

A cikloheximid rezisztencia, mint differenciált
funkció megnyilvánulásának szabályozása sárgarépában

(*Daucus carota* L.)

Doktori értekezés

Irta:

Lázár Gábor

Magyar Tudományos Akadémia

Szegedi Biológiai Központ

Genetikai Intézet

S z e g e d

1 9 8 0.



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezuton is szeretnék köszönetet mondani Dr. Dudits Dénesnek a munkámhoz nyújtott segítségéért, valamint Dr. Alföldi Lajos igazgatónak, hogy a vezetése alatt álló intézetben lehetővé tette számomra a dolgozat elkészítését.

Köszönettel tartozom még a Növényi Szomatikus Sejtgenetikai Csoport egész kollektívájának az értékes technikai segítségért, és Dusha Bélának a fotóanyag elkészítéséért.



TARTALOMJEGYZÉK

	Oldal
BEVEZETÉS	1.
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3.
1./ Szomatikus hibridszelekció növényi protoplasztok fuziója után	3.
2./ A cikloheximid gátlás hatásmechaniz- musa, cikloheximid rezisztens mutánsok	10.
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	16.
EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE	20.
1./ Cikloheximid rezisztens fenotipusu <i>Daucus carota</i> L. vad répa /WCH/ sejtvonal jellemzése	20.
a/ WCH sejtkulturák ³ H-leucin inkor- porációjának cikloheximid érzé- kenysége	20.
b/ WCH sejtkulturák cikloheximid inaktiváló képessége	22.
c/ A CH rezisztens fenotipus konstitutív expressziója a WCH sejtvonalban	26.
d/ Korreláció a CH rezisztencia és differenciáció között	27.
2./ Szomatikus hibridnövények szelekciója és a cikloheximid rezisztens fenotipus analizise a hibridekben	33.
a/ Cikloheximid szenzitív szülő kivá- lasztása, szelekciós markerek	33.

	Oldal
b/ Protoplaszt fuzió, hibridszelekció	37.
c/ Direkt szelekció	47.
d/ A CH rezisztens jelleg analizise a hibridekben	48.
e/ A 25-12-es hibrid sejtvonala instabilitása spontán szomatikus szegregáció	51.
MEGVITATÁS	54.
ÖSSZEFOGLALÁS	61.
IRODALOMJEGYZÉK	63.

BEVEZETÉS

A protoplaszt technika által nyújtott lehetőségeknek a növényi sejt és szövettenyésztés módszereivel való kombinálása új lehetőségeket nyitott a növényi sejtbiológia területén.

Egyik legperspektivikusabb kutatási terület a sejtgenetikai és szövettenyésztési technikák minden eszközét felhasználó növényi szomatikus sejtgenetika. A protoplaszt fúzióval előállított hibridsejtekből fertilis hibridnövények regenerálásának lehetősége a genetikai variabilitás növelésének gyakorlati szempontból is fontos új irányát nyitotta meg. A szomatikus hibridizáció egyedülálló módszer a citoplazmás öröklődés mechanizmusának kutatására, a sejtmag - citoplazma interakciók és génregulációs kérdések vizsgálatára.

Az eltérő információt hordozó sejtmagok, illetve citoplazmák egyetlen sejtbe kerülése a genetikai szabályozás új kérdéseit vetik fel. Működnek olyan funkciók, differenciálódási programok megnyilvánulá-

sának tanulmányozására, amelyek a klasszikus módszerekkel nem végezhetők el. Jelenlegi ismereteink a magasabbrendű növényi sejtek differenciált funkcióinak regulációjáról meglehetősen korlátozottak. A rendelkezésre álló információk elsősorban a növényi hormonok differenciációt kontrolláló hatásával kapcsolatos.

Dolgozatunkban egy a sárgarépa sejtekben megnyilvánuló differenciált funkció, a cikloheximid rezisztencia jellemzésével kapcsolatos eredményeinket foglaltuk össze. E differenciáció függő funkcióban különböző sejtvonalak szomatikus hibridizációval végzett analízise lehetőséget nyújtott a cikloheximid rezisztens jelleg specifikus regulációjának tanulmányozására is.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1. Szomatikus hibridszelekció növényi protoplasztok fúziója után

A biokémiai, genetikai markerek korlátozott száma mindezideig a leglimitálóbb tényezője a sikeres hibridszelekciónak magasabbrendű növények sejtjeinek fúzióját követően. A bakteriális /Gábor és mtsai, 1978; Hopwood és mtsai, 1978/, a gomba /Ferenczy, 1976; Peberdy, 1979/, valamint az emlős /Littlefield, 1964; Chu, 1974/ sejtgenetikában használatos indukált metabolikus mutánsok komplementációján alapuló szelekciós rendszerekhez hasonló, általánosan alkalmazható eljárások magasabbrendű növényekre még nincsenek kidolgozva. Így az eddig alkalmazott szelekciós rendszerek zöme a megfelelő szexuális hibrid viselkedésének ismeretén /Carlson és mtsai, 1972; Smith és mtsai, 1976/, a viszonylag gyakori klorofill deficiens mutánsok komplementációján alapult /Melchers és mtsai, 1974; Schieder, 1977; 1978; 1979; Cocking és mtsai, 1977; Dudits és mtsai, 1977; 1978; 1979; Power és mtsai, 1979/, illetve a fajok közti természetes metabolikus különbségeket használta ki /Power és mtsai, 1976; 1977/.

A fúziós termékek mechanikai izolálása, mikropipettával illetve mikromanipulátorral való kiemelése elsősorban technikai megoldást jelent /Kao, 1977; Gleba és mtsai, 1978/. Az izolálás a fúziós termékek azonosítására alkalmas vizuális markereket igényel, ezért fúziós partnerként elsősorban tenyésztett sejtekből és levél mezofillumból származó protoplasztok jöhetnek számításba. A heteroplazmás sejtek a vakuolizáltság, a kloroplasztok és amiloplasztok jelenléte alapján azonosíthatók és kiemelhetők. A módszer általános alkalmazhatóságának legnagyobb korlátja, hogy az eddig ismert médiumok csak néhány sejtvo-
nal esetében alkalmasak individuális sejtek tenyésztésére.

Ivaros keresztezésből ismertek tumorképző dohány fajhibridek, amelyek kalluszsövetei hormon autotrofiával rendelkeznek. Ez adta az ötletet az első sikeres hibridszelekcióhoz. Carlson és munkatársai /1972/ két szexuálisan is keresztezhető dohányfaj, a *Nicotiana glauca* és *Nicotiana langsdorffii* levél mezofill protoplasztjainak fúziója után az amfidiploid növény ismert tumoros jellegét kihasználva hormonmentes médiumon szelektáltak az auxin autotrof hibridre. A sok vitát kiváltott Carlson kísérlet sikeres megismétlése Smith és munkatársai /1976/ nevéhez fűződik, akik a Kao és munkatársai /1974/ által

kidolgozott nagy hatékonyságu PEG fuziók kezelését követően az előbb leírt módon 23 szomatikus hibridnővényt szelektáltak.

Sokkal általánosabb a levélszint érintő mutációkra alapozott szelekciós rendszerek alkalmazhatósága. A klorofill, karotenoid mutánsok viszonylag könnyen előállíthatók, jól felismerhetők, sok közülük már jól jellemzett, protoplasztfuziók munkára alkalmas sejtvonal /Melchers és mtsai, 1974; Gleba, 1978/. Problémát jelent viszont, hogy a zöldülésre történő szelekció legfeljebb kalluszon, általában csak növény szinten érhető el és nincs mód szelekciós nyomás alkalmazására.

Melchers és Labib /1974/ nem allélikus gének közti komplementáció elve alapján szelektált két haploid, klorofill deficiens, fényérzékeny *Nicotiana tabacum* levél mezofill protoplasztjainak fuziója után interspecifikus hibridnővényeket. A normális, zöld levélszinű szomatikus hibrideket a 4-5 hetes kalluszos magas fényintenzitáson /3000-6000 Lux/ való tenyésztésével szelektálták ki. A módszer hatékonynak bizonyult a *Nicotiana glauca* x *Nicotiana glauca* klorofill deficiens, fény szenzitív mutánsai interspecifikus hibridjeinek szelekciójában is /Melchers, 1977/.

Schieder /1977/ *Datura innoxia* intraspecifikus szomatikus hibridnővényt eredményező kísérlete is két különböző klorofill deficiens mutáns komplementációján alapult.

Az előzőektől némileg eltérő, de szintén klorofill deficiens mutánsokra épített szelekciós rendszert fejlesztett ki Gleba és munkatársai, /1975/. Kísérletükben a *Nicotiana tabacum* két különböző változatát használták; egy albino plasztom mutánst és egy sárgászöld homozigóta szemidomináns nukleáris mutánst. A rendszer figyelemre-méltó sajátága az, hogy ha a komplementáció megtörténik, nemcsak a nukleáris fuzióból származó paraszexuális hibrideket lehet azonosítani, hanem azokat a heterokarion eredetű citoplazmahibrideket is, amelyekben magfuzió nem jött létre, és az egyik mag eliminálódott.

Albino komplementáción alapuló szelekció azonban alkalmazható olyan esetben is, ahol csak az egyik szülő klorofill deficiens, míg a partnerként választott levél mezofill protoplasztok önmagukban nem képesek osztódni. Így a fuzió után szelektált zöld kalluszok nagy valószínűséggel csak a komplementáció eredményéből származó hibridek lehetnek. Ezzel a módszerrel szelektáltak Cocking és munkatársai /1977/ albino *Petunia hybrida* x *Petunia parodii*, Power és munkatársai /1979/ albino *Petunia inflata* x *Petunia parodii*, Schieder /1978/ klorofill deficiens *Datura innoxia* x *Datura stramonium*, valamint *Datura discolor* illetve klorofill deficiens *Datura innoxia* x *Atropa belladonna* /Schieder, 1979/ protoplasztfuziót követően szomatikus hibrideket.

Dudits és munkatársai /1977/ albino *Daucus carota* és normál, zöld *Daucus capillifolius* sejtszuszpenzió

eredetű protoplasztok fuziója után első alkalommal szelektáltak nem *Solanaceae* családhoz tartozó szomatikus hibridnövényeket. Az első nem közel rokon fajok közötti, intergenerikus fuzióból származó hibridnövényeket is az albino komplementáció elve alapján szelektálták ki Dudits és munkatársai /1978, 1979/ albino *Daucus carota* x *Aegopodium podagraria*, valamint albino *Daucus carota* x *Petroselinum hortense* levél mezofill protoplasztok fuziója után.

Az albino x levél mezofill protoplaszt típusu fuziók kombinációkban előfordulhat, hogy a mezofill protoplasztok is képesek osztódni - ami jelentősen zavarja a hibridazonosítást - így szelektálni kell ellenük. Maliga és munkatársai /1977/ *Nicotiana sylvestris* (KR 103) sejtszuszpenzió eredetű, kanamicin rezisztens, hajtás redifferenciációra defektív és *Nicotiana knightiana* hajtás redifferenciációra nem indukálható levél mezofill eredetű protoplasztjainak fuziók rendszerében a hibridszelekció a *Nicotiana knightiana* osztódását gátló auxinmentes magas citokininkoncentrációju RMB médiumon a pigmentáltság alapján történt. A zöld kolóniák közül a hibrideket egy következő lépésben, kanamicin rezisztencia alapján azonosították. A plazmon marker kanamicin rezisztencia szegregációja azonban lényegesen csökkentette a szelekció hatékonyságát. Az albino *Nicotiana*

tabacum és a zöld *Nicotiana knightiana* szomatikus hibridjét is hasonló módon, az RMB táptalajon mutatott növekedéskülönbség, pigmentáltság és hajtásorganizáció alapján szelektálták /Maliga és mtsai, 1978/, és az előbb leírt dohány szomatikus hibridhez hasonló, nagymértékű szegregációt tapasztaltak.

Az eltérő metabolikus képességekben megnyilvánuló természetes differenciák, amelyek különböző anti-metabolitokkal szembeni rezisztenciában jutnak kifejezésre új szelekciós rendszerek kiépítésére adtak lehetőséget. Power és munkatársai /1976/ szelekciós rendszere a *Petunia hybrida* x *Petunia parodii* fúziós kombinációban a *Petunia parodii* aktinomicin D-vel szembeni természetes rezisztenciáján és a protoplasztok növekedési képességének MS táptalajon mutatkozó különbségén alapult. A mindkét szülő ellen irányuló egyidejű szelekció - az aktinomicin-D-t tartalmazó MS táptalajon történő tenyésztés - után szelektált kalluszokból növényeket regeneráltak. A morfológiai bélyegek, izoenzim mintázat és a kromoszómaszám egyaránt a növények hibrid voltát bizonyították. Az F_1 szexuális hibrid 2,4-D toleráló képességének ismeretében, a táptalaj hormon-összetételének megváltoztatásával, több mint egy nagyságrenddel növelhető volt a szelekció hatékonysága /Power és mtsai, 1977/.

A magasabbrendű növények protoplaszt fúzióval történő genetikai manipulációjának nagy lehetőségét elsősorban az egymással nem keresztezhető fajok által hordozott genomok, kromoszómák, gének fúziós transzferének megoldása és a hibridkalluszok növényé váló regenerálása jelentené. Egy ilyen fúziós program számos új sejtgenetikai probléma vizsgálatát is lehetővé tenné /génexpresszió, kromoszómaelimináció, genomok közti rekombináció, génkonverzió, stb./, amely azonban jól jellemzett genetikai, biokémiai markerekkel bíró sejtvonalakat igényel. Ezeknek az igényeknek mindezekig csupán Glimelius és munkatársai /1978/ *Nicotiana tabacum* klorát rezisztens, nitrát reduktáz deficiens /Mendel és mtsai, 1978/ mutánsainak sejthibridizációs kísérlete felelt meg. A NO_3^- -on mint egyedüli nitrogénforráson szelektált hibridek, a komplementáló mutánsok recesszív genetikai karaktere mellett azt is bizonyították, hogy a mutáció különböző lokuszokba lokalizálható. A kísérlet első ízben demonstrálta, hogy a protoplasztfúzió alkalmas módszer magasabbrendű növények genetikai analizisére. White és munkatársai /1979/ 5-metiltriptofán és S-2-aminoetilcisztein rezisztens sejtvonalakra alapozott fúziós rendszerében, bár az aminosavanalóg rezisztenciák domináns markerként viselkedve megengedték kettős rezisztens szomatikus sejthibridek szelekcióját, a szülői sejtvonalak biokémiai jellemzésének abszolút hiánya jelentősen megnehezíti a kísérlet értékelését.

2. A cikloheximid gátlás hatásmechanizmusa, cikloheximid rezisztens mutánsok

A cikloheximid /actidione/ a *Streptomyces griseus* által termelt /Whiffen és mtsai, 1946/ nagy antifungális aktivitású antibiotikum. Izolálását és tisztítását Ford és Leach /1948/, kémiai szerkezetét Kornfeld és munkatársai /1949/ irták le.

A cikloheximid /CH/ különböző eukarióta sejtekben proteinszintézis inhibitor /Pestka, 1971/; specifikusan a citoplazmikus 80S riboszomákon folyó proteinszintézist gátolja, de hatástalan a 70S riboszomákon folyó mitokondriális /Pestka, 1971; Yang és mtsai, 1977/, valamint a kloroplaszt /Criddle és mtsai, 1970/ protein szintézissel szemben.

Pontos hatásmechanizmusa még nem teljesen tisztázott. Ellentmondó bizonyítékok léteznek arra nézve, hogy az elsődleges gátlás a proteinszintézis iniciációs /Lin és mtsai, 1966; Cooper és mtsai, 1976/ elongációs /Trakatellis és mtsai, 1965; Kisilevsky, 1972/, illetve terminációs /Rajalakshmi és mtsai, 1971/ lépését érinti.

Oleinick /1977/ kínai hörcsög sejteken kimutatta, hogy az összes energiafüggő transzlációs lépés érzékeny CH-re és a drognak a transzláció különböző lépéseire kifejtett hatása koncentrációfüggő. Az alacsony

koncentráció tartományban 10^{-9} - 10^{-7} M, a CH preferenciálisan az iniciációt, 10^{-7} - 10^{-5} M koncentráció tartományban a terminációt, míg a tesztelt legnagyobb koncentrációban 10^{-3} M, a peptidszintézis minden egyes lépését egyenlően gátolta. Mivel a fehérjeszintézis minden lépése GTP igényes, valószínű, hogy a CH a GTP kötődésével illetve hidrolizisével interferálhat Rajalakshmi és mtsai, 1971/.

Számos CH rezisztens mutánszt izoláltak már, első-sorban az alacsonyabbrendű eukarioták köréből:

Saccharomyces cerevisiae /Middlekauf és mtsai, 1957; Wilkie és Lee, 1965/, *Neurospora crassa* /Howe és Terry, 1962; Neuhauser és mtsai, 1970/, *Physarum polycephalum* /Haugli és mtsai, 1972/, *Aspergillus nidulans* /Warr és Roper, 1965/, *Tetrahymena pyriformis* /Roberts és Orias, 1973/ és *Dictiostelium discoideum* /Katz és Sussman, 1972/.

