

FEHÉRJESZINTÉZIS GÁTLÓK ÉS A TÁPTALAJ ÖSSZETÉ-
TELÉNEK HATÁSA DOHÁNY SZÖVETTENYÉSZETEKRE

egyetemi doktori értekezés

Készítette: Groma Gézáné

Lévi Éva

Készült: ELTE Növényélettani és a
JATE Biofizikai Tanszékén

S z e g e d

1981



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondok Dr. Maróti Mihály egyetemi tanárnak, hogy a témát számomra kijelölte, a szövettenyésztési kísérleteket figyelemmel kísérte, és támogatta. A növényélettani vizsgálatok feltételeinek biztosításáért Dr. Láng Ferenc docensnek és az ELTE Növényélettani Tanszék egész kollektívájának tartozom köszönettel.

A disszertáció megírásához adott segítségét Dr. Horváthné Dr. Mészáros Mária docensnek és Dr. Szalai Lászlónak a Biofizikai Tanszék vezetőjének köszönöm.



TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS	1
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
Az izolált tenyésztés célja és módszerei	4
Kallusz és szuszpenziós tenyészetek	5
Pollen eredetű haploid kulturák	7
Protoplaszt izolálása és tenyésztése	9
Sejtkulturák totipotenciája és embriógenézise, szelekciós rendszerek	10
A közeljövő várható kutatási témái: Információ átvitel a növényi sejtbe: genetikai transzformációk, szomatikus hibridizáció	12
A szövettenyészetek növényélettani és biokémiai vizsgálatairól általában	15
Citokininek vizsgálata	18
Fehérjék bioszintézisének gátlói: a puromicin és a kloramfenikol	22
Aktinomicin gátlás	23
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	26
Szövettenyésztési módszerek	26
Szövettenyésztésre felhasznált tápközegek	26
A tenyésztett dohány szövetvonalak jellemzése	29
Ujabb szövetvonalak indítása	31
Szuszpenziós kulturák létrehozása	31
A kísérletek kiértékelésénél alkalmazott módszerek	32
Sejtszám meghatározás	32
Száranyag tartalom meghatározás	32
A szövettenyészetek friss súly mérése	33
Növényélettani vizsgálatok	33
Egyszerre történő DNS, RNS és fehérje meghatározás	33
Peroxidáz-aktivitás fotometriás mérése	34

Ribonukleáz-aktivitás mérése	35
A ribonukleáz enzim részleges tisztítása	36
A ribonukleinsavak kivonása és vizsgálata	36
a./ Az RNS kivonása és tisztítása	36
b./ A tisztított RNS hidrolizise	38
c./ Hidrolizált RNS vékonyréteg kromatográfiája	38
A tápközegek hormonösszetételének változ- tatása	39
Gátlóanyagok alkalmazása	40
KISÉRLETEK ISMERTETÉSE ÉS MEGBESZÉLÉSE	42
Dohány szövetvonalak összehasonlító vizsgálata	42
Az 1. szövetvonal növekedése hormonhiányos tápközegeket alkalmazva. Organizációs lehetősé- ségek	47
DNS, RNS és fehérje meghatározás azonos mintából a tenyésztés 14. napján	55
A fehérjeszintézis gátlók hatása az 1. szövet- vonal növekedésére	59
Szuszpenziós kulturák kezelése fehérjeszintézis gátlókkal. Enzim aktivitás meghatározások a mintákból	71
A ribonukleáz enzim vizsgálata	76
Az RNS kivonása és tisztítása a kloramfenikol 10^{-6} M koncentrációjára rezisztens és a kontrol dohány szövetből	80
A tisztított RNS kivonatok hatása a szövet- tenyészetek növekedésére	81
A szövet növekedését serkentő ribonukleinsav kivonat vékonyréteg kromatográfiája	84
ÖSSZEFOGLALÁS	86
IRODALOMJEGYZÉK	89

B E V E Z E T É S

Az utóbbi években elért eredmények kétségtelenül bizonyították, hogy a növényi szövettenyésztés a növény-nemesítés és szaporítás sokat ígérő módszere. Az elképzeltések kibontakozása és a kísérleti eredmények gyakorlati felhasználása azonban nem minden növényfajra következett be oly robbanásszerűen, mint azt várták. Ez főként azzal magyarázható, hogy a szövettenyésztés sajátos anyagcsere folyamatainak a megismerése, a növekedés és fejlődés beindítása és szabályozása igen összetett alapkutatási feladat.

A szövettenyésztés módszere lehetőséget nyújt a hormonok hatásmódjának a feltárására, azon anyagcsere változások vizsgálatára, amelyek jellemzően kapcsolódnak a növény hormonhatásra adott válaszához. Egy adott szövettenyésztésekor a táptalaj összetételének és a tenyésztési feltételeknek az állandósítása meghatározott növekedési választ vált ki. A növekedési válasz analizálható az anyagcsere folyamatok különböző pontjain ható gátlóanyagokkal.

Jelen munkánkban a fehérjeszintézis gátlói közül a riboszóma működésére ható kloramfenikolt és puromicint használtuk fel az analóg szerkezet és riboszómális funkció alapján a kinetin hatás modellezésére. A kísérleteket dohány szövettenyésztéseken végeztük.

A tenyésztésben lévő dohány szövetvonalainak összehasonlító vizsgálatát követően kiválasztottuk a legjobb növekedést mutató szövetvonalat. Ezt használtuk fel a hormon és gátlóanyag tesztelésére. A dohányszövet magas gátló koncentrációval kezelt túlélő, valamint a gátlóhatásra túl érzékeny sejtpopulációinak a nyérése is célunk volt. A hosszú ideje tenyésztett szövetvonalra az organizációs képesség elvesztése volt jellemző, s mint ilyen, biokémiai jelzők, ún. markerek hordozója lehet. A biokémiai jelzők felhasználása a fúziós kísérleteket követő szelekció során jelentős a növénynemesítők számára.

A dohányszövettel a következő kísérleteket végeztük el:

- 1./ A tenyésztésben lévő szövetvonalak növekedésének a vizsgálata.
- 2./ Ujabb szövetvonalak indítása.
- 3./ Szuszpenziós tenyészetek létrehozása.
- 4./ Szilárd tápközeg hormon összetételének a változtatása: az optimális tenyésztési feltételek meghatározása.
- 5./ Optimális tenyésztési feltételek között tenyésztett dohányszövet kezelése fehérjeszintézis gátlókkal.
- 6./ Kísérletek túlérzékeny és rezisztens vonalak izolálására.

- 7./ Peroxidáz és nukleáz enzim aktivitásának mérése a kezelt és kontrol mintákban.
- 8./ Ribonukleinsavak kivonása, tisztítása és hidrolizise a kontrol és gátlóval kezelt mintákból.
- 9./ Az optimális összetételű tápközeghez adott RNS hidrolizátum hatása a dohányszövet növekedésére.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az izolált tenyésztés célja és módszerei

A növényélettan és a genetika a teljes növényt vizsgálta addig, míg meg nem fogalmazódott az izolált növényi részek, vagy akár egyetlen növényi sejt életben tarthatóságának a gondolata. Ennek az elképzelésnek a helyességét jó pár év elteltével, de teljesen igazolták: folyadékban tenyésztett növényi sejtből szuszpenziós tenyészetet hoztak létre. A mikrobiológia területéről átvett módszertani fogás széles teret nyitott a szövettenyésztés további fejlődésének is. Ekkor már több kutató kezdeményezését követően a tenyésztés főbb irányai is kirajzolódtak (Maróti, 1977): így az embrió-, a gyökér- és kallusztenyésztés, a hajtás, portok és pollen kultúrák. A szövettenyésztés különböző területeit a fejlődéstörténeti szempontokon túlmenően a nagy számú kísérleti eredmény rendszerezése és a gyakorlati alkalmazások eltérései miatt indokolt elkülöníteni.

A szövettenyésztés területeit viszont egymáshoz is kapcsolja az a tény, hogy a tenyésztés során egy lépésben kalluszt - differenciálatlan szövethalmazt - **nyerve, a kiindulási anyagtól szinte függetlenül** azonos tenyésztési módszerrel lehet dolgozni. Ma már közel 160 különböző növény családba tartozó növényfajból hoztak létre kalluszt, és sikeres embrió vagy hajtás képzésre



tudták készíteni, ily módon ismét teljes növényt nyerve.

Ujabb, a leirtakhoz kapcsolódó lehetőséget teremtett az a felismerés, hogy a növények testi és pollen sejtjeit a sejtfal leemésztése után un. protoplaszt állapotban elő lehet állítani. A sejtfal nélküli sejtek megfelelő körülmények között képesek egymással egyesülni, majd osztódni és új sejtfalat képezni. Ezt követően kallusz hozható létre, ami már a "klasszikus" szövettenyésztés módszereit alkalmazva elszaporítható, teljes növény képződése indukálható belőle.

Kallusz és szuszpenziós tenyészetek

A kallusz és szuszpenziós tenyészetek létrehozása és megtartása steril körülmények között történik. Az alaptápközeg a legtöbb növény esetében a Murashige és Skoog (1962), vagy a Linsmaier és Skoog (1965) által leirt tápközeg. Így a dohány esetében is többnyire ezeket használják. A Gamborg és munkatársai (1968) által leirt B-5 tápközeg pedig a szójánál hozott jó eredményeket. Más növényeknél ezek módosított változatait használják a kutatók. Az alapközeg tartalmaz ásványi sókat, szaharózt, vagy glükózt, mint szénforrást és valamint tiamint, inozitolt. A legtöbb tenyészet hormon igénye auxin és kinetin megfelelő vitamin,

nikotinsav és piridoxin háttérrel. A felsorolt anyagok különböző koncentrációikban és ezek variációi az alkalmazott tápközegek igen széles skáláját adják. A szilárd táptételre agart használnak. A táptalaj adott pH értékét puffer hatás biztosítja.

Az új tenyészetek létrehozása a teljes növény bármely részéből történhet. Az in vivo szöveti környezetéből kiszakított szövet darabot inokulumnak nevezük. Az inokulumok heterogenitása elsődlegesen az alkalmazott szövettípus heterogenitásától függ. Az elkalluszosítás hormon igényen alapján Yeoman (1970) négy alapvető növénycsoportot különített el: az elsőbe azok tartoznak, amelyek hormont nem igényelnek; a másodikba az auxint igénylők, a harmadikba a kinetin igényesek, míg a negyedikbe a két hormont megfelelő arányban igénylők kerültek. A kallusz fogalmán Dougall (1973) szerint egy tápközeg felszínén homogén masszaként növekedő sejteket értünk. Eredetét tekintve szárból, levélből, levélnyélből, a csucsi merisztémából, portok szövetből, vagy embrióból nyert kalluszt különböztethetünk meg.

Az inokulumon képződött kalluszt szilárd tápközegről folyadékba áttéve, és megfelelő módon rázattatva sejtekből és sejtaggregátumokból álló szuszpenziós tenyészet állítható elő. A leirtak viszonylag hosszú időtartamu (több hónap), és fajonként eltérő folyamatok.

Utolsó lépésként a nagyobb aggregátumoktól steril szűréssel megszabadulva homogén tenyészet állítható elő. Az így kapott tenyészetek rövid időtartamu szinkronizálása is megoldható feladat (Gibbs és Dougall, 1965). Steril szűréssel akár egyetlen sejt is kiválasztható, és indukálható a kallusz képzése (Dougall, 1973). A sejt osztódásait is nyomon tudjuk követni egy speciális tenyészedény felhasználásával a Jones és munkatársai (1960) szerint kidolgozott módon.

A tenyésztett szövetek bizonyos idő elteltével megkövetelik a környezetük regenerálását: a tápközeg frissre történő cseréjét, amit passzálásnak nevezünk. Ekkor kell elvégezni a növekvő szövetdarabok osztását, az öregedő részek eltávolítását. A szövetvonalak időről időre azonos táptalajon történő passzálása biztosítja, hogy a kísérletekhez megfelelő minőségű anyagokkal rendelkezzen a laboratórium.

Pollen eredetű haploid kulturák

Ez a módszer nagyszámu haploid növény előállítását teszi lehetővé a pollenből indukálható haploid növényke vagy kallusz képződésével. Jelentősége a genetikusok és növénynemesítők számára abban van,

hogy ily módon az indukált, recesszív mutációk könnyen izolálhatók. A kromoszómaszám megduplázata-
tásával pedig teljesen homozigóta vonal állítható
elő. A poliploid növényekből nyert vonalak azonban
nem igazi monoploidok, és így un. mutációs hézagok
(leakiness) jelentkeznek a másik genomban történő
duplikációkor, mint azt Carlson (1970) auxotrof
dohány mutánsoknál közölte.

Pollen eredetű haploid növényt elsőként *Datura*
*innoxia*ból állítottak elő. A haploid dohány létre-
hozásának a feltételeit Nitsch és Nitsch (1969)
állapították meg. A szerzők szerint csak két kritikus
faktor játszik szerepet a növényképzés indukációjában:
a pollen állapota és a tápközeg. Az alkalmas álla-
pot közvetlenül a mikrospóra magjának kettéosztódása
előtti időben van. A tápközegnek pedig ásványi sókat,
vasat és cukrot kell tartalmaznia. A mikrospóra kez-
deti osztódását követően a fejlődési állapotok álta-
lában analógok a normál embriógenézissel. A haploid
növény képződése kedvezően befolyásolható hőmérsékleti
sokkolással, valamint az embrióképző portokok homo-
genizátumának a tápközeghez való adásával. Más ese-
tekben először haploid kallusz képződik, és ebből
nyerhetők aztán növények. A haploid szövettenyésze-
teket kallusz és szuszpenziós kulturában egyaránt

lehet tenyésztetni, azonban a hosszú ideig történő tenyésztéskor számolni kell a ploiploidia szint változásával.

Protoplaszt izolálása és tenyésztése

Cocking (1972) szerint a protoplaszt fogalmán olyan sejteket értünk, amelyek sejtfalát mechanikai uton, vagy enzimatis emésztéssel eltávolították.

A protoplaszt izolálás több lehetőséget rejt magában: 1. a sejtek igen homogén populációját nyerhetjük; 2. a sejtfal hiánya lehetővé teszi a növényi sejtek egyesülését, az un. fuziót; 3. egyetlen protoplasztból több növény is nyerhető a kallusz állapoton keresztül.

A dohány protoplaszt sikeres osztódásait Vasil és Vasil (1972) figyelte meg 75 sejtes állapotig. A dohány Nagata és Takebe (1970, 1971) kísérleteinek is sikeres alanya volt.

A szomatikus hibridizáció a protoplaszt kutatás új kérdéseit hozta felszínre. Az első szomatikus hibridek vizsgálatait követően (Dudits, D. és mts. 1977) a protoplasztokból történő kromoszóma izolálás módszerét is kidolgozták (Malmberg és Greisbach 1980).

A jelenleg kibontakozó eredményekből úgy tűnik, hogy egyre közelebb kerülünk a különböző növényi fajok génjeinek kromoszómák által történő transzferéhez (Szabados és mts. 1981).

A protoplasztokat a növényi vírus kutatás terén is alkalmazzák, az itt felmerülő kérdések részben hasonlóak a növényi géntranszfer kérdéseihöz. A fő eltérés abban áll, hogy a vírus virulens állapotában a növényi sejtet nem csak saját felvételére, de az abban történő replikáció lefolytatására is készíti.

Sejtkulturák totipotenciája és embriógenézise, szelekciós rendszerek

Több kutató munkája bizonyította már, hogy egyetlen sejt vagy protoplaszt képes növényregenerációra, azaz totipotens. A növény regenerálódása hormonális szabályozás alatt áll, és a környezeti hatásokra is érzékeny. Kritikus szövettenyésztői feladat a szomatikus és ivari sejtekből történő indukció feltételeinek a megválasztása, és az indukciót kiváltó tényezők megismerése. A tenyésztés során a szelekciós rendszerek felhasználása többnyire megelőzi az embriógenézis folyamatát.



Az ezen a területen eddig elvégzett kísérletek a genetikai változásokhoz kapcsolódó élet-tani és biokémiai vizsgálatok voltak. Szelektált mutánsok vizsgálatát elsőként Carlson (1970) végezte el. Dohány tenyészetből auxotrof mutánst és aminosav analógokkal szemben rezisztenciát mutató vonalakat különített el. Heiner és Filner (1970) L-treoninnal szemben rezisztens, Maliga és mts. (1973) sztreptomycin és 5-brom-deoxiuridin rezisztens vonalakat állított elő haploid dohányból. Widholm (1972, 1976) DL-5-metil-triptofán rezisztens vonalában az L-triptofán szintje a kontrol-tizennyolcszorosa volt. A módszer a speciális aminosavak felhalmoztatását tenné lehetővé, így a gabonában a lizinét, a metioninét pedig a szójában. Az eljárás hiányossága csak annyi, hogy az aminosav-készletben történő felhalmozódás nem tevődik át egy az egyben a fehérje szintre, hanem az a C és N-metabolizmusán keresztül is csökken.

