eredményeképpen a vizsgált hibridek 81%-a bizonyult aneuploidnak, míg a szülői protoplaszt eredetű növényeknél nem tapasztaltunk változást a kromoszómaszámban. A nagy számú aneuploid hibrid jelenléte magyarázható a hibridek megnövekedett ploidiaszintjével, mely a genetikai állomány instabilitását okozhatja. Diploid burgonya és *S. brevidens* tetra-, hexa- és oktoploid hibridjeit vizsgálva Pehu és mtsai (1989) szintén azt találták, hogy a ploidia szint növekedésével nő az aneuploidok aránya. A magas szintű ploidia a hibrid sejtben kromoszómavesztést indukált, mellyel egy viszonylag stabilabb állapot jöhetett létre, és az egyes kromoszómák elvesztése nem járt szükségszerűen együtt az életképesség egyidejű csökkenésével. Kísérletünkben a hibridek

kromoszómaszáma két kivétellel visszavezethető a *S. tuberosum* és *S. brevidens* sejtek 1:1 arányú fúziójára, mely hexaploid kromoszómaszámot eredményezett. Az alkalmazott szelekciós eljárás valószínűleg elősegítette a populáció hexaploid klónokban való feldúsulását, az oktoploidok gyengébb növekedésük miatt nem kerültek továbbtenyésztésre. Az oktoploid szinten levő burgonya+ *S. brevidens* szomatikus hibridek minden eddigi esetben abnormális vagy erősen visszamaradt fejlődésűek voltak, függetlenül a szülői genomok arányától (Austin és mtsai 1986, Fish és mtsai 1988b, Pehu és mtsai 1989).

Az izoenzim és RFLP mintázat analízisének segítségével a vizsgált klónok hibriditása további bizonyítást nyert. A hibridekben lejátszódó DNS-szintű változásokat csak néhány esetben vizsgálták az ún. "szimmetrikus" szomatikus hibrideknél, azaz melyeknél a kromoszómavesztést mesterségesen (sugárzással) nem indukálták. Williams (1990) egy *S. brevidens* + *S.tuberosum* szomatikus hibridnél deléciót mutatott ki, mely egy *S. brevidens* kromoszómán történt, s a szövettenyésztési periódus során jött létre. Pehu (1990) hasonló fajkombinációnál nem talált a hibridek között különbséget fajspecifikus DNS próbát használva. Az általunk izolált fajspecifikus szekvencia a *S. brevidens* genom körülbelül egy százalékát alkotja -Ramanna (1988) becslését véve alapul a genomméretet illetően- nagy gyakorisága ellenére a hibridekben nem tapasztaltunk változást az adott DNS szakaszokon. A fajspecifikus repetitív DNS szakaszok a szomatikus hibridek vizsgálatán kívül jó eszközül szolgálnak a növényi genetikai állomány szerveződésének és evolúciójának tanulmányozásához. Az izolált szekvencia teljes kimutathatatlansága *S. tuberosum*-ban a két faj törzsfejlődéstani távolságára vezethető vissza. Ugyanakkor 74%-os hasonlóságot találtunk egy paradicsomból izolált szakasszal (TGR I), mely számos más *Lycopersicon* fajban is megtalálható, a *Solanum* nemzetségben azonban csak a *S. lycopersicoides*-ben (Ganal és mtsai 1988, Schweizer és mtsai 1988). Rendszertanilag a *S. brevidens* és a *S. lycopersicoides* azonos szubszekcióba (*Petota sectio, Estolonifera subsectio*) tartozik, a gumót képző *Solanum* fajoktól nagy evolúciós távolságra található. Molekuláris taxonómiai vizsgálatok, melyek a kromoszomális és kloroplasztisz DNS restrikciós mintázatának változásán alapulnak, megerősítik a két faj szoros rokonságát (Debener és mtsai 1990, Hosaka és mtsai 1984). Ugyanakkor felvetik annak a lehetőségét, hogy a *Solanum* nemzetség ezen ága kisebb evolúciós távolságra van a *Lycopersicon* nemzetségtől, mint eddig feltételezték. A TGR I szekvencia jelenléte a paradicsomban, a *S. lycopersicoides*-ben és a *S. brevidens*-ben alátámasztani látszik ezt a hipotézist. A két homológ szekvencia valószínűleg azonos eredetű, s az evolúciós változások során mind a bázissorrend, mind az ismétlődő szekvencia szerveződése eltérően változott. A TGR I szakasz tandem ismétlődésben fordul elő

a paradicsom kromoszómák telomérhez közeli régióiban (Broun és mtsai 1992). Az általunk leírt szakasz szerveződése komplex, azaz több nem homológ alegység építi fel, ugyanakkor feltételezhetjük, hogy az "A" szakasz, mely részben homológ a paradicsom TGR I szekvenciával, tandem ismétlődésben is előfordul. Az ismétlődő szakaszok szerveződése eltérő a paradicsomból ismerthez képest. A nem homológ alegységek szekvenciából ismert sorrendje (8. ábra) rekombinációs és amplifikációs folyamatok eredményeként alakulhatott ki, és valószínűleg ez az elrendeződés dominál a *S. brevidens* genetikai állományában. Emellett a Southern hibridizációs mintázatból következtethetünk más szerveződési formák jelenlétére is. A több példányszámban, tandem előforduló szekvenciák gyakran egy vagy néhány helyen lokalizáltak a kromoszómákon (Peacock és mtsai 1988, Wu és mtsai 1991). Ebben a tekintetben a *S. brevidens*-ből és *Lycopersicon esculentum*-ból leírt DNS előfordulási helye alapvetően nem tér el. Különbség azonban, hogy a *S. brevidens*-ben egy pár, valószínűleg homológ kromoszómán nagyobb példányszámban halmozódott fel az ismétlődő szakasz. Ismert folyamat az ismétlődő DNS szakaszok megsokszorozódása, eltűnése és összetett ismétlődések kialakulása egyenlőtlen rekombinációk sorozatának eredményeként. Mindezt a magasabbrendű növényeknél reasszociációs kinetikai vizsgálatok, és a klónozott ismétlődő szekvenciák szerveződésének vizsgálata is megerősítette (Flavell 1980, Evans és mtsai 1983, Dhar és mtsai 1988, Ganal és mtsai 1988).