A CH ismert proteinszintézisgátló hatása alapján valószínűnek látszott, hogy a rezisztencia riboszomához kötött tulajdonság. Először Siegel és Sisler /1965/ demonstrálták, hogy a rezisztencia riboszomához kötődik, kihasználva, hogy az egyik élesztőfaj a *Kluyveromyces fragilis* 1000 γ /ml CH-del szemben is rezisztens, míg a *Saccharomyces pastorianus*t már a 0,17 γ /ml is teljesen gátolta. A két törzsből preparált különböző riboszoma és szupernatans frakciókat egy poly-U sejtmentes proteinszintetizáló rendszerben



használva kimutatták, hogy a rezisztencia nem a szupernatans frakcióhoz, hanem a riboszomához kötött jelleg. Rao és Grollmann /1967/ a *Kluyveromyces fragilis*ben a rezisztenciát a 60S riboszomális al-egységre lokalizálták. *Saccharomyces cerevisiae* CH rezisztens mutánsokon végzett kísérletek hasonló eredményre vezettek /Cooper és mtsai, 1967; Jimenez és mtsai, 1972/. Megváltozott CH szenzitivitásu riboszomákkal rendelkező mutánsokat *Neurospora*ból /Pongratz és mtsai, 1973/, *Physarum*ból /Haugli és mtsai, 1972/ és kínai hörcsög sejtttenyészetből /Poche és mtsai, 1975/ is leírtak már.

Schizosaccharomyces pombe spontán, illetve indukált CH rezisztens mutánsainak genetikai analizise során 4, a rezisztenciáért felelős lókuszt azonosítottak /Ibrahim és mtsai, 1976/. A cyh-1 és cyh-4 allélek recesszívnek bizonyultak a vad tipussal szemben diploid dominancia tesztben, míg a cyh-2 és cyh-3 allélek szemidominánsként viselkedtek. Más rendszerekkel való összehasonlítás alapján az első csoportban /cyh-1, cyh-4/ a rezisztenciát a riboszoma megváltozásának tulajdonították. Sejtmentes proteinszintetizáló rendszeren végzett kísérletek ugyanis azt bizonyították, hogy egy mutáns és vad allélt hordozó, rezisztens és szenzitív riboszomákat tartalmazó heterozigóta diploid sejt a droggal szemben fenotipusosan szenzitív /Cooper és mtsai, 1967/. Mivel a

CH nem gátolja meg a poliszómák képződését /Williamson és Schweet, 1965/ de megakadályozza a riboszómák mozgását az m-RNS-en /Wettstein és mtsai, 1964/, így a drog jelenlétében a kevert poliszómák egy nem-funkcionáló rendszert alkotnak, mert a rezisztens riboszómákat az m-RNS-re "ráfagyott" szenzitívek leblokkolják. A cyh-1 alléleket hordozó törzsek 80S riboszomális proteinjeinek kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézisével később sikerült egy a 60S alegységbe lokalizálható megváltozott mobilitású proteint szeparálni /Coddington és mtsai, 1977/, amelynek molekulásúlya a vad típusú protein 22000 daltonnal szemben 25000 dalton volt. A cyh-1 allélt hordozó mindegyik törzsben /4/ a 66-os riboszomális protein molsúlya 3000 daltonnal haladta meg a vad típusú proteinét. A szerzők azt valószínűsítették, hogy a cyh-1 gén nem a megváltozott 66-os riboszomális proteint kódolja, hanem egy specifikus modifikáló, illetve processing enzimet, azaz a 66-os fehérje egy végső működő formája egy eredetileg nagyobb proteinnek, amelyet specifikusan a cyh-1 gén által kódolt, pl. "endopeptidáz" hasít az érés során. A hipotézis szerint a cyh-1 gén mutációja a specificitását elvesztő megváltozott enzim-formát eredményez, és így a 66-os protein riboszómába beépülő nem módosított, hosszabb formája felelős a CH rezisztenciáért.

A cyh-2 és cyh-3 allélekhez hasonló, a vad típussal szemben diploid dominancia tesztben szemidominánsként viselkedő három, CH rezisztenciáért felelős lókuszt írt

le Wilkie és Lee /1965/ *Saccharomyces cerevisiae*ban. A sejtmentes proteinszintetizáló rendszeren végzett analízis /Cooper és mtsai, 1967/ kimutatta, hogy a rezisztenciáért nem a riboszóma megváltozása felelős. Mivel ezekben a mutánsokban a membrán a CH-re nézve szabadon permeabilis volt, feltételezték, hogy a drognak egy redukált biológiai aktivitású származékká való átalakítása a rezisztencia alapja.

Campbell és Birt /1975/ *Lucilla cuprin*ában a CH gyors detoxifikációját mutatta ki.

Virágos növények sejtszuszpenziókultúráiból, az eddig meglehetősen korlátozott számban szelektált CH toleráns sejtvonalakban is a rezisztencia a drog inaktivációján alapult /Maliga és mtsai, 1976; Gresshoff, 1979/. A rezisztencia azonban mind a *Nicotiana tabacum*, mind a *Daucus carota* sejtvonalak esetében átmenetinek bizonyult; a szelektív körülmények között mutatott rezisztens fenotípus drogmentes médiumon már egy tenyésztési ciklus után elveszett. A "rezisztenciát" kallusz kultúrákban normális körülmények között nem expresszáldó gén vagy gének aktivációjának tulajdonították /Maliga és mtsai, 1976/.

A különböző növényfajokból származó sejtkultúrák jelentős mértékben különböznek CH-del szemben mutatott érzékenységükben /Gresshoff, 1979/. Figyelemreméltó a pillangósvirágok sejtszuszpenzióinak természetes, nagyfokú CH rezisztenciája: a *Trifolium*

repens 100 γ /ml, a *Glycine max.* 200 γ /ml CH-del szemben is rezisztensnek bizonyult, míg pl. az azonos körülmények között tenyésztett *Nicotiana tabacum* kolóniaképző képességét az 1 γ /ml CH már teljesen gátolta. A pillangósvirágok sejtszuszpenzióiban detektálható természetes CH rezisztencia okának vizsgálatáról azonban mindezekig nincsen adat.

A magasabbrendű növények körében, az irodalomban eddig ismert egyetlen stabil CH rezisztens fenotípusu sejtvonalat Sung /1976/ izolálta *Daucus carota* L. vad répából EMS, illetve MNNG mutagénkezelést követően. A 10^{-8} gyakorisággal előforduló spontán rezisztensek számát mutagénkezeléssel két nagyságrenddel növelni lehetett. A 10 γ /ml cikloheximiddel szemben rezisztens, izolált kolóniák nem-szelektív feltételek között való több hetes tenyésztés után ujratestelve változatlan rezisztenciát mutattak. A rezisztens sejtvonalak izolálásának körülményei és a rezisztens fenotípus stabilitása az epigenetikus változással szemben /Maliga és mtsai, 1976; Gresshoff, 1979/ mutációs változást valószínűsítene.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtvonalak :

A₁ albino sárgarépa sejtvonal, a *Daucus carota* ssp. *Nantesi* sárgarépából EMS kezeléssel előállított degenerált növényfejlődést mutató nukleáris albino mutáns /Dudits és mtsai, 1977; 1979/.

WCH (*Daucus carota* L.) cikloheximid rezisztens fenotípusu, degenerált növényfejlődést mutató vad répa sejtvonal /Sung, 1976/.

A *Daucus carota* ssp. *Nantesi* répa sejtvonal a laboratóriumban sterilen csiráztatott növénykék hajtás eredetű kalluszainak felhasználásával indított sejtszuszpenzió-kultúra.

A *Daucus carota* L. WOOLC vad répa sejtvonal, a Berkeley Egyetem Genetikai Intézetében előállított /Sung, 1976/ sejtkulturában fenntartott tenyészet.

A sejtszuszpenzió-kulturákat 0,5 mg/l 2,4-D jelenlétében, B₅ vitaminokkal kiegészített Murashige - Skoog /MS/ médiumon /Sung, 1976/ tartottuk fenn. A növényregenerációs kísérletekben a sejteket hormonmentes MS médiumon tenyésztettük.

A tenyészetek ^3H -leucin inkorporációjának mérésekor a logaritmikus növekedési fázisban lévő sejtsuszpenzió-kultúrákhoz $5\ \mu\text{Ci/ml}$ ^3H -leucint adtunk. Az inkorporációt a mintával egyenlő térfogatú jéghideg 10 %-os TCA hozzáadásával állítottuk le. A homogenizálás után a mintákat $10^{-4}\ \text{M}$ leucint tartalmazó 5 %-os TCA oldattal Whatmann GF/C filterre mostuk, szárítottuk, majd toluolos scintillációs koktéliban Packard Tri Carb liquid szcintillációs számlálóval mértük a TCA precipitátum aktivitását.

A növekedési görbék felvételéhez a szárazsúlyokat, Miracloth filteren súlyállandóságig szárított 60°C , 12 óra/ három párhuzamos minta átlagaként adtuk meg.

A szenzitív sejtek felhasználására alapozott CH inaktivációs tesztet Gresshoff /1979/ szerint végeztük el.

Az agargéldiffúziós tesztben *Saccharomyces cerevisiae* GRF 18 törzsének YPDP táptalajon fenntartott 48 órás tenyészeit használtuk. A 185 mm átmérőjű Petri csészébe 100 ml 2 % agarral szilárdított YPDP médiumot öntöttünk, majd a *Saccharomyces* szuszpenzióval végzett masszív oltást követően az agarba 7 mm átmérőjű lukakat vágunk. A 0,1 ml térfogatban bevitt minták gátlóhatását 48 órás 30°C -on történő inkubálás után a gátlási udvar átmérője alapján értékeltük.

A sejtszuszpénzió kulturából és a levélanyagból Dudits és munkatársai /1979/ módszere alapján izoláltuk a protoplasztokat. A WCH sejtkulturából származó protoplasztok inaktiválását Nehls /1978/ szerint 30 mM jódacetamiddal 30 percig végeztük, 5×10^5 ml protoplaszt-denzitás mellett. A levél protoplaszt preparáláshoz steril körülmények közt fenntartott WCH sejtszuszpénzióból származó növénykéket használtunk. A növények degenerált fejlődése miatt a leveleket nem lehetett biztonságosan izolálni a hajtástól, így a levélprotoplaszt populáció hajtás eredetű protoplasztokkal "szennyezett".

A fuziót 1:1 arányban összekevert 2×10^6 denzitású protoplaszt szuszpenzió polyetilén glikol /PEG/ kezelésével indukáltuk Kao /1974/ szerint. A szülői kontroll kulturákat azonos módon kezeltük. Nem PEG kezelt kevert protoplaszt populációt tartalmazó kontrollokat minden fuziós kísérletben beállítottunk.

A protoplasztokat plastik Petri csészékben, az MS médiumból az alábbi kiegészítéssel ellátott /mg/l/, MS/VI médiumon tenyésztettük: élesztőkivonat, 200; L-glicin, 10; L-glutamin, 100; L-triptofán, 10; L-cisztein, 10; L-metionin, 10; kolin, 10; kókusztej, 100 ml; sejtszuszpénzió eredetű kondicionált médium, 100 ml; glükóz, 0,38 M; NAA, 0,18 mg/l; 2,4-D, 0,55 mg/l; és zeatin 0,11 mg/l.

A fuzió kezelés után két héttel a tenyészeteket a sejttenyésztéshez használt MS médiummal fokozatosan kihigitottuk. Az egy hónapos tenyészeteket két részre osztottuk: egyik részét 0,5 mg/l 2,4-D-t tartalmazó MS táptalajra szélesztettük, a populáció másik feléből pedig növényregenerációt indukáltunk. A regenerált kis embriókat Erlenmeyer lombikokban egy hónapos átoltásokkal tenyésztettük 1500 Lux megvilágítás mellett, 16/8 órás fotóperiódussal.

A citológiai analízist sejtszuszpenzió kultúrából származó mintákon Dudits és munkatársai /1979/ módszere szerint végeztük.

EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE

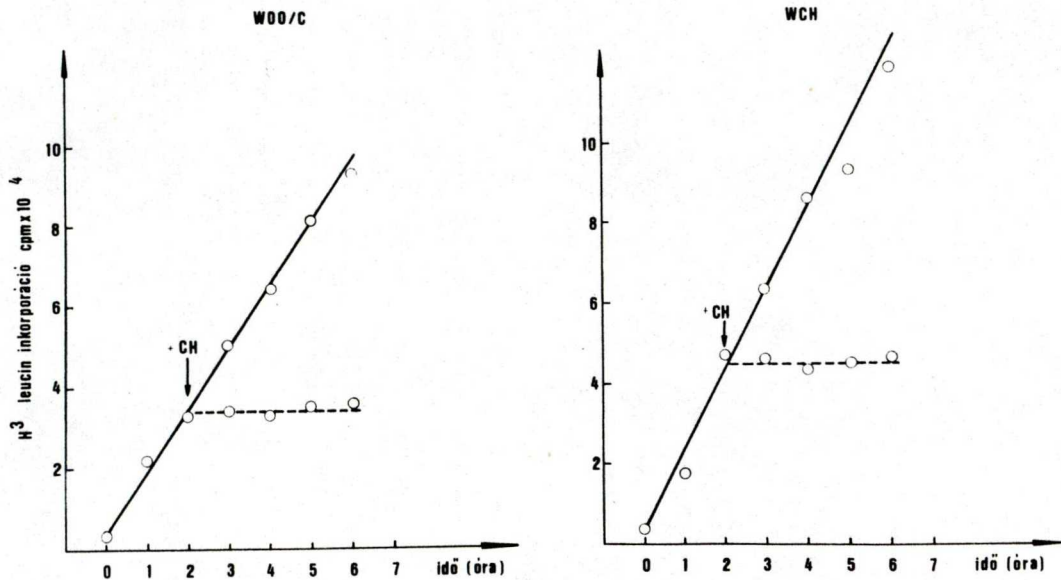
1. Cikloheximid rezisztens fenotipusu *Daucus carota* L. vad répa /WCH/ sejtvonala jellemzése

1./a. WCH sejt kultúrák ^3H -leucin inkorporációjának cikloheximid érzékenysége

Annak eldöntése céljából, hogy a CH rezisztens fenotípus a citoplazmikus 80S riboszómákon folyó proteinszintetizáló rendszerben bekövetkezett változásnak tulajdonítható-e, összehasonlítottuk a CH szenzitív szülői WOOLC és a rezisztens WCH sejt vonal sejt szuszpenzió kultúrái ^3H -leucin inkorporációjának CH érzékenységét.

A kísérletben az alaptáptalajon nem szelektív körülmények között fenntartott WOOLC és WCH sejt kultúrákat, valamint 10 γ /ml CH jelenlétében tenyésztett WCH sejt szuszpenziót használtunk.

A nem szelektív körülmények között előtenyésztett szenzitív és rezisztens sejt vonal ^3H -leucin inkorporációjának CH érzékenysége teljes megegyezést mutatott /lásd: 1. ábra/.



1 ábra WOOLC és WCH vad répa sejt kultúrák ^3H -leucin inkorporációjának cikloheximid érzékenysége

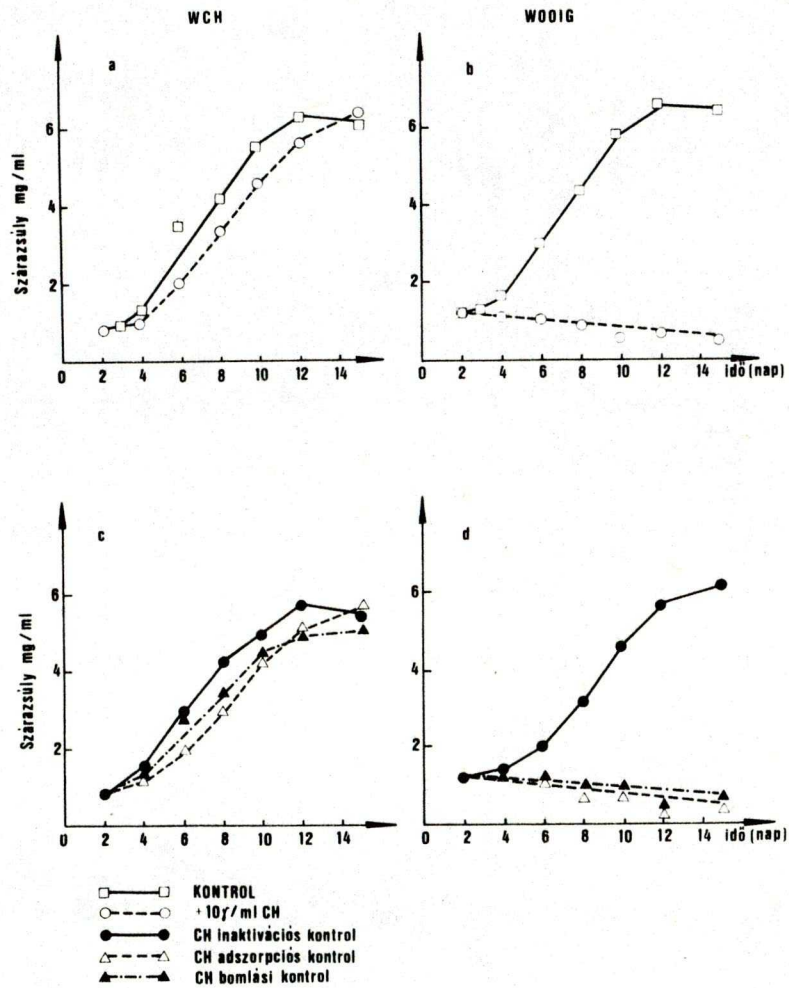
10 γ /ml CH hozzáadása után /2. óra/, mind a WOOLC, mind a WCH sejt kultúrák ^3H -leucin inkorporációjában azonnali gátlást kaptunk, míg a kontroll tenyészetekben folyamatos növekedést detektáltunk. A 10 γ /ml CH jelenlétében, szelektív körülmények között előtenyésztett WCH sejt vonal ^3H -leucin inkorporációjának CH érzékenysége is megegyezett a WOOLC sejt vonaléval.