Bizonyos növényi betegségekkel szembeni rezisztencia kialakítása is célként szerepel a kallusz-tenyésztéskor. *Phytophthora parasitica* és dohány kallusz-kölcsönhatását vizsgálták. A szelektált rezisztens növényből előállított tenyészetekben a gomba nem volt

képes szaporodni, tehát a kallusz is rendelkezett rezisztenciával az adott tenyésztési körülmények között. A mikroplazma jelenléte és eliminációja a táptalaj összetételével befolyásolható volt.

Az alacsony molekulahúlyu antimikrobiális komponensek, a fitoalexinek a tenyésztő tápfolyadékban megtalálhatók. A szintézisek kiváltásában a mikróbák által termelt bizonyos metabolitok szerepét feltételezik, és de novo enzim szintézist is tudtak bizonyítani (Dixon és mts. 1981). A gomba hifa sejtfal komponenseivel, a kis molekulahúlyu cukorszarmazékokkal a protoplasztok agglutinálódását lehetett előidézni (Doke, Timiyama 1980). Ezek a tények újabb szelekciós rendszerek létrehozásához adnak lehetőséget, akár a protoplasztálást követő lépésben, akár a tenyésztés során.

A közeljövő várható kutatási témái: Információ átvitel a növényi sejtbe: genetikai transzformációk, szomatikus hibridizáció

Az eddig elvégzett vizsgálatok eredményeikkel elsősorban a lehetőségeket vázolták fel. Bendich és Filner (1971) borsó csiranövény és dohány kallusz *Pseudomonas DNS* felvételét vizsgálták. A borsó növényekből nyert kivonatban a felvett DNS részlegesen

lebontott formában volt jelen. Az esetleges beépülést nem vizsgálták. A dohány kallusz által felvett idegen nagy molekulásulýu DNS viszont a magfrakcióhoz kapcsolódva volt kimutatható.

Protoplasztok alkalmazásával több növény képes volt nagyobb mennyiségű *E. coli* DNS felvételére, amely felvétel polikationokkal serkenthető volt (Ohyama és mts, 1972). Davey és Cocking (1972) borsó protoplasztok *Rhizobium* felvételét közölték. A baktérium a sejtfal leemésztésekor volt jelen a tápközegben. Holstein és mts, (1973) szója és *Rhizobium* *in vitro* indukált szimbiózisát írták le. Carlson (1973) közlése szerint két T_3 bakteriofág-specifikus enzim szintézise volt kimutatható árpa protoplasztok T_3 bakteriofág fertőzését követően. Ez egyben azt is bizonyította, hogy a vírus DNS transzkripciós és transzlációs templátként egyaránt szerepelhet a fertőzött növényben. *E. coli* galaktóz és laktóz operonjának haploid paradicsom sejtbe történő átvitelét is közölték. A jelenséget transzgenózisnak nevezték el. A transzfer és az incorporáció módja pontosan máig sem ismert.

A kísérletek fő problémáit a genetikai információ átvitelekor annak "csomagolása" adja. Így a felvétel módja, a felvett anyagot lebontani készülő enzimek gátlása döntő tényező a kísérletek sikerében.

Az információ beépülése az eredeti genomba függ még a felvett és citoplazma szinten is megvédett anyag sejtmagban bekövetkező sorsától. Ez utóbbiról tudjuk a legkevesebbet.

A genom módosítás másik lehetőségét a szomatikus sejtfúziók jelentik. Melhers és Labib (1974) cikke részletesen foglalkozik a szomatikus sejtek fúziós lehetőségeivel. Amennyiben a szomatikus sejtek egyesülését követően a teljes genom átkerül a fuzionáló partnerba, ezt a szerzők "paraszekszuális hibridizációnak" nevezik. A fúzió után nyerhető növény mind a két szülő tulajdonságait hordozza. Az inkompatibilitási gátak azonban ma még jelentősen leszűkítik a hibridizációs partnerek számát. Fúzió során az alkalmas partnerek és körülmények megválasztása, a fúziós frekvencia egy kivánt szintre való növelése az első feladat. Ezt követi az ön-fúziós sejtek eltávolítása a paraszekszuális hibridek közül, valamely szelekciós rendszer alkalmazásával. A módosított genommal rendelkező sejtpopuláció tenyésztése és organizáltatásával növények nyerése az utolsó lépés.

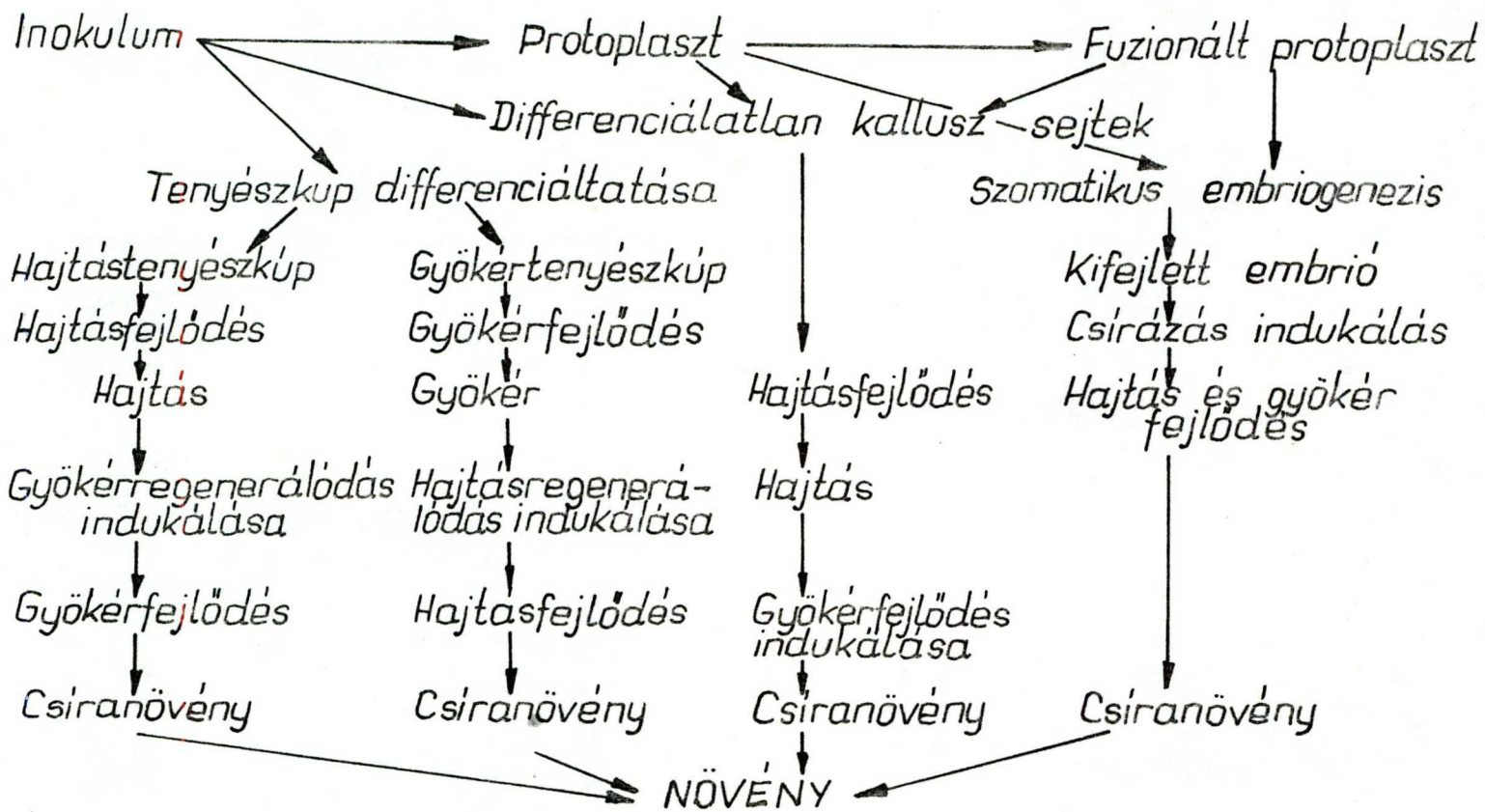
Az első szomatikus hibridek nyerését és vizsgálatát követően (Dudits és mts, 1977) ma a protoplaszt kromoszóma felvételét és annak további sorsát vizsgálják a kutatók.

Ezen a téma területen meg kell még említenünk Gamborg (1977) összefoglalóját, mint ma már alapvetőnek számító cikket.

A szövettenyészetek növényélettani és biokémiai vizsgálatáról általában

A szövettenyészetekkel elért eredmények felvetik a "Mi és hogyan történt?" kérdését. A válasz pedig nem is olyan egyszerű. Tekintsünk az első ábrára, melyen összefoglaltuk a szövettenyésztés lehetséges lépéseit, és képzeljük magunk elé az intermedier anyagcsere utakat: a vizsgálati lehetőségek száma óriási, még akkor is, ha az ábráról csak egyetlen kis nyilat választunk is ki.

A szövettenyészeteken elvégzett növényélettani és biokémiai vizsgálatok során a teljes növényen, vagy izolált szerveken végzett kísérletek módszereit veszik át, amennyiben szükséges kellő módosítással. A szuszpenzióban osztódó sejtek azonos fiziológiai állapota, a tenyészetek szinkronizáltsága elengedhetetlen az izotópos vizsgálatok (Berlin és Widholm, 1978), de egy egyszerű gél elektroforetikus fehérje profil elkészítése, vagy az izoenzim vizsgálatok során is. Már a hatvanas években elvégezték a dohány levél oldható fehérjéinek, a peroxidázainak, eszterázainak,



1 ábra: A szövettenyésztés lehetséges útjai a teljes növény előállításáig.

és leucin-aminopeptidázainak vizsgálatát (Hart és Bhatia, 1967). A szomatikus hibridek jellemzősekor ezt a módszert használták fel a kutatók. Szója- dohány hibridek esetében az alkohol-dehidrogenáz és az aszpartát-aminotranszferáz profillal jellemezték a fúziós partnereket és a szomatikus hibridet (Wetter, 1977). E témakörbe tartoznak az albinó és klorofill hiányos mutánsokat, mint a sejt-fúziós kísérletek alanyait jellemző vizsgálatok is (Szilágyi, Nagy 1977).

A dohány levél és kallusz ribonukleinsavainak összehasonlító vizsgálatát Van Sittert és mts már 1975-ben elvégezték. A kalluszban magasabb turn over-t tapasztaltak, mint a levélben. A kallusz RNS-ek viszonylag alacsony poli-A tartalommal rendelkeztek. A szerzők kimutattak olyan ribonukleinsavakat, melyek egyáltalán nem rendelkeztek intramolekuláris poli-A résszel. A tumoros szövet eltérő RNS profilu volt: igen magas poli-A tartalommal rendelkezett, és ez intenzív izotópos jelölődést mutatott. A szerzők az RN-áz rezisztens szekvenciákban is intenzív jelölődést mutattak ki, és több hasonló eredményre is hivatkoztak cikkükben.

A tenyésztett szövetek nukleinsavainak vizsgálata napjaink időszerű kérdése, és jelenlegi tudásunk szerint közvetlenül, de még nem egyértelműen tisztázott módon kapcsolódik a citokininek által történő hormonális szabályozáshoz.



Citokininek vizsgálata

A citokininek széles morfogenetikai és élet-tani hatása vált már ismertté napjainkig. Az eredmények egyértelműen bizonyították, hogy az RNS- és fehérjeszintézis folyamatának serkentésére képes a sejtmagban, és a sejten belül a sejtorganelleumok működését is befolyásolja. A kloroplasztiszokra kifejtett hatása a hetvenes években mind ismertebbé vált. A klorofill szintézis, a fotoszintetikus enzimek szintézisének normális lefolyása igényli az endogén citokininek jelenlétét. A levelek öregedési folyamatának citokinin gátlása is bizonyítást nyert. Feierabend (1970) kísérlete alapján a fotoszintézis főbb enzimeire, így a karboxi-dizmutázra, a NADP^+ -függő glicerin-aldehid-dehidrogenázra, a transzketolázra és a ribofoszfát-izomerázra fejt ki a hormon szintézisüket indukáló hatást.

A dohány szövetkulturák optimális citokinin koncentráció mellett a normális ütemű növekedéshez auxint és tiamint is igényelnek. Magas citokinin tartalmu tápközegek esetében azonban a tiamin elhagyható, mert szintézise megtörténik (Dravniecks és mts, 1969). A nukleázokra *in vivo* gátló hatást képesek kifejteni. A xantin-oxidázok működésének a befolyáso-

lásával fontos szerepet játszó vegyületek szintézisét befolyásolják (Henderson és mts, 1962).

Dohányból kivont tRNS esetében bizonyították, hogy a citokininek jelenlétében magasabb a tRNS metiláltsági foka, valamint kifejezettebb az aminosav kötő képesség is (Abbels és mts, 1972). A citokinin kezelést követően a tRNS fajták aránya is megváltozik.

A felgyülemelő ismeretanyag ellenére a citokininek elsődleges hatáspontja még ma sem tisztázott teljesen, de a hetvenes évektől kezdődően a probléma mind jobban a molekuláris biológia tRNS kutatásainak témakörébe kapcsolódott.

Szövetkulturában az endogén citokinin szintet és annak szintézisét adenin és mevalonsav adásával kedvezően tudták befolyásolni (Van Staden, 1979). A növényi szövetekből kinyert aktiv citokininek, valamint az inaktív szubsztituált adenin származékok gáz-folyadék kromatográfiája, tömegspektrofotometriálása és magas nyomású folyadék kromatográfiája igen hatékony vizsgálati módszerként lépett előtérbe az utóbbi néhány évben. Oszlopkromatográfiás frakcionálással pedig a szövettenyésztésben is felhasználható mennyiségben juthatunk citokininekhez (Hutton, Van Staden, 1981).

Folyamatos tenyésztésben lévő szuszpenziós kulturák esetében a citokininek transzlációban betöltött szerepét, a G_2 során a fehérjeszintézisre, valamint a G_2 -ből mitózisba történő átlépéskor kifejtett hatását bizonyították (Wang és mts, 1981). Az egyes növényfajok között a sejtosztódási ciklusra kifejtett hatásban eltérés van, így például a répa kultúra G_1 , míg a platán S fázisba kerül a hormon megvonást követően. A hormonhiány általában S fázisban tartja a sejteket (Nishi és mts, 1977). A leirtak alapján hasznos lehet a citokinin-függő sejtvonalak alkalmazása ezekben a vizsgálatokban. Véleményünk szerint a speciális enzimek, valamint más regulátorok hiánya, amelyek a G_1/S és a G_2/M átmenethez lennének szükségesek, a fehérjeszintézis gátlók alkalmazásával is modellezhetők.

Mivel a puromicin szerkezete nagy hasonlóságot mutat a tRNS-3' végének adeninjével, ha az aminoszilárdulva van, igen kézenfekvő volt e gátló alkalmazása kísérleteinkben, citokinin-függő tenyészeteket alkalmazva. Ugyanis az egyik citokininként ismert növényi minor bázis az IPA (6-izopentenil-aminopurin) is közvetlenül az antikodon mellett helyezkedik el a szerint-tRNS-nél (Hess, 1979). Egyfelől így biztosítja az antikodin rákapcsolódást az mRNS kodonjára, más-

másfelől a tRNS-ek lebontását követően, mint citokinin hatású regulátornak lehet szerepe.

Ma már általánosan elfogadottnak látszik egy citokinin hatásmódról alkotott hipotézis (Smith, 1977), bár a nukleázokkal foglalkozók körében vannak még ellenvetések. A hipotézis mellett szólnak a következők: A prekuzorként adott IPA nem épül be a tRNS-be. A tRNS érése során jön létre mevalonsavból az izopentenil csoport. Továbbá más citokinin hatású anyagokról is bizonyították, hogy nincs szerepük a tRNS szintézisben. Cherry és Anderson (1971) szerint a tRNS hasításakor felszabaduló citokinin hatású minorok specifikus nukleázokra fejtik ki hatásukat. A megállapítást támogatják Maab és Klämbt (1981) eredményei is. A szerzők ^{14}C -adenin kezelést követően 1/70 arányban mutatták ki a tRNS-be történő beépülést, és ez az IPA-ban volt lokalizálható. A tRNS-ek felezési idejét 65-70 órában állapították meg. A jelölt oligonukleotidok felezési ideje 8 óra körüli érték volt. Erison és Fox (1981) a 80 S natív riboszómában és a citoplazmában kötetlen állapotban lévő fehérjét tisztított meg és karakterizált. A fehérje a citokinin aktivitású 6-szubsztituált purinok megkötésére is képes. A szerzők esetleges nukleáz aktivitásról nem tesznek említést. Az azonban

igen valószínű, hogy más fehérjével, vagy fehérjével kerül kapcsolatba az IPA, mint a tRNS része a transláció folyamán, és megint másokkal a molekula szállítása és lebontódása során. Az említett szerzők a citokinin-kötő fehérjét a riboszómával hozták kapcsolatba, de említették az esetleges hormon receptor szerepét is.