5.3. Genetikai sokféleség - morfológiai diverzitás

A morfológiai változatosság a hibrid populációban általános jelenség, a szomaklonális variáció (Larkin és Scowcroft 1981) illetve a hibridek eltérő genetikai összetételének eredménye. Az növények fenotípusa közel állhat az egyik szülőéhez (Schieder 1978), átmenetet képezhet a két szülő között (Dudits és mtsai 1977, Harms 1985) illetve új mennyiségi és minőségi tulajdonságok jelenhetnek meg (Fish és mtsai 1988b, Austin és mtsai 1986). Az általunk létrehozott szomatikus hibridek hajtásainak általános külső megjelenése a *S. tuberosum* szülőhöz hasonlított, azonban számos mérhető tulajdonságban felülmúlták azt (szárvastagság, levélméret). A részletes vizsgálat során a morfológiai jegyeket külön-külön felmérve a *S. brevidens* génkészlet hatása (pl. megnövekedett anthociános pigmentáltság) megfigyelhető volt. A növények mindkét szülőét meghaladó magassága valószínűleg a hibrid hatásra vezethető vissza, azonban ez nem általános jelenség a *S. tuberosum* + *S. brevidens* hibrid populációkban (pl. Fish és mtsai 1988). Legjellemzőbb a hibridek csökkent gumótermő képessége, melyet más kísérletekben is leírtak (Fish és mtsai 1987, 1988a, 1988b, Austin és mtsai 1986), s Pehu és mtsai (1989)

kimutathatták hogy a csökkenés a *S. brevidens* genetikai állományának jelenlevő mennyiségével arányos.

A morfológiai bélyegek általában több gén által meghatározottak. A szülői genomok hatásának kimutatása számos jelleg egyidejű vizsgálatával nem vihető végbe statisztikai módszer alkalmazása nélkül. Állatok és növények nemesítése a sokváltozós analízis felhasználásával ismert módszernek számít, azonban a genetikai és morfológiai bélyegek kapcsolatának vizsgálata e módszerrel csak néhány tanulmányra korlátozódik (Reyment 1984 összefoglaló munkája). A sokváltozós analízisben nagyszámú morfológiai bélyeg néhány mesterséges változóvá összevonva könnyebben tanulmányozható. A főkomponens analízis eredményeként négy, jól elhatárolható fenotípus csoportba sorolhattuk a hibrideket. A csoportokat alkotó klónok kromoszómaszáma igen változatos volt, nem találtunk összefüggést a klónok topológiai helyével. Ez utalhat arra, hogy a kromoszómavesztés véletlenszerű volt, azaz bármelyik szülői faj bármely kromoszómája elimininálódhatott. Valószínű, hogy az alkalmazott módszer érzékenysége nem éri el azt a fokot, mellyel ilyen apró változások követhetők. Pehu és mtsai (1989) megfigyelték, hogy a PCA térben a tetra-, hexa- és oktoploid hidridek ploidiaszintjüknek megfelelően csoportosulnak, azonban itt is nagy szóródás volt megfigyelhető a csoportokon belül. Hexaploid hibridjeink és a szülők egymáshoz viszonyított helyzetét elemezve azt találtuk, hogy a hibrid populáció a szülői genomok részvételi arányának megfelelő helyet foglal el a PCA térben. A genetikai összetétel hatása a hibridek morfológiájára, mely számos gén kölcsönhatásának eredményeként jött létre, az alkalmazott statisztikai módszerrel kimutatható volt.

5.4. A *S. brevidens* rezisztencia tulajdonságainak kifejeződése a hibrid populációban

A különböző patogén organizmusokon kívül a *S. brevidens* bizonyos fokú fagyhatásra is rezisztens (Ross és Rowe 1969). E tulajdonság jelenlétét szomatikus hibridekben még nem vizsgálták. Esetünkben a fagytűrés a hajtások fagyhatás utáni járulékos rügyből való regenerációs képességét jelenti. A vizsgált két hibridben bizonyos mértékben megtalálható ez az előnyös tulajdonság, bár nem éri el a vad fajra jellemző értéket.

A *S. brevidens* + *S. tuberosum* szomatikus hibridek eddigi megfigyelések szerint rezisztenciát mutattak levélsodródási vírussal szemben (Austin és mtsai 1985b, Helgeson és mtsai 1986, Gibson és mtsai 1988). Az ellenállás képességét az általunk előállított klónok egy része is hordozta. A vizsgált 14 hibrid közül hét mutatott egyértelmű rezisztenciát. A többi klón csökkent rezisztenciája, illetve az

ellentmondó vizsgálati eredmények eredhetnek a *S. brevidens* kromoszómák eliminációjából. A vad faj kromoszómáinak elvesztése okozhat csökkent mértékű ellenállóképességet, mint azt Gibson és mtsai (1988) valamint Pehu és mtsai (1990) hasonló vizsgálataik alapján feltételezték.

