

GÉNÁTVITELI RENDSZER KIDOLGOZÁSA LUCERNÁBAN

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

1986

Készült az MTA Szegedi Biológiai
Központjának Genetika Intézetében

Készítette:

Deák Mária



TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés	3
Rövidítések	6
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
2.1. Szomatikus sejtek regenerációja növényé	7
2.2. Szövettenyésztésben alkalmazott genetikai manipu-	
lációs módszerek	9
2.2.1. DNS transzformáció Agrobaktériummal	10
2.2.2. Szomatikus hibridizáció	15
2.2.2.1. Protoplaszt fúzió	15
2.2.2.2. Pillangós virágúakon végzett szomatikus	
hibridizációs kísérletek	16
2.2.3. Mutánsok izolálása szövettenyésztésben	17
2.2.3.1. Lucernából szövettenyésztésben izolált mutáns	
sejtvonalak	17
2.2.3.2. Herbicid rezisztens növények izolálása	
szövettenyésztésben	18
2.2.3.3. Foszfinitricin rezisztens lucerna vonalak	19
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	22
3.1. Növény és baktérium törzsek	22
3.2. Táptalajok és tenyésztési körülmények	23
3.3. Protoplaszt izolálás és tenyésztés	23
3.4. Protoplaszt fúzió	24
3.5. Nopalin szintáz enzim aktivitásának kimutatása	24
3.6. Növényi DNS tisztítás, emésztés, nitrocellulóz	
filterre transzferálás	25
3.7. Specifikus DNS próbák izolálása, P ³² -vel	
történő jelölése, emésztett DNS-hez való	
hibridizálása	25
4. EREDMÉNYEK	26
4.1. A lucerna szövettenyésztési körülményeinek	
optimalizálása	26
4.1.1. Kalluszból történő növényregeneráció vizs-	
gálata különböző lucerna növényvonalakon	26
4.1.2. Levélprotoplasztok izolálása és tenyésztése	27
4.1.3. A protoplasztból való növényregeneráció	
körülményeinek az optimalizálása	29
4.2. A lucerna transzformációja Agrobaktériummal	35
4.2.1. Transzformáció vad típusu Ti plazmidot	
hordozó Agrobaktérium törzsekkel	35
4.2.2. A transzformáció gyakoriságának	
optimalizálása	38
4.2.3. Transzformáció "disarmed" Ti plazmiddal	40
4.2.4. A kanamicin rezisztens szövetek	
regenerációja	42
4.2.5. A rezisztens fenotípus ellenőrzése	43
4.2.6. A kanamicin rezisztenciáért felelős struktur-	
gén jelenlétének kimutatása a transzformáns	
növényekben	44

	2
4.3. Lucerna protoplasztok szomatikus hibridizációja	46
4.3.1. Km és PPT rezisztens szuszpenziók protoplasztjainak fuziója	46
4.3.2. Mezofill sejtekből származó lucerna protoplasztok fuziója szuszpenzió eredetű protoplasztokkal	51
4.3.3. Szomatikus hibridek szelektálása dedifferenciált stádiumban	53
4.3.4. A kettős rezisztens kolóniák hibrid eredetének bizonyítása	55
5. AZ REDMÉNYEK MEGVITATÁSA	57
6. Az eredmények összefoglalása	65
Irodalomjegyzék	67

1. BEVEZETÉS

Napjainkban a növények genetikai anyagának módosításában egyre nagyobb szerepet kapnak a molekuláris- és sejtgenetikai módszerek. Ezek segítségével megváltoztatható mind a nukleáris, mind az extranukleáris örökítőanyag, idegen DNS juttatható a genomba. Az idegen genetikai információt hordozó növény előállításának alapjául a szomatikus sejtek növényregenerációs képessége szolgál. Ez azt jelenti, hogy differenciált növényi szövetek mesterséges körülmények közt dedifferenciáltathatók, ilyen állapotban fenntarthatók és ebből újra növényre regeneráltathatók. Sőt, lehetőség van sejtfauktól megfosztott egyedi sejtjeikből, protoplasztjaikból is növényeket kapni. Ezért a sejtgenetikai manipulációs munka gyakran protoplasztokon történik. Ez általában mutációk indukálását, valamint idegen genetikai anyag bejuttatását jelenti. A leghatékonyabb DNS bevitel jelenleg a kétszikű növények esetében egy természetes vektor, az Agrobaktérium segítségével történik. A talajban található Agrobaktériumok ugyanis rendelkeznek olyan funkciókkal, melyek lehetővé teszik hogy a sérült növényi felületen a baktérium genetikai anyagának egy része behatoljon a növényi sejtekbe, és beépüljön annak örökítő anyagába. Ezt a természetben előforduló jelenséget fel lehet használni különböző izolált gének növényi sejtbe juttatására. A módosított genetikai anyagu sejtekből ezután szövettenyészetben megfelelő hormonkezelésekkel növény regeneráltatható, melynek minden sejtje a megváltoztatott DNS-t hordozza.

Az ilyen DNS manipulációs megközelítések azonban csak azokon a növényeken alkalmazhatók, melyeknél módszertanilag nem jelent problémát a kalluszból vagy protoplasztból történő növényregeneráció. Emiatt ezekben a munkákban idáig csak néhány - elsősorban Solanaceae családba tartozó - növényfajt lehetett alkalmazni.

Munkám célja az volt, hogy lucernára olyan hatékony szövettenyésztési rendszert dolgozzak ki, melynek felhasználásával lehetőség nyílik e fontos mezőgazdasági növény genetikai anyagának módosítására. A megfelelő szövettenyésztési rendszer birtokában módomból volt az Agrobaktériummal történő génbevitel és a protoplaszt fúzió módszerét használni idegen információt hordozó lucerna növény előállítására.

Az Agrobaktérium segítségével kanamicin rezisztenciát biztosító gént juttattam a lucernába. Így ezek a növények szövettenyésztésben szelektálható tulajdonsággal rendelkeznek. Nagy előnyük, hogy szomatikus sejthibridizációs kísérletben közvetlen módon lehet sejteiket szelektálni. Így szomatikus hibridizációban fúziós partnerként szolgálhatott egy mezőgazdasági szempontból fontos, herbiciddel szemben rezisztens, növényregenerációra nem képes lucerna sejtvonal jellemzéséhez. A protoplasztok fúziója után a szomatikus hibrid sejteket kettős (kanamicin+herbicide) szelekcióval lehetett kiszűrni. Biokémiai markerekkel tanulmányoztam a szelektált kolóniák fúziós eredetét és a növényregenerációs képesség helyreállításának lehetőségét.

Az eddig elért eredmények megteremtették az alapot a lucernán további genom manipulációs munkák véghezviteléhez, melyekkel lehetőség nyílik számos biológiai alapprobléma tanulmányozására.

Rövidítések

2,4-D:	2,4-dikloro-fenoxi ecetsav
NES	naftil-ecetsav
IES	indolecetsav
BA	benzil-adenin
Km	kanamicin
PPT	foszfinotricin
GS	glutamin szintáz
PEG	poli-etilén glikol

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Szomatikus sejtek regenerációja növényé

A növények speciális sajátossága szomatikus sejtjeik totipotenciája. Ez a képesség lehetővé teszi, hogy differenciált sejtjeik megfelelő körülmények közt, mesterségesen kiváltott sejtosztódások révén új egyedfejlődési programot kezdjenek. E folyamat eredményeként a szomatikus sejtekből növények fejlődhetnek.

A pillangós virágu növények esetében kevésbé ismertek azok a szövettenyésztési körülmények, - táptalaj makro- és mikroelem vagy hormon összetétele-, amelyek optimalizálása szükséges a növényregenerációhoz. Szemben más, szövettenyésztésben könnyen kezelhető, ezért a vizsgálatokban gyakran használt növényfajjal, - mint a Nicotiana tabacum, Petunia hibrida, Daucus carota - a gazdaságilag fontos pillangós viráguk már több nehézséget támasztanak. A szövettenyésztési lehetőségek korlátozottságára utal, hogy legtöbbjük esetében a növény felnevelés csak kalluszsövetekből kiindulva sikeres. Protoplaszt eredetű sejtekből mindezidáig csak Trifolium és Medicago fajokon irtak le növényregenerációt (1,2).

A szomatikus sejtek regenerációs képessége a lucernánál is, akárcsak sok más növényfaj esetében (3,4) nem csak fajtától, hanem ezen belül genotípustól is függ. Ezért különböző M. sativa egyedek vizsgálatakor akár 0-100% közt változhat a regenerációs gyakoriság, teljesen azonos tenyésztési feltételek mellett (5). Ennek az eltérő viselkedésnek az alapját a populáció genetikai heterogenitása adja.

A lucerna ugyanis tetraploid kromoszóma állományu és idegen megporzásu növény, ezért sokféle kombináció alakulhat ki a különböző egyedek örökítő anyagában.

Szövettenyésztésben jól regeneráló, valamint regenerációra nem képes lucernák ivaros utódaiban vizsgálták e sajátság megnyilvánulását. A kapott eredmények alapján azt a következtetést lehetett levonni, hogy a szomatikus regenerációs képesség az adott kísérletben két domináns gén jelenlétéhez kapcsolható (6.) Más növényfajok esetében is a regenerációs képesség ivaros keresztezésekben domináns jellegként viselkedett (103.).

Az eddig megjelent kísérleti eredmények alapján megállapítható, hogy a növényi sejtek totipotenciájának megnyilvánulását meghatározó genetikai tényezőkről még igen kevés információ áll rendelkezésünkre.

Az elsődlegesen fontos genetikai adottság mellett külső tényezők - táptalaj, hormonösszetétel, ezek időbeni változtatása - befolyásolják a szomatikus sejtből való növényregeneráció folyamatát.

A szövettenyésztésben való növényregenerációnak két alaptípusa van: a) organogenezis, b) szomatikus embrió képzés.

a) A dedifferenciált kallusszövetben az egyes szervek - hajtás, gyökér - kialakulása egymástól elkülönülten megy végbe. A táptalaj hormontartalma, valamint a citokinin/ auxin típusu hormonok aránya határozzák meg, hogy hajtás vagy gyökér differenciálódása következzen-e be. Ez a típusu regeneráció elsősorban a Solanaceae család tagjaira jellemző.

b) A szomatikus embriogenezis során a zigotikus embrióhoz hasonló struktúra jelenik meg a kallusz vagy protoplaszt eredetű szövetben. Az így fejlődő embriók alakja jól definiált: globuláris, sziv, majd torpedó stádiumai vannak. Feltehetően ez a struktúra egyetlen sejtéből alakul ki (9,84). Az ilyen típusú regeneráció számos növényfajra jellemző, köztük a Medicago és Trifolium fajokra is (10).

Kifejezetten lucernára jellemző sajátosság azonban, hogy az embriók indukálásához 3-10 napig tartó igen magas, (10 mg/l) 2,4-D indukció szükséges (7). Sok más növénynél ilyen erős auxin kezelés már toxikus lenne. Az is jellegzetes sajátossága a lucernának, hogy az embriók már a 2,4-D jelenlétében is kifejlődhetnek (11).

Ezek a sajátosságok érvényesek a protoplasztból való növényregenerációra is. Többféle Medicago faj esetében (M. sativa, M. coerulea, M. glutinosa) jelent már meg publikáció mind kallusz, mind protoplaszt eredetű anyag regenerációjáról (2,12,13). Ennek ellenére a lucernán szövettenyészetben végzett genetikai manipulációs munkák száma elenyésző.

2.2.Szövettenyészetben alkalmazott genetikai manipulációs módszerek

A szomatikus sejtekből vagy szövetekből történő növényregeneráció lehetősége módot ad arra, hogy az ivaros folyamatok megkerülésével ezen az úton módosított génállományú növényeket állítsunk elő. A szomatikus sejtek genetikai manipulációjára leginkább használt módszerek a következők:



1. DNS transzformáció (Agrobaktériummal vagy izolált DNS-sel)
2. szomatikus sejthibridizáció
3. in vitro végzett mutáns izolálás.

2.2.1. DNS transzformáció Agrobaktériummal

Az izolált DNS fizikai-kémiai módszerekkel is bejuttatható a növényi sejtbe - elsősorban protoplasztba -, ahol a sejtmagot elérve a genomba is beépülhet. (Erről a területről jó összefoglalók állnak rendelkezésünkre, pl. 101). E módszer transzformációs hatékonysága (1-2%) azonban jóval kisebb, mint a természetes génvektorral, az Agrobaktériummal történő génbevitelé. Az utóbbi módszer másik nagy előnye, hogy nem szükséges (bár lehetséges) protoplasztokon dolgozni, elegendő a kalluszból való növényregeneráció a transzformáns növény előállításához. Alkalmazásának korlátot szab az, hogy segítségével olyan tulajdonságok átvitelére kerülhet sor, melyekért felelős gének mint klónozott DNS szekvenciák állnak rendelkezésünkre. Továbbá általánosan elfogadott, hogy csak a kétszikű növények körében használható.

A talajban előforduló Agrobaktériumok a kétszikű növények sérülési felületén daganatképződést vagy burjánzó gyökeresedést okoznak (14,15). Az Agrobaktériumok virulens törzseiben egy nagy (140-240 kb) un. Ti (tumor inducing) plazmid található (16,17). Amikor ezek a baktériumok sérült növényi felülettel kerülnek kapcsolatba, a Ti plazmid meghatározott része, az un. T-DNS transzferálódik a növényi sejtbe és integrálódik annak genomjába (18,19).

A T-DNS különböző géneket kódol, melyek eukarióta promoterrel rendelkeznek; ezek tehát kifejeződhetnek a növényi sejtben, ahol új enzimek termelődését indítják meg (20). A egyik ilyen enzim - amit az un. "tmr" gén kódol - a citokininek bioszintézisét irányítja, másik kettő - "tms1" és "tms2" terméke auxin típusú hormon termeléséért felelős (21,22). Ezeknek a növényi hormonoknak a túlermelődése okozza a jellegzetes szövetburjánzást, tumoros szövet képződését (23).

A Ti plazmidon levő T-DNS-t két 25 bázispár hosszúságú un. direkt ismétlődő szekvencia határolja (24,25). Ezek a szekvenciák különböztetik meg a T-DNS-t a plazmid többi részétől, ugyanis csak ezen határrégiók között elhelyezkedő DNS szakasz fog transzferálódni és integrálódni a növénybe (26). Ezt a folyamatot a Ti plazmid nem transzferálódó régiójában levő un. "vir" gének termékei, valamint más, a baktérium kromoszómáján levő "chv" gének működése szabályozzák (27). A kromoszómális gének konstitutívan működnek, a "vir" gének aktiválását a sérült növényi sejtekben termelődő fenolos vegyületek befolyásolják (28).

Az utóbbi időben vált ismertté, hogy a transzferálódás folyamata során intermedierként először egy egyszáлу, lineáris T-DNS molekula keletkezik (58).

A 8-23 kb hosszú T-DNS-en a hormontermelésért felelős géneken kívül különleges aminosav származékok, un. opinok (octopin, nopalín, mannopin stb.) szintézisét biztosító gének is vannak (30). Ezek az anyagcsere-termékek normális növényi szövetben nem fordulnak elő, és csak az adott típusú Agrobaktérium képes tápanyagforrásként felhasználni (31).

Az opinok jelenlétének kimutatása a növényi szövetben a transzformációs esemény egyik bizonyítéka.

A rendkívül intenzív kutatások eredményeként hamarosan ismertté vált, hogy a T-DNS integrálódásához a rajta levő szekvenciák közül elegendő a jobb határrégió jelenléte. (32.), így - többek- közt a hormonszintézisért felelős gének is eliminálhatók. Génsebészeti módszerekkel ezeket a DNS szakaszokat eltávolították. Az ilyen ún. "disarmed" T-DNS integrálódása nem jár szövetburjánzással, mivel nem változtatja meg többé a sejtek endogén hormonszintjét. Ezekből a szövetekből lehetséges a növényregenerálás (33). Mivel a "vir" gének transzferáló hatáuskat "transz" helyzetben is kifejtik -azaz akkor is hatnak, ha nem a Ti plazmidon, hanem a bakteriális kromoszómán vagy egy másik plazmidon vannak - ezért lehetséges volt az ún. bináris vektorok kifejlesztése (34). A bináris vektorokban általában két plazmid van jelen: egyik tartalmazza többek közt a "vir" funkciójú géneket, a másik a jól lerövidített T-DNS-t, valamint a nopalín szintáz gént. Ezen a kis méretű plazmidon van még egy olyan faktor is, mely lehetővé teszi a plazmid E.coliban való replikálódását. Így a "genetic engineering" azaz valamilyen génnek a T-DNS-be történő helyezése a már jól ismert, könnyen kezelhető E.coli rendszerben történhet, s utána mobilizálják a plazmidot a "vir" funkciókat is tartalmazó Agrobaktériumba. Ezzel történik majd a növény transzformációja. A transzformált sejtek szelektálására antibiotikummal (kanamicin, kloramfenikol, higromicin) szembeni rezisztenciát biztosító bakteriális eredetű géneket "varrtak" a T-DNS-en levő,

növényi sejtben konstitutívan működő nopalin szintáz gén promotere mögé (35).

Ezek az új konstrukciók lehetővé teszik bármilyen izolált gén bejuttatását a növényi sejtbe, s nem interferálnak a növényregenerációval sem. Az ilyen növényekben a T-DNS a meiózis során fennmarad és Mendeli öröklődést mutat (36,37,38).

Ujabban egy természetben is előforduló dohányfajban is sikerült kimutatni bizonyos Agrobaktérium eredetű szekvenciák létét (39).