Fehérjék bioszintézisének gátlói: a puromicin és a kloramfenikol

A növényélettani kísérletekben a fehérjék bioszintézisének lépéseit gátló két leggyakrabban használt kémiai ágens a puromicin és a kloramfenikol. Ezek a gátlók a fehérjeszintézis "riboszomális lépésekor" hatnak. A puromicin szerkezete nagy hasonlóságot mutat a tRNS-3' végének adeninjével, ha az aminoacilálva van. A vegyület hatásmódja is alapvetően ezzel magyarázható: a puromicin képes kapcsolódni az 50, illetve a 60 S riboszóma alegység aminoacil-affin helyéhez, és így képes kölcsönhatásba lépni a peptidil-tRNS-sel. Az így kialakult konfiguráció azonban nem képes kapcsolódni a peptidil-transzferáz központtal. Bizonyos szempontból a kloramfenikol is hasonlóan hat, mint a puromicin. Az aminoacil-affin helyhez kötődik, de a peptidil-tRNS-sel nem képes kapcsolódni. A kloramfenikol

csak az 50 S riboszóma alegységgel lép kölcsönhatásba. Baktériumok és sejtorganellumok fehérjeszintézisét gátolja, ugyanakkor számos növényélettani hatása is ismert.

Steril szövettenyészetekben a kloramfenikol meghatározott koncentrációját szokták alkalmazni a tápoldatok elő-inkubálására. Felhasználásakor 10^{-3} M-os koncentrációban alkalmazva már számolni kell mutagén hatásával. Ez utóbbi a lapos policiklikus molekulák közbeékelődésével és alkilezéssel a véglegesen DNS-hez történő kötődésükkel magyarázható. Növényélettani hatásai közül a plasztisz képződés gátlása már régen ismert, sőt az is, hogy a plasztisz riboszómák érzékenyebbek kloramfenikollal szemben, mint a plazma riboszómái.

Aktinomicin gátlás

Az aktinomicin polimeráz gátló, a magasabbrendű szervezetekben és baktériumokban egyaránt hatékony. Kölcsönhatása közvetlen a DNS-el, a gátló nem hat a polimeráz DNS-hez való kötődésére. A fehérjeszintézist nem gátolja akkor, ha a DNS helyett az RNS szolgál templátul, például az RNS vírusok esetében. A denaturált DNS-re in vivo kevésbé hatékony.

Az élő végleges DNS strukturája a gátlás hatékonyságára meghatározó jellegű. A gátló kromofor csoportja a DNS duplexbe képes beékelődni. A policiklikus molekulák közbeékelődésén keresztül más molekulák véglegesen is kapcsolódhatnak apozícióban a lánc-hoz, alkilezés révén. Ezt a gátlót azért választottuk kísérleteink alanyául, mert nem szerepelhet hatásában citokinin analóggként a transzláció folyamatában. Magas koncentrációban alkalmazott kloramfenikol esetében a két gátló támadáspontja azonban azonos.

Mivel dolgozatunk célja egy igen hosszú ideje tenyésztett dohány szövetvonal összehasonlító vizsgálata volt, és a téma gyér irodalommal rendelkezik, összefoglaló áttekintést adtunk a szövettenyésztés módszereiről. Ebben a részben tisztáztunk bizonyos fogalmakat, módszertani fogásokat. Az irodalmi anyag összeállításánál "dohány centrikus" szemléletünk mellett célunk volt egy jellemző kép adása a kísérletek mai állásáról és a kirajzolódó további lehetőségekről. Befejezésül pedig a citokininekről és a kísérleteinkben felhasznált gátlókról irtunk a kísérleti beállításaink logikai vázát adva.

Kísérleteinkben a citokininek élettani hatását vizsgálva a következő kérdésekre kerestük a választ:



1. Eltérőek-e az általunk tenyésztett szövetvonalak a citokinin érzékenység tekintetében?
2. Kimutatható-e ribonukleáz aktivitásban különbség a vonalak között?
3. Az izolált tRNS-ek mennyire emészthetők a részlegesen tisztított nukleázokkal?
4. Milyen a nukleotid profil az egyes vonalaknál, gátlók hatására milyen változás észlelhető?
5. A tRNS preparátumunk hidrolizátuma rendelkezik-e növekedést serkentő hatással?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Szövettenyésztési módszerek

Szövettenyésztésre felhasznált tápközegek

A kísérletek egy részében felhasznált különböző összetételű tápközegek alapja a Murashige és Skoog által 1962-ben dohány tenyésztésére leírt táptalaj volt. A kísérletek más csoportjaiban pedig a Gamborg és Miller (1968) által szója gyökér tenyésztésére leírt tápközegét alkalmaztuk bizonyos módosításokkal. A táptalajok pH = 5.8 értékét NaOH 0.1 N oldatával állítottuk be autóklávozás előtt. A sterilizálás ideje 45 perc volt 120 C^o-on. A hatóanyagokat (hormonok, bomló vitaminok, gátlóanyagok) a még meg nem dermedt agaros táphoz szűrtük Millipor szűrőn steril fülkében.

Alkalmazott tápközegek:

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

NH ₄ NO ₃	1650 mg/l
KNO ₃	1900 mg/l
CaCl ₂	440 mg/l

MgSO ₄	370 mg/l
KH ₂ PO ₄	170 mg/l
Fe-Na-EDTA t.o.	3 ml
H ₃ BO ₃	6,2 mg/l
MnSO ₄	22,3 mg/l
ZnSO ₄	8,6 mg/l
KJ	0,83 mg/l
A-Z t.o.	0,5 ml/l
Glicin	2,0 mg/l
IES	2,0 mg/l
Kinetin	0,2 mg/l
Gibberellin	1,0 mg/l
Mezo-inozitol	100,0 mg/l
Nikotinsav	0,5 mg/l
Aneurin	0,1 mg/l
Piridoxin	0,5 mg/l
Szaharóz	30,0 g/l
Agar (por)	5-6 g/l
pH = 4,8 - 5,2	

A-Z Hoagland törzsoldat összetétele

H ₃ BO ₃	0,550 g/l
MnCl ₂	0,350 g/l
CuSO ₄	0,050 g/l
ZnSO ₄	0,050 g/l
Al ₂ /SO ₄ /3	0,050 g/l

NiSO ₄	0,050 g/l
Co/NO ₃ / ₂	0,050 g/l
TiO ₂	0,050 g/l
LiCl	0,025 g/l
SuCl ₂	0,025 g/l
KJ	0,025 g/l
KBr	0,025 g/l

Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ohyama, K.: Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells Exp. Cell. Res. 50, 151-158, 1968.

NH ₄ NO ₃	1000,00 mg/l
KNO ₃	1000,00 mg/l
KCl	65,00 mg/l
Ca/NO ₃ / ₂	260,00 mg/l
/NH ₄ / ₂ SO ₄	200,00 mg/l
NaH ₂ PO ₄	165,00 mg/l
MgSO ₄	360,00 mg/l
MnSO ₄	5,00 mg/l
ZnSO ₄	3,00 mg/l
H ₃ BO ₃	3,00 mg/l
NaMoO ₄	0,25 mg/l
CuSO ₄	0,25 mg/l
CoCl ₂	0,25 ml/l
Fe-Na-EDTA	5,00 ml/l
Nikotinsav	5,00 mg/l
Aneurin	10,00 mg/l

Piridoxin	1,00 mg/l
Ca-pantotenat	0,25 mg/l
Aszkorbinsav	10,00 mg/l
Meso-inozitol	100,00 mg/l
Glicin	10,00 mg/l
L-Glutamin	50,00 mg/l
Kasein	250 mg/l (helyette aminisol 25 ml/l)
2,4-D	0,44 mg/l
Agar	6,00 g/l
Szaharoz	20,00 g/l
pH = 4,8 - 5,2	

A tenyésztett dohány szövetvonalak jellemzése

Szövetvonal alatt az azonos eredetű és egy adott összetételű tápközegen növekedő kalluszt értjük. Passzáláskor és a kísérletekhez esetenként 250 ± 5 mg apikális szövetrészt mértünk ki sterilén, torziós mérleget alkalmazva. 50 ml tápközegre centrálisan, kissé az agarba mélyesztve helyeztük el az inokulumokat.

Az 1. jelzésű dohányvonal izolálása *Nicotiana tabacum* szárból közel 15 éve történt, és azóta folyamatos a passzálása. A kallusz homogén megjelenésű, halvány sárga színű. Kulturában tartása alatt organizációt nem mutatott. A törzsanyag fenntartása

Murashige, Skoog (1962) által leirt tápközegben folyik.

A 2. jelzésű szövetvonal *Nicotiana tabacum* Wisconsin-38-ből származik, portok eredetű, és két éve állt folyamatos passzálás alatt. A kallusz-képzés indukciója a Gamborg, Miller, Ohyama (1968) által leirt tápközegen történt. Ezen a tápközegen organizációt nem mutat a viszonylag nagy viztartalmu hófehér szövet. Öregedéskor intenzív elbarnulás látható a tápközeggel érintkező zónából kiindulva.

A 3. jelzésű szövetvonal *Nicotiana silvestris* portok eredetű, és két éve állt folyamatos passzálás alatt. A 2. szövetvonallal azonos körülmények között tartva tömött, fehér színű, organizációt nem mutató kalluszt képez.

A szövetvonalakat sötétben és fényen, 25 ± 2 C^o-on tartottuk. A megvilágítást 16/8 órás fény/sötét periódusban fénycsövekkel biztosítottuk 120 W/m^2 fényerősséggel /Tungsram 20 WF. 33-White és Orion 20 WF. 7-Day light/.

A tenyésztés során a Maróti (1971) által leirt módszertani fogásokat alkalmaztuk.

Ujabb szövetvonalak indítása

Az 1. jelzésű dohányvonalból egy 4. jelzésű szövetvonalat is előállítottunk a Gamborg, Miller, Ohyama (1968) féle tápközegre oltással. Az 5. és a 6. jelzésű szövetvonalat Murashige és Skoog (1962) által leírt tápközeg alkalmazásával állítottuk elő a 2. és 3. jelzésű vonalból.

A tenyészetek minden vonalából, sötétben 22 C^o-on, ugynevezett törzsanyagot tartottunk fenn. Az átoltásokat 4 hónapig kéthetente, majd ezt követően havonta végeztük. Ekkor a kísérletekhez 34 napja tenyésztésben lévő szövetek apikális 250₊₅ mg-ját mértük ki sterilén egy-egy lombikba, amely 50 ml agaros tápot tartalmazott. Más kísérleti beállításban 14 napos szövet 200₊₅ mg-nyi mennyiségét használtuk fel.

Szuszpenziós kulturák létrehozása

A 14 napig tenyésztett szövetvonalak 300-300 mg-ját Wasserman csövekben a megfelelő agarhiányos, folyékony tápoldatba helyeztük, és Vibroterm rázó-készülékkel a legkisebb fordulaton rázattuk. A szét-rázott szöveteket többrétegű gézen átszűrtük, majd

200 ml-es Erlenmayer lombikok 50 ml-nyi tápközegébe oltottuk. A munkát steril körülmények között, oltófülkében végeztük. Az így nyert szuszpenziókat 150 mg friss súly/50 ml tápoldat sűrűségűre állítottuk be. A rázatást horizontális New-Brunswick G-25-ös készülékkel végeztük (1300 rpm).

A tenyészetek sejteket és kis aggregátumokat tartalmaztak, amelyek közül a legnagyobb sem haladta meg az 50 sejtes állapotot. A tenyészetek fertőzőességeségét mikroszkóppal ellenőriztük.

A kísérletek kiértékelésénél alkalmazott módszerek

Sejtszám meghatározás

A meghatározáskor ismert mennyiségű szövetet rázattunk szét adott térfogatu 5 %-os krómsavval, majd ekvivalens luggal közömbösítettük. Az így nyert szuszpenzió további károsodás nélkül jégsekényben eltartható volt. A számlálást Bürker kamrában végeztük, háromszori ismétlésben. A sejtszámot lg szövetre vonatkoztatva adtuk meg.

Szárazanyag tartalom meghatározás

100 mg súlyu szövet mintát 8 óráig 100 C^o-on, majd egy napon át 60 C^o-on szárítottuk és ezután mér-

tük a súlyát. Az eredményt a száraz súly friss súlyra vonatkoztatott %-ában adtuk meg.

A szövettenyészetek friss súly mérése.

A napi növekedés és a relatív növekedés értékeinek számítása.

Növényélettani vizsgálatok

Egyszerre történő DNS, RNS és fehérje meghatározás

Az alkalmazott eljárást Pilet és Braun (1967) módszerének módosításával dolgoztuk ki. Potterrel 3 ml TCA-acetonban esetenként 750 mg szövetet homogenizáltunk el, jégben hűtve. A homogenizátumot Janetzki centrifugán 800 rpm fordulaton 15 percig centrifugáltuk. A felüluszt elöntve a csapadékot egyszer hűtött 3 ml TCA-acetonnal, majd kétszer 0,2 N perklórsavval mostuk. Ezután a csapadékot 4 ml 0,4 N NaOH-dal 37 C^o-on 24 órán át hidrolizáltuk. A hidrolizist 1,5 ml 1,5 N perklórsavval állítottuk le, és a mintákat 1 órára 0 C^o-ra helyeztük. 20 percig 8000 rpm-el centrifugáltuk. Az ekkor kapott felüluszt adta az RNS I frakciót. A csapadékot 2 ml 0,2 N perklórsavas mosás után centrifugáltuk. A viz-

tiszta felüluszó adta az RNS II frakciót. A két frakciót egyesítve a ribóz tartalom orcin reakcióval történő meghatározását végeztük el. Az RNS tartalmat kalibrációs görbéről leolvasva kaptuk.

A visszamaradt csapadékot 3,0 ml 0,5 N perklórsavval 70 °C-on hidrolizáltuk, majd lecentrifugáltuk. A felüluszóból DNS meghatározást végeztünk ecetsavas difenilaminnal, a dezoxiribóz tartalom alapján. A DNS tartalmat kalibrációs görbéről olvastuk le.

A visszamaradt csapadékot 3 ml 0,1 N NaOH-dal főztük 15 percig, lehülés után centrifugáltuk. A minták fehérje tartalmát Folin-reagenssel, az aromás aminosavak reakciója alapján határoztuk meg. A kapott eredményeket µg/1000 mg friss szövetsúly értékben fejeztük ki.

Peroxidáz-aktivitás fotometriás mérése

A meghatározáshoz esetenként 200 mg friss szövetet használtunk fel. A lehűtött mintákat pH = 6,0-os, 0,01 M-os foszfát pufferben elpotteroltuk, majd 8000 rpm fordulaton 25 percig centrifugáltuk. A meghatározás kúvetta reakcióval történt. Az optikai denzitás változását 420 nm-en mértük. A reakcióelegy összetétele a következő volt: 1,9 ml foszfát puffer, 1,0 ml 0,2 %-os H₂O₂, 1,0 ml 0,1 %-os guajakol, valamint

a reakció indítását adó 0,1 ml enzim kivonat. Az enzim aktivitást $\Delta OD_{420}/g$ friss súly x perc értékben adtuk meg.

Ribonukleáz-aktivitás mérése

Az enzim vizsgálatát elsődleges (crude) kivonatokból végeztük Udvardy (1967) szerint. A meghatározásokhoz esetenként 500 mg szövetmintát használtunk fel. Az anyagot hűtve potteroltuk 0,05 M Tris-HCl pH = 7,5 oldattal. A szövetminták intenzív peroxidáz aktivitását észlelve bizonyos szövetek vagy kezelések esetében a kivonó puffert 0,1% aszkorbinsavval, 0,1% ciszteinnel és 0,5 M szaharózzal egészítettük ki. A kivonatokat 0 °C-on 16000 g-vel 20 percig centrifugáltuk. Az enzimreakcióhoz 0,2 ml kivonatot használtunk fel. Szubsztrátként 2,5 mg/ml élesztő RNS-t, illetve részlegesen tisztított, magából a dohány szövetmintákból kivont RNS-t használtunk. A reakciók végtérfogata 3 ml volt, az inkubációs idő 1 óra, 37 °C-os termosztátban. A reakciót mélyhűtőből kivett cCHCl-alkohol 1:3 arányu oldatának 1,6 ml-ével állítottuk le. A csapadékot két órai állás után vizzisztára centrifugáltuk, és a felülusztót megfelelő hígítás után spektrofotométertünk 260 nm-en (Unicam spektrofotométer). A savoldható reakciótermékek elnyelése alapján 0,1 OD változást tekintetünk egy enzim aktivitási egységének. A viszonyítási alapot a 0-idő minták képezték.



A ribonukleáz enzim részleges tisztítása

Az enzim kivonásához 14 napig azonos körülmények között tenyésztett szövetminták 10 g-ját használtuk fel. A kivonó 0,05 M pH = 7,5 Tris-HCl puffer volt. A feltárást 1:3 arányban, jeges vízben hűtve, potterolással végeztük. Az így nyert kivonat sejtmენტességét mikroszkóppal ellenőriztük. A részleges tisztítást Udvardy és mts. (1967) szerint végeztük, $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ -os kicsapást követően Sephadex G-100 oszlopon való tisztítást alkalmaztunk. Az aktív frakciókat egyesítve szaharóz hozzáadásával liofilizáltuk az enzimet és azt mélyhűtőben tároltuk.