5.5. Az előállított szomatikus hibridek lehetséges növénynemesítési jelentősége

A kísérletben alkalmazott fajkombináció megválasztásakor figyelembe vettük, hogy mind a vírusrezisztencia, mind a fagytűrés olyan bélyegek, melyek fontosak lehetnek egy nemesítési programban. Virológiai szempontból különösen figyelmet érdemel, hogy a *S. brevidens* egyidejűleg több vírussal szemben rendelkezik rezisztenciával. Ez indokolta, hogy a fúziót elvégezzük, bár a kísérletek kezdetekor más kutatócsoportok néhány eredménye már ismert volt. Munkánk célja az volt, hogy kiindulási alapanyagot szolgáltassunk a magyar burgonyanemesítők számára. A hibridekre jellemző heterózis hatás szintén érdeklődésre tarthat számot. További kérdés, hogy mennyire stabil ez a sajátosság, a megnövekedett növekedési erély stabilan fennmarad-e a hibridek vegetatív illetve ivaros szaporítása során. A hibrid növényeket már átadtuk értékelésre a Vetőmag Vállalat Nyíregyházi Kutatóintézetének illetve a Pannon Agrártudományi Egyetem Keszthelyi Burgonyanemesítési Osztályának. Jelenleg folyik a keresztezés lehetőségeinek vizsgálata.

Hasonlóan a vad fajokkal végzett ivaros hibridizációhoz, a szomatikus hibridek előállítása során is számolni kell nem kívánt kedvezőtlen tulajdonságok átkerülésével. Ezért szükséges a hibridek visszakeresztezése megfelelően kiválasztott burgonyafajtákkal. A káros hatások kifejezetten jelentkeztek a gumótermés esetében. A burgonya gumóképző sajátossága e tekintetben kodominánsnak tekinthető. A tervezett keresztezések eredményeként az utódnemzedékben a burgonya genetikai állományának aránya nő. Ennek megfelelően hangsúlyosabban kifejeződnek a *S. tuberosum* tulajdonságai. Ez előnyös a gumótermelés szempontjából, azonban lehetséges, hogy a *S. brevidens*-ből származó rezisztencia mértéke kisebb lesz az ivaros utódokban, mint a szomatikus hibridekben. A hibridek sorozatos visszakeresztezése burgonyával a vad faj tulajdonságainak "kihígulásához" vezethet. Ezért az utódok szigorú szelekciójára van szükség, mely során a vad és a termesztett *Solanum* faj hasznos tulajdonságai egyaránt a lehető legmegfelelőbb mértékben nyilvánulnak meg.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

1. *S. tuberosum* és *S. brevidens* fajok levélprotoplasztjainak fúzióját követően hibrid mikrokolóniákat szelektáltunk, melyek növekedési erélye meghaladta a szülői vonalakét, s e tulajdonságuk alapján a szövettenyésztés korai fázisában a hibrideket azonosítani tudtuk. Bár a hibridekben kromoszómavesztés megfigyelhető volt, az aneuploidia mértéke nem volt hátrányos hatással a növények életképességére.

2. A regenerált hibrid növényekben mindkét szülő tulajdonságai egyidejüleg kifejeződtek. Többváltozós analízissel kimutattuk, hogy a hexaploid vonalak morfológiájukban a két szülő közti átmenetet képviselnek, mégpedig a szülői genomok arányának megfelelően. A hibridekben megnyilvánul néhány, a *S. brevidens*-re jellemző rezisztencia (fagytűrés, levélsodródási vírus rezisztencia). A vonalak agronómiai értéke elmarad a burgonyáétól, azonban fertilitásuk igazolódása esetén a továbbiakban nemesítési alapanyagként szolgálhatnak.

3. A *S. brevidens*-ből leírt repetitív szekvencia organizációja nem azonos a vele bizonyos fokú homológiát mutató paradicsom szekvenciával. Ugyanakkor a vizsgált szakasz számos más rokon fajból (pl. a *S. tuberosum*-ból) nem mutatható ki. Valószínű, hogy egy ősi szekvencia evolúciójának eredményeként alakultak ki a jelenlegi szerveződési különbségek a vizsgált fajokban.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

cpm	percenként számlált jel (counts per minute)
CTAB	cetil-trimetil-ammónium-bromid
cv.	*cultivar*
dATP	deoxiadenozin-trifoszfát
dUTP	deoxiuridin-trifoszfát
dCTP	deoxicitidin-trifoszfát
DNS	deoxi-ribonukleinsav
EDTA	etilén-diamin-tetra-acetát
ELISA	enzimkötött szilárd fázisú immunteszt (enzyme linked immunosorbent assay)
GOT	glutaminsav-oxálacetát transzamináz
MS	Murashige-Skoog féle táptalaj
PCA	főkomponens analízis
PEG	polietilén-glikol
PLRV	burgonya levélsodródási vírus
RFLP	restrikciós fragment-hossz polimorfizmus
RNS	ribonukleinsav
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
20xSSC	3 M nátrium-klorid és 0.3 M trinátrium-citrát vizes oldata
SOD	szuperoxid diszmutáz
Tris	trisz-(hidoxi-metil)-amino-metán
tRNS	transzfer RNS
U	az enzimaktivitás nemzetközi egysége
UV	ultraibolya sugárzás

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném köszönetemet kifejezni Dr Dudits Dénesnek, kinek munkacsoportjában lehetőségem nyílt tudásom minden irányú fejlesztésére. Külön hálás vagyok Fehér Attilának, aki a kutatómunka minden fázisában maximális segítséget nyújtott.