Bár számos kétszikű növényen sikerült már optimalizálni az Agrobaktérium mediált génbevitel módszerét, pillangósokon idáig elenyésző sikeres kísérletről számoltak be. Szója esetében transzformáns, hormon auxotróf szövet előállítását irták le (40). Mivel a szövettenyésztésben való növényregenerálás a szójánál még nem tekinthető jól kidolgozottnak a nem transzformáns szövetek esetében sem, nem meglepő, hogy transzformáns növényt még nem állítottak elő. Hasonló a helyzet bab és borsó esetében is.

M. sativa esetében Mariotti et al. 1984-ben irt le baktériummal kezelt vágott szárfelületen történő tumorképződést. A transzformáció tényét a tumor szövetekben octopin ill. nopalin jelenlétének kimutatásával bizonyította. Ujabban K. Webbnek is sikerült igen körülményes módszerrel, vágott szárfelületre történő baktérium inokulálással tumorképzést elérni különböző Medicago és Trifolium fajokon (42). Tekinettel arra, hogy az általa használt Ti plazmid hormon szintéziséért felelős régiókat tartalmazott, a növényregenerációt nem sikerült megoldania.

Az Agrobaktérium mediált génbevitel felhasználásával egyre több érdekes eredmény születik a növényi gének megnyilvánulásának tanulmányozásában és gyakorlati irányú kutatásokban egyaránt (1.ábra). Az 1. ábrán bemutatott kísérletekben recipiens növényfajokként dohányt, petuniát és napraforgót használtak. Növényregenerálést ezen utóbbi faj esetében még nem sikerült elérni.

izolált gén	eredete	expresszió	irod.
ovalbumin	csirke	RNS	43
fazeolin	bab	fehérje	44,45
ribulóz 1,5-bifoszfát			
karboxiláz kis alegység	borsó	fehérje	46
B conglycinin	szója	fehérje	47
növekedési hormon	ember	RNS	48
kloramfenikol-acetyl-			
transzferáz	baktérium	fehérje	49
neomicin-foszfo-			
transzferáz	baktérium	fehérje	50.
glyfozát rezisztenciáért			
felelős gén	baktérium	fehérje	97
zein gén	kukorica	fehérje	99

1.ábra

Agrobaktérium segítségével növényi sejtekbe juttatott idegen gének és megnyilvánulásuk

2.2.2.Szomatikus sejtek hibridizációja

2.2.2.1.Protoplaszt fuzió

A vékony membránnal határolt protoplasztok megfelelő kezelésekkel (polietilén glikol vagy elektromos erőter hatására) összetapaszthatók, majd membránjuk fuzióját követően citoplazmájuk és magjuk egyaránt összeolvadhat. Ezzel mindkét szülő intra- és extra nukleáris genetikai anyagát hordozó szomatikus hibrid sejt jöhet létre.

Ez a módszer lehetőséget nyújt új, ivaros keresztezéssel nem megvalósítható genetikai kombinációjú növények előállítására. Leggyakrabban a következő területeken alkalmazzák:

a)természetben nem kereszteződő fajok hibridjeinek létrehozása

Közeli rokon fajok protoplasztjainak fuziójakor a hibrid sejtekben akár mindkét genom jelen lehet anélkül, hogy komolyabb inkompatibilitási problémák lépnének fel. Távoli fajok szomatikus hibridjeinél csak a genom egy részének bevitelére és fennmaradására van reális esély (101).

b)citoplazma alkotórészek bevitele protoplaszt fuzióval

Ez lehetőséget nyújt a mitokondrium és a kloroplaszt DNS-e által kódolt, sajátságoknak (pl.himsterilitás) új nukleáris háttérbe helyezésére (100.).

d)sejtvonalak mutációjának genetikai analizise

Amennyiben nem sikerül növényt regenerálni a szövettenyészetben izolált ismeretlen sajátságú mutációt hordozó anyagból, akkor a mutáció genetikai jellemzésére (domináns, vagy recesszív jelleg,) csak szomatikus hibridizációval nyílik lehetőség.

e) A regenerációs képesség helyreállítása szomatikus
hibridizációval

A növényi szövettenyészetben izolált mutáns sajátosságu sejtvonalak gyakran a túl hosszú ideig tartó dedifferenciált állapot miatt nem képesek újra növényt regenerálni. Az ilyen sejtvonalak protoplasztjait vele azonos vagy rokon faj regenerábilis protoplasztjaival fuzionálva sok esetben sikerült szomatikus hibrid növényt kapni, melyek mutatták mindkét kiindulási szülő jellegzetességeit (5,52,53). Arra is van példa, hogy két, önmagukban regenerációra nem képes répa sejtvonál protoplasztjainak fúziójából származó szomatikus hibridek növényt regeneráltak (93). Ezek a kísérleti eredmények arra utalnak, hogy az eddig vizsgált növényfajokban a szövettenyészetben való regenerációs képesség domináns sajátság. Leírtak azonban olyan esetet is, (két paradicsom faj protoplasztjainak fúzióját,) amikor a szomatikus hibrid kolóniák nem fejlődtek növénné (54). Feltehetőleg ilyenkor a dedifferenciált sejtekben történt változások olyan mértékűek, hogy a regenerációra képes genetikai anyag működését is meggátolják.

2.2.2.2. Pillangós viráguakon végzett szomatikus
hibridizációs kísérletek

A legtöbb pillangós növényfaj esetében szövettenyésztési nehézségek miatt nem végeztek protoplaszt fúziós kísérleteket. Lucernán végzett protoplaszt fúzióról is alig van információ. Teule Eveline személyes közlése szerint (Laboratoire d'Amélioration des Plantes, Orsay, France)

M. sativa és M. falcata levélprotoplasztok fuziója után szelekció nélkül sikerült szomatikus hibrid növényeket kapnia, melyek virágszínben és levél morfológiában különböztek a szülőktől.

2.2.3. Mutánsok izolálása szövettenyészetben

Az in vitro szövettenyészetekben spontán kialakuló vagy indukált genetikai változékonyság lehetőséget nyújt mutánsok izolálására. Ezideig a növények széles körének bevonásával, nagy számú sejtmagi és extrakromoszomális mutánst izoláltak és jellemeztek. Erről jó áttekintést adó irodalom áll rendelkezésre (98).

2.2.3.1. Lucernából szövettenyészetben izolált mutáns

sejtvonalak

A lucernából izolált mutánsok száma ezzel szemben igen alacsony. A 2. ábrán látható, hogy elsősorban aminosav analógokkal, bázis analógokkal szemben rezisztenciát mutató sejtvonalakat állítottak elő.

2. ábra

Szövettenyészetben előállított mutáns fenotípusa

Medicago sativa sejtvonalak

fenotípus	irodalom
etionin rezisztens	55.
8-azaguanin rezisztens	56.
bromdeoxy-uridin rez.	56.
sótűrő	57.
foszfinotricin rez.	58.
5-metil-triptofán rez.	93.

A 2. ábrán felsorolt esetekben az izolálás sejtszuszpenzióból történt, nem protoplaszt eredetű anyagból. Ezekből a rezisztens fenotípusu sejtvonalakból egyetlen esetben sem sikerült növényt regenerálni. (A. Atanassov -Inst. Genetics, Sofia- személyes közleménye szerint laboratóriumukban sikerült etionin rezisztens *M. sativa* növényt előállítani.)

2.2.3.2. Herbicid rezisztens növények izolálása

szövettenyészetben

A sejt- illetve protoplaszt tenyészetek előnye, hogy kis térfogatban igen nagy számú sejt (melynek mindegyike potenciális növényt jelent) herbicid érzékenysége vizsgálható, ezért szívesen alkalmazzák ezt a módszert rezisztens vonalak szelektálására. Hátránya, hogy csak olyan vegyületek esetében használható, melyek hatásukat dedifferenciált szinten -esetleg zöld kalluszban- is kifejtik.

Bár nagyszámú herbicid rezisztens sejtvonalat állítottak már így elő, ezekből csak néhány esetben sikerült növényt regenerálni, szinte kizárólag a Solanaceae családon belül (3. ábra).



3. ábra

Szövettenyésztetben előállított herbicid rezisztens növények

Herbicide	növényfaj	irodalom
Izopropil-N-karbamát	N. tabacum	60.
Paraquat	"	61.
"	Lycopersicon e.	63.
Pyridine	N. tabacum	62.
Triazine	"	64.
Amitrol	"	65.
Bentazon	N. plumbaginifolia	66.

2.2.3.3. Foszfinotricin rezisztens lucerna vonalak

A szövettenyésztetben előállított mutáns fenotípusu lucerna vonalak közül részletesebben foglalkozom a foszfinotricin (PPT) rezisztens anyaggal, mivel ezeket használtam protoplaszt fúziós kísérleteimben.

Az L-PPT a glutaminsav analógja, amit a természetben néhány Streptomyces viridochromogenes gomba faj termel (67). Ez a vegyület a glutamin szintáz enzim működését mind kompetitív, mind nem kompetitív módon gátolja (68). Mivel legtöbb növényfajnál a szabad ammonia eliminálásának egyetlen útja ezen enzim által végzett glutaminsav-glutamin átalakulás, (69) a PPT jelenlétében bekövetkező ammónia felhalmozódás a szervezet pusztulását eredményezi (70).

A PPT kiválóan megfelel környezetvédelmi szempontoknak (gyorsan bomlik, természetesen is előforduló vegyület), ezért számos helyen alkalmazzák nem szelektív herbicidként (71). Ha lennének olyan kulturnövények, melyek jól tolerálják a PPT jelenlétét, szelektív herbicidként is használhatnák. Ezért a HOECHST AG nagyszabású programot indított PPT rezisztens gazdasági növények szelektálására, rezisztenciájuk jellemzésére, az ebben szerepet játszó gének izolálására valamint ennek transzformálására a szenzitív növények sejtjeibe.

E program keretén belül M. sativa és M. varia sejtszuspenziókból kiindulva a PPT mennyiségének fokozatos emelésével a kontroll szuspenziókhöz képest 20-100-szoros rezisztenciát mutató sejtvonalatokat sikerült izolálni (58).

Az szelektáló ágens koncentrációjának fokozatos emelésével történő mutáns izolálási stratégia gyakran vezet az érintett mechanizmusban felelős DNS szekvenciák olyan amplifikációjához, mely rezisztenciát biztosít (87). A G. Donn által kapott sejtvonalakról is az derült ki, hogy rezisztenciájuk az amplifikálódott glutamin szintáz gén következtében megnövekedett enzimszintnek köszönhető. A glutamin szintáz enzim a növényekben az ammónia asszimiláció legelső lépésében játszik szerepet. A rezisztens sejtvonalakból izolált enzim aktivitásában, valamint a PPT gátlás formájában nem mértek jelentős eltérést a kontroll enziméhez képest, ami arra utal, hogy nem a fehérje strukturájában történt változás.

Ugyanakkor a GS specifikus cDNS próbát használva kimutatható volt az enzim mRNS-ének kb. 8x-ros mennyiségűre való növekedése. Southern analizissel a GS gén amplifikációja is nyilvánvaló volt.

Ezek a sejtvonalak az izolálás során elvesztették regeneráló képességüket. Ezért szükségessé vált, hogy a szomatikus hibridizáció módszerét használjuk a sejtvonal további genetikai analiziséhez.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1) Növény és baktérium törzsek

Szövettenyésztésben jól regeneráló M.varia A2 növényvonalat Dr. Atanas Atanassovtól (Bolgár Tudományos Akadémia, Genetika Intézete, Szövettenyésztő Laboratórium, Szofia, Bulgária) kaptuk. A M. coerulea, M.sativa, és M. truncatula magok Dr. Böcsa Ivántól (GATE Mezőgazdasági Kutató Intézet, Kompolt) származnak. M.sativa RA3 növényvonalat Dr. D.A. Stewart bocsátotta rendelkezésünkre. (Plant. Gen. Inc. Davis, California)

Az Agrobacterium tumefaciens bo42 jelű törzs Dr. G. Antól (Inst. of Biol. Chem. Washington State University, Pullman, USA) származik. Ez a törzs A. tumefaciens C58C1 pTibo542, pGA471 (72). A pTibo542 plazmid mely hormonszintéziséért felelős géneket is tartalmaz, széles gazdaspektrumu, hipervirulens fertőzést tesz lehetővé. A pGA 471 jelű kis méretű "disarmed" plazmidon van a nopalinszintáz enzim promoteréhez kapcsolva a Tn5-ből származó neomicin foszfortranszferáz gén, mely a kanamicin rezisztenciáért felel, ezen kívül colE1 típusú replikációs origó, lambda kohéziós vég, és klónozáshoz szükséges restrikciós végek.

Az A. tumefaciens A6, T37, C58, valamint ennek mutáns Ti plazmidot hordozó változatait (C8C1pRi15834, C58C1pGv3101, C58C1B6S3, C58C1pGv2215, C58C1pGv2250 C58C1pGv4025, C58C1pGv2024) Koncz Csabától kaptam (94, 95).

3.2.) Táptalajok és tenyésztési körülmények

A baktériumokat a megfelelő Ti plazmid jelenlétére szelektáló antibiotikumok (tetraciklin 12.5 mg/l, kanamicin 100 mg/l) jelenlétében 2%-os agaros, LB táptalajon tartottam. A növények inokulálásához éjszakán át folyadék LB-táptalajban jól felnőtt (OD 550:1.0-1.5) tenyészetet használtam.

A hajtástenyészeteket 0.9% agar (Difco) tartalmu, hormon mentes UM (73). mediumon, 0.5 l-es üvegekben sterilen tartottam.

A kalluszk indítása steril műanyag petri csészékben, különböző 2,4-D, NES, és BA koncentrációju UM és SH (74) agaros mediumokon történt. A regenerálást hormon mentes UM, vagy BIY (75) agaros vagy vattás táptalajokon végeztem.

A folyadéokban történő embrió indukcióhoz B5N tenyészmédiumot használtam. Ez egy módosított B5 táptalaj, (76.) mely 3% cukrot, 500 mg/l meso-inositol (Sigma), 10 mg/l glutationt (Sigma), 1 mg/l 2,4-D-t (Sigma) és 0.2 mg/l BA-t (Sigma) tartalmaz. A táptalajok többi komponense Reanal gyártmányu volt.

3.3.) Protoplaszt izolálás, tenyésztés

A levél eredetű protoplasztok izolálása apróra vágott steril levelekből, K75 tenyészoldat (8) és Kao enzim (5) 1:1 arányu keverékében, éjszakán át, rázatás nélkül történt. Az enzimoldat készítésekor a gyárilag előállított sejtfalemészto enzimeket előbb Sephadex G-25 oszlopon elválasztottam a benne levő sók jelentős részétől.

A sejtszuszpenziót 1:1 arányban (általában 10-10 ml-t) higitottam E1 enzimmal (96). A protoplasztokat éjszakán át, gyenge rázatás mellett, (50 fordulat/perc) izoláltam.

A sejtfaluktól megfosztott sejteket szűrőssel és centrifugálással (1000 rpm/min) választottam el a törmeléktől. Magas ozmotikumú utómosó oldattal (UM1,96) vagy K75 táptalajjal történő mosás után tenyésztésre vagy fuzióra használtam őket.

3.4) Protoplaszt fuzió

A különböző eredetű protoplasztokat 1:1 arányban összekevertem, majd műanyag petri csésze aljára ülepítettem. A protoplasztok összetapasztása 25%-os 6000 D molekulaszúlyú polietilén glikol oldattal történt (97).

Az összetapadt sejtek együttmaradásának elősegítésére, membránjuk destabilizálására s ezáltal a hibrid sejtek gyakoriságának növelésére magas Ph-ju Ca^{2+} és dimetilszulfoxid tartalmú oldattal kezeltem őket 2x5 percig.

Ezután a kimosás UM1 oldattal történt, majd K75 tenyészoldatban maradtak az anyagok. A tenyésztés további lépéseit az Eredmények fejezetben részletesen is tárgyalom.

Kontrollként a két szülő összekevert de PEG kezelést nem kapott protoplasztjait, valamint csak egy-egy partner protoplasztjait tartalmazó tenyészeteiket használtam.

3.5) A nopalinszintáz enzim aktivitásának kimutatása

Az Agrobaktériummal transzformált növényi szövetben működő enzim kimutatása a szubsztrátok (α -keto-glutársav, arginin, NADH) növényi kivonathoz adása után 1 óra inkubálás elteltével, a keletkezett reakciótermék papírkromatográfiás elválasztáson alapuló módszerével történt (78). Az előhívást 0.02%-os orto-fenantrén kinonnal végeztem.

3.6) Növényi DNS tisztítás, emésztés, agaróz gélen való elválasztás, nitrocellulóz filterre transzferálás

Teljes növényi DNS izolálás Peerbolte (79) módszerével történt. Hind III és Eco R1 emésztést a gyártó cég (Bethesda Res. Comp.) utasításai alapján végeztem azzal az eltéréssel, hogy az enzimet az előírtnál 4x nagyobb mennyiségben adtam a DNS-hez. Az emésztett DNS agaróz gélen való elválasztása, denaturálása és neutralizálása valamint a nitrocellulóz filterre transzferálása Maniatis et al.(80) szerint történt.

3.7) Specifikus DNS próbák izolálása, P32-vel történő jelölése, emésztett DNS-hez való hibridizálás

pSUP1011 plazmid (81) izolálása a Maniatis et al. által leírtak (80) alapján történt. Ebből a Bgl-Sma1 fragment tartalmazza a Km rezisztenciáért felelős Tn5-ből származó DNS szakaszt (82). Az izolált fragment radioaktív foszforral történő jelölését Feinberg and Vogelstein (83) random primert alkalmazó módszerével végeztem. A nitrocellulóz filterre transzferált DNS-sel történő hibridizálás Maniatis et al. (80) módszere szerint történt.