1./b. WCH sejtkulturák cikloheximid inaktiváló
képessége

Az azonos induló denzitásu / ~ 1 mg/ml/ rezisztens /2.a ábra/ és szenzitív /2.b ábra/ sejtkulturák szárazsulynövekedés alapján felvett növekedési görbéinek lefutása nem szelektív körülmények között jó megegyezést mutatott, 10γ /ml CH jelenlétében viszont már lényeges különbség volt kimutatható. A WOOLC sejtszuspenzióban CH jelenlétében teljes növekedésgátlást kaptunk. A WCH sejtkulturák ezzel szemben, a 10γ /ml CH tartalmu médiumba való inokulálás után, egy két napos log. fázist követően a nem szelektív feltételek között tenyésztett kontroll WCH sejtkulturával közel megegyező ütemű növekedést mutattak.

Az induló sejtdenzitástól függően eltérő kezdeti 1-3 napos stagnálás után meginduló, a kontroll tenyésztettel megegyező ütemű növekedés azt valószínűsíti, hogy a drog inaktivációja felelős a rezisztenciáért.

Ennek eldöntése céljából 10γ /ml CH-et tartalmazó a log. növekedési fázis végéig benövesztett WCH sejtkulturák szűrt felüluszó médiumába szenzitív /2.d ábra/ és rezisztens /2.c ábra/ sejteket inokuláltunk. A WOOLC szenzitív sejtpopulációnak a rezisztens sejtkulturával megegyező növekedési üteme arra utalt, hogy a médium már nem tartalmazott gátló koncentrációju CH-et. /Megelőző kísérletekben a 2γ /ml CH már teljesen gátolta a szenzitív sejtpopuláció növekedését./



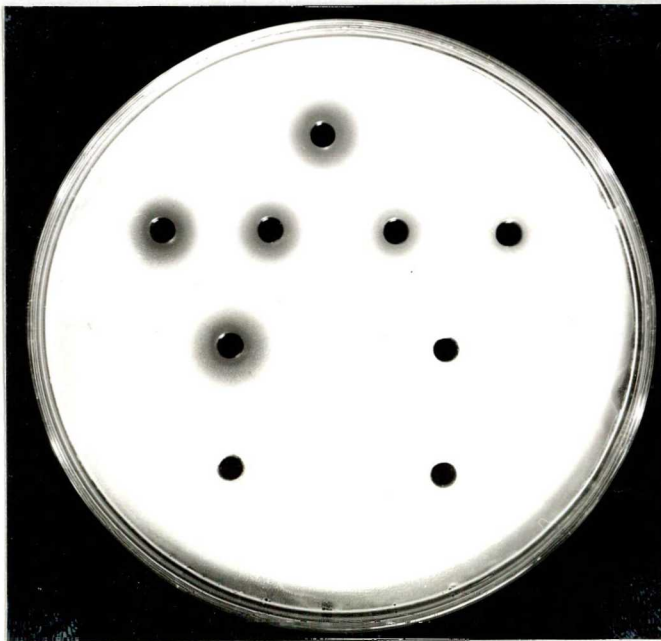
2. ábra WCH és WOOLC sejtszuspenzió kulturák növekedésének cikloheximid érzékenysége
Cikloheximid inaktivációs teszt

Két további kontroll beállításával kizártuk annak a lehetőségét, hogy a CH bomlása, illetve a drognak a rezisztens sejtekre való adszorpciója a felüluszó médiumban kapott növekedésképeség alapja. Az adszorpciós kontrollban 10 γ /ml CH tartalmu médiumban 10 napig tenyésztett WOOLC szenzitív sejtpopulációban kapott növekedésgátlás /lásd: 2.d ábra/ gátló koncentrációju CH jelenlétére utalt. Egy 10 γ /ml CH-et tartalmazó 10 napos, öreg médium a szenzitív WOOLC sejtkulturákra szintén növekedésgátló hatásnak bizonyult, kizárva, hogy a CH-nek a médiumban való kémiai lebomlása a WCH sejtkulturák felüluszójában mért növekedés alapja.

Nem zárható ki azonban annak valószínűsége sem, hogy a rezisztens sejtek a CH-et a proteinszintetizáló rendszerüktől jól elkülönülő kompartmentben halmozzák fel, és így nem a drog inaktivációja, hanem speciális akkumulációja felelős a WCH sejtkulturák rezisztens fenotípusáért. A kérdés CH jelenlétében tenyésztett WCH sejtekből nyert kivonat növekedésgátló hatásának tesztelésével egyértelműen eldönthető. Az egzaktabb kiértékelés céljából a minták CH koncentrációjának mérését a növényi növekedési tesztnél egy nagyságrenddel érzékenyebb *Saccharomyces cerevisiae* agargéldiffúziós tesztel végeztük.

Az első képen 10 γ /ml CH jelenlétében log. fázis közepéig tenyésztett /4. nap/ WCH és az azonos

körülmények közt fenntartott WOOLC sejtkulturák felül-
uszó médiumának, valamint a megfelelő sejttöledékből
kloroformos extrahálás után nyert kivonatok növekedés-
gátló hatását mutatjuk be.



CH konc. sor / γ /ml /		
1		
0,75	0,5	0,25 0,1
WOOLC	felüluszó médium	sejt- extraktum
WCH	felüluszó médium	sejt- extraktum

1. kép WCH sejtszuszpenzió CH inaktiváló képességé-
nek agargéldiffúziós tesztje

Gátlási zónát egyedül a WOOLC sejtkultura felül-
uszójából származó minta esetén kaptunk, ahol a gát-
lási udvar átmérője alapján a médiumba bevitt 10 γ /ml
CH négy napos tenyésztés után is hiánytalanul vissza-
mérhető volt. Sem a WOOLC sejtextraktumból, sem a WCH
sejtkivonatból és kultura felüluszóból származó min-
táknál gátlást nem tapasztaltunk, ami azt bizonyítja,

hogy a minták CH tartalma a 0,1 γ /ml kimutathatósági szint alatt volt.

A WCH sejtpopuláció CH rezisztenciája tehát a drog inaktivációjának tulajdonítható.

1./c. A CH rezisztens fenotípus konstitutív expressziója a WCH sejtvonalban

A WCH sejtvonalban a CH nemcsak a de novo proteinszintézis inhibitora, hanem egyidejűleg az inaktiváló enzim/ek/ szubsztrátja is.

Egy több mint egy évig nem szelektív körülmények között fenntartott 7×10^6 sejt/ml denzitású WCH sejtkulturában 10 γ /ml CH bemérése után öt órával már nem találtunk az agargéldiffúziós teszt alapján kimutatható mennyiségű drogot /2. kép/. A közel háromszor nagyobb denzitású 2×10^7 sejt/ml WOOLC sejtpopuláció felülszójából a bevitt 10 γ /ml CH hiánytalanul visszamérhető volt.

A WCH sejtpopuláció CH inaktiváló kapacitása 1 pM CH /sejt/ óra aktivitásnak felel meg. Az inaktivációnak a drog bemérését követő azonnali megindulása az inaktivációért felelős enzimek indukálható természetével szemben azok konstitutív voltát erősítik meg.



CH konc. sor / γ /ml /

1

0,75 0,5 0,25 0,1

30 perces időközökkel vett minták /balról jobbra/

2. kép WCH sejtkultúra CH inaktivációjának időfüggése

1./d. Korreláció a CH rezisztencia és differenciáció között

A WOOLC és WCH dedifferenciált sejtszuszpenzió kulturáknak valamint differenciálódó embrió és növénykulturáinak CH érzékenységet összehasonlítva a differenciáció állapotától függő szignifikáns különbség volt megfigyelhető.

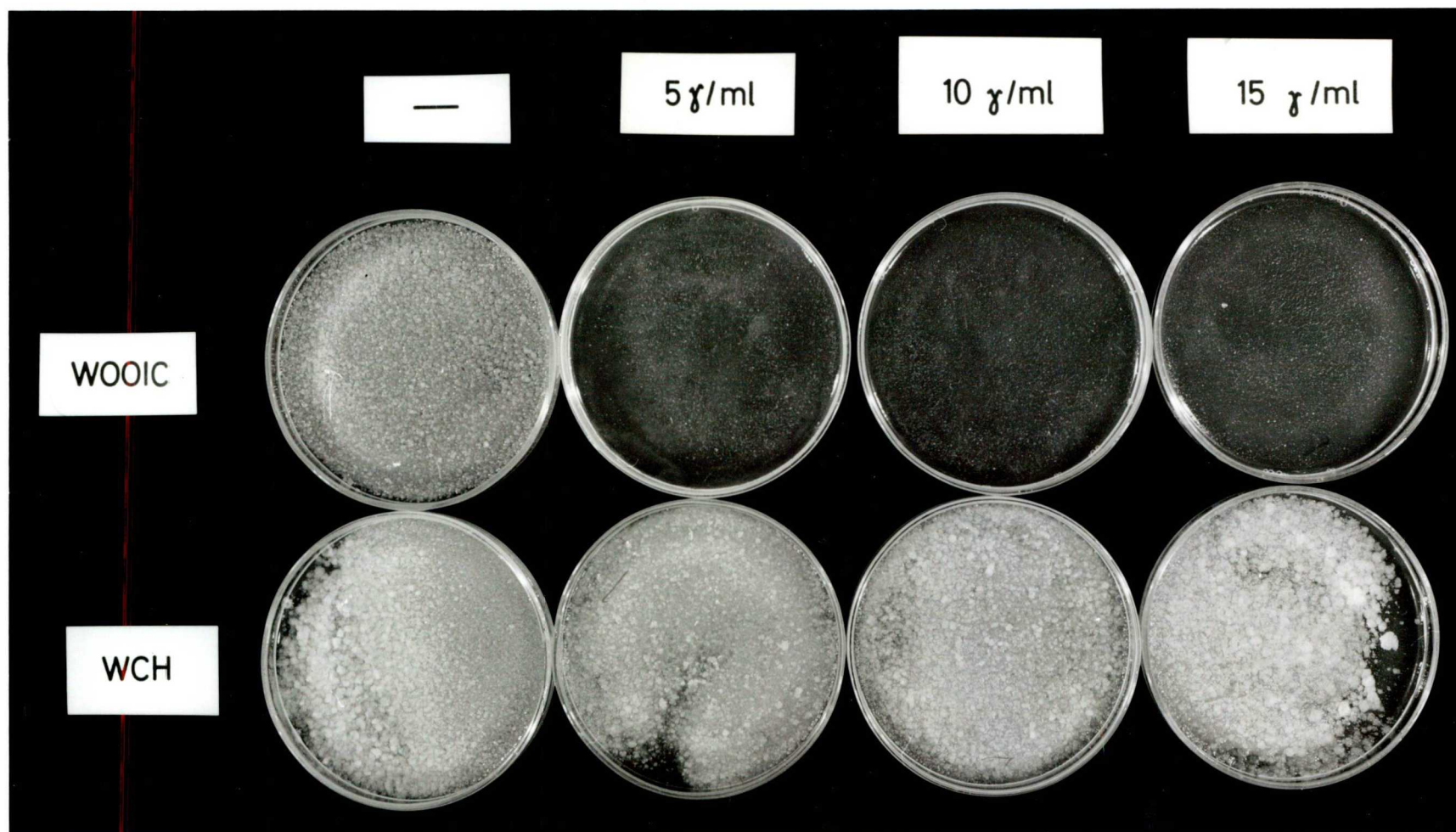
A dedifferenciált WCH sejtkulturák kolóniaképző képessége 15 γ /ml CH jelenlétében még közel megegye-

zett a kontrolléval; míg a WOOLC dedifferenciált sejtszuspenzióinak kolóniaképző képességét már a tesztelt legalacsonyabb koncentrációju 5 γ /ml CH is teljesen gátolta /lásd: 3. kép/.

A sejtszuspenzió kulturákból hormonmentes médiumon indukált, az embriogenezis torpedó stádiumában szelektív 10-100 γ /ml CH tartalmu médiumra kisélesztett WCH és WOOLC tenyészetekben, a dedifferenciált sejtkulturáktól eltérően nem tapasztaltunk a droggal szemben szenzitivitás-különbséget. A sejtvonaltól függetlenül mind a WCH, mind a WOOLC embriókból regenerálódó növénykulturákban még 100 γ /ml CH jelenlétében is a nem szelektív kontroll lemezeken detektálhatóval megegyező mértékű növekedési ütemet tapasztaltunk /lásd: 4. kép/.

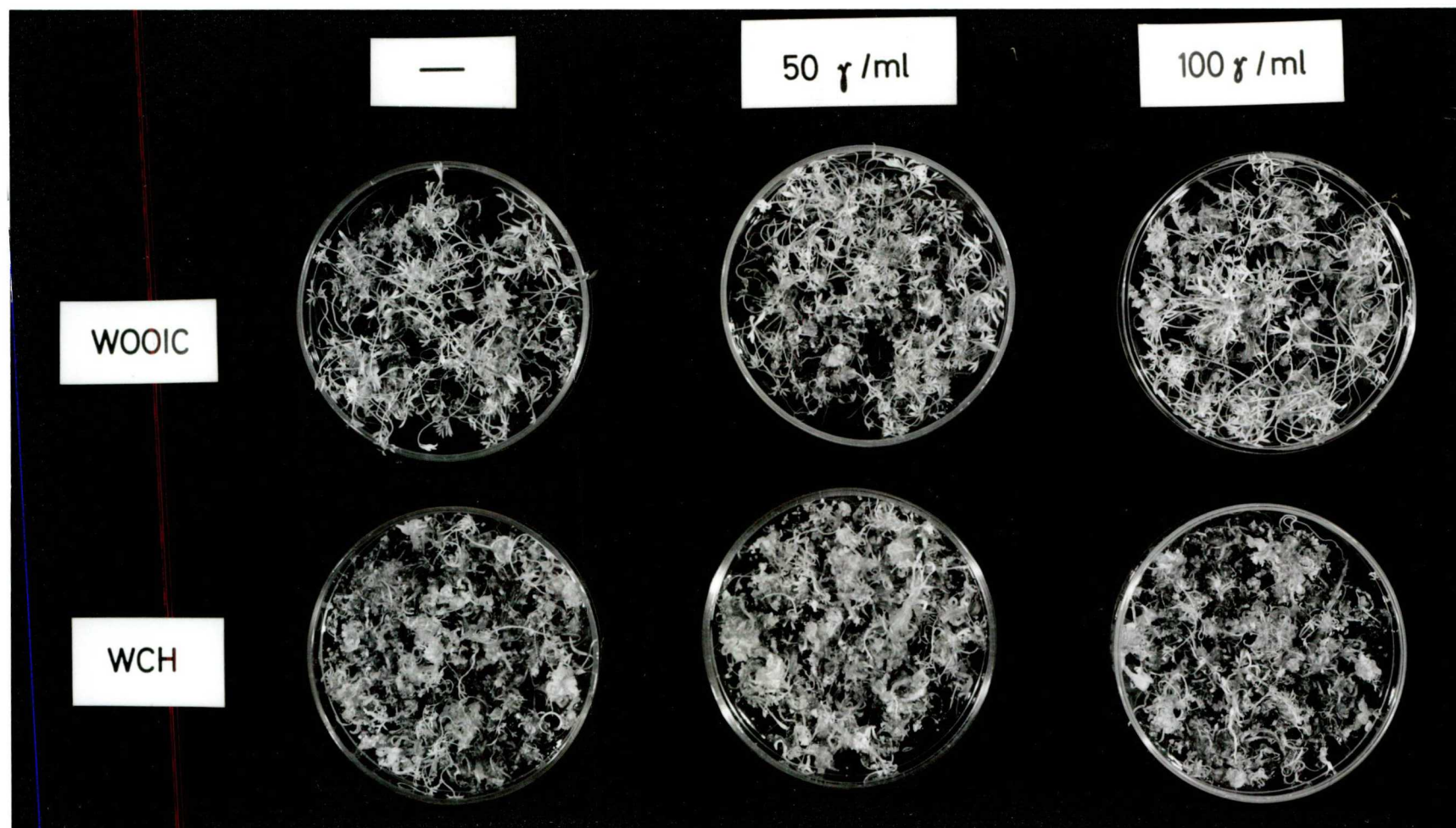
A CH szenzitív WOOLC sejtpopulációból származó torpedó stádiumu embriókulturában, a dedifferenciált sejttenyészettel szemben agargéldiffúziós teszttel jól mérhető CH inaktivációt tapasztaltunk.