Ribonukleinsavak kivonása és vizsgálata

a. / Az RNS kivonása és tisztítása

A gátlókkal kezelt és a kezeletlen, 14 napon át növekedett kalluszokat Kirby (1968) fenolos módszere alapján tártuk fel. A kivonó frissen desztillált fenolvíz 0,3% dietilpirokarbonát tartalmu egy-egy arányu elegye volt. A homogenizálást Waring Lab. Blendor 5BA. 60 VL 35A típusu homogenizátorral, megszakításokkal 5 percig végeztük. Esetenként 500 g szövetet 1500 ml térfogatban homogenizáltunk el, majd kétrétegű steril gézen átszűrtük. A fázisok szétválasztása hűtve centrifugálással történt: 4 C^o, Janetzky K-70, 3000 ford/perc.

A vizes fázisból a nukleinsavat 0,1 térfogat kálium-acetátot tartalmazó két és fél térfogatnyi 96%-os etanollal csaptuk ki pH = 5.0 értékben. Ezután a csapadékot a teljes kiválásig -20 C° -on tároltuk. Ismételtén centrifugáltuk 30 percig 2500 fordulaton. A csapadékot 150 ml-re oldottuk 0,3 M-os NaCl-ban, majd szelektive kicsaptuk a nukleinsavakat 30 ml 0,3 M-os NaCl-ban oldott 5 %-os cetavlonnal. A csapadék kialakulása 4 C° -on 30 perc alatt megtörtént. A csapadékot 30 percig 2500 fordulat/perc értékben centrifugáltuk. A csapadékot 100 ml 0,3 M-os NaCl-ban oldott cetavlonnal mostuk, majd újra centrifugáltuk és háromszor mostuk hűtött steril desztillált vízzel. A csapadékot 96 %-os 50 C° hőmérsékletű etanollal kevertük el, és 15 percig ezen a hőmérsékleten tartottuk vízfürdőben, a maradék fenol és fehérje szennyezés kicsapása céljából. Lecentrifugáltuk, és a felüluszóhoz 0,5 térfogatnyi 2 M-os NaCl-ot adtunk, a nukleinsavak Na-sóját képeztetve. 2 órán át -20 C° -on tároltuk, majd 30 percig 2500 fordulat/perc értéken centrifugáltuk. A csapadékot 20 ml 0,3 M-os NaCl-ban oldottuk, és lecsaptuk 2,5 térfogatnyi 96 %-os etanol hozzáadásával. Az így nyert RNS egy részét oszlopon történő sótalanítást követően szubsztrátként alkalmaztuk a ribonukleáz aktivitások mérésekor.

A csapadék másik részét centrifugálás után 100 ml 2 M-os NaCl-ban extraháltuk 30 percig. A kis molekulasúlyú RNS-ek a tRNS-ek és az 5S RNS, ekkor oldódtak, és a csapadék a 18 S és a 26 S RNS-t tartalmazta. A csapadékot centrifugálás után (30 perc, 2500 rpm) vákum excikátorban $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Az RNS tisztaságát a $\Delta\text{OD}_{260}/\Delta\text{OD}_{280}$ arány mérésével ellenőriztük Unicam spektrofotométeren. A DNS esetleges jelenlétét difenilaminos reakcióval ellenőriztük.

b./ A tisztított RNS hidrolizise

A savas hidrolízist 1N sósavval $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, zárt fiolában, vízfürdőn végeztük. Az enzimatis bontáshoz tisztított elsődleges kivonatot használtunk (1 mg RN-ázt tartalmazott 0,2 ml 0,1 M-os Tris-puffer, pH = 7,5 értéken) 8 órán át $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. A reakció leállítását 1,5 térfogat Tris-HCl pufferrel telített fenollal végeztük. A fehérjék kicsapását még kétszer ismételtük meg két térfogatnyi ugyanilyen fenol hozzáadásával. A vizes fázisból a maradék fenolt háromszori di-etiléteres kirázással távolítottuk el. A sótalanított liofilizált hidrolizátumot $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

c./ Hidrolizált RNS vékonyréteg kromatográfiája

Az MN-300-as cellulóz réteget Desaga 65630L típusu rétegekészítővel 20x20 cm-es üveglapra 0,5 vagy

1,0 mm-es vastagságban készítettük, a felviendő anyagmennyiségtől függően. A mintát 1 µl-es részletekben mikropipettával vittük fel. (Felvitel 20 OD/lap).

A kromatogramokat 2 dimenzióban fejlesztettük ki: Björk és Svensson (1967) módszere alapján. Első futtatás A irányban: n-butanol/víz 86/14 arányban, telített ammóniás gőztérben. Második futtatás B irányban (A-ra merőlegesen): izopropanol/cCHCl/víz 170/41/39 arányban.

A kromatogramok kiértékelése UV fény segítségével történt. A lapokat telített ammóniás gőztérben tartva 15-20 percig a bázisok UV megvilágításakor elnyelnek. A foltokat körülhatároltuk, majd lekapartuk és 2,5 ml 0,1 N HCl-ban oldottuk fel.

A foltok azonosítása az ismert bázisok (adenin, uracil, citozin, guanin) azonos körülmények közötti futtatásával, majd a minták és a viszonyító bázisok spektrumának felvételével történt.

A tápközegek hormonösszetételének változtatása

Az alaptáp agaros Murashige és Skoog (1962) által leírt táptalaj volt. A módosítások csak a fő hormon alkotókat, az idolecetsavat és a kinetint érintették. A hormonhiány hatását a fényperiódus hatásával

egyidejűleg teszteltük. A kísérleti összeállítást az I. táblázat foglalja össze. Az itt alkalmazott jelöléseket használtuk fel az eredmények értékelésekor is. A kísérleteket kétszer ismételtük meg.

I. táblázat

A táptalaj hormon összetételének hatása a növekedésre sötétben és fényperiódus alatt. I. és III. megvilágítás 16 óra fény + 8 óra sötét, 30 C^o, II. és IV. megvilágítás nélkül 25+2 C^o.

Inokulum	Táptalaj variációk			
	Kontrol	Hormon hiányos		Hormon nélküli
	+/IES+ kinetin/	-/IES/+ kinetin	-/kinetin/ +/IES/	-/IES+ kinetin/
250 mg 30 napos dohányszövet sötétben tenyésztett kulturából	I/1	I/2	I/3	I/4
	II/1	II/2	II/3	II/4
250 mg 14 napos dohányszövet 14 napig fényen növekedő kulturából	III/1	III/2	III/3	III/4
	IV/1	IV/2	IV/3	IV/4

Gátlóanyagok alkalmazása

A fehérjeszintézis gátlói közül az első kísérleti beállításban az aktinomicint, a kloramfenikolt, és a

puromicint nagy (10^{-6} M-os) koncentrációban alkalmaztuk. A szilárd táptalajba az agar megszilárdulása előtt kevertük be a gátlót, steril szűrést követően. A következő kísérleti beállításnál a leirtakkal egyező módon a kloramfenikol és puromicin 10^{-6} , 5×10^{-7} és 10^{-6} M-os koncentrációit és az aktinomicin 4×10^{-6} , 2×10^{-6} , 10^{-6} és 5×10^{-7} M-os koncentrációit mértük be a tápközegbe.

A rezisztens és tulérzékeny vonalak elkülönítésekor a rázatott folyékony tápközegű tenyészetek 10^{-6} M-os koncentrációban tartalmazták a gátlókat. A kezelési idő 3×24 óra volt, ezután a kulturákból vett mintákat 10^{-6} és 10^{-6} M koncentrációban tartalmazó szilárd tápközegre szélesztettük, és további 14 napig tenyésztettük.

KISÉRLETEK ISMERTETÉSE ÉS MEGBESZÉLÉSE

Dohány szövetvonalak összehasonlító vizsgálata

Az összehasonlító vizsgálatokban a Murashige és Skoog 1962 által leírt tápközegen növekvő 250₊₅ mg sulyu, torziós mérlegen sterilen bemért inokulumok jellemző paramétereit határoztuk meg a tenyésztés 14. napján. A kísérleteket két variációban állítottuk be: egy sötétben növekvő és egy fotoperiódus szerint megvilágított tenyészetet használva. A kapott eredményeket a II. és III. táblázatban foglaltuk össze.

II. táblázat

Sötétben 14 napig növekedett dohány szövetvonalak jellemző adatai

Szövetvonal jelölése	1.	5.	6.
Friss suly (mg)	972 ₊₂₄	315 ₊₉	265 ₊₁₀
Szárazsuly a friss suly %-ában	5,6 _{+0,2}	2,6 _{+0,2}	3,2 _{+0,2}
Sejt szám (x 10 ⁶ /1000 mg szövet)	1,8 _{+0,3}	1,4 _{+0,4}	1,8 _{+0,5}

III. Táblázat

Megvilágított (16 óra fény és 8 óra sötét), 14 napig növekedett dohány szövetvonalak növekedést jellemző adatai

Szövetvonal jelölése	1.	5.	6.
Friss suly (mg) szórás	1700 _± 200	534 _± 38	980 _± 32
Száraz suly a friss suly %-ában	6,9 _± 0,6	6,6 _± 0,6	6,9 _± 0,7
Sejt szám (x 10 ⁶ /1000 mg szövet)	2,5 _± 0,3	3,0 _± 3	2,3 _± 0,3

Az 1. szövetvonal (*Nicotiana tabacum*) esetében főként mennyiségi változások jelentkeztek a fénykezelt és sötétben növekedett szövetminták között. A szövetminták sulya mindhárom esetben közel megkétszereződött a fény hatására; ez mondható el a sejt számról is. Az 1. szövetvonal kallusza kissé megzöldült, organizáció azonban nem következett be a vizsgált időtartamon belül, sőt a tenyésztés idejét 54 napra meghosszabbítva sem. Az 5. szövetvonal (*Nicotiana tabacum* Wisconsin-38) szöveit 14 napon át megvilágítva, azok sulya átlag 219 mg-al gyarapodott jobban a sötétben tenyésztetteknél.

A szárazsúly értékek növekedése ennél a variánsnál volt a legnagyobb, valamint a fehérje tartalom változása is. Ez utóbbit a IV. táblázatban tüntettük fel. A szöveteken az organizáció - hajtás képződés - jelei a tenyésztés 14. napján már jelentkeztek, szemmel láthatók voltak.

A 6. szövetvonal igen intenzív zöldülést mutatott, azonban az organizáció a tenyésztés 14. napján még nem volt megfigyelhető. A szövet igen apró sejtekből állt, és tömött szerkezetű volt. A fehérje tartalom változása az organizációt szintén nem mutató 1. szövetvonalnál mért értékekhez hasonló növekedést mutatott. A nukleinsavak mennyisége a három megvilágított szövetvonalnál egyaránt emelkedett, és ez a fokozottabb fehérjeszintézishez kapcsolódott. Az értékeket a IV. táblázat tartalmazza.

A három szövetvonal az első összehasonlító vizsgálat alapján alkalmasnak bizonyult egy organizálódó rendszer modellezésére, hiszen az általunk választott tenyésztési körülmények között igen eltérő "fejlődési választ" adtak, bizonyos hasonlósági tendenciák ellenére is. Így ebben a modellben

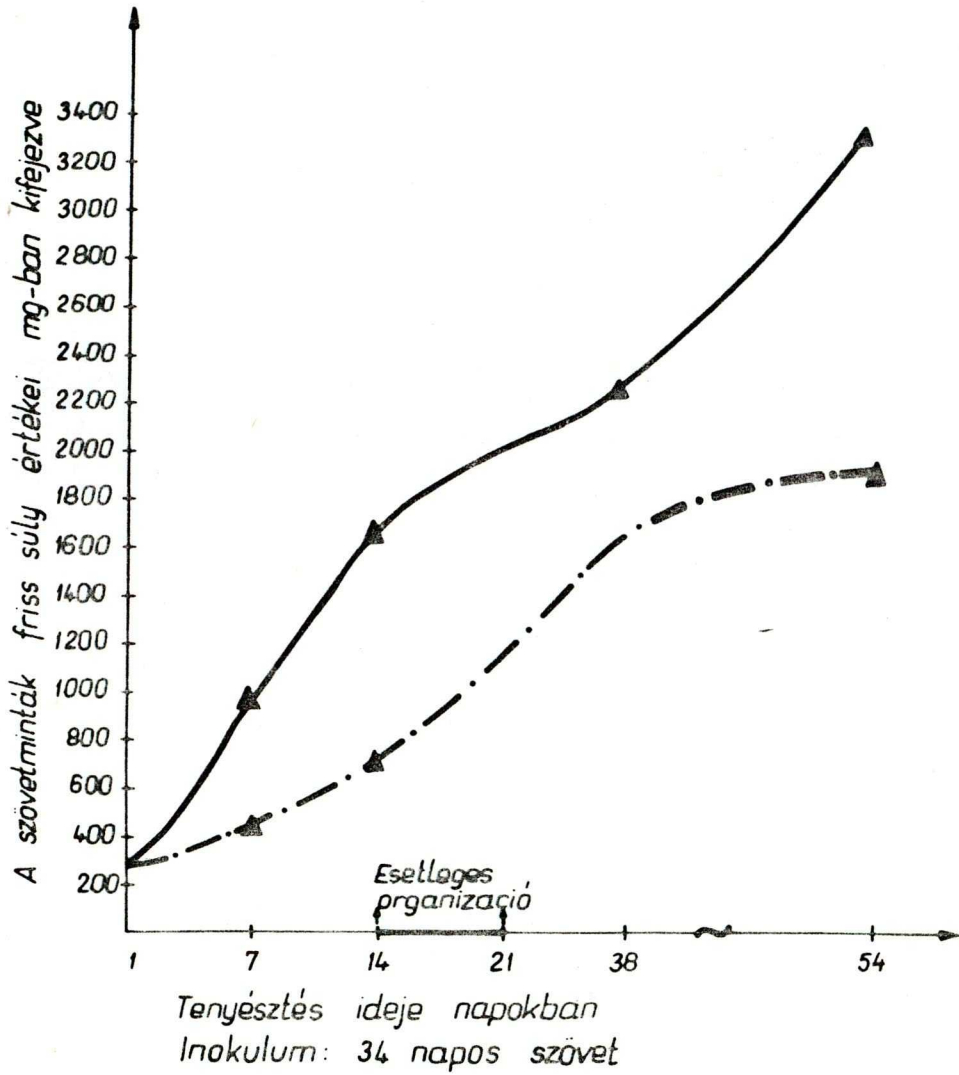


IV. táblázat

Dohány szövetvonalak nukleinsav és fehérje tartalma
a tenyésztés 14. napján

Szövetvonalak jelölése	Megvilágítási körülmények					
	Fényperiódusos variáns			Sötét variáns		
	1.	5.	6.	1.	5.	6.
Ribonukleinsav tartalom ($\mu\text{g}/1000 \text{ mg}$ szövet)	1927,0	1772,5	1834,3	1425,6	1568,1	1880,1
Fehérje tartal- lom ($\text{mg}/1000 \text{ mg}$ szövet)	4,3	5,85	4,65	3,8	2,4	2,8

az 1. szövetvonal jelenti az igen jól növekedő, differenciálatlan, megvilágítás hatására kevésbé zöldülő kallusz típusu szövetet. Az 5. szövetvonalban játszódtak le a mennyiségi gyarapodást követő minőségi változások a megvilágítás hatására a tápközeg kihasználódását követően. Ez a szövet modellünkben a spontán organizálódó kalluszt képviseli. A 6. szövetvonal átmenetet jelent a kallusz és organizálódó kallusz között az igen jól zöldülő, de nem organizálódó, tömött szövetstruktúrájával.



2. ábra. Dohány 1. szövetvonal növekedése /- / fényen és /-.-.- / sötétben. Háromszori ismétlés átlagértékei.

Ezen első kísérleti beállításunkban azonos tápközegeket alkalmaztunk: azonos hormonhatások érvényesültek. Az eltérő növekedési válasz és a vizsgált paraméterek különbözőségei a szövetek eltérő élet-tani sajátosságaival magyarázhatók.

A táptalaj hormon összetételének megváltoztatása: a kinetin és az indolecetsav (IES) egyenkénti, valamint együttes kihagyása a tápközegből történő hormon felhasználás határeseteit hozta létre mesterségesen. Vizsgálataink következő lépése így a hormonhiányos tápközeg tesztelése volt az 1. szövetvonal felhasználásával. (Az I. táblázat foglalja össze a kísérleti variációkat).

Az 1. szövetvonal növekedése hormonhiányos tápközegeket alkalmazva. Organizációs lehetőségek

Mind a három szövetvonal előállításakor a kalluszosodást kiváltó tápközeg tartalmazott 2,4-diklórfenoxiacetsavat. Valószínű, hogy elszaporításukkor eltérő ideig növekedtek 2,4-D tartalmu táptalajon. A kísérleteinket megelőző egy év során IES-t és kinetint együtt tartalmazó tápon növekedtek. Az 1. szövetvonal esetében a 15 év tenyészidő több száz átoltást jelentett. A másik két szövetvonal esetében ez jóval száz alatti érték. Az 1. szövetvonal hosszú tenyészideje miatt itt

indokoltabb a kérdés felvetése, hogy nem rendelkezik-e a szövet kinetin vagy IES autonomiával. A másik két szövetvonalnál is felmerülhet ez a kérdés, de az organizálódási képesség jelentkezése miatt az 1. és az 5., 6. szövetvonal nem vethető össze ebből a szempontból.