A szójából izolált auxin indukálható P4 gén cDNS-ét tartalmazó pBR322 plazmidot J.Key-től és T.Ulrich-től kaptuk (9). A fragment izolálása a PSt1 hasítóhelyről történt.

Autoradiográfiát -70 C-on, Kodak XR5 röntgen filmmel végeztem.

EREDMÉNYEK

4.1.A lucerna szövettenyésztési körülményeinek
optimalizálása

4.1.1.Kalluszból történő növényregeneráció vizsgálata
különböző lucerna növényvonalakon

Több lucerna faj, ezen belül szelektált növényvonal kalluszból való regenerációját vizsgáltam a már eddig leirt táptalaj és hormonkombinációk felhasználásával. Legtöbb regenerációt a többféle genotípus esetében a következő módszer szerint kaptam: kalluszosítás 3 hétig SH alaptáptalajon 2-2-2 mg/l 2,4-D, NES és BA jelenlétében, regenerálás BIY hormon mentes táptalajon (91) (4.ábra).

4.ábra

Különböző lucerna fajok és növényvonalak kalluszaiból
történő növényregeneráció vizsgálata

faj	inokulumok		regeneráló
	eredete	száma	kalluszok száma(db)
<u>M. coerulea</u>	levélnyél	2x25	2 db
"	anthera	87	23 db
<u>M.truncatula</u>	levélnyél	2x25	1 db
"	anthera	72	16 db
<u>M. sativa</u> var.			
Regen S RA3	levélnyél	10	8 db
<u>M varia</u> var.			
Rambler A2	levélnyél	10	10 db

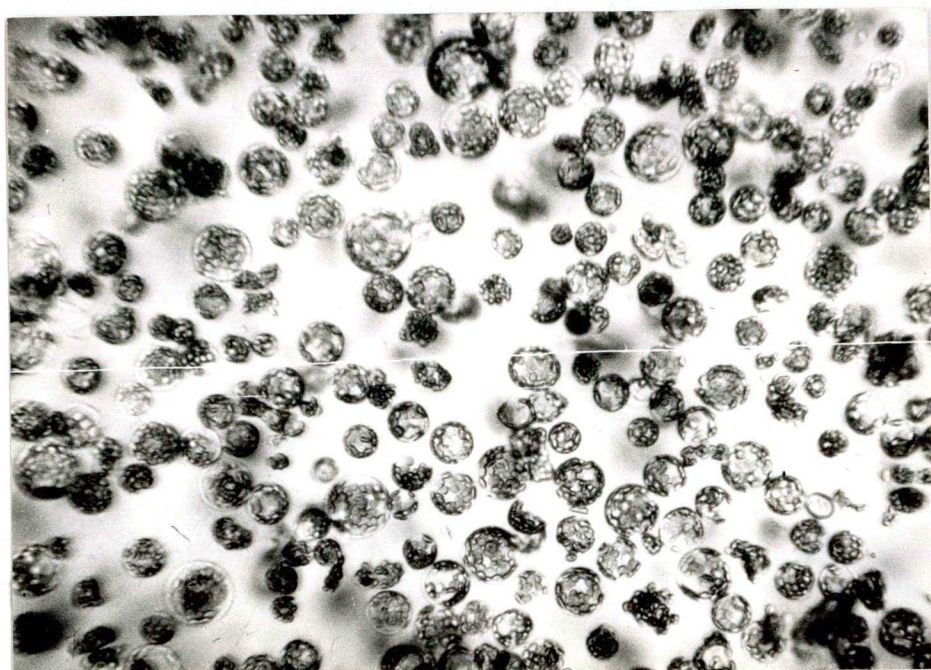
A jól regeneráló genotípusu M. sativa RA3, és M. varia A2 lucerna vonalak bármely szövetdarabja (gyökér, levél szár) különböző típusu táptalajokon, (UM, MS, Blaydes,) többféle hormonkombinációval is akár 100%-ban növénné regeneráltatható gyakorlott szövettenyésztő kezében.

4.1.2. Levélprotoplasztok izolálása és tenyésztése

Munkám során azt tapasztaltam, hogy számos publikációkban nem részletezett tényező kritikus lehet a lucerna protoplasztok túlélése osztódása és regenerálása szempontjából. Ilyenek pl.;

- a levelek kora, fiziológiai állapota, termosztát szoba hő és fényviszonyai, a levelek vágási módja,
- a protoplasztáló enzim tisztasága: Sephadex G25 oszlopon való sötétalanítás,
- a protoplaszt izolálás módja, hőmérséklete (szövet-enzim arány, rázatás, 25°C alatt).

Ezeknek a faktoroknak az optimalizálása empirikusan, számos izolálás tapasztalataiból történt. Ezek után a publikált enzim és táptalaj (2) felhasználásával több lucerna fajból is (M. sativa, M. coerulea, M. varia, M. truncatula) ép, jól osztódó protoplasztokat tudtam izolálni. Az elért izolálási hatékonyság ($1-4 \times 10^6$ protoplaszt/gram levél) már elegendő anyagot ad bármilyen protoplaszton végzendő kísérlethez (5. ábra).



5.ábra

Medicago varia levél eredetű protoplasztok izolálás után
(300-szoros nagyítás)

Ismeretes, hogy a lucerna protoplasztok hajlamosak az összetapadásra és barna, fenolos termék tenyésztőoldatba történő kibocsátására. Ezek miatt a tenyészet napok alatt bebarnul, a sejtek osztódása leáll, igen alacsony (1% alatti) a kolónia képző gyakoriság. Ezt a problémát a protoplasztok 0.8%-os agarózba ágyazásával jelentősen sikerült kiküszöbölni. A módszert más növényfajok protoplasztjaira írták le, (88) és sikeresen alkalmazható volt lucernára is.

Legkényelmesebb Seaplaque gyártmányú, alacsony olvadáspontú agarózzal dolgozni, bár ennek hiányában más (Sigma) típusok is alkalmazhatók. Ezekkel azonban gyorsan kell végezni a beágyazást, mivel igen hamar megdermednek.

Az agarózos beágyazás történhet közvetlenül az izolálás után is, de kísérleteink szerint kedvezőbb a néhány napos, fallal már rendelkező sejteken végezni. A rögzített sejtek körül egyszerűbb a táptalajcsere, nem ragadnak össze a protoplasztok, ennek következtében a tenyésztés hatékonysága legalább egy nagyságrenddel javult (6.ábra).

6.ábra

H.varia mezofil eredetű protoplasztok osztódási gyakorisága agaróz beágyazás nélkül és agarózban

	Kiindulási	osztódási	kolóniaszám
Tenyészoldat	protoplaszt szám	gyakoriság	6 hét múlva
	(1 ml-ben)	(3.napon)	
K75	$1.5-2 \times 10^5$	25-30 %	212
K75+agaróz	$1.5-2 \times 10^5$	70-90 %	8150

A lucernára eddig megjelent publikációkban általában nincs számadat a tenyésztés hatékonyságára. Egy közleményben ahol említik, (91.) 0.05%-os kolóniaképzést értek el a legjobb kombinációban. Az agarózos beágyazás segítségével 10 %-os vagy több is lehet a kolónia képzés gyakorisága.

4.1.3.A protoplasztból való növényregeneráció körülményeinek optimalizálása

A különböző lucerna genotípusok esetében - a kallusz regenerációhoz hasonlóan - nagy százalékban csak a szelektált vonalak protoplasztjaiból származó kolóniák regeneráltathatók növénygé.

Laboratóriumunkban elsősorban a *M. varia* A2 növényvonalon folynak kísérletek, így a regeneráció körülményeit ezen tanulmányoztam.

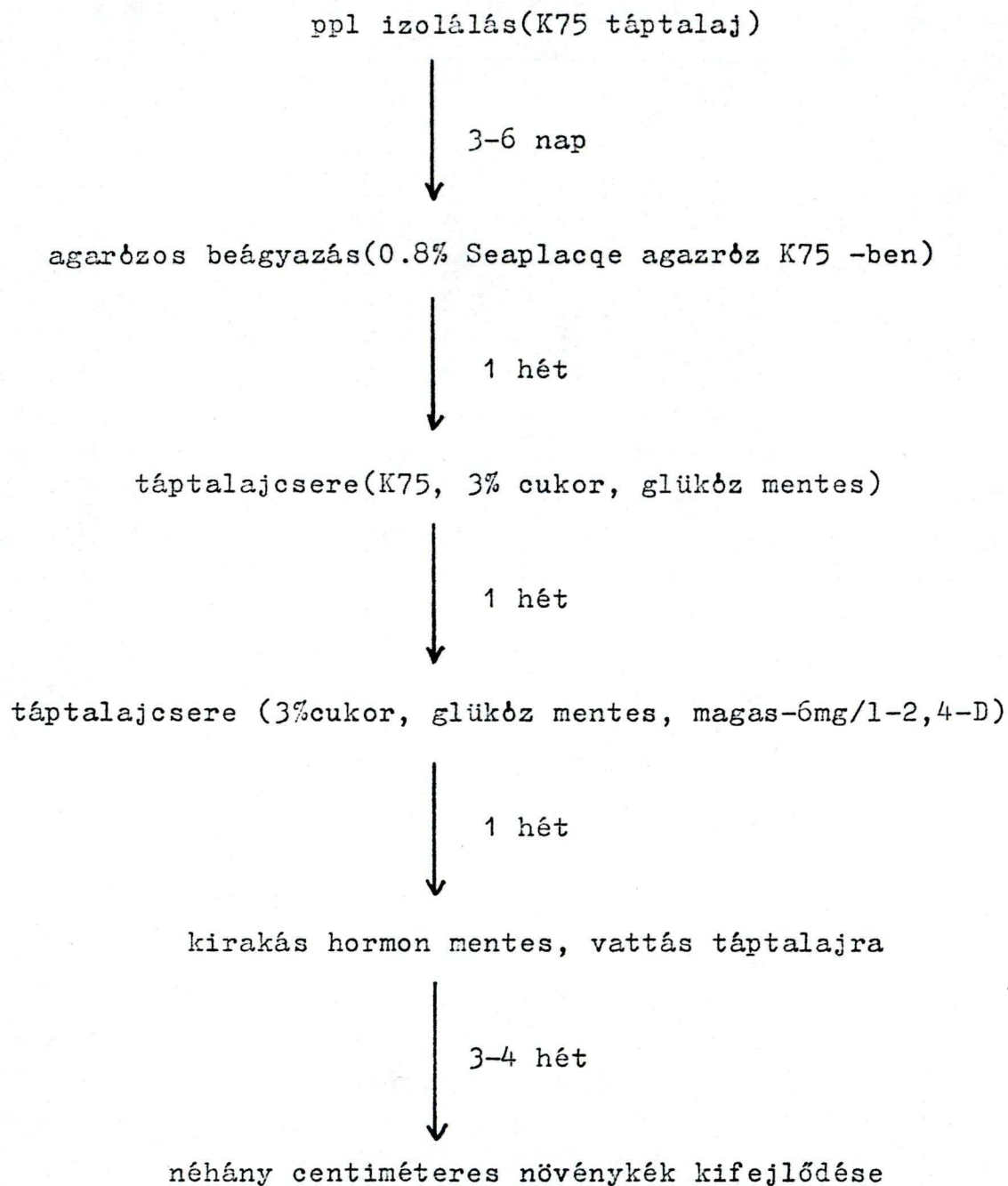
A protoplasztból való növényregenerációt a lucerna esetében két uton lehet elérni különböző hormonkezelések révén.

a) direkt embriogenezis útján

b) kalluszon keresztül törénő regenerációval

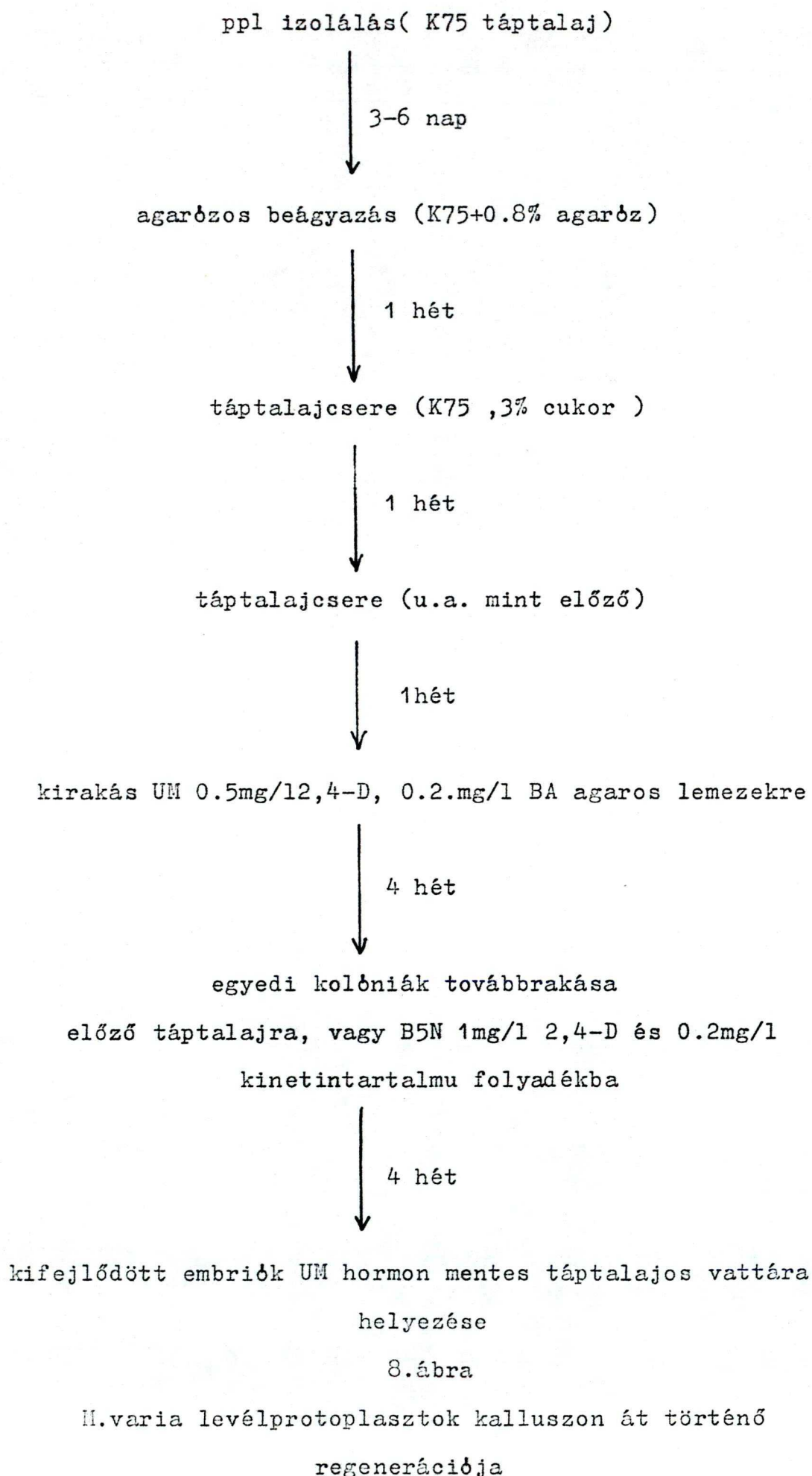
a) Ebben az esetben a protoplasztok osztódásainak eredményeként kb 4 hét alatt szabályos torpedó vagy sziv alakú embrióstruktúrák keletkeznek. Ebből további négy hét alatt hormonok nélküli táptalajon kis növénykéek fejlődnek. Direkt embriogenezissel viszonylag gyorsan kapunk növényt, azonban a sejtek osztódási szinkronjától függően a kolóniáknak csak 10-50 %-a képez embriót, a többi kalluszként elpusztul a hormon mentes táptalajon (7.ábra)

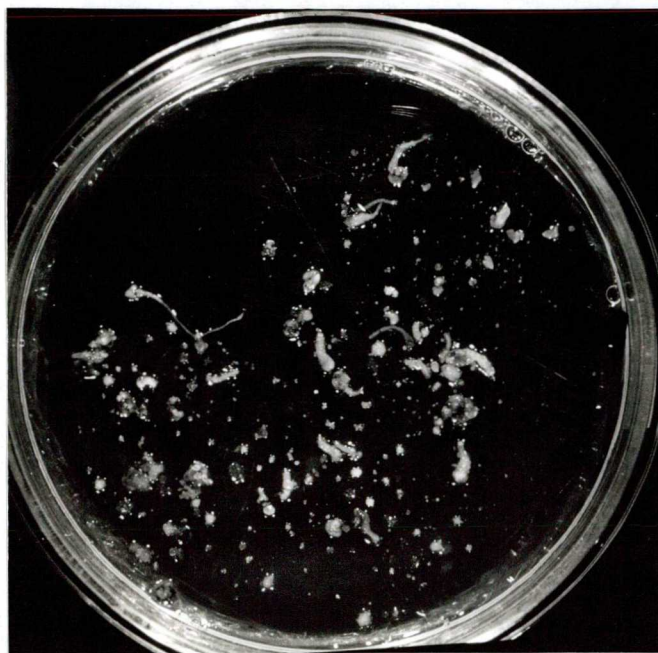
b) A protoplaszt eredetű sejtcsoportokat 4 hét elteltével továbbra is hormon tartalmú táptalajon tartjuk, ahol 95-100 %-ban zöld, kompakt, esetleg máris embriófejlődést mutató kalluszt képeznek. Az ilyen anyagot B5N folyadékban indukálva 80-100 %-ban regeneráltathatjuk. Ezzel a módszerrel 4-6 hónapig is eltart a kis növénykéek kifejlődése, de nagyobb a regeneráció gyakorisága, akár 100% is lehet (8.ábra).