A dedifferenciáció a WOOLC vad répában a differenciált embrió és növény szinten megelőzően expresszálódnak CH rezisztens fenotípus eltűnését eredményezte, míg a WCH kulturákban a CH rezisztens karakter a differenciált és dedifferenciált sejtekben egyaránt detektálható volt.



3. kép

W001C és WCH sejtvonal dedifferenciált sejtszuszpenziókultúráinak
cikloheximid érzékenysége



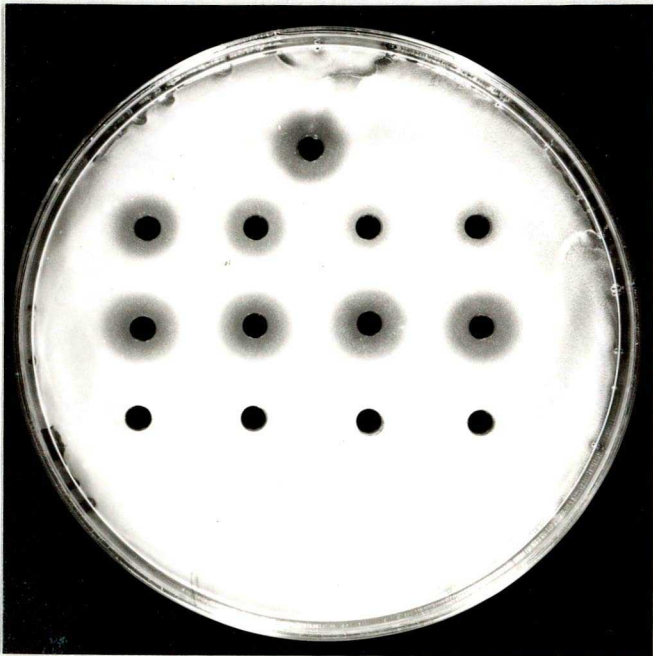
4. kép

WOOIC és WCH embriók növényregenerációs képessége cikloheximid jelenlétében

A dedifferenciáció indukciójára és a dedifferenciált sejtkulturák fenntartására azonban minden esetben a 2,4-D szintetikus auxint használtuk, ezért nem zárható ki, hogy a CH rezisztencia expresszióját nem a sejtek általános differenciált, illetve dedifferenciált állapota határozza meg, hanem egy olyan funkció, amelynek expresszióját specifikusan a 2,4-D szupresszálja.

Ezért különböző, dedifferenciációt indukáló ágensek jelenlétében: IAA /1 mg/l/, NAA /0,5 mg/l/, 2,4-D /0,5 mg/l/, valamint BUDR /6 μ M/ jelenlétében leteszteltük a WCH és WOOLC sejtvonalak CH érzékenységét. A dedifferenciáló vegyület jelenlétében történő három hetes tenyésztés után a sejtkulturákhoz 10 γ /ml CH-et adtunk, majd 8 óra elteltével agar-géldiffúziós teszttel megmértük a tenyészetek felüluszójának CH koncentrációját /lásd: 5. kép/.

A WOOLC sejtszuspenziókban a dedifferenciáló ágens típusától függetlenül egyik esetben sem mértünk inaktivációt, míg a WCH sejtkulturákban a 2,4-D jelenlétében fenntartott sejtkulturákban mért CH inaktivációs képességet minden dedifferenciációt indukáló vegyület jelenlétében ki tudtuk mutatni.



		CH konc. sor / γ /ml /			
		1			
		0,75	0,5	0,25	0,1
WOOLC	2,4-D NAA IAA BUdR				
WCH	2,4-D NAA IAA BUdR				

5. kép WOOLC és WCH sejtvonalak CH inaktiváló képességének tesztje különböző, dedifferenciációt indukáló ágensek jelenlétében

A CH rezisztencia vad répában tehát egy dedifferenciált sejtszinten represszált, csak a sejt dedifferenciált állapotában megnyilvánuló funkció. A WCH sejt kultúrákban azonban a CH rezisztens fenotípus a sejt általános dedifferenciált állapota ellenére is képes expresszálni.

2. Szomatikus hibridnövények szelekciója és a cikloheximid rezisztens fenotípus analízise a hibridekben

2./a. Cikloheximid szenzitív szülő kiválasztása, szelekciós markerek

Mivel a WCH sejtvonalból az embriogenezis indukciója után csak degenerált növénykéket lehet regenerálni, amelyek sosem jutnak el a virágzás stádiumáig, a CH rezisztens karakter további jellemzése a klasszikus módon, szexuális keresztezéssel és utódanalízissel nem oldható meg. Csak a szomatikus hibridizáció nyújt lehetőséget a CH rezisztens jelleg genetikai analízisére és a CH rezisztens fenotípus expresszió regulációjának tanulmányozására.

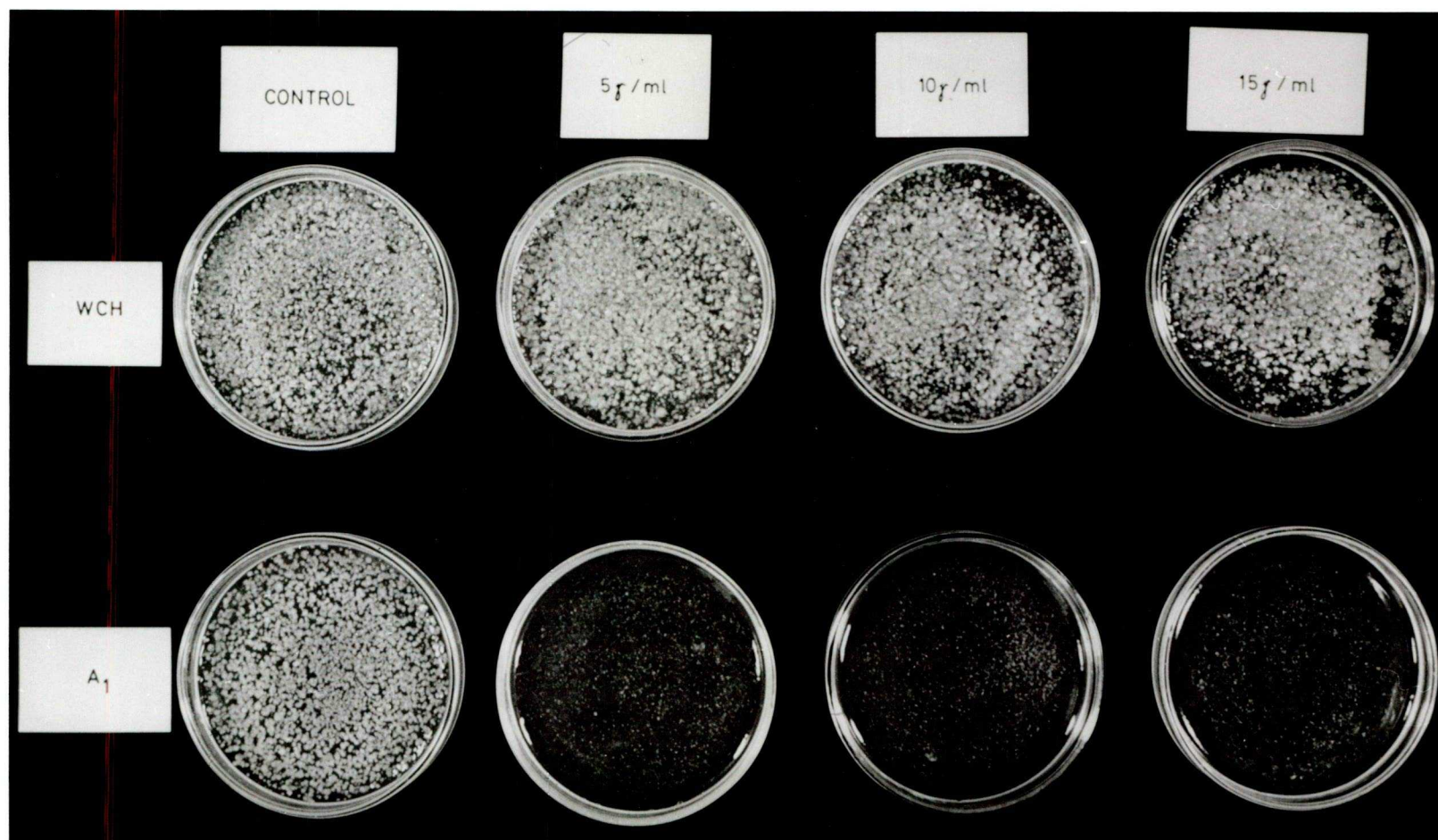
A WOOLC vad répa sejtvonal azonban, megfelelő biokémiai - genetikai markerek hiányában nem elégíti ki a protoplaszt fúzió utáni szomatikus hibridszelekció követelményeit, ezért fúziós partnerként a szelekció feltételeit is kielégítő CH szenzitív répa sejtvonalat kellett választanunk a WOOLC répa helyett. A vad répához hasonló differenciáció-függő CH rezisztenciát mutató sárgarépa /*Nantesi*/ nukleáris albino mutánsa /A₁/ megfelelő fúziós partnernek tűnt.

Az A_1 sejtvonalnak, az 5 γ /ml-enként növekvő CH dózisokat tartalmazó agarlemezen mutatott, kolóniaképző képessége megegyezett a W001C vad ré-páéval. /lásd: 6. kép/ A CH már az alkalmazott legkisebb koncentrációban teljesen gátolta az A_1 sejtek kolóniaképzését, míg a WCH sejtvonal 15 γ /ml CH jelenlétében is a kontrolléval közel megegyező növekedést mutatott.

Az A_1 sejtvonal CH szenzitív fúziós partnerként való alkalmazásának további előnye, hogy a protoplaszt, illetve sejtkulturából regenerálható albino növénykéek fejlődési defektet mutatnak és sohasem nőnek túl a 4-5 cm-es törpe növény stádiumon. Így az A_1 x WCH protoplasztfúzió után a hibridszelekció, az albino nukleáris mutáció és a két szülő fejlődési defektjeinek komplementálása alapján történhet a szabályos fejlődést mutató zöld növényekre.

A várhatóan alacsony hibridgyakoriság mellett azonban a WCH protoplasztokból regenerálódó zöld növénykéek megjelenése zavarná a hibridszelekciót, ezért megpróbáltuk a nemfuzionált CH rezisztens szülői protoplasztok eliminálását két módon:

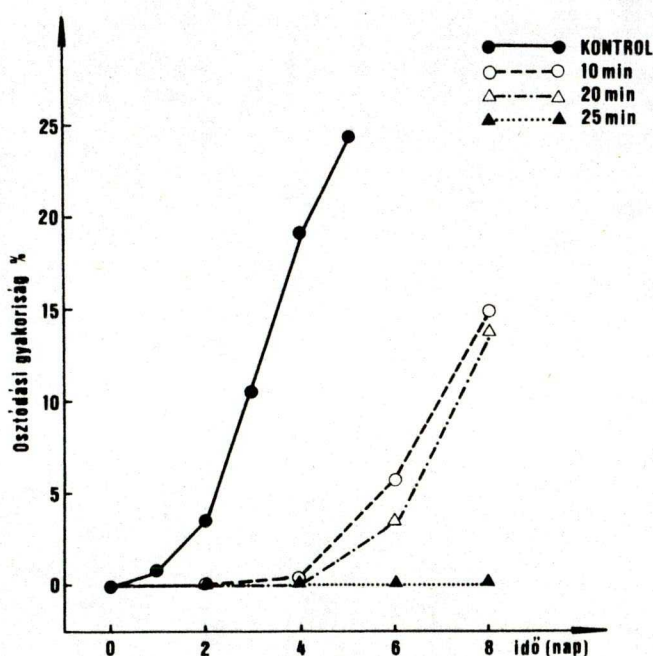
1. WCH levél mezofill eredetű, az alkalmazott tenyésztési feltételek mellett nem osztódó protoplasztok fúziós partnerként való alkalmazásával.
2. Irreverzibilisen gátló metabolikus inhibitorral, jódacetamiddal, inaktivált WCH sejtszuszpénzió eredetű protoplasztok fúziós partnerként való alkalmazásával.



6. kép

WCH és A₁ sejtvonalak kolóniaképző képessége növekvő koncentrációju
cikloheximid jelenlétében

Egy irodalmi adat alapján kiválasztott 30 mM-os jódacetamid koncentrációnál, a kezelési idő változtatásával kerestük a protoplaszt inaktiváció optimális feltételeit WCH kulturákban. A kiértékelést a protoplasztokból regenerálódó sejtpopuláció osztódási gyakorisága alapján végeztük /lásd: 3. ábra/.



3. ábra 30 mM-os koncentrációju jódacetamid protoplaszt inaktiváló hatásának függése a kezelési időtől

A jódacetamid kezelést nem kapott kontroll tenyészetekben a protoplasztokból regenerálódó WCH sejtek osztódási rátája meredeken emelkedett és az 5. napra a sejtpopuláció 25%-a már legalább egy osztódáson átment. Az 5 napos kulturákban nem ritkák a többszöri

osztódáson átment 3-5 sejtes aggregátumok sem.

10 perces jódacetamid kezelést követően az első osztódó sejtek egy 3-4 napos lag. fázist követően jelentek meg a sejtpopulációban. Ezt követően viszont a tenyészetek osztódási rátája közel megegyezett a kontrolléval.

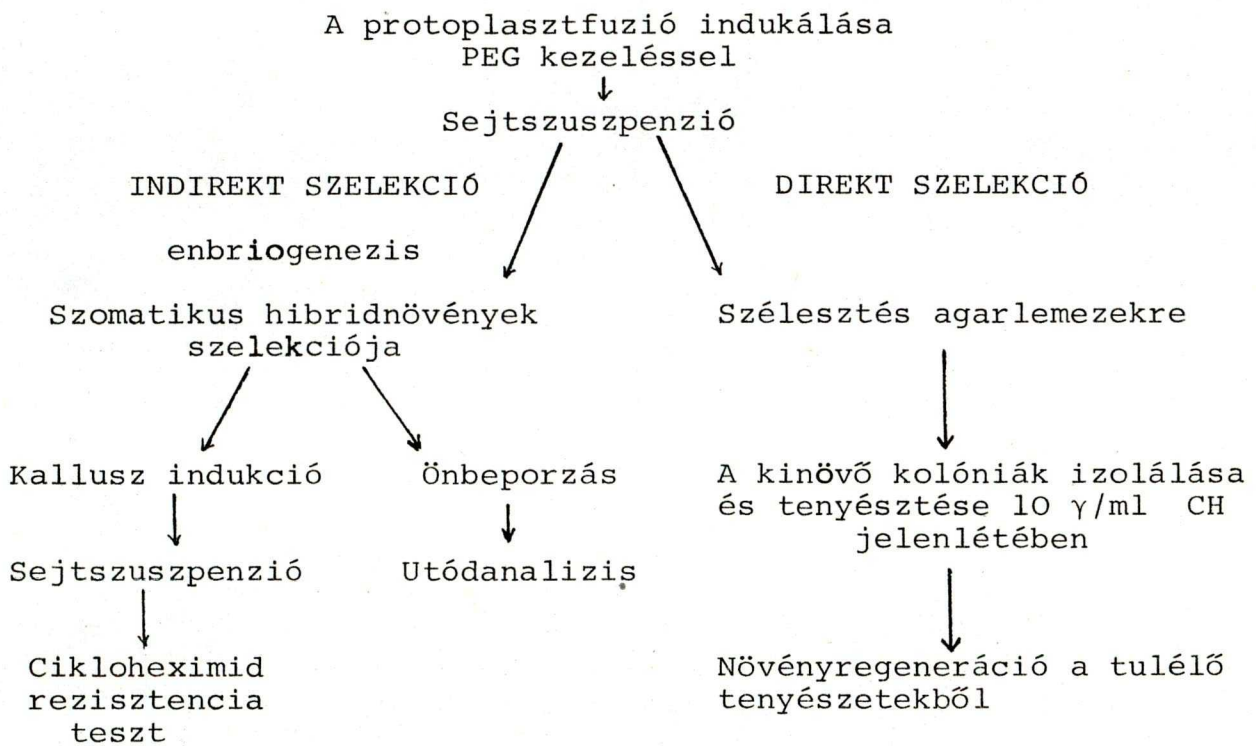
20 perces jódacetamid kezelés után a nyugalmi fázis megnőtt, a 4. napon osztódó sejtek még nem voltak detektálhatók a tenyészetekben, de a 8. napra az osztódási gyakoriság már megközelítette a 10 perces kezelés után ebben az időpontban mért 15%-os értéket.