Köszönettel tartozom minden kollégámnak, különösen Györgyey Jánosnak és Metin Bilginnek, akik szakmai tanácsaikkal és gyakorlati munkájukkal segítettek a problémák megoldásában. A statisztikai analízist dr Karsai István útmutatásai alapján tudtuk elvégezni. A *S. brevidens* génkönyvtár elkészítésében Takács Imre, a fajspecifikus szekvencia bázissorrendjének meghatározásában Kiss Péter volt segítségünkre. Dr Sutka József és Dr Weisz Ottó (MTA Mezőgazdasági Kutatóintézet, Martonvásár) együttműködésével történt a hibridek fagytűrőképességének vizsgálata.

A dolgozat illusztrációit és a fotókat Dusha Béla készítette.

A Magyar Hitelbank Rt. Magyar Tudományért Alapítványának ösztöndíja anyagi hátteret nyújtott a disszertációval kapcsolatos kiadások fedezésére.

FELHASZNÁLT IRODALOM:

Adams TL, Quiros CF (1985) Somatic hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii*: regenerating ability and antibiotic resistance as selection systems. Plant Sci 40:209-219.

Austin S, Baer M, Ehlenfeldt M, Kazmierczak PJ, Helgeson JP (1985a) Intra-specific fusions in *S. tuberosum*. Theor Appl Genet 71: 172-175.

Austin S, Baer MA, Helgeson JP (1985b) Transfer of resistance to potato leaf roll virus from *Solanum brevidens* into *Solanum tuberosum* by somatic fusion. Plant Sci 39:75-82.

Austin S, Ehlenfeldt MK, Baer MA, Helgeson JP (1986) Somatic hybrids produced by protoplast fusion between *S. tuberosum* and *S. brevidens*: phenotypic variation under field conditions. Theor Appl Genet 71:682-690.

Austin S, Lojkowska E, Ehlenfeldt MK, Kelman A, Helgeson JP (1988) Fertile interspecific somatic hybrids of *Solanum*: A novel source of resistance to Erwinia soft rot. Phytopathology 78:1216-1220.

Barsby TL, Shepard J, Kemble R, Wong R (1984) Somatic hybridization in the genus *Solanum*: *S. tuberosum* and *S. brevidens*. Plant Cell Rep 3:165-167.

Beuchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to polyacrilamide gels. Anal Biochem 44:276-287.

Binding H, Jain SM, Finger J, Mordhorst G, Nehls R, Gressel J (1982) Somatic hybridization of an atrazine resistant biotype of *Solanum nigrum* with *Solanum tuberosum*. Theor Appl Genet 63:273-277.

Bokelmann GS, Roest S (1983) Plant regeneration from protoplasts of potato (*Solanum tuberosum* cv. Bintje). Z Pflanzenphysiol 109:259-265.

Bonierbale MW, Plaisted RL, Tanksley SD (1988) RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. Genetics 120:1095-1103.

Broun P, Ganal MW, Tanksley SD (1992) Telomeric arrays display high level of heritable polymorphism among closely related plant varieties. Proc Nat Acad Sci USA 89:1354-1357.

Butenko RG, Kuchko AA (1980) Somatic hybridization of *Solanum tuberosum* L. and *Solanum chacoense* Bitt. by protoplast fusion. In: Ferenczy L, Farkas GL (Eds) Advances in protoplast research, Akadémiai Kiadó, Budapest, 293-300. o.

Carlson PS, Smith HH, Dearing RD (1972) Parasexual interspecific plant hybridization. Proc Natl Acad Sci USA 69:2292-2994.

Cocking EC (1960) A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. Nature 187:962-963.

Corpet, F (1988): Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. NAR 16:10881-10890.

Creissen GP, Karp A (1985) Karyotypic changes in potato plants regenerated from protoplasts. Plant Cell Tissue and Organ Cult 4:171-182.

D'Amato F (1985) Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerates. In: CRC Crit Rev Plant Sci 3/1:73-112.

Dai C, Mertz D, Lambeth V (1987) Improved procedures for the isolation and culture of potato protoplasts. Plant Sci 50:79-84.

De Vries SE, Bokelman GS (1986) Regeneration of callus and plants from cell suspension protoplasts of dihaploid potato (*Solanum tuberosum* L.). J Plant Physiol 122:199-203.

De Vries SE, Ferwerda MA, Loonen AEHM, Pijnacker LP, Feenstra WJ (1987) Chromosomes in somatic hybrids between *Nicotiana plumbaginifolia* and a monoploid potato. Theor Appl Genet 75:170-176.

Debener T, Salamini F, Gebhardt C (1990) Phylogeny of wild and cultivated *Solanum* species based on nuclear restriction fragment lenght polymorphysms (RFLPs). Theor Appl Genet 79:360-368.

Debnath SC, Wenzel G (1987) Selection of somatic fusion products in potato by hybrid vigour. Potato Res 30:371-380.

Deimling S, Zitzlsperger J, Wenzel G (1988) Somatic fusion for breeding of tetraploid potatoes. Plant Breed 101:181-189.