7. ábra

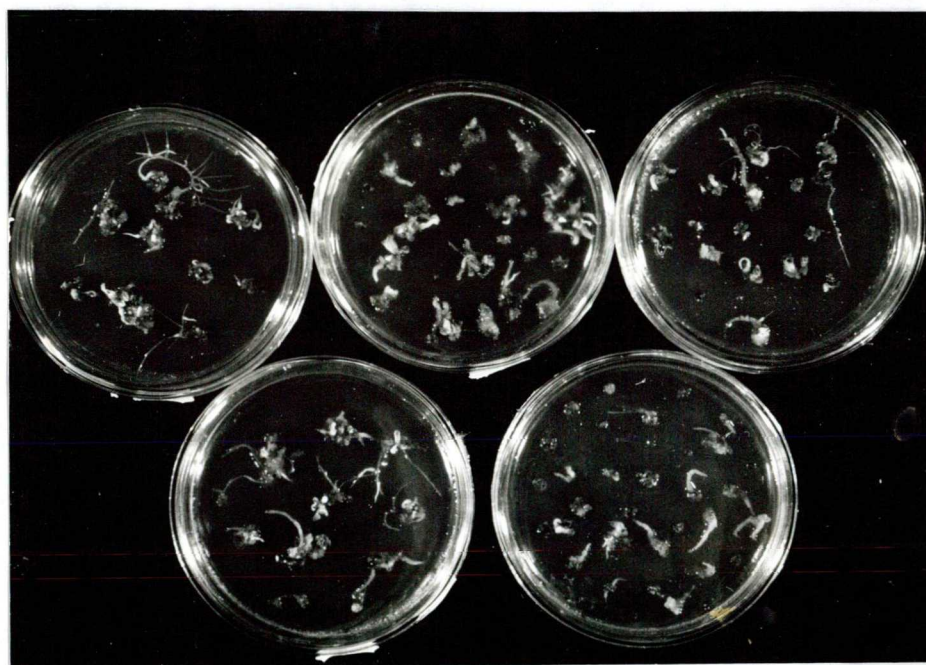
Direkt embriogenezissel történő lucerna (*M. varia*)
protoplasztregeneráció sémája





9. ábra

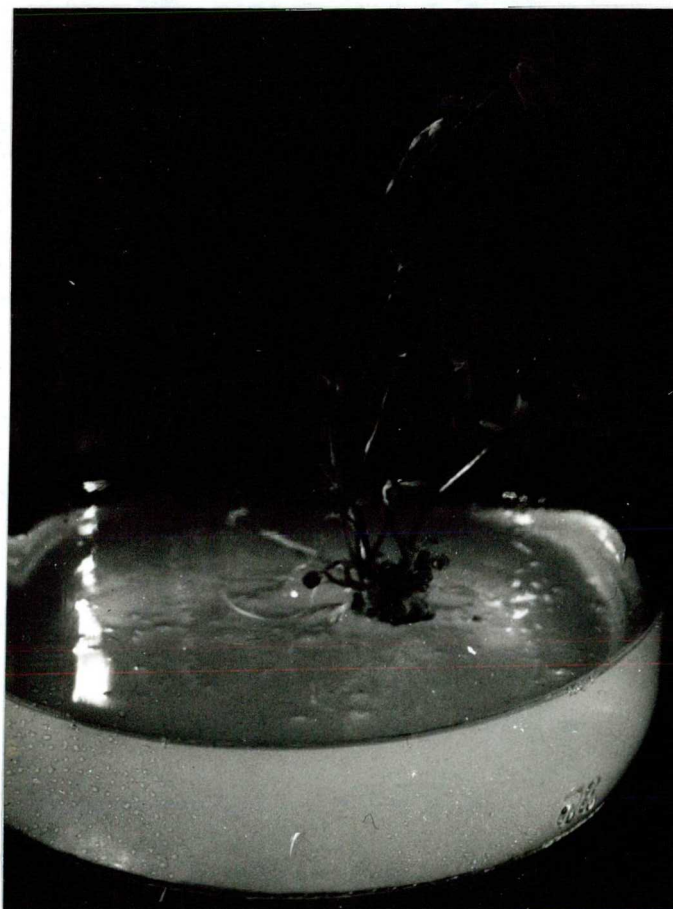
Direkt embriogenezissel kapott *H. varia* embriók



10. ábra

Regeneráló lucerna növénykék

11. ábra Protoplasztból regenerált növény



4.2.Lucerna transzformációja Agrobaktériummal

4.2.1.Transzformáció vad típusu Ti plazmidot hordozó

Agrobaktérium törzsekkel

Különböző Agrobaktérium törzsek (A.tumefaciens A6, T37, C58 vad ill. mutáns Ti plazmidot hordozó változatai: pRi1583, pGv3101, pGv2215, pGv2250) folyadéktenyészetéből 5-5 ul-t inokuláltam a különböző magasságokban elvágott M.coerulea és M.varia steril hajtásokra. Mindegyik baktériummal 5-5 szárdarab fertőzése történt. Négy hét elteltével két gyökérindukáló Ti plazmidot hordozó Agrobaktériummal (pGv2250 és pGv4025) sikerült több esetben szövetburjánzást és ebből való gyökérképződést megfigyelnünk, mindkét lucerna faj növényein (12.ábra).

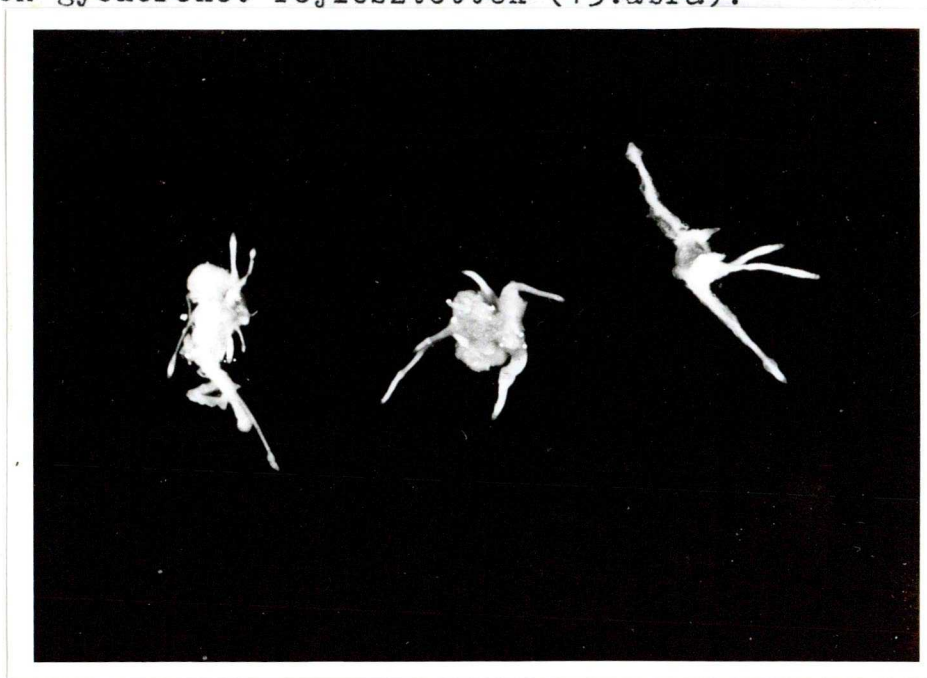


12.ábra

Gyökeres tumor M. coerulea száron



A növényről levett tumorok hormon mentes táptalajon szintén gyökereket fejlesztettek (13.ábra).



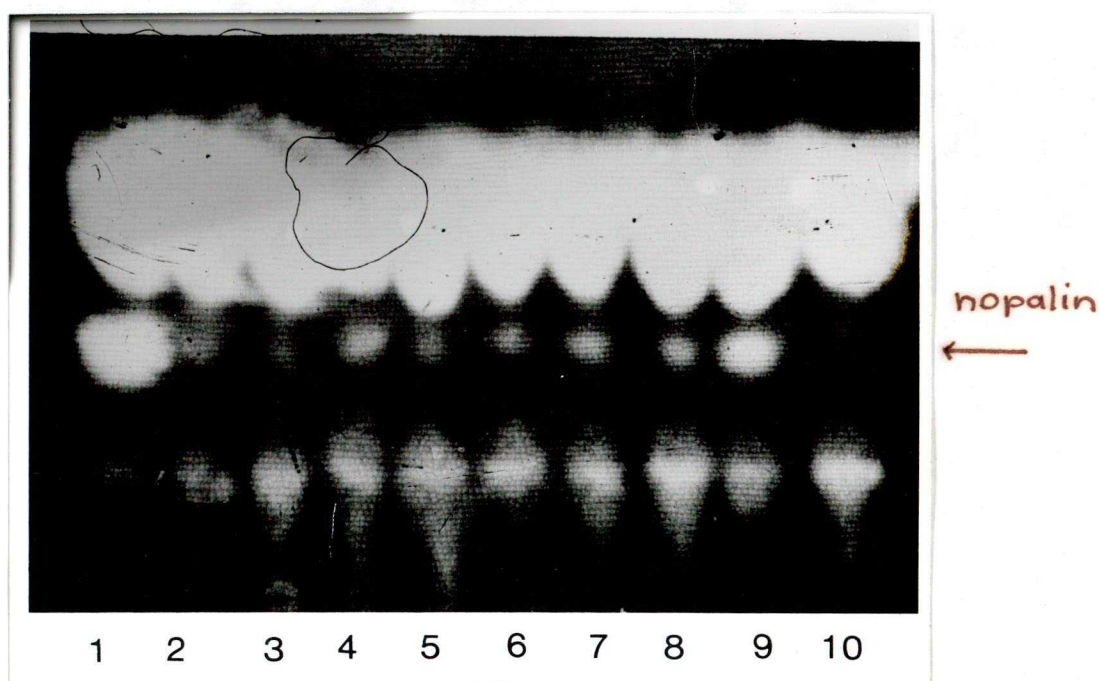
13.ábra

Vad típusu Ti plazmida (A281) ugyanezzel a módszerrel zöld, kompakt, nem differenciálódó tumorszövetet kaptam (14.ábra).



14.ábra

A levett szöveteket felszaporítottam és megnéztem a nopalinszintáz enzim aktivitását. Mint a 12.ábrán látható, a tumorszövetekben kimutatható volt a nopalín jelenléte, ami a transzformáció egyértelmű bizonyítéka. Ezekből a tumoros és gyökeres szövetekből nem sikerült növényt regenerálni egyik lucerna genotípus esetében sem.



15.ábra

Nopalín jelenlétének kimutatása:

1. Transzformált dohányyszövet.
- 2-9. Gyökeres lucernatumorok
10. Nem transzformált lucernaszövet

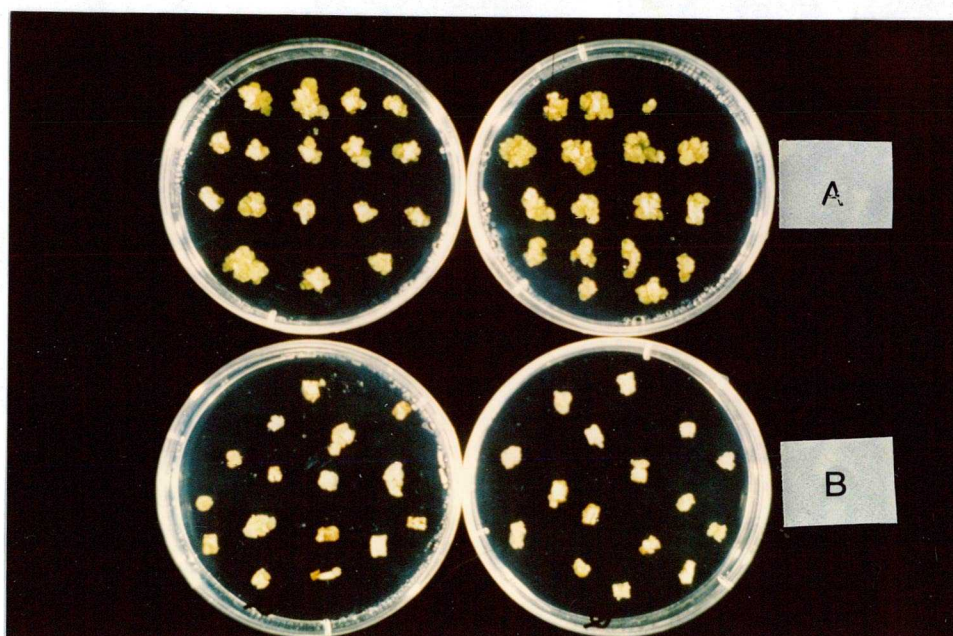
4.2.2.A transzformáció gyakoriságának optimalizálása

A vágott szárfelületre való bakteriuminokulálással kapcsolatos nehézségek kiküszöbölésére egy egyszerűbb és hatékonyabb módszert sikerült kidolgoznom, amely az alábbi műveleteket tartalmazza:

0.5-1.0 cm hosszú steril lucerna szárszegmenteket 100 ml-es Erlenmeyer lombikba helyeztem, melybe 40 ml folyékony UM hormonos (1 mg/l 2,4-D, 0.2 mg/l BA) táptalajt és 1 ml kb. 5×10^7 sejt/ml baktériumot tartalmazó éjszakán át növesztett tenyészetet tettem. A szöveteket 25 °C-on három napig rázógépen inkubáltam. Ezután a szárszegmenteket steril desztillált vízzel többször átmostam, majd agaros UM mediumra tettem, mely 300 mg/l carbenicillint tartalmazott a szárszegmenten maradt baktériumok elpusztítására. Hormon autotróf növekedésre való szelekciókor hormon mentes táptalajt használtam, kanamicin rezisztens szövet szelektálásakor 1 mg/l 2,4-D-t és 0.2 mg/l BA-t, valamint 100 mg/l kanamicint tartalmazó lemezekre raktam a szárszegmenteket. Egy hónap elteltével 3-4 zöld, növekvő pont jelent meg az Agrobaktériummal kezelt szöveteken a szelektáló lemezeken. (16.ábra) Ilyen zöld kalluszfajldést a kontroll, baktériummal nem kezelt szegmenteken soha nem tapasztaltam (16. és 17. ábra).

A szárszegmentek baktériummal való inokulálása többféle tenyészmédiumban (UM, MS, B5N, SH) egyaránt sikeres volt, különböző hormonkombinációkban is. (Baktérium fenntartó táptalaj -LB, YEB- nem felelt meg, ezekben a növényi szövetek három nap alatt elpusztultak.)

E módszerrel a szárszegmentek legalább 50%-án mindig volt legalább egy transzformáns jelölt zöld kallusznövekedés, de több kísérletben a szegmentek 100 %-án 5-10 rezisztens góc is megjelent.



16.ábra

Baktériummal inokulált (A) és nem kezelt, kontroll (B)
szárszegmentek fejlődése Km jelenlétében



17.ábra

Rezisztens élő szövet növekedése a baktériummal kezelt szárszegmenten (25x nagyítás)

4.2.3. Transzformáció "disarmed" Ti plazmiddal

Az Agrobacterium tumefaciens bo42 jelű törzsben a kanamicin rezisztenciáért felelős gént hordozó "disarmed" plazmidon kívül jelen van a "vir" régiókat tartalmazó bo542 plazmid is, melyen a növényi hormonok termelését szabályozó gének vannak (72;90.). Várható mindkét plazmid T-DNS-ének beépülése a növényi sejtek genomjába, külön-külön is, és együttesen is. A szárszegment együttenyészteses módszerrel ez a kérdés is vizsgálható volt.

Különböző lucerna fajokból 30-30 db szárszegmentet a már leírt módon kezeltem az A. tumefaciens bo42 jelű anyaggal. Ezután hormon autotróf, kanamicin rezisztens valamint mindkét sajátssággal rendelkező szöveteket szelektáltam (18.ábra).

18. ábra

Transzformáns szövetet tartalmazó szárszegmentek száma
20-20 inokulumból, különböző lucerna fajok esetében,
szelektáló táptalajokon

Növekedő szövetet mutató szárszegmentek száma
különböző táptalajokon

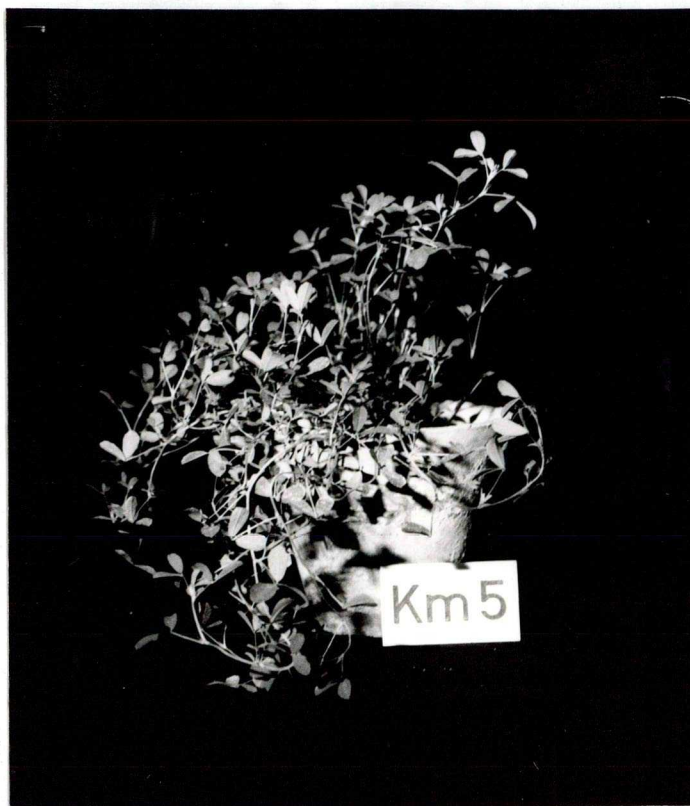
lucerna	hormon -	hormon +	hormon +
faj	Km-	Km 100 mg/l	Km 100 mg/l
<u>M.coerulea</u>	12 db	7 db	14 db
<u>M.varia</u> A2	14 "	6 "	13 "
<u>M.sativa</u> RA3	7 "	9 "	10 "

A 18. ábra adatai arra utalnak, hogy a transzformáns jelölt szövetek egy részében (a hormon mentes, kanamicines lemezekon növekedő kolóniákban) mind a bo542, mind a pGA471-es plazmidról származó T-DNS jelen van. Mivel a cél az volt, hogy transzformáns növényt kapjunk, a vad típusu T-DNS-t hordozó, hormon autotróf kolóniák érdektelenek voltak, hiszen az Agrobaktérium által kódolt hormon szintéziséért felelős gének működése más növényfajokon végzett kísérletek tapasztalatai szerint megakadályozza a növényregenerációt. Feltételezhető volt azonban, hogy a szövetek egy részébe csak a pGA471-es plazmid "disarmed" T-DNS-e integrálódott. Az ilyen kanamicin rezisztens szövetek megfelelő külső hormonok hatására képesek lehetnek a növényregenerációra.