A 25 perces, illetve ennél hosszabb idejű jódacetamid kezelés teljesen inaktiválta a WCH protoplaszt populációt, osztódó sejtet nem detektáltunk a tenyészetekben. A 4. napra a populáció zöme lizált. A mikroszkópos értékelés alapján ép "sejtek" gömb alakúak, üres citoplazmájúak, ozmotikus érzékenyséjük a protoplasztokéval volt azonos.

2./b. Protoplaszt fuzió, hibridszelekció

A hibridszelekció és a CH rezisztens jelleg analízisének lépéseit a 4. ábrán foglaltuk össze.

A ₁ /Sejtszuszpenzió	X	WCH	levél protoplaszt
eredetű proto-		vagy	
plaszt/		WCH	sejtszuszpenzió
		vagy	eredetű protoplaszt
		WCH ^{30'}	jódacetamiddal inak-
			tivált sejtszuszpen-
			zió eredetű protoplaszt



4. ábra A cikloheximid rezisztens jelleg analízise
szomatikus hibridizációval

A fúziós kísérletekben a CH szenzitív A_1 sejtvo-
nal sejtkulturából származó protoplasztjainak partneré-
ül a CH rezisztens WCH szülőből különböző eredetű pro-
toplasztokat használtunk :

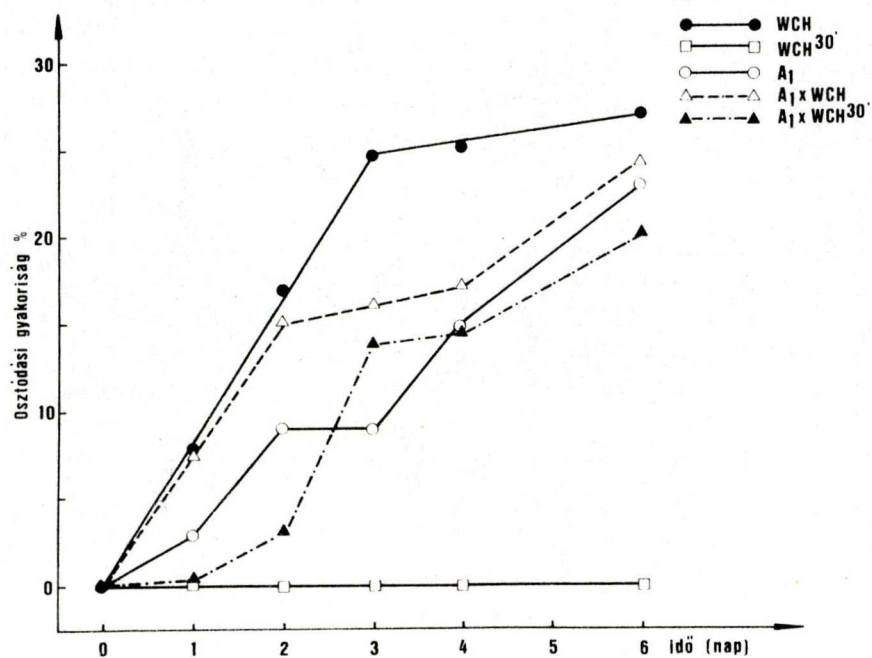
1. Sejtszuszpénzió eredetű protoplaszt populáció.
2. Sejtszuszpénzió eredetű, jódacetamiddal 30 per-
cig inaktivált $WCH^{30'}$ protoplaszt populáció.
3. Levél mezofill protoplasztok.

A szülői protoplaszt tenyészetek mellett kontroll-
ként a fúziós kísérletével megegyező denzitásban ösz-
szekevert szülői protoplaszt populációk nem PEG kezelt
kulturáit is beállítottuk.

Az 5. ábrán a WCH sejtszuszpénzió eredetű pro-
toplasztokra alapozott fúziós kísérletekből származó
tenyészetek osztódási gyakoriságait mutatjuk be a te-
nyésztés első hat napja alatt.

A jódacetamiddal kezelt szülői $WCH^{30'}$ populációk-
ban sem a tenyésztés első hat napja alatt, sem később
osztódást nem figyeltünk meg. A populáció zöme már
az első hét végére lizált.

A kezeletlen WCH kontroll tenyészetben az osztó-
dási gyakoriság már a 3. napon elérte a 25%-os érté-
ket; a populáció közel 70%-a azonban az első hat nap
alatt egyszer sem osztódott.

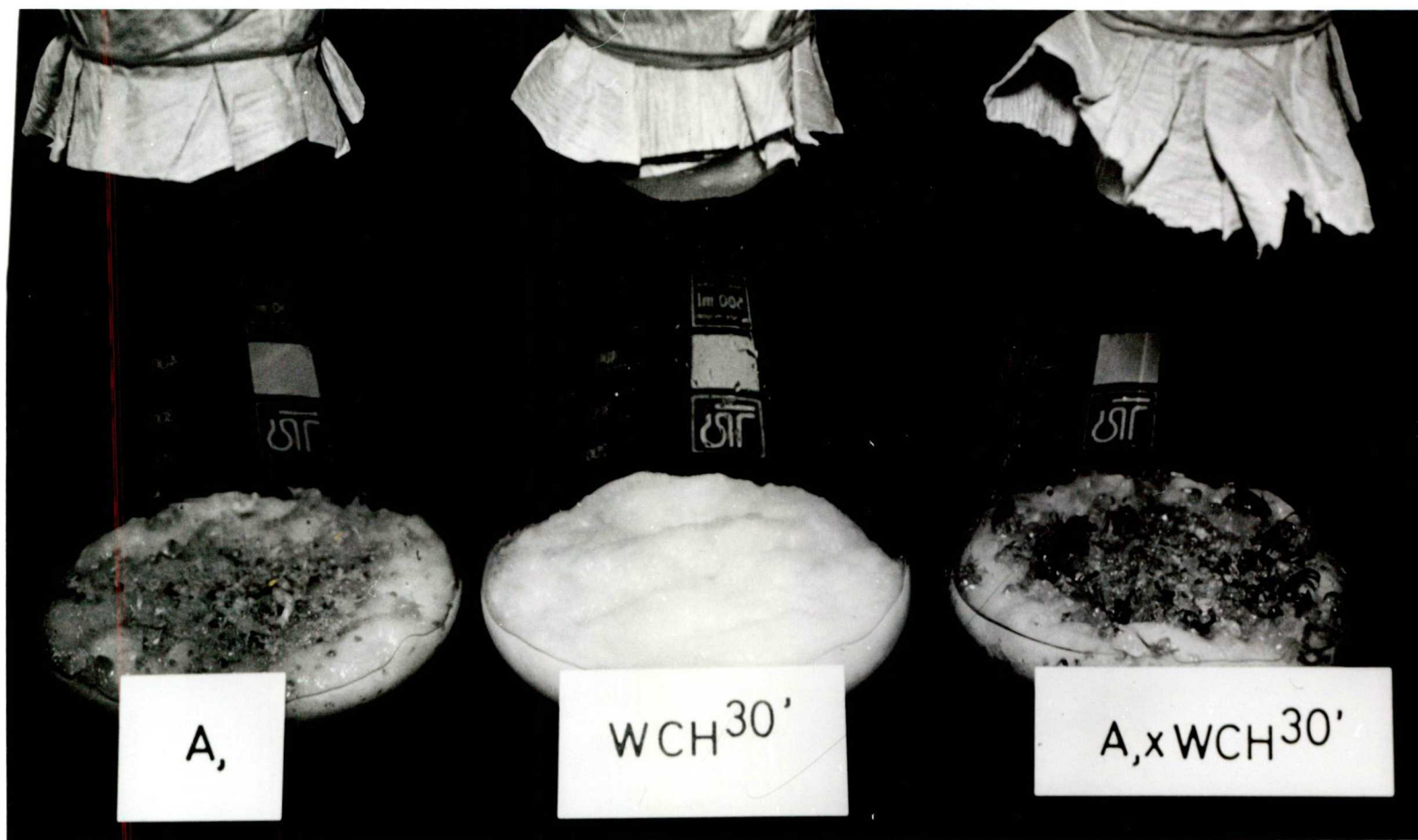


5. ábra Jódacetamid kezelés hatása a kontroll és fúziós protoplaszt populációk osztódási gyakoriságára

Az A_1 protoplasztokból regenerálódó sejtkulturákban, valamint az $A_1 \times WCH$ fúziós tenyészetekben a 6. napra az osztódási gyakoriságok közel megegyező értéket adtak. A jódacetamiddal előkezelt $WCH^{30'}$ protoplasztokra alapozott $A_1 \times WCH^{30'}$ fúziós tenyészetekben egy viszonylag rövid lag. fázis után az osztódási ráta meredeken emelkedve a 3. napra elérte a 14%-os értéket, ezt követően egy lassan emelkedő tendencia volt megfigyelhető.

A protoplaszt fúziót követően egy négy hetes tenyésztési ciklus után a kulturákat két részre osztottuk; a tenyészetek felében hormonmentes táptalajon indukáltuk az embriogenezist, másik részét MS táptalajra agarlemezekre szélesztettük.

A hormonmentes médiumon fenntartott kulturákban, a jódacetamiddal inaktivált $WCH^{30'}$ kontroll kivételével, 1 hónapos tenyésztés után kis növénykéket kaptunk. /lásd: 7. kép/ Az $A_1 \times WCH^{30'}$ fúziós kombinációban számos zöld regeneráns jelent meg, az $A_1 \times WCH$ levél protoplaszt fúziós populációban is kaptunk zöld regeneránsokat. A nem PEG kezelt $A_1 + WCH^{30'}$, illetve $A_1 + WCH$ levél protoplasztkeveréket tartalmazó kontrollban is megjelentek azonban zöld regeneránsok, az induló WCH protoplaszt denzitásra vonatkoztatva 5×10^{-5} gyakorisággal. A fúziós kombinációkban és a kontroll tenyészetekben kinövő zöld növénykéket

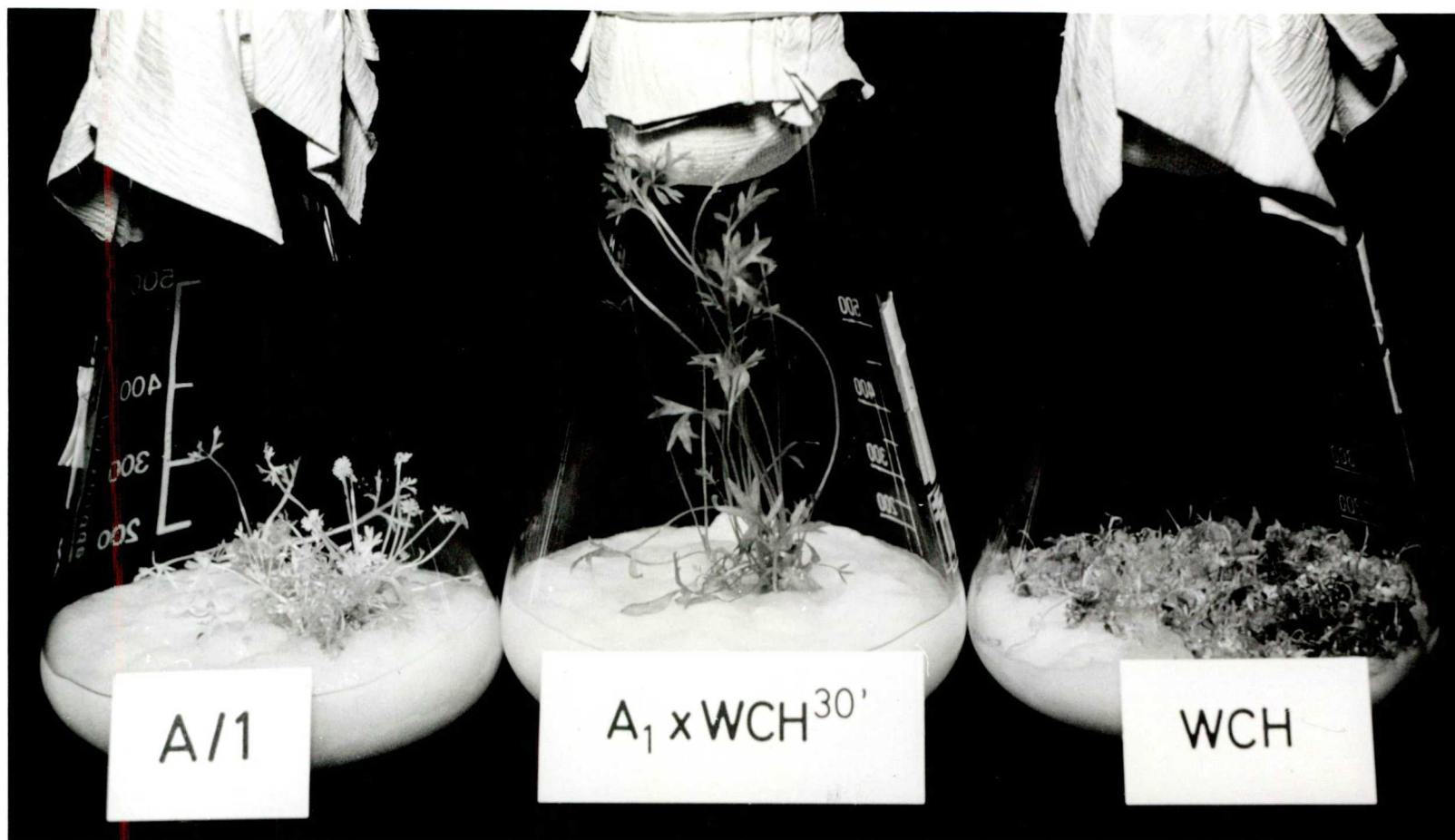


7. kép
Szülői kontrol és fúziós sejtpopulációk növényregenerációs
képessége

izoláltuk és továbbtenyésztettük hormonmentes körülmények között. A hibridszelekció a fuzió partnerek fejlődési defektjeinek komplementálása alapján történt a szabályos fejlődést mutató zöld növényekre /lásd: 8. kép/.

A CH rezisztens WCH kontroll abnormálisan fejlődő növénypopulációt eredményezett. Az albinó szülői sejtvonalból kapott regeneránsok fejlődése is megállt a törpe növény stádiumban. A nem PEG kezelt kevert populációkból a szülői kontrollokhoz hasonló tipikus albinó, illetve WCH növény fenotípust mutató degenerált növénykéket kaptunk vissza. Szabályos fejlődésű zöld növényeket csak a fuzió populációkból tudtunk regenerálni /8. kép/.