A dohány 1. szövetvonalának növekedését mutatja a 2. ábra. Fényen a kallusz gyarapodás üteme gyorsabb. A tenyésztés 54. napján mérve a kallusz súlyértékeket a szöveti előregedés jelei tapasztalhatók, míg fényen a növekedés üteme még közel lineáris.

V. táblázat

Dohány 1. szövetvonal friss súly értékeinek változása a táptalaj hormon összetételétől, az inokulum és a tenyésztett szövet tartási körülményeitől függően. Esetenként 16-18 minta került feldolgozásra.

Jelölések:

1. hormonokat tartalmazó MS tápközeg
2. IES hiányos variáció
3. kinetin hiányos variáció
4. hormon nélküli MS tápközeg
- I. Sötétben növekedett inokulum átoltása után fényen növekedett tovább.

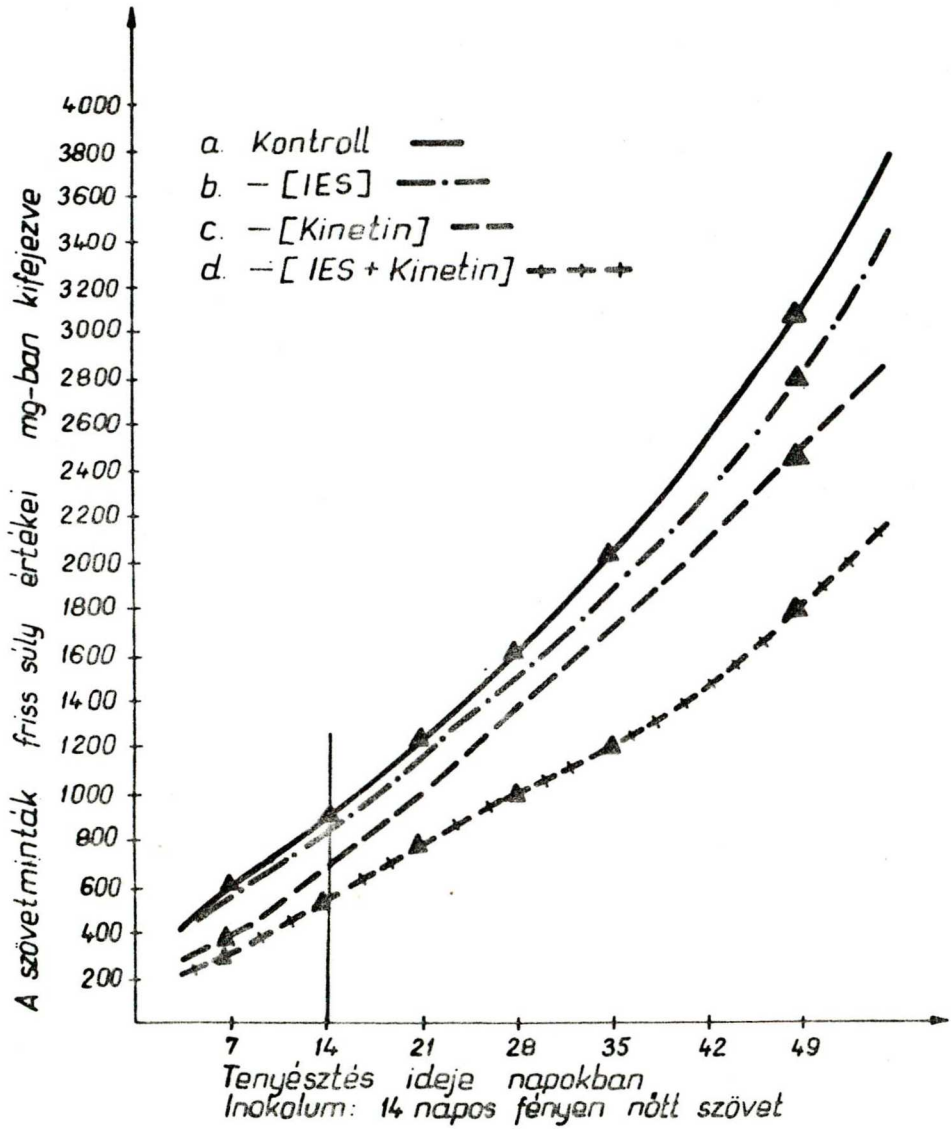
- II. sötétben növekedett inokulum átoltása után
sötétben növekedett tovább
- III. fényen növekedett inokulum átoltása után fényen
növekedett tovább
- IV. fényen növekedett inokulum átoltása után
sötétben növekedett tovább

Fényen történő inkubálás	Friss súly (mg)
I/1.	2500 _± 500
I/2.	2000 _± 150
I/3.	1300 _± 370
I/4.	1390 _± 130
III/1.	1750 _± 280
III/2.	1280 _± 300
III/3.	1150 _± 430
III/4.	1080 _± 100

Sötétben történő inkubálás	Friss súly (mg)
II/1.	1110 ₊ 100
II/2.	960 ₊ 100
II/3.	790 ₊ 220
II/4.	1040 ₊ 130
IV/1.	920 ₊ 70
IV/2.	810 ₊ 200
IV/3.	700 ₊ 350
IV/4.	500 ₊ 200

Az V. táblázatban összefoglalt kísérleti adatokból megállapítható, hogy a kallusz szövet növekedését az IES és kinetin interakciója serkentette a legjobban. Kiemelkedő növekedési értékeket kaptunk (2500 mg) amennyiben a tenyésztés alatt a fény növekedést indukáló hatása a hormonhatással együtt érvényesült. A fényen növekedett inokulum sötétben tovább tenyésztve a megfelelő hormon-ellátottság mellett is a leggyengébb szaporulatot hozta.

Amennyiben az eredetileg fényen növekedett inokulum fényen növekedett tovább (III. variációk) hasonló növekedési választ adott a hormon megvonásokra, mint az I. variáció, csak arányosan csökkent értékkel. A fényen



3. ábra. Dohány 1. szövetvonal növekedése eltérő összetételű táptalajon fényről sötétbe helyezve az átoltott tenyészeteket.

növekedett inokulum hormon megvonásos, sötétben történő tenyésztése a kezdeti szövetsúly megduplázódását váltotta ki (500 mg) a két hét alatt. A sötétben növekedett inokulum az előzőkkel egyező feltételek között azonban közel négyszeresére gyarapodott a szövet friss súlyértékei alapján. Megállapíthattuk, hogy a szövet növekedésének befolyásolásában a fény hatásának, melyet valószínűleg a fényindukált enzimszintézisek révén fejt ki, közel azonos szerepet tulajdoníthattunk, mint az alkalmazott hormon kombinációnak. Hormon hiány esetén a kinetin hiányos variáns súlynövekedése csökkent, az IES endogén szintézise azonban kielégítőnek mondható. A klorofill tartalom kvantitatív meghatározásához 250 mg szövet, mint kiinduló mennyiség nem volt elegendő, még a hormonokkal ellátott fényen növekedett kallusz esetében sem, így a fény növekedést serkentő hatása nem a fotoszintézisen keresztül érvényesülhet elsődlegesen.

A tenyészidőt a 14 napos periódus meghosszabbításával 49 napra bővítettük, és 7 naponkénti mintavétellel meghatároztuk a hormon összetétel hosszabb távu hatását. Az ekkor kapott növekedési választ tartalmazza a 3. ábra. Az IES kielégítő endogén szintézise így hosszabb tenyésztési időn belül is bizonyítottnak tekinthető, sőt a kinetin endogén szintézise is

valószínű, bár kifejezetten kisebb mértékű.

A fény hatását vizsgálva a 2. ábrán láthatjuk, hogy az a tenyésztés első 14 napján hozza a legmarkánsabb eltérést, és az még az esetleges organizáció idejére is áttérjed.

Az 1. szövetvonalnál a 2 mg/l IES és a 0,2 mg/l kinetin együttes hatása nem képes az organizáció hormonális szintjét biztosítani, sőt a szövet az irodalomban fellelhető más hormon kombinációkat alkalmazva sem mutatott differenciálódást. Az organizációs feltételeket és a szövetvonalaink viselkedését a VI. táblázatban foglaltuk össze.

A Gamborg, Miller, Ohyama (1968) táptalaj kinentint nem tartalmaz, a 2,4-D tartalma pedig 0,44 mg/l. A szövetvonalaink mindegyike kallusz formájában tenyészik ezen a tápközegen.

Az organizáció spontán jelentkezett az 5. szövetvonalnál a tenyésztés 14. napja körül, itt a hormon összetétel: IES 2,0 mg/l és kinetin 0,2 mg/l. Ezt a szövetet a Lismaier, Skoog (1965) táptalajra átolttva, ahol a hormon arány 2:1 (IES 4,0 mg/l és a kinetin 2,0 mg/l), már az átolttást követő nyolcadik napon hajtás-képzés volt megfigyelhető. A tenyésztés 14. napján átlagosan 20 %-kal volt több a fejlődő hajtások száma ennél a variációnál a spontán organizálódáshoz viszonyítva.



A 2. szövetvonalat átoltva Murshige, Skoog (1962) és a Linsmaier, Skoog (1965) tápra szintén lejátszódott az organizáció. Ebben az esetben a kallszosító táptalaj 2,4-D-t tartalmazott, és a differenciáltató tápközegben 2:1 arányu volt az IES és kinetin tartalom. Így 0,44 mg/l 2,4-D tartalomról a 2,0 mg/l IES tartalomra tértünk át, miközben a kinetin szintet 1 mg/l-re emeltük. Átlagosan 1 g szöveten 5 hajtás indult fejlődésnek.

Kísérleteink eredményei jó egyezést mutatnak az irodalomban közölt eredményekkel és megállapításokkal. Barg és Umiel (1977) megállapítása szerint a kutatók döntő többsége a Wisconsin 38 standard genetikai vonalát használja fel az organizáció feltételeit vizsgáló kísérleteiben. A mi esetünkben a 2. és 5. szövetvonal mutatott organizációs képességet, és ezek szintén a Wisconsin 38-ból indított vonalak voltak. A fenti szerzők és az általuk említett irodalmak szerint is a hajtáskezdemények a tenyésztés 15-21. napja körül jelentkeztek. A hormonösszetétel megváltoztatása mellett még meg kell említenünk a tápközegből történő cukor, mint C forrás felhasználódást, mivel a hajtás képzésre serkentő hatása.

Mint megállapítottuk, a kinetin jelenléte illetve hiánya a sötétben történő tenyésztéskor érezteti leginkább hatását, ezt mutatták a hormonhiányos tápon

tenyésztett szövetek (V. táblázat). Az irodalomban Lance és mts. (1976) különböző koncentrációju kintin sötétben kifejtett szabályozó hatását az endogén gibberellin szint befolyásolására vezetik vissza. A magasabb gibberellin szint pedig megemeli a szabad aminosav készletet, az aminoacil-tRNS szintet és az aminoacil-tRNS-szintetáz aktivitását (Wray és mts, 1974). Az említett szerzők által tenyésztett dohány szuszpenziós kulturákban a 8. nap környékén érte el a növekvő fehérje tartalom a maximális értékét, korrelációban a szintetázok aktivitásával.

Meg kell még jegyeznünk, hogy a szilárd tápközegen történő tenyésztéskor mások az anyagfelvételi és növekedési viszonyok, mint a szuszpenziós kultúrákban. Tapasztalataink alapján a tenyésztés céljából leoltott kallusz kora befolyásolja a szilárd tápközegen történő növekedést (2. és 3. ábra). Az idősebb inokulum esetében (34 napig tenyésztett szövet) sokkal karakterisztikusabb változások játszódnak le a tenyésztés első 7-14 napja alatt. A fiatal (14 napig tenyésztett szövet) inokulumok növekedése viszont állandóbb ütemű.

DNS, RNS és fehérje meghatározás azonos mintából a tenyésztés 14. napján

A szilárd tápon történő tenyésztés 14. napjára az általunk vizsgált szövetvonalak közül a 2. és 3.

szövet egy tenyészedényben gyarapodó friss súly értéke nem érte el a meghatározáshoz szükséges 750 mg-ot, míg a többi meghaladta azt. Ebben az esetben az összes tenyésztett szövetet egyesítettük, és 5x750 mg-ot kimérve végeztük el a meghatározásokat Pilet és Braun (1967) módszere alapján. A tenyésztés ezen időpontjában a kalluszok növekedési üteme közel állandó volt.

A DNS tartalom a meghatározás alapján mind-egyik mintában 450-600 $\mu\text{g}/\text{mg}$ értékek közé esett. A meghatározások többi eredményét a VII. táblázatban foglaltuk össze. A tenyésztés 14. napján az 1. szövetvonal anyagmennyisége lehetővé tette a DNS, RNS és fehérje meghatározáson túl a ribonukleáz és peroxidáz aktivitás meghatározását is, mivel az egy tenyészet friss súlyának értékei meghaladták a vizsgálatok együttes anyagmennyiségét, az 1450 mg-ot. A szövet gyarapodása megfelelőnek látszott a nukleáz és nukleinsav preparálására is. Ugyanis az ekkor egyszerre szükséges 510 g-nyi szövetmennyiséget 50 leoltott minta tenyésztéséből megkaphattuk. A gátlós kezelésekkor számolnunk kellett a friss súly csökkenéssel egyidejűleg fellépő nukleinsav és fehérje mennyiség változással is. E szempontokat összevetve a továbbiakban az 1. szövetvonalon végeztük a vizsgálatainkat, és csak a preparált RNS minták tenyészté-

VII. táblázat

Fényen 14 napig tenyésztett szövetvonalak összehasonlító vizsgálata

Szövetvonalak jelölése	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Friss súly (mg)	1740 ₊₂₀₀	690 ₊₆₀	1120 ₊₇₀	1330 ₊₄₀	530 ₊₄₀	980 ₊₃₀
Napi növekedés	124,2	49,58	80,28	94,7	38,14	70,0
Száraz súly a friss súly %-ában	6,87	8,58	8,97	7,06	6,6	6,9
Sejt szám ($\times 10^6$ /1000 mg szövet)	2,48	2,6	3,0	2,89	2,9	2,32
Ribonukleinsav tartalom (μ g/1000 mg szövet)	1927	2304	2384	1698	1772	1834
Fehérje tartalom (mg/1000 mg szövet)	4,3	7,6	6,04	3,75	5,85	4,65

tésre kifejtett hatását vizsgáltuk a többi szövetvonal felhasználásával.

A VII. táblázat alapján megállapíthattuk, hogy a szövetvonalak 1 g-ra vonatkoztatott RNS és fehérje tartalmában eltérések mutatkoztak. A kallusz jellegű szöveteket összehasonlítva a 2. és 3. szövetvonal kis-sé magasabb nukleinsav és fehérje szintet mutatott, mint a többi. A 3. vonal szövetmintáinál a friss súly és a sejt szám értékek nagyobbak adódtak, mint a 2. szövetvonalnál. A Wisconsin 38 két eltérő tápközegen tenyésztett vonala (a 2. és az 5. szövetvonal) közül a nem organizálódó 2. vonal 1,8 mg/g fehérje és 532 µg/g ribonukleinsav többlettel rendelkezett. Ugyanakkor ez a variáns 3×10^5 -ennel kevesebb sejtet tartalmazott, de a szárazsúly értéke 1,98 mg/100 mg szárazsúly többlettel rendelkezett. Az eltéréseket a Gamburg, Miller, Ohyama (1968) tápközeg 0,44 mg/l 2,4-D tartalmával hozhatjuk összefüggésbe. Valószínűnek tartjuk, hogy ekkor az organizációt biztosító lépések helyett más, ezen folyamat számára nem kedvező összetételű nukleinsav és fehérje készlet felhalmozódása történik meg. Az 1. és 4. szövetvonalnál is helytálló a megállapításunk, ha 1. szövetvonal igen jó adaptáltságát a 2,4-D-t nem tartalmazó tápközeghez figyelembe vesszük. Meghatározásaink tájékozó jellegű összehasonlítással szolgáltak. Napjaink ilyen jellegű meghatározásai már jóval kevesebb anyag (50 µg/szövet minta) és

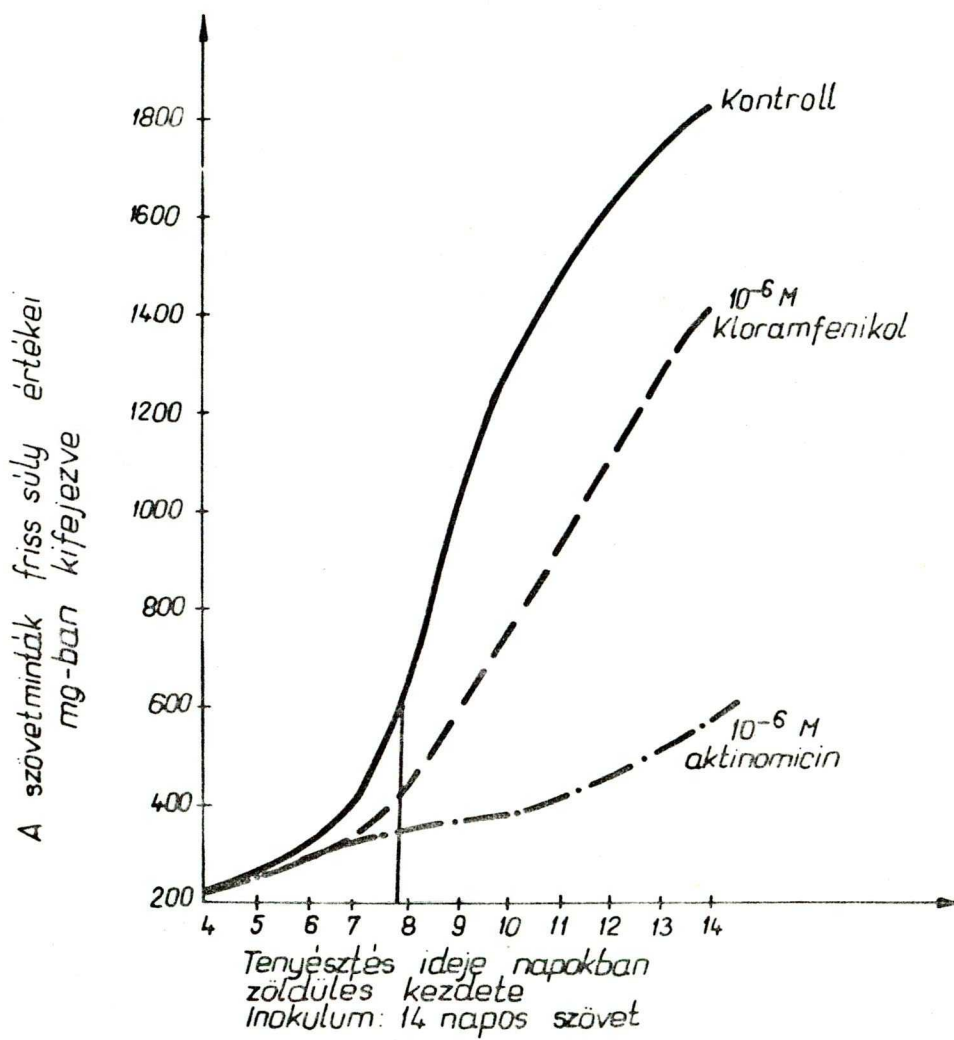
vizsgálati idő (30 perc) felhasználásával végezhető el a radióaktív jelölt nukleotidok (^{14}C timidin és ^{14}C uridin) és aminosav (^{14}C leucin) szövetbe történő beépülését követően (Ferrari és Widholm, 1973).