4.2.4.A kanamicin rezisztens szövetek regenerációja

A kanamicin rezisztens szövetek szelektálása olyan UM médiumon történt, melyen a *M. varia* A2 vonal szövetdarabjai szelekció nélkül néhány hét alatt embriókat fejlesztenek. A Km jeleléteiben növekedő szövet azonban minden esetben dedifferenciált kalluszként jelent meg. Három hetenként átrakva ezeket ugyanezen a táptalajon, néhány esetben sikerült embrióképződést, ezekből pedig növényt is kapni. Azonban így a regeneráció folyamata hónapokig tartott, és a szövetek alig 10%-ában volt sikeres. Ezért több körülményt is kipróbáltam, hogy megnöveljem a növényregeneráció hatékonyságát. A legsikeresebbnek a folyadékkulturán keresztül történő regenerációs módszer bizonyult, mellyel a rezisztens kalluszok legalább 50%-a (gyakran azonban jóval több is) adott embriót. A módszer a következőkből áll:

A rezisztens *M. varia* A2 szövetet folyadék B5N táptalajba tettem. Hetente kétszer cseréltem a tenyészoldatot. Néhány hét múlva a dedifferenciált sejtcsoportok mellett globuláris és torpedo stádiumu embriók jelentek meg a szuszpenzióban. Ezek képződése több hónapon át folyamatos volt. Az embriókat folyadékból hormon mentes, vattás táptalajra raktam, ahol azok mindegyike 3-6 hét múlva kis növénykévé fejlődött. (16. ábra) Ezzel a módszerrel 10-15 db szárszegmentből -igénytől függően- akár több száz Km rezisztens növény is kapható.

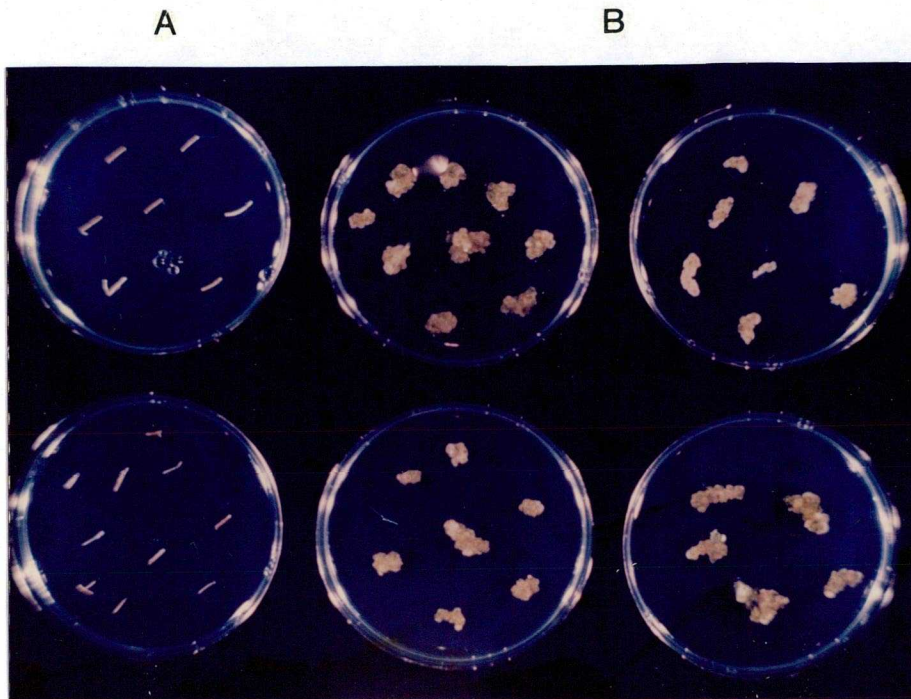


19.ábra

Km rezisztens szövetből regenerált növény

4.2.5.A rezisztens fenotípus tesztelése:

Hónapokig szelekció nélkül tartott Km rezisztens és kontroll nem transzformált lucerna növények gyökérszegmentjeit 1.0 mg/l 2,4-D, 0.2 mg/l BA valamint 100 mg/l Km tartalmu mediumra tettem. A kontroll gyökérszövet nem mutatott növekedést, míg a transzformánsok gyökérdarabjai 3 hét alatt embriókalluszt produkáltak.(20.ábra)



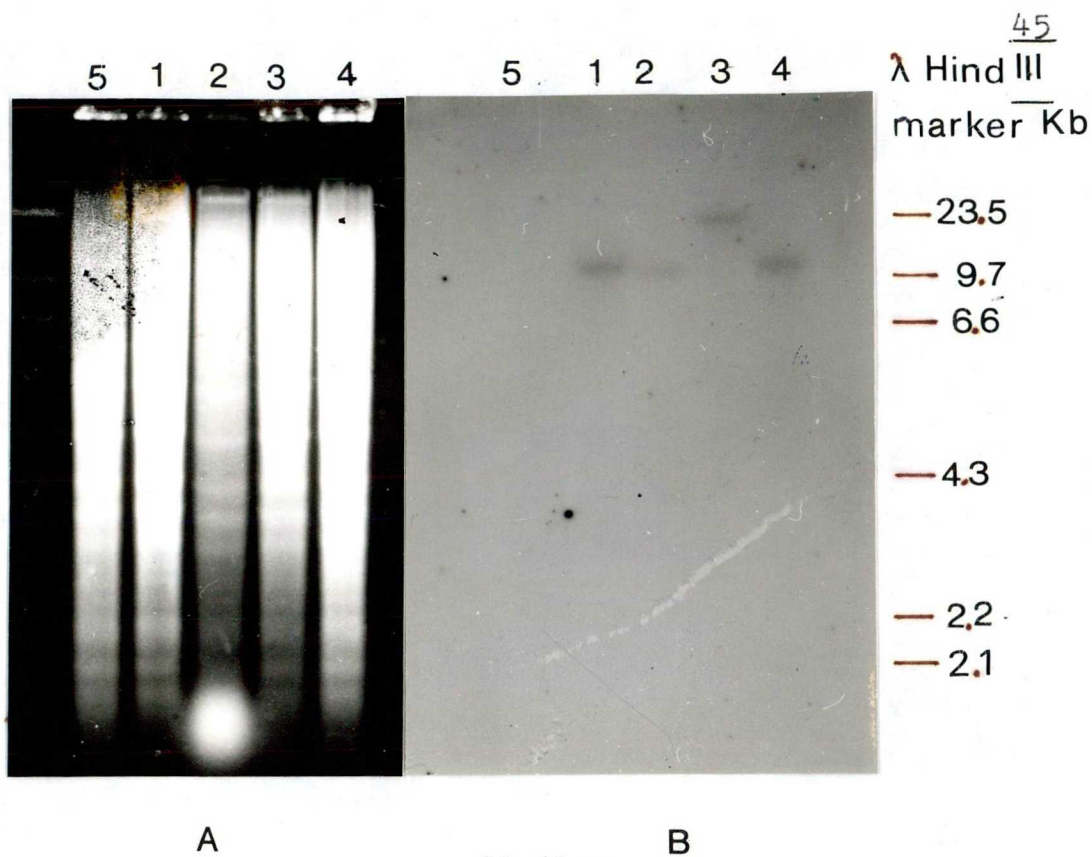
20.ábra

Szenzitív (A) és rezisztens (B) növények gyökérinokulumainak
kalluszosodása Km tartalmu táptalajon

4.2.6.A kanamicin rezisztenciáért felelős strukturgén
jelenlétének kimutatása a transzformáns növényekben

Négy transzformáns jelölt és egy kontroll lucerna növénykéből DNS-t izoláltam, Eco R1 enzimmel emésztettem, majd hozzáhibridizáltam a kanamicin rezisztenciáért felelős radioaktív foszforral jelölt DNS szakaszt.

Mint a 21.ábrán látható, csak a transzformáns növényanyagból származó DNS-sel kaptam hibridizációs jelet.



A Km rezisztencia strukturgénjének hibridizációja
szenzitív (5) és rezisztens (1,2,3,4) növényekből izolált
totál, emésztett DNS-hez

A panel: Eco R1 enzimmel emésztett, agarózon megfuttatott, etidiumbromiddal festett DNS képe. B panel: Hibridizációs kép

4.3.Lucerna protoplasztok szomatikus hibridizációja

4.3.1.Km és PPT rezisztens szuszpenziók protoplasztjainak fuziója

A szövettenyésztési módszer optimalizálása megteremtette az alapját a lucerna protoplasztokkal végezhető kísérleteknek is. Az Agrobaktériummal transzformált szövetekből kapott lucerna növények levélprotoplasztjai jól osztódnak és növényt regenerálnak 100-500 mg/l Km jelenlétében. A G. Donn által előállított PPT rezisztens M.sativa sejtszuszenziók elvesztették regenerációs képességüket és (más lucerna szövetekhez hasonlóan) 100 mg/l kanamicin jelenlétében elpusztulnak. Irodalmi adatokból (33), valamint a lucerna transzformációs munkákból is nyilvánvaló volt, hogy az Agrobaktériummal bevitt Km rezisztencia domináns sajátosság. Az amplifikált glutamin szintáz génre nem áll rendelkezésre keresztezéssel végzett genetikai analízis, mivel növényt nem tudtak felnevelni ebből az anyagból. Figyelembe véve azonban, hogy a tetraploid M.sativa genomjában megnyilvánul az amplifikáció következtében kiváltott PPT rezisztencia, várhatóan ez is domináns jellegnek tekinthető.

Igy lehetőség nyílt arra, hogy a protoplaszt fuzió módszerével szomatikus hibrid sejteket állítsunk elő, és ezeket kettős rezisztencia alapján szelektáljuk. Ezzel vizsgálható volt, hogy a PPT rezisztens sejtek regenerációs képessége helyreállítható-e egy regenerálható, közeli rokon faj mag és citoplazma anyagának bejuttatásával.

A kontroll növények és sejtvonalak PPT érzékenységének vizsgálatakor látható volt, hogy a zöld, differenciált szövet (embrió vagy növény) nagyságrendekkel érzékenyebb PPT-re, mint a dedifferenciált kallusz vagy sejtszuszpenzió tenyészetek (22.ábra)

22.ábra

Különböző tenyészetek PPT érzékenysége

A túlélő szövetek aránya (%) 4 hétig tartó különböző koncentrációju PPT jelenlétében

PPT konc.(mM)	.0.0	0.005	0.01	0.05	0.1	0.5
zöld hajtás	100	0	0	0	0	0
zöld embrió	100	50	0	0	0	0
A2 szuszp.	100	100	4	0	0	0
R62	100	100	100	100	96	87
R3200	100	100	100	100	100	92
R2003	100	100	100	100	84	70

Az R62, R3200, és R2003 jelű vonalak a G. Donn által előállított PPT rezisztens lucerna sejtvonalak, a többi kontroll M. varia növény és sejtszuszpenzió.

Az első kísérletsorozatban Km rezisztens M.varia növényekből származó sejtszuszpenzió protoplasztokat fuzionáltam a PPT rezisztens R62 (M.sativa) és R2003 (M.varia) sejtvonalak protoplasztjaival.

A PEG kezelés után a hibridek gyakoriságát mikroszkópos vizsgálattal ebben a kísérletben nem lehetett megállapítani, mivel mindkét fúziós partner protoplasztjai sejtszuspenzió eredetűek, ezért hasonló morfológiájuk voltak.

A fúziót követően négy hétig szelekció nélkül tenyésztettem mind a kontroll, mind a fúziós sejtpopulációkat, úgy ahogy a 8. ábra látható séma mutatja. Ezután, mikor már szabad szemmel látható kolóniák fejlődtek, minden egyes petri csésze anyagát négy-négy féle (kontroll és szelektáló ágenst tartalmazó) lemezekre szélesztettem:

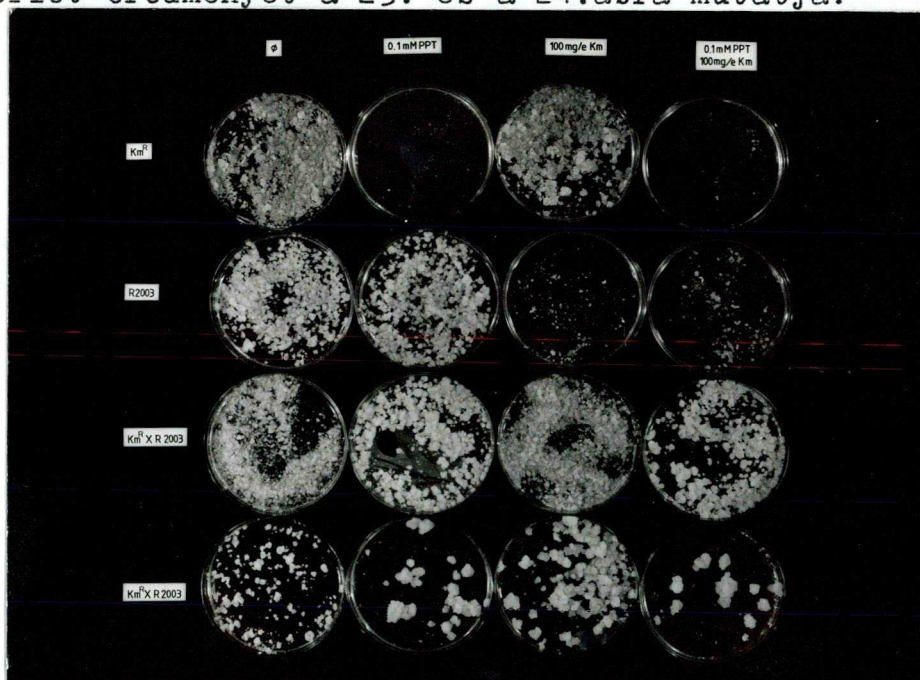
UM, hormon+ szelektáló anyag mentes

" + PPT (0.1 mM)

" + Km (100 mg/l)

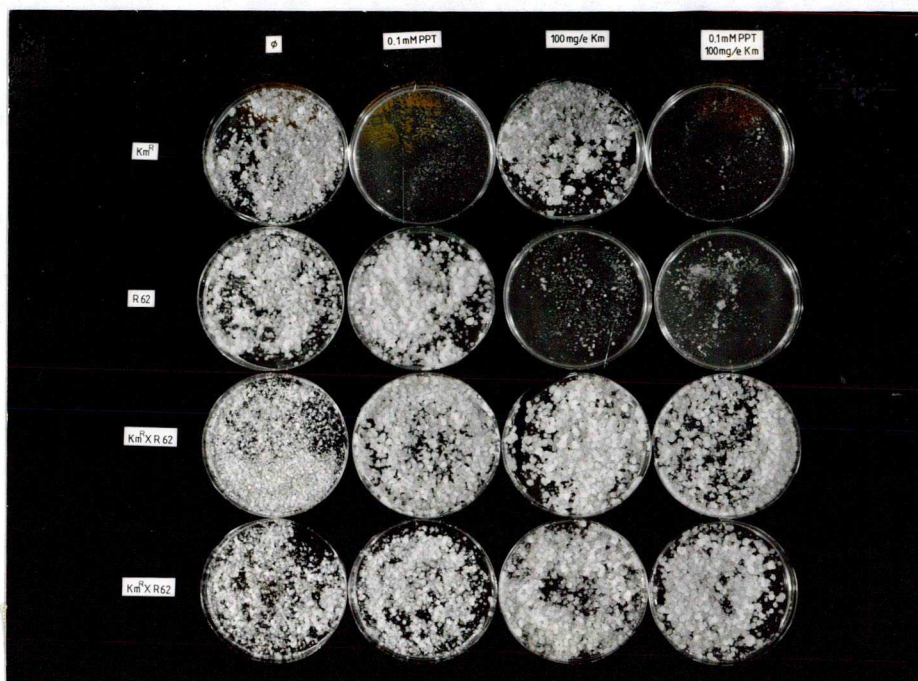
" + PPT + Km

A kísérlet eredményét a 23. és a 24. ábra mutatja:



23. ábra

Különböző szelektáló lemezekben növő szülői és fúziós eredetű anyagok 4 héttel a szélesztés után (KmR: kanamicin rezisztens szülővonal R2003: PPT rezisztens