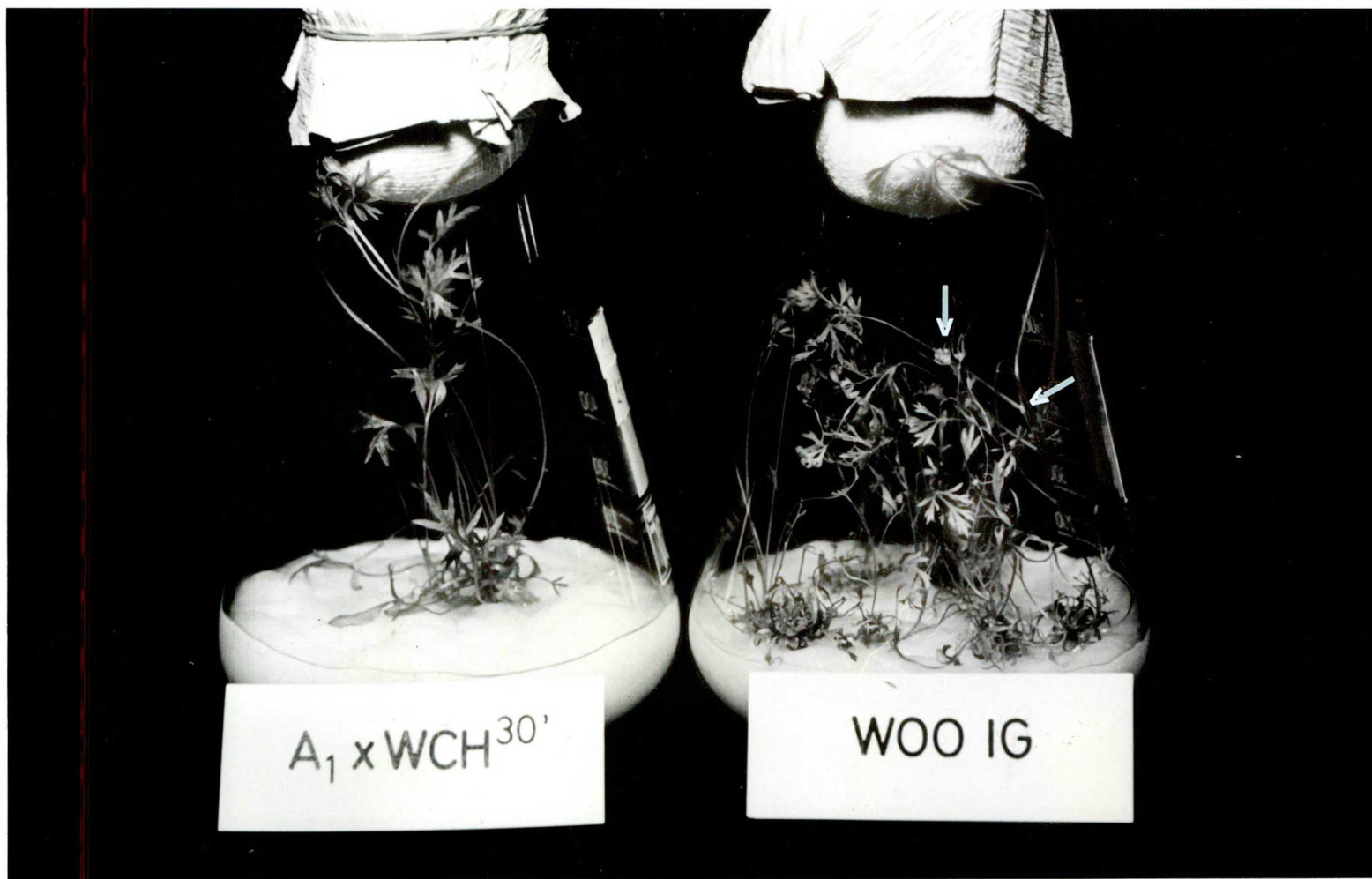
Mivel a reguláris fejlődést mutató WCH revertánsok megjelenése nem zárható ki, elengedhetetlen a WCH sejtvonal izolálásához használt vad szülői WOOLC sejtpopulációból regenerálható növények fenotípusának ismerete. Az azonos tenyésztési feltételek között regenerált WOOLC vad répa növények noduláltak és már a tenyésztés 5. hónapjában elérték a virágzási stádiumot. /lásd: 9. kép/ A fuzió populációkból szelektált növények között sem nodulációt, sem virágfejlődést nem tudtunk megfigyelni, még a tenyésztés 10. hónapjában sem. Ezek a fenotípusos különbségek lehetővé teszik a szabályos fejlődést mutató WCH revertánsok felismerését és a hibridnövények egyértelmű azonosítását, Reguláris fejlődést mutató WCH rever-



8. kép

A fúziós partnerek fejlődési defektjeinek komplementálása a szomatikus hibridekben





9. kép

Protoplasztból regenerált, azonos koru szomatikus hibrid és vad répa

/WOOLC/ fenotipusos különbségei

tánst azonban sem a kontroll, sem a fúziós populációkban nem találtunk. A szelektált zöld hibridnövények morfológiailag uniform, sárgarépa fenotípusúak voltak /lásd: 9. kép/.

A fúziós kísérletek eredményeit a 1. táblázatban foglaltuk össze. Az $A_1 \times WCH$ fúziót követően az egy hónapos stádiumban leizolált 176 zöld regeneráns a továbbtenyésztés során mind WCH répának bizonyult, hibrid fenotípusú növényt a tesztelt izolátumok között nem találtunk. Ezzel szemben az $A_1 \times WCH^{30'}$ fúziós populációban a letesztelt 285 zöld regeneráns közül 57 hibrid fenotípust mutatott. A $WCH^{30'}$ kontroll tenyészetekétől eltérően a jódacetamiddal inaktivált protoplasztok felhasználására alapozott fúziós és nem PEG kezelt kevert szülői populációkban is megjelentek a WCH regeneránsok. Bár az A_1 és $WCH^{30'}$ szülői protoplasztok közötti kereszttáplálás következtében a jódacetamid nem bizonyult alkalmasnak a rezisztens WCH fúziós partner eliminálására, de alkalmazásával jól reprodukálható dúsítást lehetett elérni a hibridekre / 15%/. Az inaktivációs kezelés hatékonyságát az $A_1 \times WCH$ fúziós kísérletekből azonos nagyságrendben letesztelt zöld regeneránsokból kapott negatív eredmény meggyőzően bizonyítja.

Az $A_1 \times WCH$ levél protoplaszt fúzióból származó 6 zöld regeneráns közül a továbbtenyésztés során 3 bizonyult hibridnek.

A hibridszelekció hatékonyságának változása az A_1 x WCH fúziós kombinációkban

Fúziós kombinációk	Fúziós kísérletek száma	Az izolált és továbbtenyésztett zöld regeneránsok száma	Hibrid fenotípusu növények száma
A_1 x WCH	1	67	-
	2	109	-
		Összesen : 176	-
A_1 x WCH ^{30'} /jódacetamiddal inaktivált/	1	20	7
	2	35	9
	3	48	5
	4	34	4
	5	44	7
	6	66	20
	7	38	5
		Összesen : 285	57
A_1 x WCH /levél/	1	6	3

8 független kísérletből 60 hibrid fenotípusu növényt szelektáltunk. A nukleáris albinó mutáció nagy stabilitását figyelembevéve kizárható, hogy a szelektált sárgarépa fenotípusu növények A_1 revertánsok lehetnek.

A WCH sejtek kromoszómaszáma $2n = 18$ stabil diploid, az A_1 sejtvonalba a kromoszómaszám $2n = 18$, illetve $2n = 46$ között variált. A hibridnövényekből indított sejtvonalakban a kromoszómaszám $2n = 36$, illetve $2n = 48$ között változott. A szülői A_1 és WCH sejtek kariotípusának megegyezése azonban lehetlenné tette, hogy különbséget tegyünk citológiai analízissel a szülői genomok között.

2./c. Direkt szelekció

A PEG kezelést követő egy hónapos tenyésztés után a fúziós és kontroll sejtpopulációkból drogmentes agarlemezekre szélesztettünk. A nem szelektív körülmények között 0,5 MS táptalajon, a jódatetamiddal inaktivált WCH^{30'} tenyészetek kivételével minden kulturában kaptunk kolóniaképzést. Az $A_1 \times$ WCH^{30'} fúziós kombinációkból 162 kolóniát egyenként leizoláltunk, nem szelektív körülmények között folyadéktenyészetben felszaporítottuk, majd 10 γ /ml CH jelenlétében két hétig tenyésztettük. 61 tenyészetben nem tapasztaltunk növekedést. A növekedést mutató kulturákból /101 tenyészet/ hor-

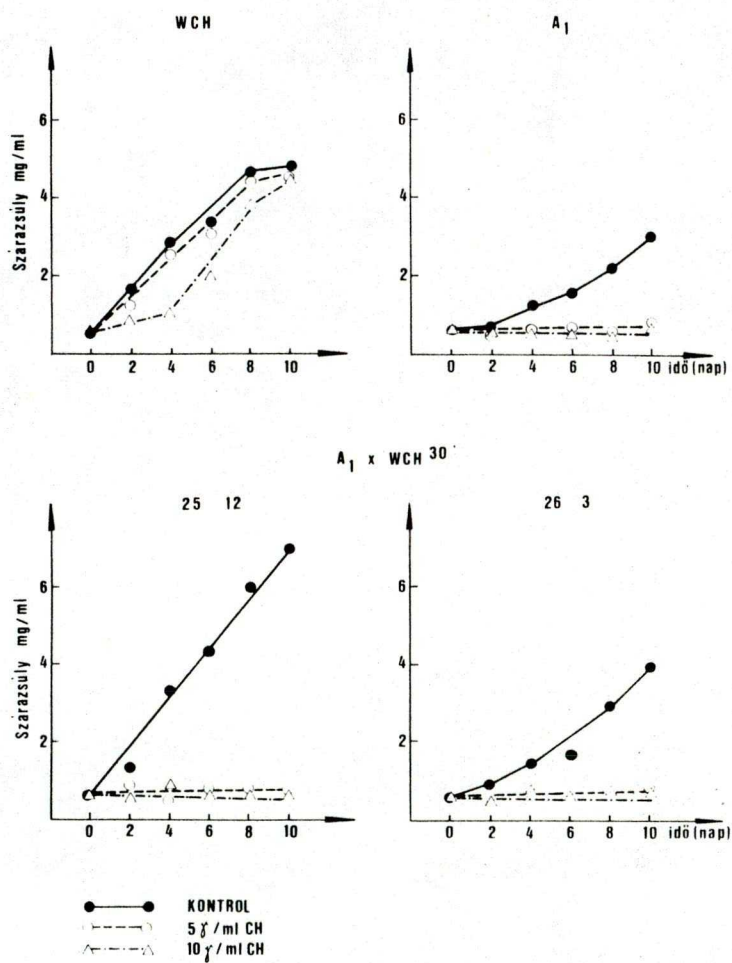
monmentes médiumon csak WCH fenotípusu degenerált fejlődést mutató zöld növénykéket tudtunk regenerálni. Az azonos módon kezelt, $A_1 + WCH^{30'}$ kontroll lemezekről származó kolóniákból is csak a WCH szülői fenotípust mutató növénykéket kaptuk vissza a regenerációs kísérletben.

A $10 \gamma/ml$ CH-del végzett folyadékszelekció után sem A_1 albinó fenotípusu növényt, sem szabályos növényfejlődést mutató zöld hibridnövényt nem találtunk a regeneránsok között.

2./d. A CH rezisztens jelleg analízise a hibridekben

Az indirekt szelekcióból származó hibridnövényekből kallusz kulturákat, majd sejtszuszpenzió-kulturákat hoztunk létre, és összehasonlítottuk az albinó és WCH növényekből származó sejtkulturák és a hibrid sejtvonalak CH érzékenységét 5 és $10 \gamma/ml$ CH jelenlétében /lásd: 6. ábra/.

A két véletlenszerűen kiválasztott és letesztelt hibrid sejtvonal /25-12, 26-3/ CH-del szembeni érzékenysége a sejtszuszpenzióban mutatott növekedésük alapján megegyezett a szenzitív A_1 szülőével. A protoplaszttól a növénystádiumig azonos körülmények között tenyésztett WCH növényekből származó sejtkulturák a $10 \gamma/ml$ CH-del szemben is rezisztensnek bizonyultak.

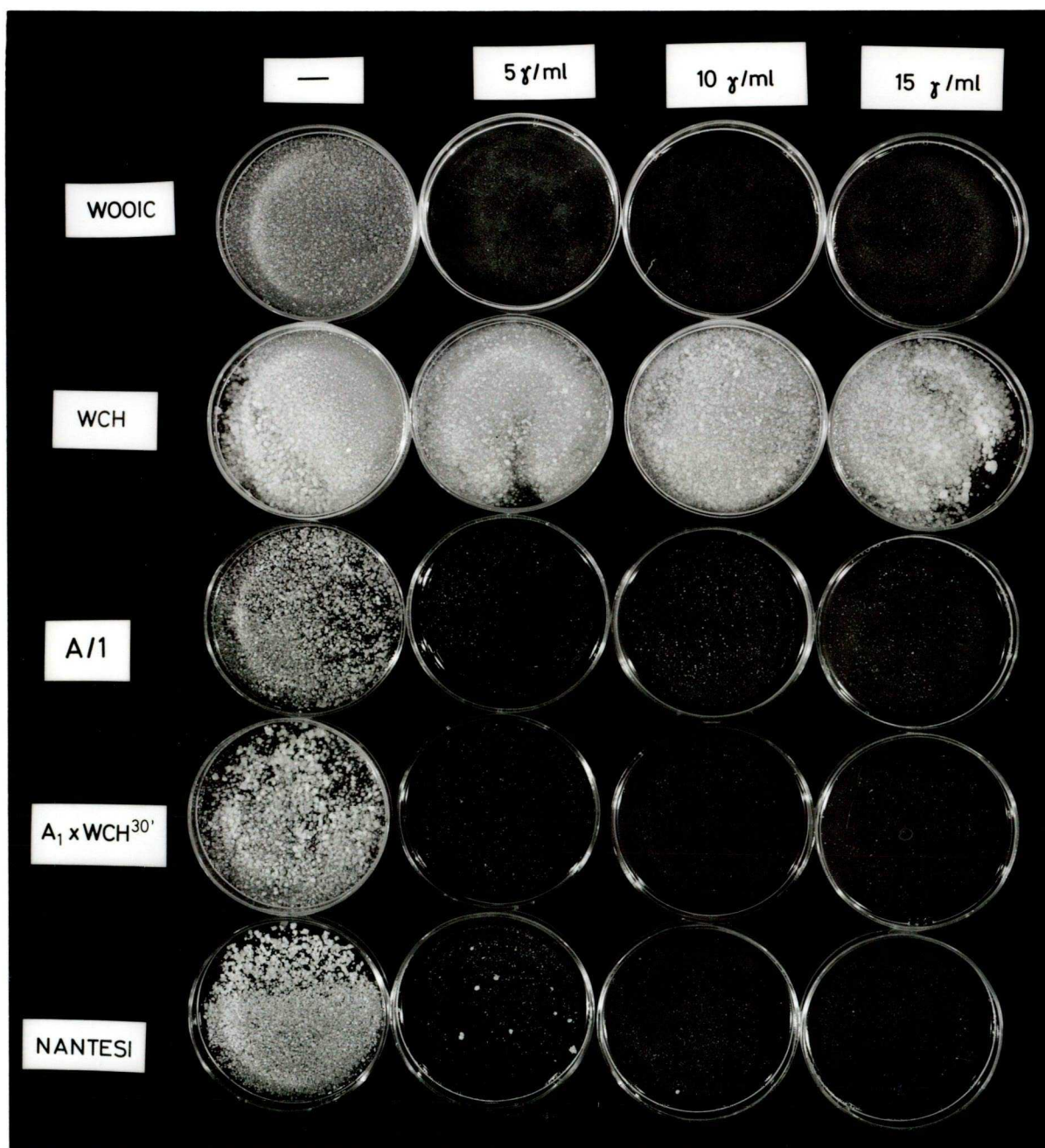


6. ábra

A₁ és WCH szülői sejtvonalak és a fuzióból származó szomatikus hibridek cikloheximid érzékenysége sejt-szuszenzió kulturában

További 17 hibrid sejtvonalt 5, illetve 10 γ /ml CH tartalmu agarlemezen mutatott kolóniaképző képességének hiánya a sejtszuszpenziós kísérletekkel megegyező eredményt adott. A 10. képen az A_1 és WCH fuziós partnerek, ezek eredeti vad típusu *Nantesi* és WOOLC sejtvonalaiknak, valamint a hibrid sejtvonalaikat reprezentáló 25-12-es sejtvonalt kolóniaképző képességét mutatjuk be nem szelektív, valamint 5 és 10 γ /ml CH-et tartalmazó médiumon. Az összes letesztelt hibrid sejtvonalt a 10. képen bemutatott 25-12-es hibrid sejtvonalthoz hasonlóan már 5 γ /ml CH-re az albinó szülőével megegyező szenzitivitást mutatott, kolóniaképzést csak a kontroll lemezekén kaptunk.