A fehérjeszintézis gátlók hatása az 1. szövetvonal növekedésére

A fehérjeszintézis gátlóinak alkalmazásával az organizálódás folyamatai egyértelműen gátolhatók. A nem organizálódó kallusz ilyen jellegű kezelésekor bizonyos anyagok felszaporodásának lehetőségével kellett számolnunk.

A kísérletsorozatban célul tűztük ki, hogy a megfelelő gátlót és annak a leghatékonyabb koncentrációját válasszuk ki a rezisztens és túlérzékeny vonal izolálására; az esetleges RN-áz aktivitás emelkedés esetén az enzim, illetve a "kórosan" szintetizált nukleinsavak preparálására.

A 4. ábrán tüntettük fel a 10^{-6} M-os koncentrációban alkalmazott gátlók: az aktinomycin, a puromicin és a kloramfenikol hatását. A kísérlet indításakor 14 napos szövetet használtunk inokulumpént. Az első hét nap alatt a 200 mg kiindulási szövet mennyiség 310 mg-ra szaporodott fel a kezelt mintákban, míg a kontrol mennyisége megduplázódott. A mind jelentősebbé



4. ábra. Fehérjeszintézis gátlók hatása az 1. dohány szövetvonal növekedésére /három ismétlés átlag értékei/.

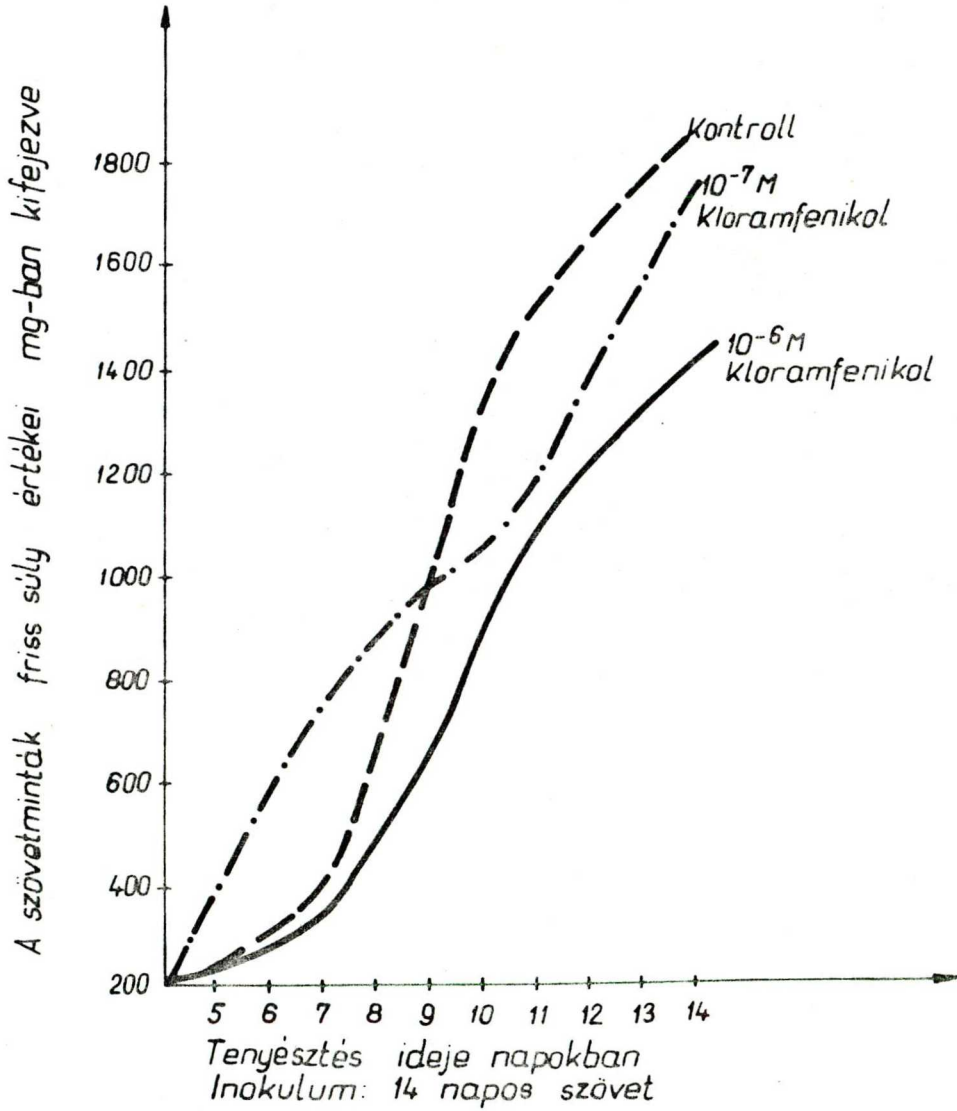
váló eltérés a 8. naptól bontakozott ki. A tenyésztés 14. napján az aktinomicinnal kezelt minták elérték a 600 mg-ot. A kloramfenikollal kezelt minták sulya 1420 mg volt, 450 mg-al kevesebb a kontrolnál. A puromicinre a kloramfenikolhoz hasonlóan reagált a szövet.

A következő kísérleti beállításban, amikor a kloramfenikolt 10^{-7} M koncentrációban alkalmaztuk a tenyésztés 9. napjáig tartó, a kontrol gyarapodását meghaladó növekedést tapasztaltunk a friss suly értékek alapján. A 10^{-6} és 10^{-7} M puromicin gátló hatása közel azonos, és a 10^{-6} M kloramfenikolével egyezőnek mutatkozott.

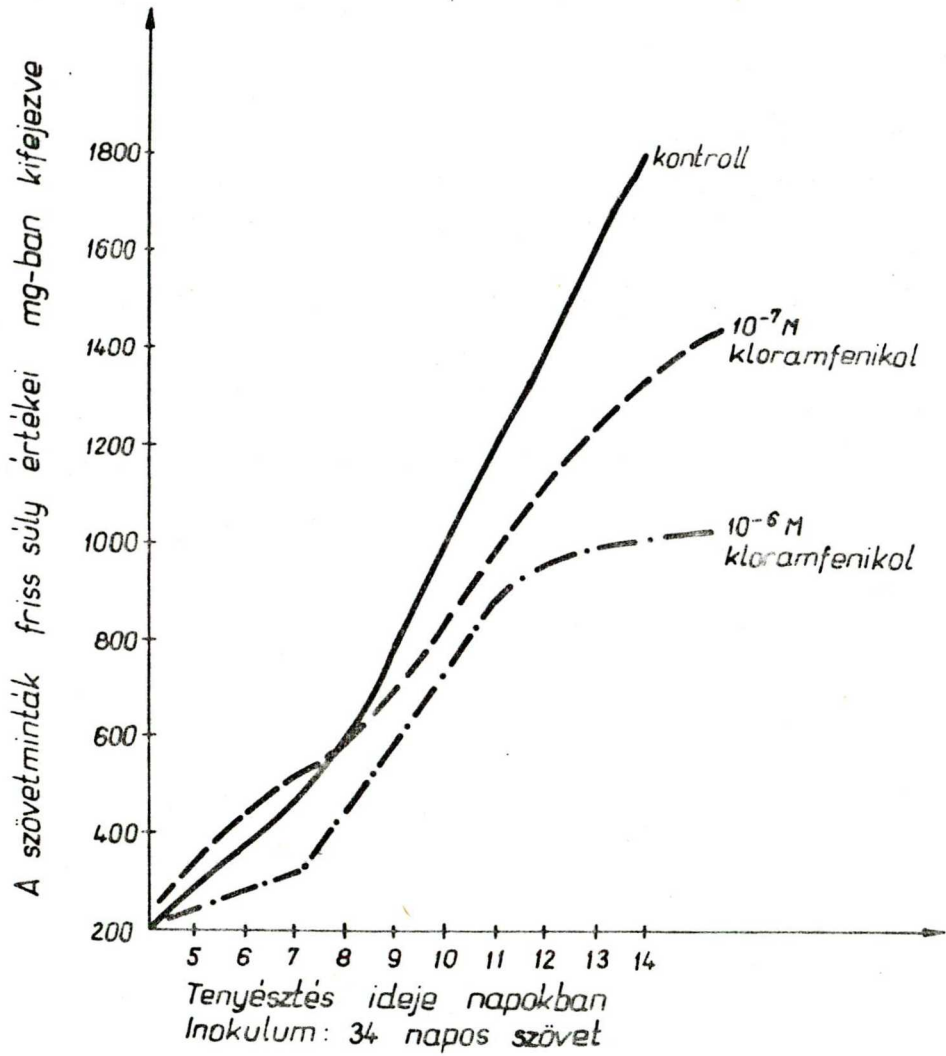
VIII. Táblázat

Fehérjeszintézis gátlókkal kezelt 1. dohányiszövet friss suly értékei a tenyésztés 9. napján

Gátló koncentráció	Szövet friss suly (mg)
Aktinomicin 10^{-6} M	368
Puromicin 10^{-6} és 10^{-7} M	625
Kloramfenikol 10^{-6} M	620
10^{-7} M	968
Kontrol	1000



5a. ábra. Kloramfenikol kis koncentrációinak hatása az 1. dohány szövetvonal növekedésére /3 ismétlés átlag értékei/.



5b. ábra. Kloramfenikol kis koncentrációinak hatása az 1. dohány szövetvonal növekedésére /3 ismétlés átlag értékei/.

Az 5a. ábrán tüntettük fel a 10^{-7} M-os kloramfenikol hatását a tenyésztési idő függvényében. Az eredmények három eltérő időben beállított kísérletsorozatban kis szórásértékekkel egyeztek.

Megállapítottuk, hogy a gátlók közül a kloramfenikol 10^{-7} M-os koncentrációban alkalmazva a tenyésztés első napjaiban növekedést serkentő hatással rendelkezik. Magyarozatként a nagyobb mértékű vízfelvételt feltételeztük a mért friss súly adatok és a korai tenyészidő alapján (5a és 6 ábra).

IX. táblázat

A kloramfenikol különböző koncentrációinak hatása a szövet friss súly értékekre a tenyésztés 14. napján

Gátló koncentráció	Friss súly értékek (mg)
Kontrol	1850
10^{-3} M kloramfenikol	195
10^{-5} M kloramfenikol	358
10^{-6} M kloramfenikol	1410
10^{-7} M kloramfenikol	1615

Amennyiben ez a jellemző szövetgyarapodás a vízfelvételhez kapcsolódó folyamat, akkor a hatásnak az öregebb, 34 napos inokulum felhasználásakor is kell

jelentkeznie. Az 5b. ábrán szemléltettük a kapott eredményeket. A tendencia hasonlóan adódott. A 10^{-7} M kloramfenikollal kezelt minták gyarapodása itt is meghaladta a kontrol értékeit az első napokban. A két növekedési görbe a nyolcadik napon keresztezte egymást. A vízfelvétel befolyása mellett szólt szerintünk az a tény is, hogy az idősebb szövetinokulum gyarapodásakor a 10^{-6} M-os koncentráció gátló hatása kifejezettebb.

X/a. Táblázat

Kloramfenikol eltérő hatása az idős (34 napos) és a fiatal (14 napos) inokulumok növekedésére a tenyésztés 14. napján

Variációk	A	B
Kloramfenikol koncentráció	Idős szövet végsúly (mg)	Fiatal
10^{-6} M	1012	1345
10^{-7} M	1400	1750

Magyarázatként a serkentő hatásra a következőket feltételeztük:

1. A hosszú ideje tenyésztett szövetnek valamely anyagfelvételi sajátossága megváltozott.

2. A kloramfenikol spontán lebomlásának ismeretében, amely 5-7 nap alatt következik be, elképzelhető, hogy a gátló hatáson annak megszűntével tulló a rendszer.
3. Bakteriális fertőzöttség esetén a gátló a baktériumok elpusztításával kedvezőbb növekedési feltételeket biztosít.

Az utolsó feltételezést vizsgálataink alapján egyértelműen elvethetjük. A gátló hatás megszűntével jelentkező serkentés magyarázatára megvizsgáltuk a kezelt és kontrol minták nukleinsav és fehérje tartalmát (X/b. táblázat).

X/b. táblázat

Koramfenikol hatása a tenyésztés 14. napján (B variáció)

Kloramfenikol koncentráció	10^{-3} M	10^{-5} M	10^{-7} M	0 M
Friss súly (mg)	192,5	332,1	1800	2003
Száranyag (mg/100 mg friss súly)	9,6	10,2	3,2	5,9
Ribonukleinsav (μ g/g)	4567	4799	4865	1328
Fehérje (mg/g)	3,7	4,0	4,3	5,5

A fehérjetartalom egyértelmű csökkenést mutatott, míg ezzel egyidőben az RNS mennyisége majdnem négyszerese lett a kontrol RNS tartalmának. A száraz súly is majdnem megkétszereződött a 10^{-3} és 10^{-5} M-os gátló koncentráció esetében. A 10^{-7} M koncentrációs gátlásnál a friss súly közepesen azonos volt a kezelt és kezeletlen mintáknál. A kezelt minták száraz anyag tartalma közel felére csökkent.

Mivel a nukleinsav és fehérje értékek közti különbség jelentéktelen a több mint háromszoros száraz anyag tartalomhoz viszonyítva a 10^{-5} és 10^{-7} M-os kloramfenikollal kezelt mintákban, feltételezéseink közül a vízfelvételi és sejtfal-képzési folyamatokat megzavaró hatását láttuk bizonyítottan. Az utóbbi megállapításunkat támogatta az a tény, hogy a puromicin a leirtakkal egyező koncentrációi a nukleinsav és fehérje értékek hasonló változását idézték elő, de itt a friss súly és száraz anyag tartalomban nem jelentkeztek kirívó értékek, mint azt a XI. táblázatban szemléltettük.