24. ábra

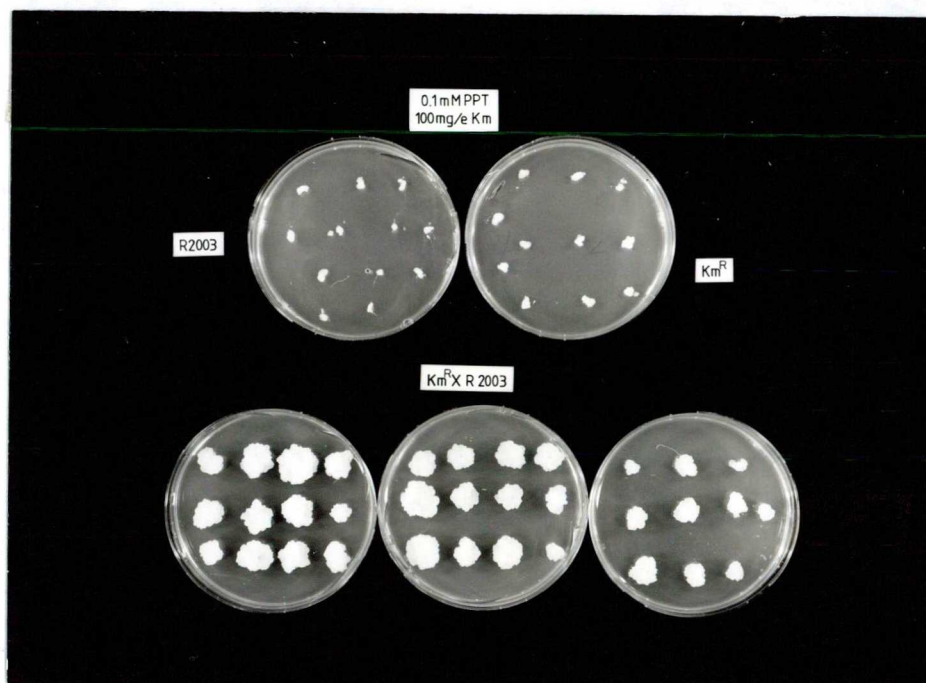
Különböző szelektáló lemezekben növő fuzió és szülői
eredetű anyagok 4 héttel a szélesztés után

KmR:kanamicin rezisztens partner, R62:PPT rezisztens
partner

A fényképen látható kísérletekben igen sok kettős rezisztenciát mutató kolóniák kaptam. A rezisztens fenotípus ellenőrzésére a szülői vonalak nem szelektáló lemezekben felnőtt kolóniáiból, valamint a kanamicin+PPT tartalmu lemezen felnőtt kolóniákból 30-30 db-ot 4 hét elteltével újra PPT és Km tartalmu lemezekre raktam. A 25. ábrán látható, hogy a kettős szelektáló lemezekben a szülői eredetű kalluszok nem képesek növekedni, míg a hibrid jelölt kolóniák jól fejlődnek.

Nem jelentek meg kettős rezisztenciát mutató kolóniák a két szülő protoplasztjainak összekevert, de PEG kezelést nem kapott tenyészetéből. Ez arra utal, hogy a túlélés nem a különböző rezisztenciájú kolóniák sejtjeinek "átetetésének" köszönhető, tényleges egybeolvadás történt a protoplasztok között.

Ezt a fúziós kísérletet 3-3-szor ismételttem meg mind az R62, mind a 2003-as vonallal, az eddig leirtakhoz hasonló eredményeket kapva.



25.ábra

Szülői eredetű és kettős szelektáló lemezekről származó kolóniák növekedése PPT és Km tartalmu lemezeken

A 25. ábrán látható növekedéshez hasonló képet mutatott a $Km^R \times R62$ fúzióból származó kettős rezisztens kolóniák vizsgálata is.



4.3.2. Mezőfili sejtekből származó lucerna protoplasztok
fúziója szuszpenzió eredetű protoplasztokkal

Másik megközelítésként Km rezisztens növények levél eredetű protoplasztjait fuzionáltam a PPT rezisztens R3200 sejtsuszpenzió protoplasztjaival. Ezekben a kísérletekben a fúzió hatékonysága mennyiségileg is értékelhető; 1 nappal a PEG kezelés után kísérletenként 5-10% volt a mikroszkópban számolt hibrid sejtek aránya a sejtsuszpenzió¹ eredetű szülőkhöz képest.

A fúziós anyagot az előzőekhez hasonlóan 4 hét után szélesztettem különböző szelektáló lemezekre (26. és 27. ábra)

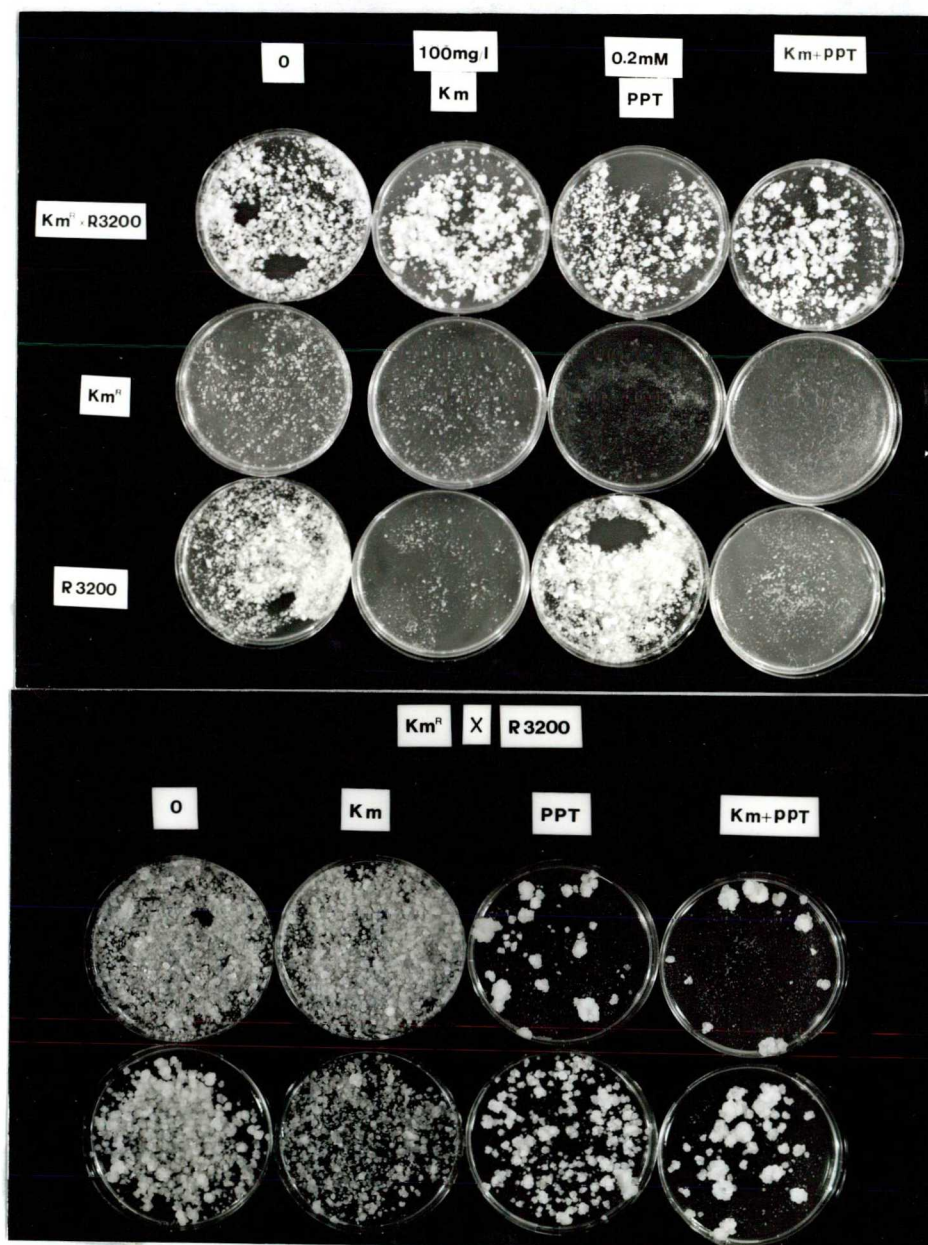
26. ábra

PPT és Km tartalmu lemezeken található kolóniák négy
 héttel a szélesztés után
 (3-3 petri csészén számolt kolóniák átlaga)

PPT (mM)	0	0mM	0.01mM	0.05mM	0.5mM	0.5mM
Kanamycin(mg/l)	0	100	0	0	0	100
KmR.	280	320	8	0	0	0
R3200	220	0			180	0
KmR x R3200 a)	300	460	10	17	22	4
KmR x R3200 b)	220	285	10	9	21	11

0.01mM PPT jelenlétében a kontroll kolóniák 10%-a képes volt kalluszként növekedni, de zöldülést nem mutattak. A fúziós anyagból ezen a PPT koncentráción néhány zöldülő embriót is kaptam, azonban a belőlük felnevesztett növények már nem mutattak jelentősebb PPT rezisztenciát.

A 0.5mM PPT-t és 100 mg/l Km-et tartalmazó lemezekon számolt kettős rezisztens kolóniák aránya a szelekciós anyagot nem tartalmazó lemezekon kinövőkhöz (5.4%) általában jó összhangban volt a fuzió után mikroszkópban számolt hibridgyakorisággal. A 27.ábra is egy ilyen kísérletnek az anyagát mutatja:



27.ábra

Szülői és fuzió anyagból származó kolóniák

növekedése szelektáló lemezekon

(Km^R: kanamicin rezisztens levél protoplaszt eredetű

kolóniák, R3200: PPT rezisztens szuszpenzió

protoplasztból fejlődő kolóniák

A szelektáló ágenst nem tartalmazó, valamint a csak Km tartalmu lemezeken kb. fele-fele arányban voltak fehér kallusz és zöld, embriós kolóniák. A PPT-t valamint Km +PPT-t tartalmazó lemezeken kapott kolóniák minden esetben fehéres kalluszként jelentek meg.

A regenerációs folyamat serkentésére a 8 hetes, kb. 0.5 cm-es kalluszok egy részét szelekció mentes valamint PPT-t és Km-et tartalmazó embrióindukáló táptalajokra raktam. Bár ezek mindenütt jól növekedtek tovább, regenerálást továbbra sem mutattak, azon kívül, hogy halvány zöldülés volt látható a PPT mentes lemezeken.

A kettős rezisztens kolóniákból folyadéktenyészeteket indítottunk, az embrióindukáló B5N táptalajban. A folyadékban lerázódott utódsejtek jól növekedtek, de embrió képzés jeleit nem mutatták. sem a szelektáló vegyületek jelenlétében, sem anélkül.

4.3.3.Szomatikus hibridek szelektálása dedifferenciált stádiumban

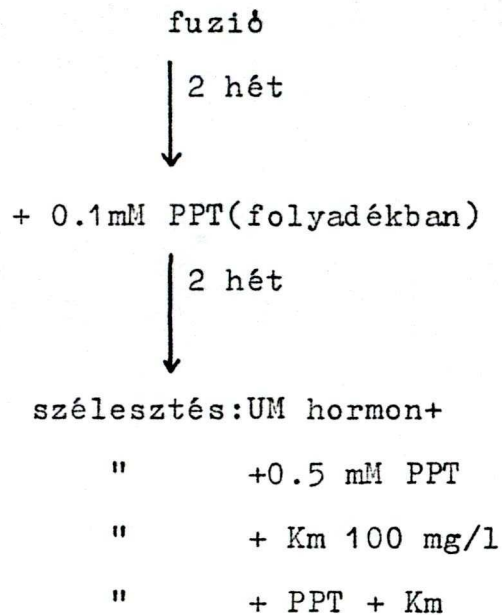
A következőkben olyan kísérleteket indítottam, ahol a kettős szelektálást még az embriók kifejlődése előtt, dedifferenciált, nem zöldülő kolóniákon végeztem. Ezután az embriók képződése már nem szelektív körülmények közt történt. E kísérlet elvégzését a következők indokolták:

- A PPT jelenlétében jelentősen megváltozhatnak az anyagcsereutak a rezisztens szövetben is, ami megakadályozhatja a differenciáció bonyolult folyamatát.
- Amennyiben az amplifikáció okozta PPT rezisztencia csak kalluszban nyilvánul meg, nem lehet dedifferenciált rezisztens szövetet szelektálni.

A kísérletnek a sémája a következő volt:(28.ábra)

28.ábra

A protoplaszt eredetű anyag differenciálódása előtt
történő PPT szelekció sémája



Már 7 nap 0.1 mM-os PPT kezelés a kontroll levélprotoplasztok fejlődését teljesen meggátolta, ugyanakkor a R3200 eredetű, valamint a PEG kezelt, hibrideket tartalmazó tenyészetekben sok kolónia zavartalanul fejlődött. Zöldülés azonban - szemben az ugyanilyen; de PPT jelenléte nélkül növesztett fuziók anyagokkal -nem tapasztalható (29.ábra)

29.ábra

14 nap 0.1 mM PPT jelenlétében tenyésztett szülői és
fuzió anyagok kolóniái különböző szelektáló
lemezeken, 4 héttel a szálesztés után
(3-3 petri csészén számolt kolóniák átlaga)

	0	Km+	PPT+	KM+PPT
KmR	0	0	0	0
R3200	320	0	287	0
Km x R3200 a)	217	145	186	164
b)	176	124	152	136

Ezzel a korai szelekcióval is lehetséges volt kettős rezisztens kolóniákat kapni. A növényregeneráció jeleit azonban ezek sem mutatták.

4.3.4.A kettős rezisztens kolóniák hibrid eredetének

bizonyítása

A PPT rezisztens vonalak közül az R62 és a R3200 jelűek M.sativa fajból származnak, míg a Km rezisztens anyag M.varia eredetű. A két közeli rokon faj szexuálisan is keresztezhető egymással, ezért a szomatikus hibridekben jelentősebb inkompatibilitást nem vártunk.

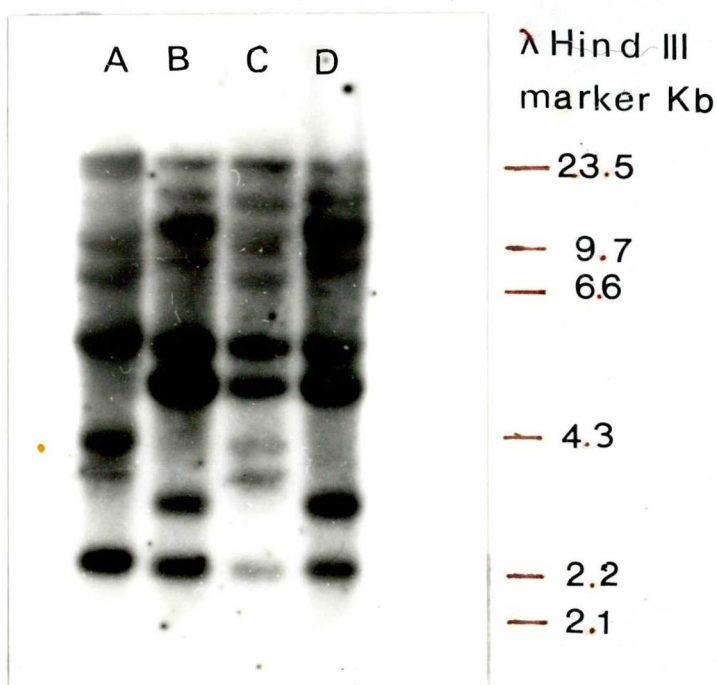
Laboratóriumunkban ismeretes volt, hogy egy szójaból izolált cDNS klón(9) - P4 jelű un. auxin indukálható gén -eltérő Southern hibridizációs képet mutat a két különböző lucerna faj esetében a Hind III-mal emésztett DNS-hez. Amennyiben a szóban forgó szomatikus hibridekben mindkét genom hiánytalanul jelen van, a hibridizációs mintázatnak a két szülőét együtt kell mutatnia. (28.ábra)

30. ábra

P4 próba hibridizációs mintázata M.varia, M.sativa szülőkből, és a kettős rezisztens növényanyagból izolált

Hind III emésztett DNS-hez

D: M.varia növényekből, **C:** R62xKm fuzióból kiválasztott kettős rezisztens kolóniából, **B:** a fuzió anyagból nem szelektíven regenerált növényből, **A:** M.sativa, R62 szuszpenzióból izolált DNS minták



A 30. ábrán látható, hogy a kettős rezisztens anyagban (**C**) megtalálható mind a M.varia, mind a M.sativa szülőre jellemző restrikciós fragment, bár e kolónia esetében egy jellegzetes M. varia csik hiányzik. További négy véletlenszerűen kiválasztott kettős rezisztens kolóniát megvizsgálva hiánytalanul kimutatható volt a közös hibridizációs mintázat (nincs az ábrán). A nem szelektált körülmények közt regenerált növény (**B**) egyértelműen M. varia szülői mintázatot mutat.

AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A lucerna gazdasági fontossága és a szimbiotikus nitrogénkötésben betöltött szerepe miatt számos laboratóriumi kísérlet alanya. A protoplasztból való növényregenerációról M. sativa esetében 1980-ban jelent meg az első közlemény (2). Azóta M. glutinosa, M. coerulea fajok protoplasztból történő regenerálásáról számoltak be (12,13,92). Ennek ellenére a lucerna szövettényészetben történő genetikai manipulációjáról szóló publikációk száma igen csekély. Ezen információk felhasználásával valamint egy jól regeneráló genotípus alkalmazásával sikerült olyan szövettényesztési módszert kidolgozni, melynek hatékonysága alkalmas effektív genetikai manipulációs munkára mind kallusz, mind protoplaszt esetében. Ezt támasztják alá a disszertációban tárgyalt kísérletek.