Dhar MS, Dabak MM, Gupta VS, Ranjekar PK (1988) Organisation and properties of repeated DNA sequences in rice genome. Plant Science 55:43-52.

Douglas GC, Wetter LR, Keller WA, Setterfield G (1981) Somatic hybridization between *Nicotiana rustica* and *N. tabacum*, IV. Analysis of nuclear and chloroplast genome expression in somatic hybrids. Can J Bot 59:1509-1513.

Dudits D, Fejér O, Hadlaczky Gy, Koncz Cs, Lázár GB, Horváth G (1980) Intergenic gene transfer mediated by plant protoplast fusion. Mol Gen Genet 179:283-288.

Dudits D, Bögre L, Györgyey J (1991) Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. J Cell Science 99:475-484.

Dudits D, Hadlaczky Gy, Bajszár G, Koncz Cs, Lázár G, Horváth G (1979) Plant regeneration from intergeneric cell hybrids. Plant Sci Lett 15:101-112.

Dudits D, Hadlaczky Gy, Lévi E, Fejér O, Haydu Zs (1977) Somatic hybridization of *Daucus carota* and *Daucus capillifolius* by protoplast fusion. Theor Appl Genet 51:127-132.

Dudits D, Maróy E, Praznovszky T, Oláh Z, Györgyey J, Cella R (1987) Transfer of resistance traits from carrot into tobacco by asymmetric somatic hybridization: regeneration of fertile plants. Proc Natl Acad Sci USA 84:8434-8438.

Ehlenfeldt MK, Helgeson JP (1987) Fertility of somatic hybrids from protoplast fusions of *Solanum brevidens* and *S. tuberosum*. Theor Appl Genet 73:395-402.

Evans DA (1984) Protoplast fusion. In: Handbook of Plant Cell Culture Vol 1, eds. Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y (Macmillan Publ Co, New York) 291-321 o.

Evans IJ, James AM, Barnes SR (1983) Organization and evolution of repeated DNA sequences in closely related plant genomes. J Mol Biol 170:803-826.

Fehér A, Dudits D (1993) Plant protoplasts for cell fusion and direct DNA uptake: culture and regeneration system. In: Vasil IK és Thorpe TA (eds.) Plant Tissue Culture-Theory and Applications. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands (közlés alatt).

Fehér A, Preiszner J, Bilgin M, Györgyey J, Takács I, Dudits D (1991) Cytological and molecular approaches to reveal X-ray induced chromosome instability in interspecific somatic hybrids of *Solanum tuberosum* and *Solanum brevidens*. Physiologia Plantarum 82: A 26.

Fehér A, Preiszner J, Csanádi Gy, Litkey Zs, Dudits D (1992) Characterisation of chromosome instability in interspecific somatic hybrids obtainedby X-ray fusion between potato (*Solanum tuberosum* L.) and *S. brevidens* Phil. Theor Appl Genet 84:880-890.

Fehér A, Preiszner J, Dudits D (1989) Differentiation of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants from cultured leaf protoplasts. Acta Biol Hung 40:369-380.

Feinberg AP, Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem 132:6-13.

Fish N, Karp A, Jones MGK (1987) Improved isolation of dihaploid *S. tuberosum* protoplasts and the production of somatic hybrids between dihaploid *S. tuberosum* and *S. brevidens*. In Vitro 23:575-580.

Fish N, Karp A, Jones MGK (1988a) Production of somatic hybrids by electrofusion in *Solanum*. Theor Appl Genet 76:260-266.

Fish N, Steele SH, Jones MGK (1988b) Field assessment of dihaploid *Solanum tuberosum* and *S. brevidens* somatic hybrids. Theor Appl Genet 76:880-886.

Flavell R (1980): The molecular characterization and organization of plant chromosomal DNA sequences. Ann Rev Plant Physiol 31:569-596.

Galbraith GW, Afonso CL, Harkins KR (1984) Flow sorting and culture of protoplasts: conditions for high frequency recovery, growth and morphogenesis from sorted protoplasts of suspension cultures of *Nicotiana*. Plant Cell Rep 3:151-155.

Ganal MW, Lapitan NLV, Tanksley S (1988) A molecular and cytogenetic survey of major repeated DNA sequences in tomato (*Lycopersicon esculentum*). Mol Gen Genet 213:262-268.

Gavrilenko TA, Barbakar NI, Pavlov AV (1992) Somatic hybridization of *Lycopersicon esculentum* and non-tuberous *Solanum* species of the *Etuberosa* series. Plant Science 86:203-214.

Gibson RW Jones MGK, Fish N (1988) Resistance to potato leaf roll virus and potato virus Y in somatic hybrids between dihaploid *Solanum tuberosum* and *S. brevidens*. Theor Appl Genet 76:113-117.

Gill KS, Lubbers EL, Gill BS, Raup WJ, Cox TS (1991) A genetic linkage map of *Triticum tauschii* (DD) and its relationship to the D genome of bread wheat (AABBDD). Genome 34:362-374.

Gleba YY, Hoffmann F (1978) Hybrid cell lines of *Arabidopsis thaliana+Brassica campestris*: No evidence for specific chromosome elimination. Mol Gen Genet 165:257-264.

Gleba YY, Shlumukov LR (1990) Selection of somatic hybrids. In: Dix PJ (ed) Plant Cell Line Selection, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 257-286 o.