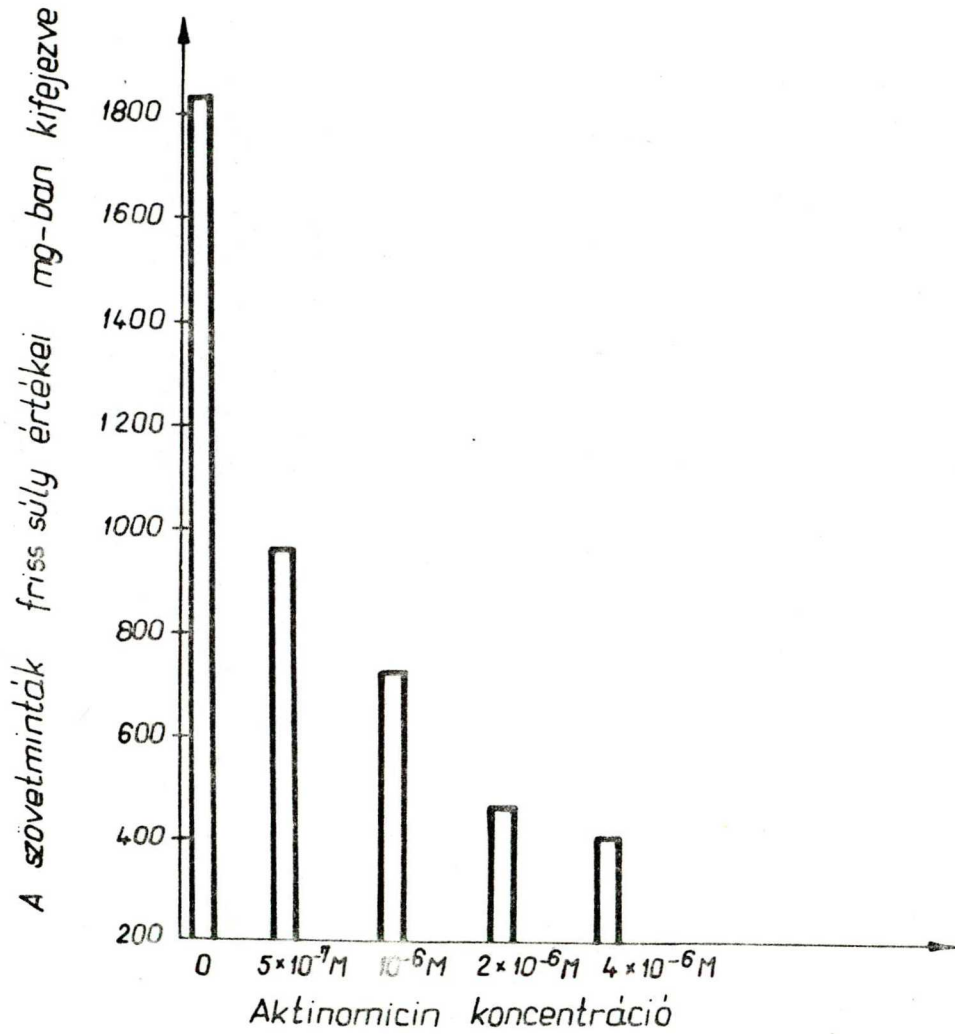
A gátlókkal végzett ezen kísérletsor eredményei a szövettenéysztő számára egy érdekes többlet információval is szolgáltak, amely a szövet protoplasztáláskor hasznosítható. A protoplaszt képzésre felhasznált leveleket a sejtfal leemésztését megelőzően a kutatók többsége valamely fehérjeszintézis gátlóval kezeli, hogy a protoplasztáláskor emelkedő hidroláz aktivitásokat gátolja (Galston és mts, 1976). Az általunk

XI. táblázat

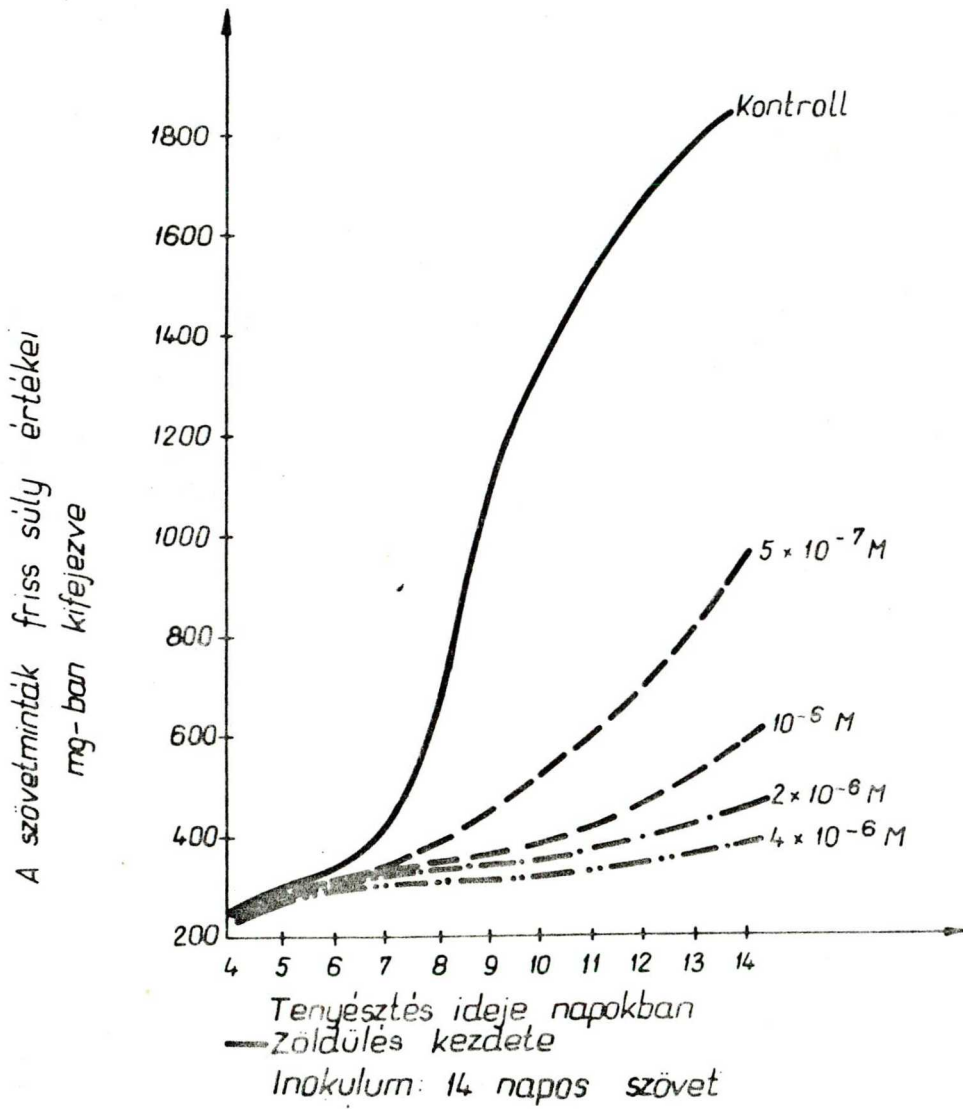
A puromicin gátló hatásának jellemző biokémiai paramétereit a fiatal inokulum tenyésztésének 14. napján.

Puromicin koncentrációk	10^{-3} M	10^{-5} M	10^{-7} M	Kontrol
Friss súly (mg)	200,8	356,0	385,0	2003,0
Száraz súly a friss súly %-ában	9,6	10,2	10,1	5,9
Ribonukleinsav ($\mu\text{g/g}$)	4678	4977	4990	1328
Fehérje (mg/g)	3,5	3,9	4,1	5,5

vizsgált szövetvonalnál a kloramfenikol vízfelvételi problémákat okozó koncentrációja helyett a puromicin alkalmazása látszik célszerűnek. Ugyanakkor az egyes szövetvonalak eltérő kloramfenikol érzékenysége egy szelekciós rendszer gondolatát is felvetheti a protoplasztálást követően. Továbbá hangsúlyoznunk kell, hogy az alkalmazott gátlók felhasználás előtti tesztelése a protoplaszt tenyésztés kedvezőtlen eseményeitől védheti meg az embert az organizáció folyamatának lejátszódásakor, vagy már azt megelőzően.



6. ábra. Aktinomycin hatása a dohány 1. szövetvonalának növekedésére a tenyésztés 14. napján mért friss súly értékek alapján.



7. ábra. Aktinomycin hatása a dohány 1. szövetvonalának növekedésére.

A puromicin és kloramfenikol kezelés mellett a DNS szinten ható aktinomicin hatását is vizsgáltuk 5×10^{-7} , 10^{-6} , 2×10^{-6} , 4×10^{-6} M-os koncentrációkban felhasználva a gátlót. Eredményeinket a 6. és 7. ábra szemlélteti: a gátlóhatás egyértelműen koncentrációfüggést mutatott.

Szuszpenziós kulturák kezelése fehérjeszintézis gátlókkal. Enzim aktivitás meghatározások a mintákból

A szuszpenziós kulturákat a létrehozásukat követő 3x24 óráig tenyésztettük, ellenőriztük a tenyészetek fertőzésmentességét, majd a kulturákba sterilen bemértük a gátlókat. A minták feldolgozását a tenyésztés 7. napján végeztük, és eredményeinket a XII. táblázatban foglaltuk össze. A relatív növekedési értékekből, amelyekkel a sejtszám és a fehérje tartalom is jó egyezést mutatott, látható, hogy a szilárd tápon történő tenyésztéskor jelentkező változások szuszpenzióban a tenyésztés 7. napján már jól regisztrálhatók voltak.

Mivel célul tűztük ki a túlérzékeny és rezisztens vonalak izolálását, a tenyésztői munka csökkentésére olyan jelzőt kerestünk, amely alapján a szélesztésre kerülő folyadék-kulturákat osztályozhattuk: ez a jelző a mi esetünkben a peroxidáz enzimaktivitás vál-



XII. táblázat

Szuszpenzióban ható fehérjeszintézis gátlók tesztelése a relativ növekedés, sejtszám és fehérje tartalom alapján (7 egyidőben tenyésztett szövetmintából történt meghatározás átlaga).

Hatóanyag koncentrációk	Relativ növekedés	Sejt ₆ szám (x 10 ⁶ /lg szövet)	Fehérje tartalom (mg/g)
Kontrol	6,32	2,05	3,87
Aktinomicin			
4x10 ⁻⁶ M	0,85	1,44	2,72
2x10 ⁻⁶ M	0,82	1,63	3,07
10 ⁻⁶ M	1,00	2,00	3,17
5x10 ⁻⁷ M	1,89	2,12	3,72
Kloramfenikol			
10 ⁻⁵ M	0,62	1,27	2,3
10 ⁻⁶ M	4,67	1,84	3,47
5x10 ⁻⁷ M	5,09	1,86	3,6
10 ⁻⁷ M	6,27	2,00	3,9

tozása volt. A XIII. táblázatban a gátlók peroxidáz aktivitására kifejtett hatását szemléltettük.

XIII. táblázat

Peroxidáz enzimaktivitások értékei a kezelt minták tenyésztésének 7. napján, és kapcsolatuk az ezen időpontban végzett szélesztésekkel

Gátló koncentráció	OD ₄₂₀ /g friss súly x perc	Sikeres szélesztések
Kontrol	26,1	+
Kloramfenikol		
10 ⁻⁷ M	26,9	+
10 ⁻⁶ M	55,4	+ (5)
10 ⁻⁵ M	94,6	-
Aktinomicin		
10 ⁻⁶ M	30,2	-
10 ⁻⁵ M	35,4	-
Puromicin		
10 ⁻⁶ M	60,8	+ (1)
10 ⁻⁵ M	65,2	-

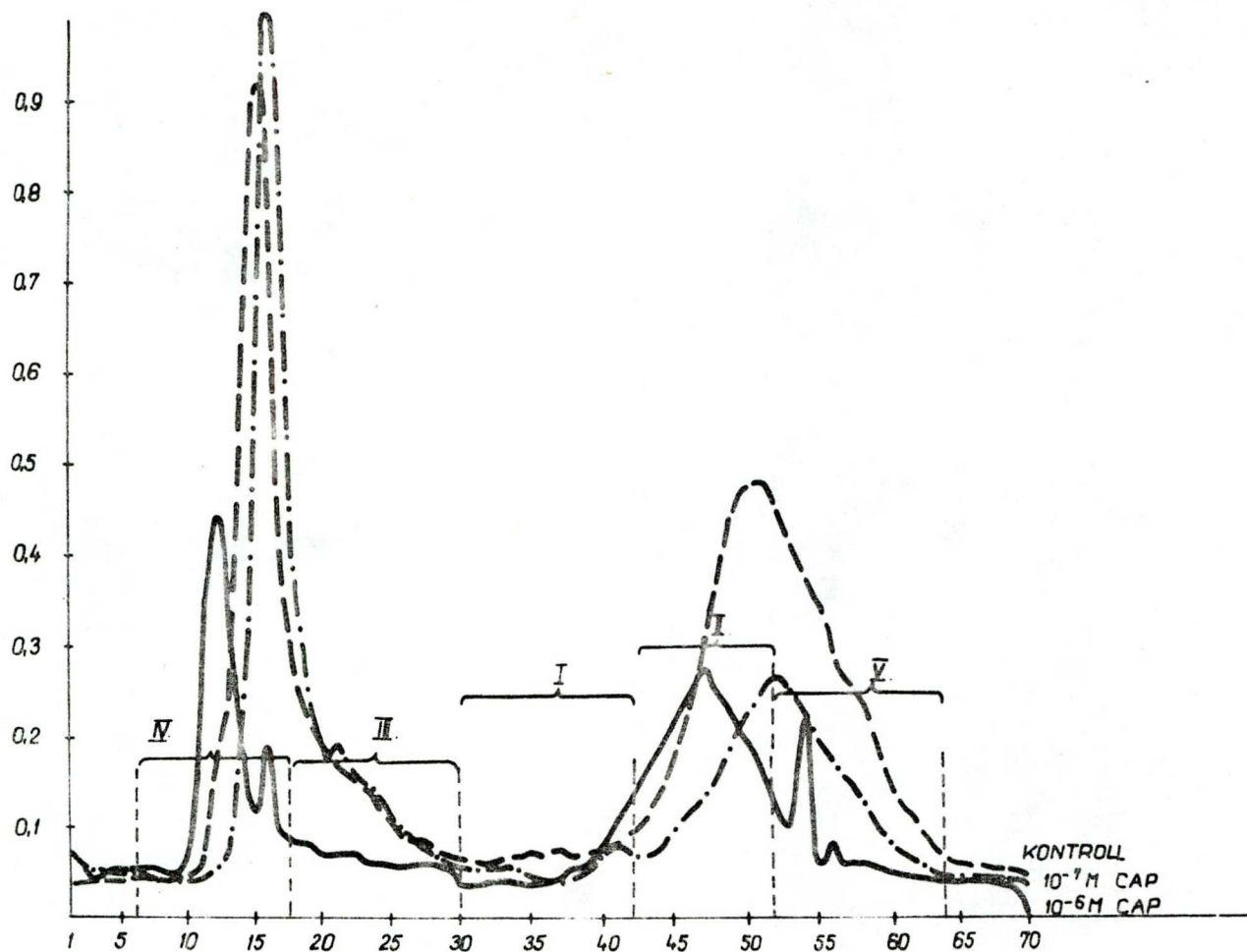
A peroxidáz aktivitást a mintákban meghatározva csak az 55_±5 ΔOD₄₂₀/g friss súly x perc értékkel rendelkező szuszpenzió mintáinkat szélesztettük szilárd tápközegre, amely továbbra is tartalmazta a gátlót

10^{-6} M-os koncentrációban. Ilyen módon 3×50 szélesztést végeztünk minden gátló esetében.

A 150 leoltás közül 1 esetben tapasztaltunk a puromicin 10^{-6} M-os koncentrációján kallusz gyarapodást. Az aktinomicinnal kezelt minták a tenyésztés 14. napjára mind elpusztultak, egészen megbarnult és összezsugorodott szövetek voltak. A kloramfenikollal kezelt mintákból 5 tenyészet indul fejlődésnek, és szépen gyarapodott. Ezeket egyesítettük és a gátlót tartalmazó tápközegen passzáltuk tovább, CAP/1. jelöléssel láttuk el.

A 10^{-6} M gátló koncentrációra tulérzékes vonalak izolálásakor a 14 napos szilárd tápközegen növekedett minták 50 mg-os szövetdarabjait mértük be 400 mg szövet/50 ml tápoldat végkoncentrációban. A kezelés harmadik napján kiválasztottuk az igen megbarnult szöveteket a minták közül, és gátlót nem tartalmazó szilárd tápon tenyésztettük további 14 napig. Ekkor a fent leírtakat megismételtük, de a gátlót a folyékony tenyészet 10^{-5} M koncentrációban kapta. Végül a folyékony táp 10^{-7} M koncentrációban tartalmazta a gátlót, és 24 órás kezelés után választottuk ki a megbarnult szöveteket. Az így nyert szövetet tekintettük a gátlóra tulérzékesnek. A kloramfenikol esetében nyert vonalat CAP⁻/1.-nek neveztük el.

8. ábra Kloramfenikol riboszómális szinten ható gátlását a Sephadex G-100 oszlopon felvett eluciós profil is jelzi.



Összefoglalva az elvégzett kísérleteket megállapíthatjuk, hogy a citokinin analóg gátlók közül a kloramfenikol kifejezetten befolyásolta a kulturák gyarapodását a tenyésztés alatt, és a hatás koncentráció függőnek mutatkozott. Kis koncentrációban növekedést serkentő hatást észleltünk. Itt a gátló a sejtfalon, a membránokon lejátszódó és főként a vízfelvételi folyamatokra fejtette ki hatását, míg a koncentráció emelésével a riboszómális szinten történő gátlás vált kifejezetté (8. ábra). A szintetizált fehérje mennyiség csökkenése és bizonyos RNS felhalmozódás volt ekkor már a jellemző.

A rezisztens izolálására végzett kísérleteink közül a kloramfenikolos kezelést tekinthetjük eredményesnek. A továbbiakban a riboszómális szinten történő gátlás vizsgálatát tüztük ki célul.