Az Agrobaktériummal végzett fertőzéseket eleinte a steril növények elvágott száraira történő baktérium inokulációval végeztem. Ezzel a módszerrel is sikerült tumor indukálást elérni a C58C1 pGv2250 és C58C1 pGv4025 Agrobaktériumokkal. Az alig 1 mm átmérőjű tumorok megjelenéséig a kezelés után négy hét - néha több is - eltelt. Mivel a baktériumok növekedése ilyen körülmények közt nem ellenőrizhető, sok esetben teljesen ellepték a növényeket a várakozási idő alatt. Emiatt több kísérlet nem volt kiértékelhető. Más alkalmakkor a szár baktériummal kezelt felületén tapasztaltam erős barnulást, ami a növényi sejtek pusztulására utalt. Ezért nem kizárható, hogy a kezdeti kísérleteimben több, különböző baktériummal kapott negatív eredmény a fertőzési módszer megbízhatatlanságából származott.

A későbbi kísérletekben kidolgozott szárszegment-baktérium együttenyésztes módszer előnye egyszerűségén túl, hogy ellenőrizhető körülményeket biztosít a kísérletekhez. Ennek köszönhetően a magas transzformációs gyakoriság reprodukálhatóvá vált. Mind hormon autotróf, mind antibiotikum rezisztens szövetet tudtam szelektálni e módon. Az általunk eddig vizsgált, véletlenszerűen kiválasztott kanamicin rezisztens szövetekben (több, mint 20 esetben) a Southern analízis mindig megerősítette a transzformáció tényét. Ezek a megfigyelések alátámasztják a módszer megbízhatóságát.

Egy-egy szárszegmenten több transzformációs esemény is lejátszódhat (gyakran 8-15 egymástól független, rezisztens góc is megfigyelhető sztereo-mikroszkóp alatt), ezért az így kapott szövet kimérának tekinthető. Nem zárható ki az a lehetőség, hogy az ilyen kevert kalluszokból való regenerációt a jelenlevő kettős (pGA471 + bo542) transzformánsok hormontermelése nagybán gátolja. Ezért a folyadéktenyészetben történő embrió indukciónak több előnye is van: egyrészt a kevert szövet apró sejtcsoomókra esik szét, így elsődlegessé válhat a külső hormonok embrióindukáló hatása, másrészt a szövet szétesésével nagyobb a valószínűsége annak, hogy az így kapott növények homogén sejtállománnyal rendelkezzenek. Ezzel jó összhangban van a 21. ábrán látható eredmény, mely azt mutatja, hogy a különböző embriókból származó növényekben 1-1 T-DNS integrációs hely van.

Ezen az ábrán látható minták közül az 1,2, és 4 számúak azonos Erlenmeyer lombikban keletkező embriókból kifejlődött növényekből származnak, míg a 3. jelű egy másik lombik embriójából származó növényé. Az 1,2,4-es mintákban a T-DNS helyzete a növények genomjában hasonló, vagy akár azonos ponton is lehet. Ezért nem kizárt, hogy mindhárom embrió egyetlen transzformált sejt utódsejtjeiből keletkezett. A T-DNS integrálódásának helyét és számát vizsgáló kísérletek ezeken és más növényeken is folyamatban vannak.

A különböző típusú Agrobaktérium törzsek használata során bebizonyosodott, hogy M.sativa, M.coerulea és M. varia esetében a magas (gyakran 100%-os) transzformációs gyakoriságot a hipervirulenciát biztosító bo542 plazmid jelenlétében sikerült elérnem. Más Agrobaktériumokkal is kaptam transzformáns lucerna szövetet, azonban jóval alacsonyabb számban, akár teljes, akár "disarmed", plazmidról bejuttatásáról volt szó. Az eltérő viselkedés oka még nem tisztázott.

M. sativa transzformációja esetében, amikor a jól regeneráló RA3 növényvonalat használtam, a folyadékban történő embrióindukcióval a Km rezisztens szövetek növényé regenerálása sem jelentett problémát. M. coerulea-nál, mely rendszeren 1-2%-ban képes levélnyél eredetű kalluszból növényt regenerálni, ezidáig 12 különböző Km rezisztens szövetből nem kaptam növényt.

A hormon mentes, kanamicin tartalmu lemezeken szelektált, feltehetőleg kettős ("disarmed" és vad típusu) T-DNS beépülést egyaránt tartalmazó szövetekből sem kaptam embriót. Ez összhangban van azzal a tapasztalattal, hogy a hormontermelést befolyásoló gének jelenléte megakadályozza a növényregenerációt (19,30).

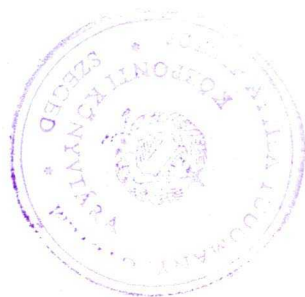
A lucernán végzett szomatikus hibridizációs kísérletek hiányának egyik oka feltehetőleg az volt, hogy nem állt rendelkezésre szövettenyészetben közvetlen szelekcióra használható, biokémiai markerrel rendelkező növényvonal. Az Agrobaktériummal történő génbevitellel előállított kanamicin rezisztens növények lehetővé tették olyan protoplaszt fúziós kísérletek elvégzését, melyekben a regenerálásra képes partnerre direkt módon lehet szelektálni. A szomatikus hibridizációs kísérlet másik partnerének M.sativa sejtszuszpenziót választottunk, amely az agronómiai szempontból is fontos PPT rezisztenciával rendelkező (58). Számos kettős rezisztens, hibrid jelölt kolóniát kaptam. A fúziós eredet bizonyítására lehetőségem volt DNS szinten tanulmányozni az anyagot. A laboratóriumunkban a lucerna embriogenezise során történő génmegnyilvánulási változások vizsgálatára egy szójából izolált gén (P4) cDNS próbáját (9) használtuk. E munkából ismeretessé vált, hogy a szója eredetű cDNS kereszthibridizál a lucernából izolált DNS-sel, és eltérő hibridizációs mintázatot mutat a M.varia és a M.sativa fajok esetében (Bögre László személyes közlése).

A véletlenszerűen kiválasztott 5 db kettős rezisztens anyagban kimutatható volt a kevert hibridizációs mintázat, a másik partnerre jellemző csíkok jelenléte.. E kolóniák hibrid jellege tehát bizonyítottan tekinthető.

A kettős rezisztenciát mutató kolóniákból egyetlen esetben sem sikerült növényt regenerálni. (a kanamicin rezisztens partner protoplasztjaiból származó kolóniák ugyanezekben a kísérletekben 80-100%-ban embriókat produkáltak a szelekció mentes vagy csak kanamicines lemezeken.) Ez az eredmény ellentétes a dohány és répa fajokon végzett szomatikus hibridizációkban tapasztaltakkal, ahol a regeneráló jellemvonás domináns sajátásként viselkedett. (78,79,80).

Az általunk kapott eredményhez hasonló megfigyelést irt le O'Connell et al. (54). *Lycopersicon esculentum* és *Lycopersicon pennellii* fajok protoplasztjainak fúziója után kalluszmorfológia alapján szelektálta, és biokémiai markerrel ellenőrizte a kapott kolóniák hibrid jellegét. Ezek a hibridek nem voltak képesek növényregenerációra, annak ellenére, hogy ugyanezen fajok szexuálisan előállított hibridje szövettenyészetben regenerálható volt.

Nincs információnk arról, hogy a pillangós virágu növényeknél a szomatikus hibridekben milyen a morfogén sajátosság genetikai meghatározottsága.



Az általam kapott kettős rezisztens kolóniák regenerációjának hiányára több magyarázat is lehetséges:

1. Ismeretes, hogy az ammónium tartalom alapvetően befolyásolja a lucernában a szomatikus embriók fejlődését, számát, mivel szoros kölcsönhatás van a növényi hormonok morfogenezisre gyakorolt hatása és az ammonium szint között. (87). A PPT rezisztens sejtekben amplifikálódott GS szekvencia és az ezzel kapcsolatos megnövekedett glutamin szintáz enzimszint (mely kulcsszerepet játszik az ammónium háztartásban), megváltoztathatja, eltorzíthatja az ammónium anyagcsere utjait, amivel megakadályozhatja teljes mértékben az embrióprodukción a rezisztens szövetekben.

2. Lehetséges, hogy jelentősebb ammónium szintbeli változás csak a szubsztrát analóg vegyület jelenlétében játszódik le, annak hiányában a szomatikus hibrid kolóniák képesek lehetnek a regenerációra. E feltevés megvizsgálására a fuzió protoplasztokból nagy számban növényeket regeneráltam vissza, melyeket üvegházba is kiültettem. Négy ilyen növényt Southern analizissel megvizsgálva egyértelmű M. varia szülői mintázatot kaptam, ezért a többiek eredetét virágszín alapján kívánom azonosítani. Erre az ad alapot, hogy mint ismeretes, a M. sativa kék virágu, míg a M. varia fehér virágu.

A kiültetett növények még nem virágoztak. Amennyiben sikerül hibrid növényt találni közöttük, ezek PPT érzékenységének vizsgálata segíthet feltárni a lehetséges összefüggéseket a glutamin szintáz gén amplifikációja illetve ennek a kallusz, esetleg növény stádiumban történő megnyilvánulása között.

G. Donn laboratóriumában egy együttműködés keretében szintén folyamatban van a hibrid kolóniákból izolált DNS minták hibridizálása a GS gén próbájával. Ezzel az amplifikált szekvencia sorsát kívánjuk követni a fúziós termékekben.

3. További lehetséges magyarázat a kettős rezisztens növény hiányára az lehet, hogy a GS gén amplifikációja csak kallusz állapotban van meg, differenciált szövetben hiányzik. Ismeretes ugyanis, hogy gyakori a genom egy részének dedifferenciált, kallusz stádiumra jellemző amplifikációja, bármilyen különösebb szelekció nélkül is (102), mely más stádiumokban nincs meg. Elképzelhető, hogy az izolált lucerna vonalak GS amplifikációja egy ilyen DNS régióban található.

Az utóbb tárgyalt feltevések helyessége esetén a PPT kihagyása a táptalajból utat nyithatna a növényregenerációnak, lefeljebb az így kapott növények érzékenyek lennének a vegyülettel szemben. A mi esetünkben a kettős rezisztens kolóniák a PPT nélküli lemezeken sem voltak képesek regenerációra. Ez a megfigyelés inkább az első magyarázat mellett szól.

Három különböző eredetű PPT rezisztens sejtvonal protoplasztjait fuzionáltam a kanamicin rezisztens protoplasztokkal, és minden esetben hasonló, azaz nem regeneráló fenotípusú kettős rezisztens kolóniákat kaptam. Ez a tény is arra utal, hogy a GS amplifikációnak közvetlen befolyása lehet a regeneráció folyamatára.

4. Mivel a differenciált szövetek nagyságrendekkel érzékenyebbek a PPT-vel szemben, mint a kalluszok, az is elképzelhető, hogy eltérő anyagcsere utak vesznek részt a különböző differenciáltságu szövetekben az ammónia anyagcseréjében.

A szomatikus hibridek fuzió következtében megnövekedett kromoszómaszáma (60-100 között volt néhány vizsgált esetben) feltehetőleg nem akadályozná meg a növényregenerációt, mivel protoplaszt eredetű anyagból 100 fölötti kromoszómával rendelkező, normális kinézetű növényeket is kaptam már vissza.

Amennyiben az elkövetkezőkben lesz információnk arról, hogy más lucerna vonalak szomatikus hibridizációjakor hogyan nyilvánul meg a regenerációs képesség, biztosabban választhatunk a lehetséges magyarázatok közül. G. Donn laboratóriumában folyamatban van az izolált GS gén visszajuttatása - esetleg több kópiában is-, ami szintén megnövekedett enzimszintet eredményezhet. Az így kapott szövetek regenerációs képességének vizsgálata szintén segíthet eldönteni, valóban az ammónium anyagcseréjében bekövetkezett változások okozták ebben a kísérletben a morfogén sajátság elvesztését.

6. Az eredmények összefoglalása

A lucerna genetikai anyagának szövettenyésztésben történő megváltoztatása, idegen információt hordozó növény előállítása igen fontos lehet mind az alap kutatás, mind a mezőgazdaság szempontjából. E területen végzett munkám során a következő eredményeket sikerült elérni:

1. H. varia A2 genotípusu lucerna növényvonal esetében sikerült a külső tenyésztési faktorokat úgy optimalizálni, hogy lehetővé vált a kalluszból és protoplasztból való nagy hatékonyságú növényregeneráció. Ez megteremtette az alapját a DNS beviteli és szomatikus hibridizációs kísérleteknek.

A kétszikű növények természetes génbeviteli vektorát, az Agrobaktériumot használtam fel idegen DNS-t hordozó lucerna növények előállítására. Mind a hormon régiókat kódoló, mind a "disarmed" T-DNS-t sikerült bejuttatni a lucerna genomjába, de a növényregenerálás csak az utóbbi esetben volt sikeres. Kísérleteim során először kanamicin rezisztens növényeket állítottam elő, de a kidolgozott módszer elméletileg alkalmas bármilyen izolált gén bejuttatására a lucerna genomjába.

A szövettanyészetben szelektálható markerrel rendelkező Km rezisztens lucerna növények protoplasztjait PPT rezisztens lucerna vonalak protoplasztjaival fuzionáltam. A szomatikus hibrideket kettős rezisztencia alapján lehetett szelektálni. Ezen kolóniák hibrid eredete biokémiai markerekkel is bizonyítható volt. A növényregenerálás azonban ezekben a kísérletekben csak a Km rezisztens kontroll protoplasztokból volt sikeres, a hibrid kolóniákból nem. Ezen eredmények jobb megértéséhez szükséges, hogy több információ álljon rendelkezésünkre lucerna protoplasztokkal végzett fuziókról.

Az eddig elért eredmények arra utalnak, hogy a laboratóriumunkban kidolgozott módszerekkel sikeresen lehet a lucernán genetikai manipulációs kísérleteket végezni.

Köszönetnyilvánítás

Ezennel szeretnék köszönetet mondani Dr. Dudits Dénesnek az értékes szakmai irányításért, valamint Dr. Alföldi Lajosnak , hogy a vezetése alatt álló intézetben lehetővé tette számomra a dolgozat elkészítését.

Köszönöm Dr. Koncz Csabának, hogy a kísérletekben használt Agrobactérium törzsek egy részét rendelkezésemre bocsátotta. Külön köszönöm Bögre Lászlónak a fotóanyag elkészítésében valamint más elméleti és gyakorlati kérdésekben nyújtott segítségét.

1. Gresshoff P.M., 1980
In vitro culture of white clover: callus, protoplast culture and plant regeneration
Bot. Gaz. 141: 157-164
2. Kao K.N. and Michayluk M.R. 1980
Plant regeneration from mesophyll protoplast of alfalfa
Z. Pflanzenphys. 96 135-141
3. Keyes G.J., Collins G.B., Taylor N.L., 1980
Genetic variation in tissue cultures of red clover
T.A.G. 58: 265-271
4. Kumar A.S., Reddy T.P., Reddy G.M., 1983
Plantlet regeneration from different callus cultures in pigeon pea (*Cajanus Cajan*)
Plant. Sci. Lett. 32:271-278
5. Brown D.C.W. and Atanas Atanasov, 1985
Role of genetic background in somatic embryogenesis in *Medicago*
Plant Cell Tissue Cult. 4: 111-122
6. Bingham E.T., Huley L.V., Kaatz D.M., Saunders J.W., 1975
Breeding alfalfa which regenerates from callus tissue in culture
Crop. Sci. 15:719-721
7. Walker K.A., Wendeln M.L., and Jaworsky E.G. 1979
Organogenesis in callus tissue of *Medicago sativa*. The temporal separation of induction processes from differentiation process
Plant. Sci. Lett. 16:23-30
8. Kao K.N. and Michayluk M.R. 1975
Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at very low population density in liquid media
Planta 126:105-118
9. Walker J.C. and Key J.L. 1982
Isolation of cloned cDNAs to auxin-responsive poly(A)+ RNAs of elongating soybean hypocotyl
PNAS USA 79:7185-7189
10. Ammirato P.V. 1983
Embryogenesis
In "Handbook of Plant Cell Cultures"
Vol.1. pp.82-123. Macmillan Publishing Comp. NY.
11. Saunders J.W., and Bingham E.T., 1975
Growth regulator effects on bud initiation in callus cultures of *Medicago sativa*
Am. J. Bot. 62:850-855
12. Arcioni S., Davey M.R., dos Santos A.V.P., and Cocking E.C. 1982
Somatic embryogenesis in tissues from mesophyll and cell suspension protoplasts of *Medicago coerulea* and *Medicago glutinosa*
Z. Pflanzenphys. 106:105-110
13. Johnson L.B., Stutewille D.L., Higgins R.K., and Skinner D.Z. 1981
Regeneration of alfalfa plants from protoplasts of selected Regen S clones
Plant. Sci. Lett. 20:297-304
14. Chilton M-D., Drummond M.H., Merlo D.J., Sciaky D., Montoya A.L., Gordon M.P. and Nester E.W. 1977
Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis
Cell 11:263-271
15. De Cleene M., and De Ley J. 1982
The host range of crown gall
Bot. Rev. 42: 389-476