Glimelius K, Fahlesson J, Landgren M, Sjödin C, Sundberg E (1991) Gene transfer via somatic hybridization in plants. Trends in Biotech 9:24-30.

Gupta PP, Schieder O, Gupta M (1984) Intergeneric nuclear gene transfer between somatically and sexually incompatible plants through asymmetric protoplast fusion. Mol Gen Genet 197:30-35

Haberlach GT, Cohen BA, Reichert NA, Towill LE, Helgeson JP (1985) Isolation culture and regeneration of protoplasts from potato and several related *Solanum* species. Plant Sci 39:67-74.

Handley LW, Nickels RL, Cameron MW, Moore PP, Sink KC (1986) Somatic hybrid plants between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum lycopersicoides*. Theor Appl Genet 71:691-697.

Harms CT (1983) Somatic incompatibility in the development of higher plant somatic hybrids. Quart Rev Biol 58:325-353.

Harms CT (1985) Hybridization by somatic cell fusion. In: Fowke LC, Constabel F (eds) Plant protoplasts. CRC Press, Boca Raton, Florida, 169-203 o.

Helgeson JP (1989) Somatic hybridization of wild *Solanum* species with potato: a potential source of diversity for breeders. In: Louwes KM, Toussaint HAJM, Dellaert LMW (eds) Parental line breeding and selection in potato breeding, Pudoc, Wageningen, 87-94 o.

Helgeson JP, Hunt GJ, Haberlach GT, Austin S (1986) Somatic hybrids between *Solanum brevidens* and *Solanum tuberosum*: Expression of late blight resistance gene and potato leaf roll resistance. Plant Cell Rep 3:212- 214.

Horváth J, Király Z, Föglein F, Balogh J (1987) Resistance to potato leaf roll luteovirus in four accessions of *Solanum brevidens* Phil. In: Abstracts of Conference Papers and Posters, EAPR Conference 26-31. July, 1987, Aalborg, Denmark, 321-322 o.

Hosaka K, Ogihara M, Matsubayashi M, Tsunewaki K (1984) Phylogenetic relationship between the tuberous *Solanum* species as revealed by restriction endonuclease analysis of chloroplast DNA. Jpn J Genet 59:349-369.

Imai T, Irikura Y, Ishige T (1992) Studies of the gene expression in a somatic hybrid of dihaploid *Solanum tuberosum* and diploid *S. brevidens* using two-dimensional protein electrophoresis. Plant Cell Tissue and Organ Cult 29:115-124.

Imamura J, Saul MW, Potrykus I: X-ray irradiation promoted asymmetric somatic hybridisation and molecular analysis of the products. Theor Appl Genet 74: 445-450(1987).

Ish-Horowitz D, Burke JF (1981) Rapid and efficient cosmid cloning. Nucl Acid Res 9: 2989-2998.

Itoh K, Iwabuchi M, Shimamoto K. (1991) In situ hybridization with species-specific DNA probes gives evidence for asymmetric nature of *Brassica* hybrids obtained by X-ray fusion. Theor Appl Genet 81:356-362.

Johnston SA, Hannemann, RE (1982) Manipulations of endosperm balance number overcome crossing barriers between diploid *Solanum* species. Science 217:446-448.

Jones H, Karp A, Jones MGK (1989) Isolation, culture and regeneration of plants from potato protoplasts. Plant Cell Rep 8:307-311.

Jones RAC (1979) Resistance of potato leaf roll virus in *Solanum brevidens*. Potato Res 22:149-152.

Kao KN (1975) A nuclear staining method for plant protoplasts. In: Gamborg OL, Wetter LR (eds) Plant Tissue culture methods. NRCC Praire Regional Laboratory, Saskatoon. 60-62 o.

Kao KN (1977) Chromosomal behavior in somatic hybrids of soybean-*Nicotiana glauca*. Mol Gen Genet 150:225-230.

Kao KN, Michayluk MR (1974) A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. Planta 115:355-367.

Kao KN, Saleem M (1986) Improved fusion of mesophyll and cotyledon protoplasts with PEG and high pH-Ca2+ solutions. J Plant Physiol 122:217-225.

Karp A, Nelson RS, Thomas E, Bright SW (1982) Chromosome variation in protoplast-derived potato plants. Theor Appl Genet 63:265-272.

Keller WA, Melchers G (1973) The effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion. Z. Naturforsch 28:737-741.

Laine E, Ducreaux G (1987) Plant regeneration from root apical protoplasts of *Solanum tuberosum* cv. BF15. J Plant Physiol 126:345-354.

Larkin PJ, Scowcroft WR (1981) Somaclonal variation- a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor Appl Genet 60:187-214.

Maheshwari SC, Gill R, Maheshwari N, Gharyal PK (1986) Isolation and regenarion of protoplasts from higher plants. In: Reinert J, Binding H (eds.) Differentiation of protoplasts and of transformed plant cells. Springer Verlag, Berlin. 3-36. o.

Martin R, Burke JF (1989) Multiple *E. coli* transformations on a single bacterial plate. NAR 17:8386.

Masson J, Lanceli D, Bellini C, Lecerf M, Guerche P, Pelletier G (1989) Selection of somatic hybrids between diploid clones of potato (*Solanum tuberosum*) transformed by direct gene transfer. Theor Appl Genet 78:153-159.