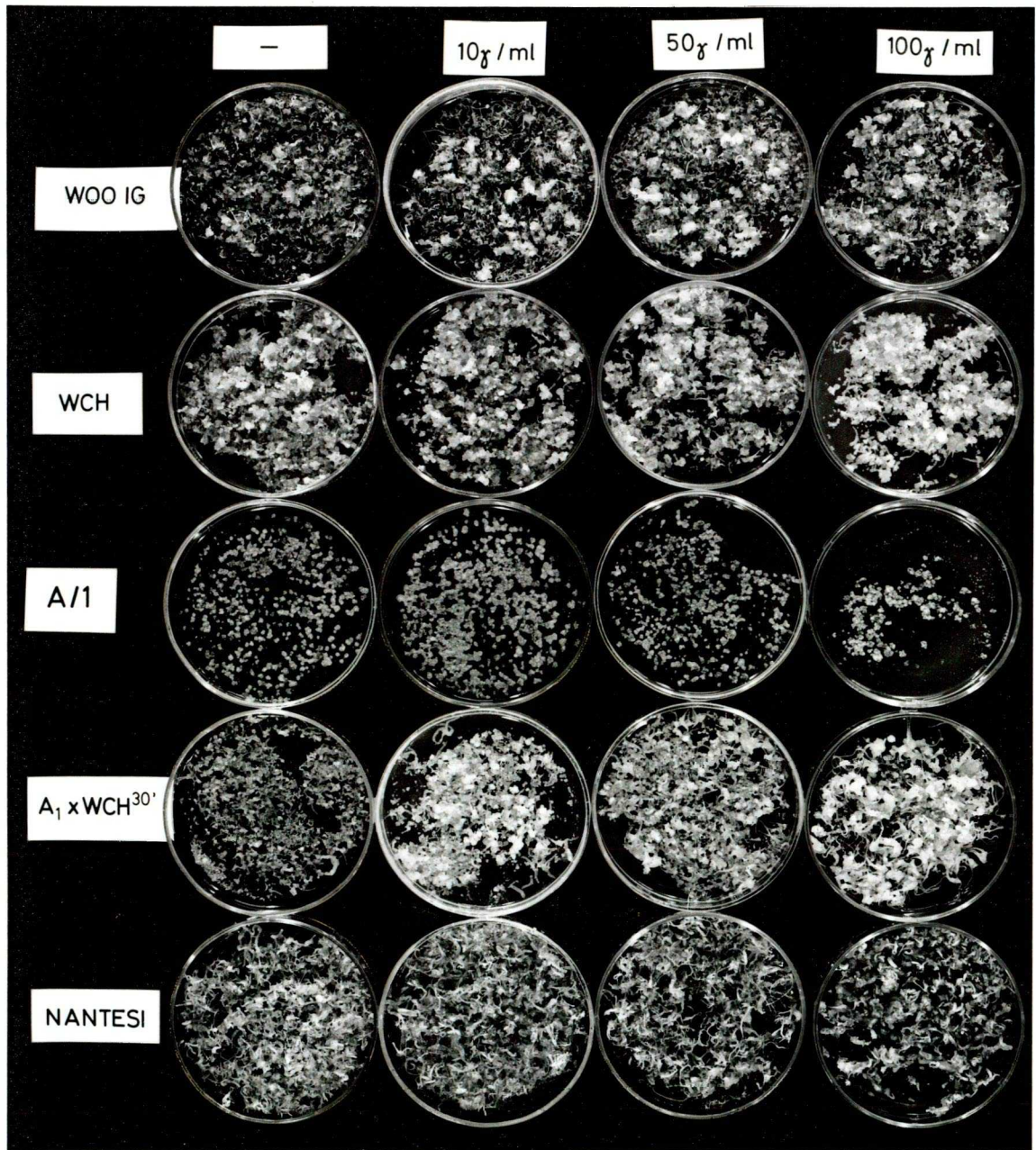
A CH rezisztenciának differenciált növény szinten való összehasonlítása céljából a szülői, valamint a hibrid sejtvonalaikból indukált torpedó stádiumu embriókat 100 γ /ml-ig növekvő koncentrációju CH jelenlétében tenyésztettük /lásd: 11. kép/. A nem szelektív és szelektív körülmények között a növényfejlődés üteme teljes megegyezést mutatott. Az albinó tenyészetben tapasztalt, a CH koncentráció emelkedésével csökkenő mértékű növekedés az A_1 tenyészetek embriogén képességének elvesztésével magyarázható.



10. kép

A fuzió partnerek, ezek eredeti vad típusu sejtvonalai és egy szomatikus hibrid dedifferenciált sejtkulturáinak cikloheximid érzékenysége





11. kép

A fúziós partnerek, ezek eredeti vad típusu sejt-vonalai és egy szomatikus hibrid embriókultúráinak növényregenerációs képessége cikloheximid jelenlétében

2./e. A 25-12-es hibrid sejtvonala instabilitása,
spontán szomatikus szegregáció

A fúziós kezelés után egy évvel az addig sejtszuszpenzió kultúrában fenntartott 25-12-es hibrid sejtvo-
nalból hormonmentes médiumon indukáltuk a növényrege-
nerációt és agarlemezen 10 γ /ml CH jelenlétében ismét
leteszteltük a sejtvonala kolóniaképző képességét.

10 γ /ml CH-et tartalmazó médiumon a 10^5 kolónia-
képző egységet képviselő $1,08 \times 10^7$ kiszélesztett
sejtből 59 kolóniát kaptunk. A kolóniákat leizolál-
tuk, nem szelektív körülmények között felszaporítot-
tuk, majd 10 γ /ml CH jelenlétében való 24 órás inku-
bálás után 11 véletlenszerűen kiválasztott tenyészet-
ben agar-géldiffúziós teszttel megmértük a sejt kultu-
rák drog inaktivációs képességét. Gátlókoncentrációja
CH-et csak egy tenyészet felülszójából származó min-
tában tudtunk detektálni, ahol az eredetileg bevitt
10 γ /ml CH 24 órás inkubáció után hiánytalanul vissza-
mérhető volt. A másik tíz tenyészetben teljes inakti-
vációt mértünk, az agar-géldiffúziós tesztben a min-
ták körül gátlási zónát nem kaptunk.

A 10 γ /ml CH-et tartalmazó szelekciós lemezek-
en kinövő, az inaktivációs tesztben negatív eredményt
adó kolónia megjelenése a szélesztésre használt sejt-
szuszpenzió fizikai heterogenitásának következménye;
a nagyobb méretű több 100-1000 sejtet tartalmazó ag-
gregátumok antimetabolitokkal szembeni, az individuális
sejteket lényegesen meghaladó, tolerálóképességének
tulajdonítható.

Ha az inaktivációs tesztben kapott szenzitív : rezisztens tenyészet = 1 : 10 megoszlás alapján a szelektív körülmények között megjelenő kolóniák 90 %-át CH rezisztensnek tekintjük, a spontán szegregációs gyakoriság 2×10^{-3} a CH rezisztens karakterre. Ez az érték 4-5 nagyságrenddel magasabb a WOOLC vad répában a CH rezisztens kolóniák spontán megjelenési gyakoriságánál, és ugyancsak legalább 2 nagyságrenddel meghaladja az A_1 domesztikált répában spontán megjelenő CH rezisztens kolóniák számát. Az A_1 sejtszuspenzióból 2×10^5 kolóniaképző egységet képviselő $2,25 \times 10^7$ letesztelt sejtből egy sem bizonyult rezisztensnek 10 γ /ml CH-re: a 25-12-es hibrid sejtvonalból a 10 γ /ml CH-et tartalmazó lemezeken kinövő kolóniákon belül a kromoszómaszám 30-100 között variált. Az individuális kolóniákban a sejtek 30-40 %-a 30-34 kromoszómás volt.

Az embriogenezis indukciója után, a 25-12-es hibrid sejtvonalból regenerált zöld növénypopulációban kis gyakorisággal megjelenő, albino fenotípusú növénykéket figyeltünk meg. Sem a vad répa WOOLC és WCH, sem az A_1 fúziós partner eredeti zöld szülői *Nantesi* répa sejtvonalaiból, sem a korábbi tesztek során, sem a kísérlet kontrolljául szolgáló 1×10^7 sejt nagyságrendben tesztelt kultúráiból albino növényeket nem tudtunk regenerálni. Albino szegregánsokat csak a hibrid sejtpopulációból származó növények között találtunk.

Gyökércsucsokból végzett kromoszóma számolás során az albino növényeket 30-34 kromoszómásoknak határoztuk meg. Tetraploid 36 kromoszómás növényt nem találtunk az albino szegregánsok között.

MEGVITATÁS

Az irodalomban a magasabbrendű növények köréből eddig ismert dohány /Maliga és mtsai, 1976/ és vad répa /Gresshoff, 1979/ instabil CH "rezisztenciával" szemben több megfigyelés arra utalt, hogy az általunk vizsgált vad répa WCH sejtvonalaiban mutáció felelős a rezisztens fenotípusért.

1. A rezisztens fenotípus az előbb említett dohány és répa sejtvonalakkal ellentétben nagy stabilitást mutatott. A több mint egy évig nem szelektív körülmények között fenntartott sejtvonala megtartotta eredeti rezisztenciáját.
2. A protoplasztból növénystádiumig regenerált, majd visszakalluszozított WCH kultúrákban a CH-del szemben változatlan rezisztencia szintet tudtunk detektálni.
3. A WCH sejtvonala izolálásának körülményei is azt valószínűsítik, hogy a rezisztens fenotípus mutációs változás eredménye.



Szelektív körülmények közé való inokulálás után, a rezisztens sejtvonalnak a szenzitív szülőével megegyező, a ^3H -leucin inkorporáció azonnali gátlása alapján kimutatható CH-del szembeni érzékenysége arra utalt, hogy a WCH sejtek permeabilisak a drogra és a citoplazmatikus proteinszintetizáló rendszer CH-del szembeni érzékenysége megegyezik a vad szenzitív szülőével. A rezisztencia tehát nem, az alacsonyabbrendű eukarióták CH rezisztens mutánsainak körében leggyakoribb, riboszomális mutánsok /Cooper és mtsai, 1967; Rao és mtsai, 1967; Coddington, 1977/ kategóriájába tartozik.

A 10 γ /ml CH jelenlétében tenyésztett WCH sejtvonalban az inokulumdenzitástól függő kezdeti 1-4 napos log. fázis után meginduló, a nem szelektív körülmények között fenntartott kontroll kulturáéval megegyező ütemű növekedés, erősen valószínűsítette, hogy a drog inaktivációja felelős a rezisztens fenotípusért. A szenzitív WOOLC sejtkulturák felhasználására alapozott növekedési teszttel és agar-géldiffúziós teszttel a feltevést egyértelműen bizonyítani lehetett. Eredményeink jó megegyezést mutatnak Gresshoff /1979/ adataival, aki *Daucus carota* L. vad répából izolált, átmeneti CH rezisztenciát mutató sejtvonalban a rezisztens fenotípusért szintén a drog inaktivációját találta felelősnek. *Nicotiana tabacum* átmeneti CH rezisztenciát mutató sejtvonalban is a drog inaktiváció-

jának tulajdonították a kalluszszeniten detektálható rezisztencia okát /Maliga és mtsai, 1976/. A CH rezisztens fenotípus azonban csak a hajtasregeneráló, előzetesen szelektív körülmények között fenntartott kallusztenyészetekben nyilvánult meg, a nem szelektált CH szenzitív kalluszokból hajtasregenerációt nem figyeltek meg. Ezzel szemben az általunk vizsgált *Daucus carota* vad répa nem szelektív körülmények között fenntartott CH szenzitív WOOLC sejtvonalában az embriogenezis torpedó stádiuma után a rezisztens WCH sejtvonallal megegyező mértékű, CH inaktivációra alapuló drog rezisztenciát tapasztaltunk. A rezisztens fenotípus a WOOLC vad répában a sejt általános differenciált állapotától függő expressziót mutatott. A WCH sejtvonalban a rezisztens fenotípusnak dedifferenciált sejtszinten való megnyilvánulása a rezisztenciáért felelős gén/ek/ expresszióját reguláló mechanizmusban bekövetkezett stabil megváltozásra utal. Az a tény, hogy egy több mint egy évig nem szelektív körülmények között fenntartott WCH sejtkulturában a drog bemérése után azonnal meginduló CH fogyást lehet detektálni, az inaktivációért felelős enzimek indukálható volta ellenében azok konstitutív természetét erősíti meg.

A CH rezisztens fenotípus genetikai analizisét csak szomatikus hibridizációval lehetett megoldani.

Irreverzibilisen ható biokémiai inhibitorok szomatikus hibridizációs kísérletben szelekció céljából való sikeres alkalmazására eddig csak emlős sejtfúziós rendszerben van példa /Wright, 1978/. Nehls /1978/ növényi protoplaszt fúziós kísérletében az irreverzibilisen ható biokémiai inhibitorok szelekciós célra való használhatóságát csak valószínűsíteni tudta. Az általunk alkalmazott szulfhidril-csoport inhibitor, jódacetamid, bár a szülői sejtek közti keresztáplálás következtében az $A_1 \times WCH^{30'}$ fúziós kombinációban nem volt alkalmas a rezisztens szülői protoplasztok teljes eliminálására, alkalmazásával jól reprodukálható dusitást értünk el a hibridekre. A kezelés legalább két nagyságrenddel emelte meg a hibridgyakoriságot a fúziós populációkban.

A hibrideket az albino répa fotoszintetikus funkciójának helyreállítása és a két szülő fejlődési hibáinak komplementálása alapján szelektáltuk növény szinten.

A nem szelektált marker CH rezisztencia, a hibridekben recesszív karaktert mutatott. A hibridnövényekből visszakalluszosítás után indított sejtkultúrákban a szenzitív A_1 szülőével megegyező CH érzékenységet detektáltunk. A 10 γ /ml CH-del végzett direkt szelekció eredménytelensége is a CH rezisztens jelleg recesszív voltát erősítette meg.

A CH rezisztens karakter genetikai természetét a 25-12-es hibrid sejtvonalból egy éves tenyésztés után, CH rezisztens és albino spontán szegregánsok szokatlan megjelenése bizonyítja. Az eddig szelektált szomatikus hibridnövények kromoszómaszámukat tekintve általában nagy stabilitást mutattak és bár a hibridek között nagy gyakorisággal fordultak elő aneuploid növények /Smith és mtsai, 1976; Melchers és mtsai, 1974; Schieder, 1977; 1978; Dudits és mtsai, 1977/, szülői fenotípusu szegregánsokat nem találtak. Intenzív kromoszómaszegregációval együttjáró instabilitást csak a *Nicotiana tabacum* x *Nicotiana knightiana* /Maliga és mtsai, 1978/, illetve a *Nicotiana sylvestris* x *Nicotiana knightiana* fúziós kombinációkban, valamint filogenetikailag távoli, egymással nem keresztezhető fajok sejthibridjeiben /Kao, 1977/ figyeltek meg. Fajon belüli szomatikus hibrideknél az általunk tapasztalt szegregációval együttjáró kromoszómális instabilitásra mindezideig nincsen példa.

Egymással keresztezhető, fajon belüli kategóriába eső szomatikus hibridek hosszú ideig sejtszuszpenziókultúrában fenntartott sejtvonalaról lévén szó, feltételezhető, hogy a szülői fenotípusu szegregánsok megjelenése a tenyésztett növényi sejtek között gyakori kromoszómális instabilitásnak tulajdonítható /Orton, 1980/, és nem citoplazmikus vagy nukleáris

inkompatibilitási okokra vezethető vissza. Ez utóbbi esetben már az elsődlegesen szelektált hibridkallusz, illetve növény populációban már várható lenne a kromoszómaszegregációval együttjáró fenotipusos variabilitás /Maliga és mtsai, 1978/.

Tekintve, hogy az A_1 sejtvonalban az albino fenotípus nukleáris mutáció következménye, a zöld hibridnövény populációban megjelenő albino szegregánsok feltehetően az albino mutációt komplementáló gént /géneket/ hordozó WCH kromoszóma /kromoszómák/ elvesztésének tulajdonítható. Az albino növények 30-34 közötti, tetraploid alatti kromoszómaszáma is ezt a feltevést támasztja alá. A CH rezisztens szegregánsok a rezisztens fenotípust kontrolláló gént /géneket/ hordozó A_1 genom eredetű kromoszómák elvesztésének következtében jelenhetnek meg a hibrid sejtpopulációban. Bár a szelektív körülmények között kinövő kolóniákban a kromoszómaszám jelentősen variál /30-100/, valószínű, hogy csak a tetraploid alatti /30-34/ kromoszómaszámu sejtek képesek a drog inaktívációjára, lehetőséget nyújtva a kolóniában lévő CH szenzitív sejtek túlélésére.

Egy differenciált funkció expresszióját reguláló mechanizmusnak a szomatikus sejthibridizáció módszerével való vizsgálatára az emlős sejtgenetikában számos példa van /Thompson és mtsai, 1971; Schneider és mtsai, 1971; Weiss és mtsai, 1971/. A differenciált funkciót expresszáló és nem expresszáló sejtek fúziójából származó, differenciált funkciójukat elvesztő

emlős sejthibridekhez hasonlóan, az $A_1 \times WCH$ fuzióból származó szomatikus hibridekben mi sem tudtuk detektálni a differenciált funkció CH rezisztencia megnyilvánulását. Az a tény, hogy a CH rezisztens fenotípus recesszíven viselkedik a hibridekben, erősen valószínűsíti, hogy a rezisztenciáért felelős gén/ek/ expressziója negatív kontroll alatt áll. Eredményeink jó megegyezést mutatnak Thompson /1971/, emlős szomatikus sejtekből származó heterokarionokban a differenciált funkció expressziójának negatív kontrollját bizonyító megfigyeléseivel.