16. Cuvier T.C., and Nester E.W. 1976
Evidence for diverse types of large plasmids in tumor inducing strains of *Agrobacterium*
J.Bact. 126:157-165
17. Merlo D.J., and Nester E.W. 1977
Plasmids in avirulent strains of *Agrobacterium*
J.Bact. 129:76-80
18. Chilton M.-D., Saiki R.K., Yadav N., Gordon M.P., and Qetier F. 1980
T-DNA from *Agrobacterium* Ti plasmid is in the nuclear DNA
PNAS USA, 77:4060-4064
19. Drummond M.H., Gordon M.P., Nester E.W., and Chilton M.-D. 1977
Foreign DNA of bacterial plasmid origin is transcribed in crown gall tumors
Nature 269:535-536
20. McPherson J.C., Nester E.W. and Gordon M.P. 1980
Proteins encoded by *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid DNA (T-DNA) in crown gall tumors
PNAS USA, 77:2666-2670
21. Garfinkel D.J., Simpson R.B., Rean L.W., White F.F., Gordon M.P. and Nester E.W. 1981
Genetic analysis of crown gall: fine structure map of the T-DNA by site-directed mutagenesis
Cell 27:143-153
22. Leemans J., Deblaere R., Willmitzer L., DeGreeve H., Hernalsteens J.P., VanMontagu M. and Schell J. 1982
Genetic identification of functions of TL-DNA transcripts in octopine crown galls
EMBO J.1:147-152
23. Joos H., Inze D., Caplan A., Sorman M., VanMontagu M. and Schell J. 1983
Genetic analysis of T-DNA transcripts in nopaline crown gall tumors
Cell 32:1045-1056
24. Yadav H.S., Vanderleyden J., Bennett D.R., Barnes W.M. and Chilton M.-D. 1982
Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti plasmid
PNAS USA, 79:6322-6326
25. Simpson R.B., O'Hara D.J., Krok W., Montoya A.L., Lichtenstein C., Gordon M.P. and Nester E.W. 1982
DNA from the AGS/2 crown gall tumor contains scrambled Ti-plasmid sequences near its junction with plant DNA
Cell 29:1005-1014
26. Zambryski P., Joos H., Genetello C., Leemans J., VanMontagu M. and Schell J. 1983
Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity
EMBO J.2:2143-2150
27. Stachel S.E. and Nester E.W. 1986
The genetic and transcriptional organization of the vir region of the A6 Ti plasmid of AT
EMBO J. 5:1445-1454
28. Stachel S.E., Nester E.W. and Zambryski P.C. 1986
A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens* vir gene expression
PNAS USA, 83:379-383
29. Stachel S.E., Timmerman B. and Zambryski P. 1986
Generation of single stranded T-DNA molecules during the initial stages of T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells
NATURE 322:706-712

30. Braun C.A. 1982
A history of the crown gall problem
in Molecular Biology of Plant Tumors
eds.Kahl G.and Schell J.,Academic Press
31. Kemp J.D. 1982
Enzymes in octopine and nopaline metabolism
in Molecular Biology of Plant Tumors
eds.Kahl G.and Schell J.,Academic Press
32. Lemmers M.,DeBeuckeler M.,Holsters M.,Zambryski
P.,Depicker A.,Hernalsteens J.J.P.,VanMontagu M. and
Schell J. 1980
Internal organization, boundaries and integration of Ti
plasmid DNA in nopaline crown gall tumors
J.Mol.Biol. 144:353-376
33. Bevan M.W.,Flavell R.B. and Chilton M.-D. 1983
A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable
marker for plant cell transformation
Nature 304:184-187
34. Hoeckema A.,Hirsh P.R.,Hoykaas P.J.J. and Schilperoort
R.A. 1983
A binary vector strategy based on separation of vir- and
T-region of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid
Nature 303:
35. Herrera-Estrella L.,Van den Broeck G.,Maenhaut
R.,VanMontagu M.,Schell J.,Timko M. and Cashmore T. 1984
Light-inducible and chloroplast-associated expression of
a chimeric gene introduced into Nicotianatabacum using Ti
plasmid vector
Nature 310:115-120
36. Barton K.A.,Bins A.N.,Matzke A.J.M. and Chilton M.-D.
1983
Regeneration of intact tobacco plants containing full
length copies of genetically engineered T-DNA,
and transmission of T-DNA to F1 progeny
Cell 32 1033-1043
37. Zambryski P. Herrera-Estrella L.,DeBlock M.,VanMontagu M.
and Schell J. 1984
The use of Ti plasmid of Agrobacterium tumefaciens to
study the transfer of foreign DNA into plant cells new
vectors and methods
In Setlov and Holleander eds.Genetic
engineering, Principles and Methodes, Plenum
Press,NY
38. Hain R.,Stabel P., Czernilofsky A.P., Steinbis
H.H.,Herrera-Estrella L. and Schell J. 1983
Uptake, integration expression and genetic transmission
of a selectable chimeric gene by plant protoplasts
M:G:G: 199:161-168
39. Furner J.J.,Huffman G.A.,Amasino R.M.,Garfinkel
D.J.,Gordon M.P. andNester E.W. 1986
An Agrobacterium transformation in the evolution of the
genus Nicotiana
Nature 319:422-427
40. Pedersen H.C.,Christiansen J. and Wyndale R. 1983
Induction and in vitro culture of soybean crown gall
tumors
Plant Cell Rep. 2:201-204
41. Mariotti D.,Davey M.R.,Draper J.,Freeman J.P.and Cocking
E.C. 1984
Crown gall tumorigenesis in the forage legume Medicago
sativa L.
Plant Cell Phys. 25:473-482

42. Webb K.J. 1986
Transformation of forage legumes using *Agrobacterium tumefaciens*
TAG 72:53-58
43. Koncz Cs., Kreuzaler F., Kalman Zs. and Schell J. 1984
A simple method to transfer, integrate and study expression of foreign genes such as chicken ovalbumin and α -actin in plant tumors
EMBO J. 3:1029-1037
44. Murai N., Sutton D., Murray M., Slightom J., Merlo D., Reichert N., Sengupta-Gopalan C., Stock C., Barker R., Kemp J. and Hall T. 1983
Phaseolin gene from bean is expressed after transfer to sunflower via tumor inducing plasmid vectors
Science 222:476-482
45. Sengupta-Gopalan C., Reichert N., Barker R., Hall T. and Kemp J. 1985
Developmental regulation of the bean α -phaseolin gene in tobacco seed
PNAS USA, 82:3320-3324
46. Nagy F., Morelli G., Frayley R.T., Rogers S.G. and Chua N.H. 1985
Photoregulated expression of pea rbc S gene in leaves of transgenic plants
EMBO J. 4:3063-3068
47. Beachy R.N., Chen Z.L., Horsch R.B., Rogers S.G., Hoffman N.J. and Frayley R.T. 1985
Accumulation and assembly of soybean conglycinin in seeds of transformed petunia plants
EMBO J. 4:3047-3053
48. Barta A., Sommergruber K., Thompson D., Horthmuth K., Matzke A.M. and Matzke A.J.M. 1986
The expression of a nopaline synthase-human growth hormone chimeric gene in a transformed tobacco and sunflower tissue
Plant Mol. Biol. 6:347-357
49. Herrera-Estrella L., Depicker A., VanMontagu M. and Schell J. 1983
Expression of chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells
Nature 303:209-219
50. Herrera-Estrella L., DeBlock M., Messens E., Hernalsteens P.J., VanMontagu M. and Schell J. 1983
Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells
EMBO J. 2:987-993
51. Adams T.L. and Quiros C.F. 1985
Somatic hybridization between *Lycopersicon peruvianum* and *Lycopersicon esculentum*: regenerating ability and antibiotic resistance as selection systems
Plant. Sci. 40:209-219
52. Maliga P., Lazar G., Joo F., Nagy A.H. and Menczel L. 1977
Restoration of morphogenic potential in *Nicotiana* by somatic hybridization
MGG 157:291-296
53. Glimelius K. and Bonnett H.T. 1981
Somatic hybridization in *Nicotiana*: restoration of photoautotrophy to an albino mutant with defective plastids
Planta 153:497-503

54. O'Connel M.A. and Hanson M.R. 1985
Somatic hibridization between *Lycopersicon esculentum*
and *Lycopersicon pennelii*
TAG 70:1-12
55. Reish B., Duke S.H. and Bingham E.T. 1981
Selection and characterization of ethionine-resistant
alfalfa (*Medicago sativa*) cell lines
TAG 59:89-94
56. Loschiavo F., Mela L., Ronchi N.R. and Terzi M. 190
Use of HAT system on mutants isolated from cell cultures
of *Medicago sativa*
In Plant Cell Cult. Results and perspectives
pp.127-132 (Sala F., Parisi R., Cella R and
Ciferri O. eds.)
57. Croughan T.P., Stavarek S.J. and Rains D.W. 1978
Selection of a NaCl-tolerant line of cultured alfalfa
cells
Can. J. Bot. 55:1351-1358
58. Donn G., Tischer E., Smith J.A. and Goodman H. 1984
Herbicide-resistant alfalfa cells: an example of gene
amplification in higher plants
Crop. Sci. 18:959-963
59. Oswald T.H., Smith A.E. and Phillips D.V. 1977
Herbicide tolerance developed in cell suspension of
perennial white clover
Can. J. Bot. 55:1351-1358
60. Aviv D. and Galun E. 1977
Isolation of tobacco protoplasts in the presence of
isopropil-N-carbamate and their culture and regeneration
into plants
Z. Pflanzenphys. 83:267-273
61. Miller O.K. and Hughes K.W. 1980
Selection of paraquat-resistant variants of tobacco from
cell culture
In vitro 16:1085-1091
62. Chaleff R.S. 1980
Further characterisation of picloram-tolerant mutants in
Nicotiana tabacum
TAG 58:91-95
63. Thomas B.R. and Pratt D. 1978
Isolation of paraquat tolerant mutants from tomato cell
cultures
TAG 63:167-176
64. Cséplő Á., Medgyessy P., Hideg É., Demeter S., Márton L. and
Maliga P. 1985
Triazine-resistant *Nicotiana* mutants from
photomixotrophic cell cultures
MGG 203:508-510
65. Barg R. and Umiel N. 1977
Development of tobacco seedlings and callus cultures in
the presence of amitrol
Z. Pflanzenphys. 83:437-447
66. Radin D.W. and Carlson D.S. 1978
Herbicide-tolerant tobacco mutants selected in situ and
recovered via regeneration from cell culture
Genet. Res. 32:85-89
67. Bayer E., Gugel K.H., Haegeler K., Hagenmeier H., Jessipov S.,
Koenig W.A. and Zalhner H. 1972
Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen 98.
Mittlung: Phosphinothricin und Phosphinothricyl-Alanyl-
Alanin
Helv. Chim. Acta 55:224--239

68. Leason M., Cunliffe D., Parkin D., Lea P.J and Mifflin B.J. 1981
Inhibition of pea leaf glutamine synthetase by methionine sulfoximine: phosphinotricine and other glutamate analogues
Phytochem. 21:855-857
69. Mifflin B.J. and Lea P.J. 1980
Ammonia assimilation. The biochemistry of plants . vol.5. Aminoacids and derivates. pp.169-202 in Mifflin eds., Academic press, N.Y.
70. Koecher H. 1983
Influence of the light factor on physiological effects of the herbicide Hoe 39866
Aspects of Appl. Biol. 4:227-234
71. Schwerdtle F., Bieringer H. and Finke M. 1981
Hoe 39866 - ein neues nicht selektives blatttherbizid
Z. Pflanzenkrankh Pflanzenschutz):431-440
72. An G., Watson B.D., Stachel S. and Nester E.W. 1985
New cloning vehicles for transformation of higher plants
EMBO J. 4:277-284
73. Uchimiya T. and Murashige M. 1974
Evolution of parameters in the isolation of viable protoplasts from cultured tobacco cells
Plant Phys. 54:936-944
74. Schenk R.U. and Hildebrandt A.C. 1972
Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures
Can. J. Bot. 50:199-204
75. Blaydes D.F. 1966
Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean tissue
Phys. Plant. 19:748-753
76. Gamborg O., Miller R. and Ojima K. 1968
Nutrient requirements of suspension cultures of soybean
Exp. Cell Res. 50:151-158
77. Constabel F. 1985
Fusion of protoplasts by polyethylene glycol (PEG) in cell culture
in Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants pp.414-422. ed Vasil I.K. Vol.1. Academic Press
78. Otten L. and Schilperoort R.A. 1978
A rapid microscale method for the detection of the lysopine and nopaline dehydrogenase activities
BBA 527:497-500
79. Peerbolte R., Krens F.A., Mans R.M.W., Floor M., Hoge Willems J.H.C., G.J. and Schilperoort R.A. 1985
Transformation of plant protoplasts with DNA: cotransformation of non-selected calf thymus carrier DNA and meiotic segregation of transforming DNA sequences
Plant Mol. Biol. 5:235-246
80. Maniatis T., Fritsch E.F. and Sambrook J. 1982
Molecular cloning. A laboratory manual
Cold Spring Harbor Lab.
81. Simon R. 1984
High frequency of mobilization of Gram-negative bacterial replicons by the in vitro constructed Tn-5 Mob transposon
MGG 196:413-420
82. Jorgensen R.A., Rothstein S. and Reznikoff W.S. 1979
A restriction enzyme cleavage map of Tn-5 and location of a region encoding neomycin resistance
MGG 177:65-72

83. Feinberg A.P. and Vogelstein B. 1983
A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity
Anal. Biochem. 132:6-13
84. Nomura K. and Komamine A. 1985
Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at high frequency in a carrot suspension culture
Plant. Phys. 79:988-991
85. Somers D.A., Narayan K.R., Kleihofs A., Cooper-Bland S. and Cocking E.C. 1986
Immunological evidence for transfer of the barley nitrate reductase structural gene to *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion
MGG 204:296-301
86. Uchimiya H., Oghawara T., Kato H., Akiyama T. and Harada H. 1983
Detection of two different nuclear genomes in parasexual hybrids by ribosomal RNA gene analysis 1983
TAG 64:117-118
87. Walker K.A. and Sato S.J. 1981
Morphogenesis in callus tissue of *Medicago sativa*: the role of ammonium ions in somatic embryogenesis
Plant Cell Tissue Organ Cult. 1:109
88. Schimke R. 1984
Gene amplification in cultured animal cells
Cell 37:705-713
89. Shillito R.D., Paszkowski J. and Potrikus I. 1983
Agarose plating and a bead type culture technique enable and stimulate development of protoplast-derived colonies in a number of plant species
Plant Cell Rep. 2:244-247
90. Komart T., Halperin W. and Nester E.W. 1986
Physical and functional map of supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing plasmid pTibo542
J. Bact. 166:88-94
91. Stuart D.A. and Strickland S.G. 1984
Somatic embryogenesis from cultures of *Medicago sativa* L. I. The role of amino acid additions to the regeneration medium
Plant. Sci. Lett. 34:165-174
92. Atanas Atanasov and Brown D. 1984
Plant regeneration from suspension culture and mesophyll protoplasts of *Medicago sativa* L.
Plant Cell Tissue Organ Cult. 3:149-162
93. Dudits D., Maroy E., Praznovszky T. and Fehér A. 1985
Expression of methotrexate in carrot interspecific and intergeneric somatic hybrid
in Somatic embryogenesis, pp.103-108. ed. Terzi M., Pitta L., and Sung Z.R.
94. VanLarebeke N., Genetello C., Schell J., Schilperoort A., Hermans A.K., Hernalsteens P.J., and VanMontagu M. 1975
Acquisition of tumor-inducing ability by non-oncogenic *Agrobacteria* as a result of plasmid transfer
Nature 255:742-743
95. Holsters M., Silva B., VanVliet F., Genetello C., DeBlock M., Dhaese P., Depicker A., Inzé D., Engler G., Villaroel R., VanMontagu M. and Schell J. 1980
The functional organization of nopaline *Agrobacterium tumefaciens* pTiC58
Plasmid 3:212-230

96. Dudits D., Kao K.N., Constabel F. and Gamborg O.L. 1976
Embryogenesis and formation of tetraploid and hexaploid
plants from carrot protoplasts
Can.J.Bot. 54:1063-1067
97. Comai L., Faciotti D., Stalker D.M., Thompson G.A. and Hiatt
W.R. 1985
Expression in plants of a bacterial gene coding for
glyphosate resistance
in Biotechnology in Plant Science pp.329-338.
ed Zaitlin M., Day P., and Hollaender .,
Academic Press, 1985
98. Maliga P. 1984
Isolation and characterisation of mutants in plant cell
culture
Ann.Rev.Plant.Phys. 519-542
99. Matzke M.A., Susani J., Binns A., Lewis E., Rubinstein J. and
Matzke A.J.M.
Transcription of zein gene introduced into sunflower
using a Ti plasmid vector
EMBO J. 3:1525-1531
100. Hanson M.R., Rothenberg M., Boeshore M.C. and Nivison H.T.
1985
Organelle segregation and recombination following
protoplast fusion :analysis of sterile cytoplasm
in Cell Culture and Somatic Cell Genetics of
Plants pp.129-144. ed Vasil I.K. Vol.1.
Academic Press
101. Dudits D. 1983
Fusion of plant protoplasts: recent advances in studies
on regulation of cell cycle and gene expression with
parasexual gene transfer
In Plant Cell and Culture in Crop Improvement
pp.215-226. ed Sen K. and Giles K., Plenum
102. Natali L., Cavallini R., Cremonini R., Bassi P. and Cionini
P.G. 1986
Amplification of nuclear DNA sequences during induced
plant cell differentiation
Cell Differentiation 18:157-161
103. Tomes D.T. and Smith O.S. 1985
The effect of parental genotype on initiation of
embryogenic callus from elite maize (Zea mays) germplasm
T.A.G. 70:505-509