Mattheij WM, Eijlander R, de Koning JRA, Louwes KM (1992) Interspecific hybridization between the cultivated potato *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* L. and the wild species *Solanum circaeifolium* ssp. *circaeifolium* Bitter exhibiting resistance to *Phytophtora infestans* (Mont.) de Bary and *Globodera pallida* (Stone) Behrens. Theor Appl Genet 83:459-466.

Menczel L, Nagy F, Lázár G, Maliga P (1983) Transfer of cytoplasmic male sterility by selection for streptomycin resistance after protoplast fusion in *Nicotiana*. Mol Gen Genet 189:365-369.

Melchers G, Sacristan MD, Holder AA (1978) Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. Carlsberg Res Comm 43:203-218.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497.

Murray MG, Thompson (1980) Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucl Acid Res 8:4321-4326.

Nagata T (1978) A novel cell-fusion method of protoplasts by polyvinil-alcohol. Naturwissenschaften 65:263-264

O'Connell MA, Hanson MR (1987) Regeneration of somatic hybrid plants formed between *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii*. Theor Appl Genet 75:83-89.

Okamura M (1987) Regenaration and evaluation of somatic hybrid plants between *Solanum tuberosum* and *Lycopersicon pimpinellifolium*. In: Puite KJ és mtsai (Eds) Progress in plant protoplast research, Kluwer Academic publishers, Dodrecht, 213-214 o.

Osifo EO, Webb JK, Henshaw GG (1989) Variation amongst callus- derived potato plants, *Solanum brevidens*. J Plant Physiol 134:1-4.

Peacock WJ, Dennis ES, Rhoades MM, Pryor AJ (1981) Highly repeated DNA sequence limited to knob heterochromatin in maize. Proc Nat Acad Sci USA 78:4490-4494.

Pehu E, Gibson RW, Jones MGK, Karp A (1990) Studies on the genetic basis of resistance to potato leaf roll virus, potato virus Y and potato virus X in *Solanum brevidens* using somatic hybrids of *Solanum brevidens* and *Solanum tuberosum*. Plant Sci 69:95-101.

Pehu E, Karp A, Moore K, Steele S, Dunckley R, Jones MGK (1989) Molecular, cytogenetic and morphological characterization of somatic hybrids of dihaploid *Solanum tuberosum* and diploid *S. brevidens*. Theor Appl Genet 78:696-704.

Pehu E, Thomas M, Poutala T, Karp A, Jones MGK (1990) Species-specific sequences in the genus *Solanum*: identification, characterization, and application to study somatic hybrids of *S. brevidens* and *S. tuberosum*. Theor Appl Genet 80:693-698 .

Perl A, Aviv D, Galun E (1988) Ethylene and *in vitro* culture of potato: supression of ethylene generation vastly improves protoplast yield, plating efficiency and transient expression of an alien gene. Plant Cell Rep 7:403-406.

Piastuch WC, Bates GW (1990) Chromosomal analysis of *Nicotiana* asymmetric somatic hybrids by dot blotting and in situ hybridization. Mol Gen Genet 222:97-103.

Pijnacker LP, Ferwerda MA (1984) Giemsa C-banding of potato chromosomes. Can J Cytol 26:415-419.

Pijnacker LP, Ferwerda MA, Puite KJ, Roest S (1987) Elimination of *Solanum phureja* nucleolar chromosomes in *S. tuberosum*+*S. phureja* somatic hybrids. Theor Appl Genet 73:878-882.

Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity fluorescence hybridization. Proc Nat Acad Sci USA 83:2934-2938.

Podani J (1988) SYN-TAX III. Computer programs for data analysis in ecology and systematics: a users' manual. Abstr Bot 12/Suppl.1.

Polgár Zs, Preiszner J, Dudits D, Fehér A: Vigorous growth of fusion products allows highly efficient selection of interspecific potato somatic hybrids: molecular proofs. Plant Cell Rep (benyújtva).

Preiszner J, Fehér A, Veisz O, Sutka J, Dudits D (1991) Characterization of morphological variation and cold resistance in interspecific somatic hybrids between potato (*Solanum tuberosum*) and *S. brevidens*. Euphytica 57:37-49.

Preiszner J, Takács I, Bilgin M, Györgyey J, Dudits D, Fehér A (előkészületben) A *Solanum brevidens* repetitive sequence related to the TGRI subtelomeric repeats of *Lycopersicon esculentum*: similar chromosomal distribution but different organization.

Puite KJ, Roest S., Pijnacker LP (1986) Somatic hybrid potato plants after electrofusion of diploid *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*. Plant Cell Rep 5:262-265.

Ramanna MS (1988): Strategies for cloning useful genes from *Solanaceous* crops. In: Louwes KM, Toussaint HAJM, Dellaert LMW (eds.): Parental line breeding and selection in potato breeding, Pudoc, Wageningen, 118-122 o.

Reyment RA, Blackith RA, Campbell NA (1984) Multivariate morphometrics. Academic Press, London.

Roddick JG, Melchers G (1985) Steroidal glycoalkaloid content of potato, tomato and their somatic hybrids. Theor Appl Genet 70:655-660.

Ross RW, Rowe PR (1969) Utilizing the frost resistance of diploid *Solanum* species. Am Pot J 46:5-13.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989): Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

San LH, Vedel F, Sihachakr D., Remy R (1990) Morphological and molecular characterisation of fertile tetraploid somatic hybrids produced by protoplast electrofusion and PEG-induced fusion between *Lycopersicon esculentum* Mill. and *L. peruvianum* Mill. Mol Gen Genet 221:17-26.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc Nat Acad Sci USA 74:5463-5467.