A legegyszerűbb génregulációs modellt feltételezve /Jacob és Monod, 1961/, a vad répa tenyésztett sejtjeiben kell lennie egy diffuzibilis represszornak, amely a CH inaktivációjáért felelős enzimet /enzimeket/ kódoló gént vagy géneket represszálja. A differenciált növény sejtjeiben a represszor hiánya a CH rezisztens fenotípus expresszióját eredményezi. A WCH sejtvonalba a represszor mutációs megváltozása a CH^R gén/ek/ expressziójához vezet, amelynek eredményeképpen a rezisztens fenotípus dedifferenciált sejtszinten is képes megnyilvánulni. A hibridekben a vad típusu szülő A_1 által termelt diffuzibilis represszor a CH^R gének egyidejű represszióját eredményezve helyreállítja a vad típusu dedifferenciált sejtekre jellemző CH szenzitív fenotípust.

ÖSSZEFOGLALÁS

Daucus carota L. répában a cikloheximid rezisztens fenotípus öröklődő jelleg, amely differenciáció-függő expressziót mutat. Vad répában a rezisztens fenotípus csak differenciált sejtszinten, az embriogenezis torpedó stádiuma után nyilvánul meg, a dedifferenciált kalluszsejtek CH szenzitívek.

A vad répából izolált WCH sejtvonalban a CH rezisztens jelleg a fejlődési állapottól függetlenül mind a differenciált, mind a dedifferenciált sejtekben expresszálik. A rezisztencia alapja a drog inaktivációja. A WCH sejtkulturákban az inaktiváció konstitutív módon nyilvánul meg, nem igényel CH indukciót.

A CH rezisztens WCH répa és a CH szenzitív A_1 albino nukleáris mutációt hordozó *Daucus carota* L. *Nantesi* répa protoplaszt fúzióját követően szomatikus hibridnövényeket szelektáltunk. A hibridszelekció az albino partner fotoszintetikus funkciójának és a két szülő fejlődési defektjeinek komplementálása alapján történt a reguláris fejlődést

mutató zöld növényekre.

A fuziót megelőzően a WCH partner protoplaszt-populációjának jódacetamid kezeléssel végzett inaktivációja jól reprodukálható dúsítást eredményezett a hibridnövényekre. Az inaktivált protoplasztokkal végzett fuziós kísérletekben a szelektált hibridek száma legalább két nagyságrenddel meghaladta a kontroll populációjét.

A hibridnövényekből származó sejtszuspenziókultúrákban a nem szelektált marker CH rezisztencia recesszív jelleget mutatott; a tesztelt hibrid sejtvonalak mind CH szenzitívek voltak. A rezisztens karakter genetikai természetét a 25-12-es hibrid sejtvonalban egy éves tenyésztés után spontán megjelenő CH rezisztens szegregánsok bizonyították. A CH rezisztens jelleg recesszív természete erősen valószínűsíti, hogy a rezisztenciáért felelős gén/ek/expressziója negatív kontroll alatt áll.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Bennett, L.L., Smithers, D. and Ward, C.T. /1964/
Inhibition of DNA synthesis in mammalian cells by
actidione. Biochim. Biophys. Acta, 87, 60-69.
2. Carlson, P.S., Smith, H.H., Dearing, R.D. /1972/
Parasexual interspecific plant hybridisation.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 2292-2294.
3. Cocking, E.C., George, D., Price-Jones, M.J.,
Power, J.B. /1977/ Selection procedures for the
production of inter-species somatic hibrids of
Petunia hybrida and Petunia parodii II. Albino
complementation selection. Plant Sci. Letter,s
10, 7-12.
4. Campbell, J.A. and Birt, M.L. /1975/ The effect of
inhibitors in vivo on protein synthesis and the
amino acid pool in the sheep blowfly, Lucilia
cuprina. Biochem. J. 150, 227-234.
5. Chu, E.H.Y. /1974/ Induction and analysis of gene
mutations in cultured mammalian somatic cells.
Genetics, 78, 115-132.

6. Coddington, A. and Fluri, R. /1977/ Characterization of the ribosomal proteins from *Saccharomyces pombe* by two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. *Molec. gen. Genet.* 158, 93-100.
7. Cooper, D., Banthorpe, D.V. and Wilkie, D. /1967/ Modified ribosomes conferring resistance to cycloheximide in mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 26, 347-350.
8. Cooper, T.G. and Bossinger, T. /1976/ Selective inhibition of protein synthesis initiation in *Saccharomyces cerevisiae* by low concentrations of cycloheximide. *J. Biol. Chem.* 251, 7278-7280.
9. Criddle, R.S., Dau, B., Kleinkopf, G.E. and Huffaker, R.C. /1970/ Differential synthesis of ribulosediphosphate carboxylase subunits. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 41, 621-627.
10. Dudits, D., Hadlaczky, Gy., Lévi, É., Fejér, O., Haydu, Zs. and Lázár, G. /1977/ Somatic hybridisation of *Daucus carota* and *D. capillifolius* by protoplast fusion. *Theor. Appl. Gen.*, 51, 127-133.
11. Dudits, D., Hadlaczky, Gy., Bajszár, Gy., Koncz, Cs., Lázár, G. and Horváth, G. /1978/ Plant regeneration from intergeneric cell hybrids. *Plant. Sci. Letters*, 15 101-112.
12. Dudits, D., Koncz, Cs., Bajszár, Gy., Hadlaczky, Gy., Lázár, G. and Horváth, G. /1979/ Intergeneric transfer of nuclear markers through fusion between dividing and mitotically inactive plant protoplasts. In: *Proceedings of Symp. on plant tissue culture. Pavia.*

13. Ferenczy, L. /1976/ Some characteristics of intra and interspecific protoplast fusion products of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. In: Cell Genetics in Higher Plants, ed. D.Dudits, G.L.Farkas, P.Maliga, Budapest, Akadémiai Kiadó, 171-183.
14. Ford, J.H. and Leach, B.E. /1948/ Actidione, an antibiotic from *Streptomyces griseus*. J. Amer. chem. Soc. 70, 1223-1225.
15. Gábor, H.M. and Hotchkiss, R.D. /1979/ Parameters Governing bacterial regeneration and genetic recombination after fusion of *Bacillus subtilis* protoplasts. J. Bact. 137, 1346-1353.
16. Glimelius, K., Eriksson, T., Grafe, R. and Müller, A.J. /1978/ Somatic hybridisation of nitrate reductase deficient mutants of *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion. Physiol. Plant. 44, 273-277.
17. Gleba, Yu.Yu., Butenko, R.G. and Sytnyak, K.M. /1975/ Protoplast fusion and parasexual hybridisation in *Nicotiana tabacum* L. Genetika, 221, 1196-1198.
18. Gleba, Yu.Yu. /1978a/ Tobacco plants from single mesophyll protoplasts. Naturwissenschaften, 65, 158-159.
19. Gleba, Yu.Yu. /1978b/ Non chromosomal inheritance in higher plants as studied by somatic cell hybridisation. In: Plant Cell and Tissue culture - Principles and Applications /Ohio State University Press/.

20. Gresshoff, P.M. /1979/ Cycloheximide resistance in *Daucus carota* cell cultures. *Theor. Appl. Genet.* 54, 141-143.
21. Haugli, F.B., Dove, W.F. and Jimenez, A. /1972/ Genetics and Biochemistry of cycloheximide resistance in *Physarum polycephalum*. *Molec. gen. Genet.* 118, 97-107.
22. Hopwood, D.A. and Wright, H.M. /1978/ Bacterial protoplast fusion: Recombination in fused protoplasts of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. gen. Genet.* 162, 307-317.
23. Howe, H.B. and Terry, C.E. /1962/ Genetic studies of resistance to chemical agents in *Neurospora crassa*. *Can. J. genet. Cytol.* 4, 447-
24. Ibrahim. M.A.K. and Coddington, A. /1976/ Genetic studies on cycloheximide-resistant strains of *Schizosaccharomyces pombe*. *Heredity*, 37, 179-191.
25. Jimenez, A., Littlewood, B. and Davies, J. /1972/ Inhibition of protein synthesis in yeast. In: *Molecular Mechanism of Antibiotic Action on Protein Synthesis and Membranes* /eds. E.Munoz, F.Garcia-Fernandez and D.Vazquez/ Elsevier, Amsterdam, 292-306.
26. Kao, K.N. and Michayluk, M.R. /1974/ A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta*, 115, 355-367..

27. Kao, K.N. /1977/ Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soybean-Nicotiana glauca. Molec. gen. Genet. 150, 225-230.
28. Katz, E.R. and Sussman, M. /1972/ Parasexual recombination in Dictiostelium discoideum: selection of stable diploid heterozygotes and stable haploid segregants. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 495-498.
29. Kisilevsky, R. /1972/ The regulatory parameter of protein synthesis most affected by ethionine and cycloheximide. A comparison of computer and in vivo studies. Biochim. Biophys. Acta. 272, 463-472.
30. Kornfeld, E.C., Jones, R.G. and Parke, T.V. /1949/ The structure and chemistry of actidione, an antibiotic from Streptomyces griseus. J. Amer. chem. Soc. 71, 150-159.
31. Lin, S.-Y., Mosteller, R.D. and Hardesty, B. /1966/ The mechanism of sodium fluoride and cycloheximide inhibition of hemoglobin biosynthesis in the cell free reticulocyte system. J. Mol. Biol. 21, 51-69.
32. Littlefield, J.W. /1964/ The selection of hybrid mouse fibroblasts. Cold Spring Harbor Symp. Quan. Biol. 29, 161-166.

33. Maliga, P., Lázár, G., Sváb, Z. and Nagy, F.
/1976/ Transient cycloheximide resistance in tobacco cell line. Mol. gen. Genet. 149, 267-271.
34. Maliga, P., Lázár, G., Joó, F., Nagy, A.H. and Menczel, L. /1977/ Restoration of morphogenic potential in Nicotiana by somatic hybridisation. Mol. gen. Genet. 157, 291-296.
35. Maliga, P., Kiss, Zs., Nagy, A.H. and Lázár, G. /1978/ Genetic instability in somatic hybrids of Nicotiana tabacum and Nicotiana knightiana. Mol. gen. Genet. 163, 145-153.
36. Melchers, G. and Labib, G. /1974/ Somatic hybridisation of plants by fusion of protoplasts I. Selection of light resistant hybrids of "haploid" light sensitive varieties of tobacco. Mol. gen. Genet., 135, 277-294.
37. Melchers, G. /1977/ Microbial techniques in somatic hybridisation by fusion of protoplasts. International Cell Biology, 207-216.
38. Mendel, R.R. and Müller, A.J. /1978/ Reconstitution of NADH-nitrate reductase in vitro from nitrate reductase deficient Nicotiana tabacum mutants. Mol. gen. Genet. 161, 77-80.
39. Middlekauf, J.E., Mino, S., Yang, S.P., Lindegren, G. and Lindegren, C.C. /1957/ Gene control of resistance vs Sensitivity to actidione in Saccharomyces. Genetics, 59, 327-333.

40. Nehls, R. /1978/ The use of metabolic inhibitors for the selection of fusion products of higher plant protoplasts. *Molec. gen. Genet.* 166, 117-118.
41. Neuhauser, A., Klingmüller, W. and Kaudewitz, F. /1970/ Selektion actidion resistenter Mutanten bei *Neurospora crassa* sowie ihr genetische und biochemische Analyse. *Molec. gen. Genet.* 106, 180-194.
42. Oleinick, N.L. /1977/ Initiation and elongation of protein synthesis in growing cells: differential inhibition by cycloheximide and emetine. *Arch. Biochem. Biophys.* 182, 171-180.
43. Orton, T.J. /1980/ Chromosomal variability in tissue cultures and regenerated plants of *Hordeum*. *Theor. Appl. Genet.* 56, 101-112.
44. Peberdy, F.J. /1979/ Fungal protoplasts: isolation, reversion and fusion. *Ann. Rev. Microbiol.* 33, 21-39.
45. Pestka, S. /1971/ Inhibitors of ribosome functions. *Ann. Rev. Microbiol.* 25, 487-563.
46. Pongratz, M. and Klingmüller, W. /1973/ Role of ribosomes in cycloheximide resistance of *Neurospora* mutants. *Molec. gen. Genet.* 124, 359-363.
47. Power, J.B., Frearson, E.M., Hayward, C. and Cocking, E.C. /1975/ Some consequences of the fusion and selective culture of *Petunia* and *Parthenocissus* protoplasts. *Plant Sci. Letters*, 5, 197-207.

48. Power, J.B., Frearson, E.M., Hayward, C., George, D., Evans, P.K., Berry, S.F., Cocking, E.C. /1976/ Somatic hybridisation of *Petunia hybrida* and *P. parodii*. *Nature*, 263, 500-502.
49. Power, J.B., Berry, S.F., Fearson, E.M. and Cocking, E.C. /1977/ Selection procedures for the production of inter-species somatic hybrids of *Petunia hybrida* and *Petunia parodii*.
I. Nutrient media and drug sensitivity complementation selection. *Plant Sci. Letters*, 10, 1-6.
50. Power, J.B., Berry, S.F., Chapman, J.V. and Cocking, E.C. /1979/ Somatic hybrids between unilateral cross incompatible *Petunia* species. *Theor. Appl. Genet.* 55, 97-99.
51. Rajalakshmi, S., Liang, H., Sarma, D.S.R., Kisilevsky, R. and Farber, E. /1971/ Cycloheximide, an inhibitor of peptide chain termination or release in liver in vivo and in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42, 259-265.
52. Rao, S.S. and Grollman, A.P. /1967/ Cycloheximide resistance in yeast: a property of the 60S ribosomal subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29, 696-704.
53. Roberts, C.H.T. and Orias, E. /1973/ A cycloheximide resistant mutant of *Tetrahymena pyriformis*. *Exp. Cell. Res.* 81, 312-316.



54. Schieder, O. /1977/ Hybridisation experiments with protoplasts from chlorophyll- deficient mutants of some Solanaceous species. *Planta*, 137, 253-257.
55. Schieder, O. /1978/ Somatic hybrids of *Datura innoxia* Mill. + *Datura discolor* Bernh. and *Datura innoxia* Mill. + *Datura stramonium* L. var *tatula* L. I. Selection and characterization. *Mol. gen. Genet.* 162, 113-121.
56. Schieder, O. and Krumbingel, G. /1979/ Selection of somatic hybrids after fusion of protoplasts from *Datura innoxia* Mill. and *Atropa belladonna* L. *Planta*, 145, 371-375.
57. Schneider, J.A. and Weiss, M.C. /1971/ Expression of differentiated functions in hepatoma cell hybrids. I. Tyrosine aminotransferase in hepatoma-fibroblast hybrids. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 127-131.
58. Siegel, M.R. and Sisler, H.D. /1965/ Site of action of cycloheximide in cells of *Saccharomyces pastorianus*. II. Further studies on the mechanism of action and the mechanism of resistance in *Saccharomyces* species. *Biochim. Biophys. Acta.* 103, 558-567.
59. Smith, H.H., Kao, K.N. and Combatti, N.C. /1976/ Interspecific hybridisation by protoplast fusion in *Nicotiana*. *J. Heredity*, 67, 123-128.

60. Sung, Z.R. /1976/ Mutagenesis of cultured plant cells. *Genetics*, 84, 51-57.
61. Thompson, E.B. and Gelehrter, T.D. /1971/ Expression of tyrosine aminotransferase activity in somatic cell heterokaryons: evidence for negative control of enzyme expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 2589-2593.
62. Trakatellis, A.C., Montjar, M. and Axelrod, A.E. /1965/ *Biochemistry*, 4, 2065-2071.
63. Warr, J.R. and Roper, J.A. /1965/ Resistance to various inhibitors in *Aspergillus nidulans*. *J. gen. Microbiol.* 40, 273-281.
64. Wilkie, D. and Lee, B.K. /1965/ Genetic analysis of actidione resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genet. Res., Camb.* 6, 130-138.
65. Weiss, C.M. and Chaplain, M. /1971/ Expression of differentiated functions in hepatoma cell hybrids: Reappearance of tyrosine aminotransferase inducibility after the loss of chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 3026-3030.
66. Williamson, A.R. and Schweet, R. /1965/ Role of the genetic message in polyribosome function. *J. Mol. Biol.* 11, 358-372.
67. Whiffen, A.J., Bohonos, N. and Emerson, R.L. /1946/ The production of an antifungal antibiotic by *Streptomyces griseus*. *J. Bact.* 52, 610-611.

68. White, D.W.R. and Vasil, I.K. /1979/ Use of amino acid analogue resistant cell lines for selection of *Nicotiana sylvestris* somatic cell hybrids. Theor. Appl. Genet. 55, 107-112.
69. Wright, E.W. /1978/ The isolation of heterokaryons and hybrids by a selective system using irreversible biochemical inhibitors. Exp. Cell. Res. 112, 395-407.
70. Yang, N. and Scandalios, J.G. /1977/ Effects of cycloheximide and chloramphenicol on the synthesis of polypeptides found in three subcellular fractions of maize scutellum. Plant. Physiol. 59, 1067-1071.