Saul MW, Potrykus I (1984) Species-specific repetitive DNA used to identify interspecific somatic hybrids. Plant Cell Rep 3:65-67.

Schieder O (1978) Somatic hybrids of *Datura innoxia* Mill+ *Datura discolor* Bernh. and of *Datura innoxia* Mill.+*Datura stramonium* L. var. tatula L. I. Selection and characterisation. Mol Gen Genet 162:113-119.

Schiller B, Herrmann RG, Melchers G (1982) Restriction endonuclease analysis of plastid DNA from tomato, potato and some of their somatic hybrids. Mol Gen Genet 186:453-459.

Schweiger HG, Dirk J, Koop HU, Kranz E, Neuhaus G, Spangenberg G, Walff D (1987) Individual selection, culture and manipulation of higher plant cells. Theor Appl Genet 73:769-783.

Schweizer G, Ganal M, Ninnemann H, Hemleben V (1988) Species-specific DNA sequences for identification of somatic hybrids between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum acaule*. Theor Appl Genet 75:679-684.

Scowcroft WR, Larkin PJ (1981) Chloroplast DNA assorts randomly in intraspecific somatic hybrids of *Nicotiana debneyi*. Theor Appl Genet 60:179-184

Serraf I, Sihachakr D, Ducreaux G, Brown SC, Allot M, Barghi N, Rossignol L (1991) Interspecific somatic hybridization in potato by protoplast electrofusion. Plant Sci 76:115-126.

Shepard JF (1980) Cultivar dependent cultural refinements in potato protoplast regeneration. Plant Sci Lett 26:127-132.

Shepard JF, Totten RE (1977) Mesophyll cell protoplasts of potato- isolation, proliferation and plant regeneration. Plant Physiol 60:313-316.

Sidorov VA, Zubko MK, Kuchko AA, Komarnitsky IK, Gleba YY (1987) Somatic hybridization in potato: use of gamma-irradiated protoplasts of *Solanum pinnatisectum* in genetic reconstitution. Theor Appl Genet 74:364-368.

Spangenberg G, Osusky M, Oliviera MM, Freydl E, Nagel J, Pais MS, Potrykus I (1990) Somatic hybridization by microfusion of defined protoplast pairs in *Nicotiana*: morphological, genetic and molecular characterisation. Theor Appl Genet 80:577-587.

Sree Ramulu K, Dijkhuis P, Roest S (1983) Phenotypic variation and ploidy level of plants regenerated from protoplasts of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L. cv. 'Bintje') Theor Appl Genet 65:329-338.

Szabados L, Dudits D (1980) Fusion between interphase and mitotic plant protoplasts. Induction of premature chromosome condensation. Exp Cell Res 127:442-446.

Takebe I, Labib G, Melchers G (1971) Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. Naturwissenschaften 58:318-320.

Tanksley SD, Mutschler MA, Rick CM (1987) Linkeage map of tomato (*Lycopersicon esculentum*) (2n=24). In: O'Brian SJ (ed) Genetic maps 1987. A compilation of linkeage and restriction maps of genetically studied organisms. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 655-669 o.

Thomas E, Bright SWJ, Franklin J, Lancaster VA, Miflin BJ (1982) Variation amongst protoplast-derived potato plants (*Solanum tuberosum* cv. 'Maris Bard') Theor Appl Genet 62:65-68.

Uijtewaal BA, Suurs LCJM, Jacobsen E (1987) Protoplast fusion of monohaploid (2n=x=12) potato clones: identification of somatic hybrids using malate dehydrogenase as a biochemical marker. Plant Sci 51:277-287.

Vincze É, Kiss GB (1990): A phosphate group at the cos ends of phage l DNA is not a prerequisite for *in vitro* packaging: an alternative method for constructing genomic libraries using a new phasmid vector, λpGY97. Gene 96:17-22.

Waara S, Tegelstrom H, Wallin A, Eriksson T (1989) Somatic hybridization between anther-derived dihaploid clones of potato (*Solanum tuberosum* L.) and the identification of hybrid plants by isozyme analysis. Theor Appl Genet 77:49-56.

Wallin A, Glimelius K, Eriksson T (1974) The induction of aggregation and fusion of *Daucus carota* protoplasts by polyethylenglycol. Z Pflanzenphysiol 74:64-80.

Williams CE, Hunt GJ, Helgeson JP (1990) Fertile somatic hybrids of *Solanum* species: RFLP analysis of a hybrid potato and its sexual progeny from crosses with potato. Theor Appl Genet 80:545-551.

Wu HK, Chung MC, Wu T, Ning CN, Wu R (1991) Localization of specific repetitive DNA sequences in individual rice chromosomes. Chromosoma 100:330-338.

Yagi T, Kagamiyama H, Nozaki M (1981) A sensitive method for the detection of aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase activity on polyacrilamide gels. Anal Biochem 110:146-149.

Zelcer A, Aviv D, Galun E (1978) Interspecific transfer of cytoplasmic male sterility by fusion between protoplasts of normal *Nicotiana sylvestris* and X-ray irradiated protoplasts of male-sterile *N. tabacum*. Z Pflanzenphysiol 90:397-407.

Zimmermann U, Scheurich P (1981) High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. Planta 151:26-32.

Zuba M, Binding H (1989) Isolation and culture of potato protoplasts. In: Bajaj YPS (ed.) Biotechology in Agriculture and Forestry, vol 8. 124-146.o.