A ribonukleáz enzim vizsgálata

A szövetvonal ribonukleázainak a vizsgálatához egy kis kísérleti kitérő után érkeztünk el. A fehérjeszintézis gátlókkal kezelt szövettenyészetekben az RNS mennyisége megnégyszereződött, így kézenfekvő volt ezen nukleinsavak vizsgálata. Az első lépés: a nukleinsavak kivonása a gátlókkal kezelt és kontrol mintából. A kivonási kísérlet többiben is, különböző módszerek alkalmazása ellenére is sikertelennek

bizonyult, a nukleinsavak döntő hányada elhidrolizált. Végül Kirby (1968) kivonási módszerét módosítottuk: a kivonáskor alkalmazott fenol-viz elegyet dietilpirokarbonáttal, erőteljes nukleáz gátlóval egészítettük ki. A dietilpirokarbonátot, mint nukleáz gátlót több szerző is említi (Solymosi és mts, 1968; Abadom és Elson, 1970). A nukleázok jellemzésére és viszonyításu alapul az 1. szövetvonalat használtuk fel.

A szövetmintákat hűtve elhomogenizáltuk pH = 7,5 0,05 M-os Tris-HCl pufferben, és az elsődleges kivonatanban vizsgáltuk az enzimaktivitást. Az enzim pH függését vizsgálva megállapítottuk, hogy pH = 5,0-nál valamint 5,7-6,0 pH tartományban van optimális aktivitása.

A kivonat ezen optimális pH értékeken DNS bontó aktivitást nem mutatott. Élesztő RNS-t használva szubsztrátként, az enzim K_m értéke 0,5 mg/ml-nek adódott. Az aktivitás szinte teljesen gátolható volt nehézfém-ionokkal. A Zn^{2+} 10^{-3} M koncentrációban és a Cu^{2+} 10^{-5} M koncentrációban már gátolta az enzimet.

Az enzim fenollal szembeni érzékenységét a Kirby (1968) féle kivonás során vizsgáltuk. A fenol-viz eleggyel történő feltárást követően a vizes fázisból vetünk mintát az enzimaktivitás meghatározására a kálium-acetátot tartalmazó etanolos kicsapás előtt. Az enzimaktivitási értékek csak 0,3% dietilpirokarbonát alkal-

mazásakor tűntek el.

Vizsgálatainkkor egy enzim egység alatt (1EU) az egy óra inkubációs idő alatt felszabaduló nukleotidokból adódó 260 nm-en mérhető 0,1 OD változást értettünk. Az enzim kivonatok elég nagy hőstabilitással rendelkeztek: 60 C^o-on tartva fél óráig a kivonatot 20%-os aktivitás csökkenést mértünk. A XIV. táblázatban foglaltuk össze a szövetvonalak nukleáz aktivitási értékeit. A szövettenyésztés és az enzimaktivitás mérés körülményei azonosak voltak.

XIV. táblázat

A tenyésztett szövetvonalak RN-áz aktivitási értékei szilárd tápközegen történő tenyésztés 14. napján

Szövetvonal	Enzimaktivitás (EU)
1.	93
2.	78
3.	76
4.	80
5.	95
6.	94

Az 1. szövetvonal kloramfenikol 10^{-6} M-os kezelésekor a nukleáz aktivitás 126%-ra emelkedett. A

CAP⁻/1. tenyészetekben - tehát a CAP érzékeny tenyészetekben - az aktivitás emelkedése a 30%-ot is meghaladta. A rezisztens vonal aktivitása a kontroléval egyező volt.

Az emelkedő nukleáz aktivitási értékek egy öregedés jellegű folyamat jelzői ebben az esetben, amely öregítést a fehérjeszintézis gátlói váltották ki, a tenyészetek fiziológiai öregedését megelőzően.

A dohány levél nukleázairól Jervis (1974) vizsgálatai alapján tudjuk, hogy a levélből két endonukleáz az RN-áz₁ és az RN-áz₂ volt kimutatható. Specificitásukat tekintve relative guanin és adenin specifikus enzimet jellemzett a szerző. Az enzimek tisztítását is elvégezte: 905-szörös tisztítást értek el az RN-áz₂-nél, míg az RN-áz₁-nél 4000-szerest. Az RN-áz₂ bizonyult a tisztításra érzékenyebbnek, és az elsődleges kivonatanban mért aktivitásának csak 22%-át tartotta meg. Az enzimek jól gátlódtak poliaminokkal (0,5 mg/ml spermin). Az ion érzékenységet vizsgálva az Ag⁺ ion 10⁻⁴ M koncentrációja 100%-os gátlást idézett elő. 100 mM feletti koncentrációban a KCl is gátolt, a kétértékű kationokon kívül. Az RN-áz₁ oldékonynak bizonyult a frakcionálásakor, míg az RN-áz₂ mikroszóma-kötöttnek. A levelek korosodásával az enzimek aktivitása fokozódott. A szerző ezen nukleázok affinitás kromatográfiájára is

kidolgozott egy módszert, az 5'/4-aminofenilfoszforil/-guanozin-2'/3'/foszfátját Sepharose 2B-hez kötötte és használta fel kromatografálásra. A pH = 5,4-nél kötődő enzimet aztán az eluáló puffer pH-jának és ionerősségének a változtatásával eluáltatták. Hasonló jelenség játszódhat le az RN-ázok kivonásakor is, amikor az enzim a funkcionálisan és strukturálisan felborított rendszerben olyan komponensekhez kapcsolódhat, melyek az adott körülmények között képesek kivédeni a denaturációját. A poliszaharidok, a DNS és RNS lehet védő hatásu.

A dohány kalluszból kivont enzimek sajátosságait tekintve jó egyezést mutattak a Jervis által leirt és jellemzett nukleázokkal, így várható volt, hogy a tisztított RNS-ek teljes enzimatis hidrolizisére alkalmasak lesznek.

Az RNS kivonása és tisztítása a kloramfenikol 10^{-6} M koncentrációjára rezisztens és a kontrol dohány szövetből

Az RNS kivonását Kirby (1968) fenolos módszere alapján végeztük az 1. szövetvonalból, a CAP érzékeny és rezisztens szövetekből és a CAP 10^{-6} M koncentrációjával kezelt szuszpenziós mintákból. Esetenként 500 g szövetet használtunk fel a kivonásra.

A tisztításkor nyert és sótalánított RNS mintákat egyöntetűen jobban bontotta az I. szövetvonalból kivont és részlegesen tisztított RN-áz, mint az élesztő RNS szubsztrátot. A kontrolból és CAP rezisztens vonalból kivont RNS-t 40%-kal, a CAP kezelt és CAP érzékeny mintákból kivont RNS-t változó értékkel, 23-30%-kal bontotta jobban. A szubsztrát koncentráció azonosan 2,5 mg/ml-re volt beállítva.

A 8 órán át történő totális enzimatis bontáskor a szubsztrátokat teljesen lebontotta az enzimkivonat. Az RNS tisztításakor minden mintából izoláltunk kis molekulásulyu RNS-eket: a tRNS-eket és az 5S RNS-t tartalmazó RNS I. kivonatot, valamint az általunk RNS II-nek nevezett mintákat, amelyek a 18 és 26S RNS-eket tartalmazta. Ezen kivonatoknak esetenként 500 OD mennyiségét adtuk a táptalajhoz, vizsgálva azok növekedésre kifejtett hatását.

A tisztított RNS kivonatok hatása a szövettenyészetek növekedésére

Mivel a tRNS-ek és citokininek kölcsönhatása bizonyítottan tekinthető, megvizsgáltuk, hogy az általunk preparált RNS I és RNS II kivonatok befolyásolják-e a szövettenyészetek növekedését.

A különböző szövetmintákból kivont RNS-ek hatását azonos, 500 OD/l tápközeg tenyésztési feltételek mellett teszteltük. A kapott eredményeket a XVI. táblázatban foglaltuk össze.



XVI. táblázat

Különböző szövetek RNS I kivonatának hatása a tesztelt szövet gyarapodására

RNS-t adó szövetvonal	RNS hatását tesztelő szövetvonal	Előidézett változás: friss suly gyarapodás
1. szövetvonal RNS I.	1.	--
	CAP ⁺ /1.	--
	CAP ⁻ /1.	30%
CAP ⁺ /1. szövetvonal RNS I.	1.	--
	CAP ⁺ /1.	--
	CAP ⁻ /1.	20%
CAP ⁻ /1. szövetvonal RNS I.	1.	--
	CAP ⁺ /1.	--
	CAP ⁻ /1.	--

Az RNS II. frakció közel egyöntetű és kis mértékű gyarapodást okozott a szövetminták friss suly értékeiben a tenyésztés 14. napján vizsgálva. Az RNS I. frakció hatásánál a 10% alatti szövet friss suly gyarapodását nemleges válasznak tekintettük a nagy szórás értékek miatt. Jelentős változást így csak a kloramfenikol érzékeny vonalnál tapasztaltunk: az 1. szövetvonal RNS I. kivonata 30%-al, a CAP rezisztens vonalé pedig 20 %-al emelte a kallusz friss suly gyarapodását a tenyésztés 14. napjára.

Az RNS II. frakció, amely főleg riboszómális RNS-eket tartalmaz, nem váltott ki jelentős változást. Ezt a szövetek speciális szénhidrát ellátottságával, a fotoszintézis háttérbe szorítottságával magyarázhatjuk. A kloroplasztisz képződésének és funkciójának stagnálása ugyanis nem jár magas RNS turn over-rel, így az nem is hasznosítódott.

Mivel a citokinin analóg gátlók vizsgálatának kis részterületét tüztük ki célul, itt csak megemlékezünk az RNS metabolizmus olyan élettani megfigyeléseiről, amelyek kifejezetten a kloroplasztisz differenciálódására és az etioplaszt megvilágítását követő keletkezésére vonatkozik. Az rRNS szintézise a kloroplasztiszban elég rövid időszakra, a plasztisz differenciálódás idejére esik. Ez szövetkulturáknál a sejtek gyors osztódását követően játszódik le. A plasztiszok rRNS tartalma az öregedés folyamán csökken (Wollgieun és mts, 1976).

Más szerzők eredményei is rámutatnak a rRNS fényindukált változásaira. A citoplazmatikus enzimek közül az RNS-t módosító enzimek működésére és ezáltal a minor komponensek mennyiségi változására hat a fény (Rácz és mts, 1978). A fehérjeszintézis gátlói közül a cikloheximid az etiolálódási folyamathoz hasonlóan változtatta a minor tartalmat. A kloramfenikol 10^{-4} M koncentrációja nem befolyásolta a minor tartalmat a szerzők szerint. A szövettenyészetek felhasználásával

is történtek ilyen jellegű vizsgálatok, de az igen alacsony plasztisz rRNS szint miatt ezek sikertelenek voltak. A szerzők utaltak a kallusz alacsony plasztisz tartalmával való kapcsolatra (Ibrahim és mts, 1975).

A szövet növekedését serkentő ribonukleinsav kivonat vékonyréteg kromatográfiája

A vékonyréteg kromatográfiás vizsgálatokhoz az 1. szövetvonalból, a CAP⁺/1. szövetvonalból és a CAP⁻/1. szövetvonalból kivont és tisztított RNS I. frakciót használtuk fel. Az RNS-t az 1. szövetvonalból kivont és részlegesen tisztított nukleáz preparátummal emésztettük, valamint nem enzimatikusan teljes sósavas hidrolízisnek vetettük alá.

A sósavas hidrolízis eredményeként szabad purin bázisokat és pirimidin nukleotidokat nyertünk. A módszer azért jó, mert nem befolyásolja a módosított, így például a metilált nukleotidok mennyiségét.

Az enzimes és savas hidrolízis eredményei jó egyezést mutattak az 1. szövetvonalnál $\pm 0,2$ Mol % eltérési értékekkel. A másik két szövetvonalnál sem haladta meg az eltérés a $\pm 0,5$ Mol % értéket. A kapott eredmények alapján összefüggést feltételezhetünk a növekedés serkentés és a CAP⁺/1. és 1. szövetvonal magasabb adenin tartalma között, bár kis mennyi-

XVII. Táblázat

A nukleinsav minták fő bázisainak összetétele a sósavas emésztés után, négy ismételt meghatározása alapján

Vizsgált RNS I minta	Nukleotid tartalom Mol %-ban megadva			G
	C	A	U	
1. szövetvonalból	22.0	23.8	22.5	31.7
CAP ⁺ /1. szövetből	18.1	25.7	26.0	30.2
CAP ⁻ /1. szövetből	24.0	21.5	22.8	31.7

ségü módosított adenin jelenlétét sem zárhattuk ki. Itt kell megemlítenünk azt a tényt is, hogy a tumoros szövetek adenin tartalma jelentősen magasabb, valamint a jelzett adenin beépülése is. A minor nukleotidok kimutatására tett próbálkozásaink a csiranövények vizsgálatánál bevált módszerek alapján (Rácz és mts, 1978) sikertelenek voltak.

ÖSSZEFOGLALÁS

A szövettenyésztés során számtalan növényélettani jellemző vizsgálatára nyílik lehetőség. Mind a mai napig kiemelt szerepük van a hormon kutatásoknak ezen a területen, mert erre a célra kifejezetten alkalmasak a tenyésztett, habituált és valamely hiánymutáns szövetek.

Az általunk vizsgált hosszú ideje tenyésztett dohányyszövet auxin indukálta növekedését és bizonyos enzimeinek vizsgálatát már elvégezték (Vetter, 1973). Így a tenyésztésben lévő dohány szövetvonalak összehasonlító vizsgálata után most a kinetin hatás analízisét tűztük ki célul. A kinetin speciális riboszóma szinten történő hatását analóg gátlók, a kloramfenikol és puromicin felhasználásával vizsgáltuk.

A szövettenyésztési feladatok közül elvégeztük a rendelkezésünkre álló szövetvonalak tenyésztését, vizsgálatát: a friss súly, szárazanyag tartalom, nukleinsav és fehérje tartalom meghatározásokat. Kiválasztottuk a legjobban gyarapodó, kallusz jellegű szövetvonalat. Teszteltük növekedését hormonhiányos tápközegek alkalmazásával. Megállapítottuk, hogy a fény hatása és az inokulum kora is befolyásolja a tenyésztés eredményét. Az auxin endogén szintet kielégítőnek találtuk, míg a kinetin hiányos variáns növekedése

sötétben nem volt megfelelő. A szövetvonalak organizációs készségét tekintve az organizálódó kallusz esetében a spontán organizáció megindulásához a 0,2 mg/l kinetin külső koncentráció megfelelőnek bizonyult. A régen tenyésztett kallusz szövet organizációját azonban nem tudtuk kiváltani.

Szuszpenziós kulturákat hoztunk létre, és vizsgáltuk a fehérjeszintézis gátlók hatását mind szilárd, mind folyékony tápközegen történő tenyésztéskor.

Kloramfenikolra túlérzékeny és rezisztens vonalat tudtunk izolálni. A sikeres szélesztések és a peroxidáz enzimaktivitások közötti összefüggést a tenyésztői munka csökkentésére használtuk fel. Mivel puromicines kísérleteinkben nem tudtunk rezisztens vonalat izolálni, feltételeztük, hogy a kloramfenikol iránti eltérő viselkedés alapja nem riboszómális eredetű.

Elvégeztük a szövetvonalak nukleázainak vizsgálatát. Megállapítottuk, hogy az egyes szövetvonalak eltérő aktivitási értékekkel rendelkeztek. A gátlókkal történő kezelés befolyásolta a nukleáz aktivitást is.

A kivont és nukleázoktól megvédett, tisztított RNS I. és RNS II. frakciók eltérő hatását mutattuk ki.

Az RNS I. frakció, amely a tRNS-eket is tartalmazta, teljesen bontható volt a dohány szövetből kivont és részlegesen tisztított nukleázzal. A savas hidrolízis és

az enzimatis bontás után végzett vékonyréteg kromatográfiás meghatározás alapján a növekedést serkentő mintákban magasabb adenin tartalmat tudunk kimutatni. A fehérjeszintézis gátlóinak hatására az RNS mennyiség közel megnégyszereződött, azonban a fő bázisok aránya nem változott.

IRODALOMJEGYZÉK

Abadom, P.N., Elson, D. (1970) A procedure for isolating transfer ribonucleic acid from human placenta *Biochim. Biophys. Acta* 199, 528-531.

Abbels, M., Digneffe, C., Dubois, E. (1972) Methylation of nucleic acids by higher plants *Symp. Biol. Hung.* 13, 69-74.

Armstrong, D.J., Burrows, P.K., Evans, W.J., Skoog, F. (1969) Isolation of cytokinins from tRNA *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 451-456.

Barg, R., Umiel, N. (1977) Effect of sugar concentrations on growth greening and shoot formation in callus cultures from four genetic lines of tobacco *Z. Pflanzenphysiol.* 81, 161-166.

Barnes, M.F., Tien, C.L., Gray, J.S. (1980) Biosynthesis of cytokinins by potato cell cultures *Phytochemistry* 19, 409-412.

Burrows, W.J., Armstrong, D.J., Kaminek, M., Skoog, F. (1970) Isolation and identification of four cytokinins from wheat germ tRNA *Biochemistry* 9, 1867-1872.

Bendich, A.J., Filner, P. (1971) Uptake of exogenous DNA by pea seedlings and tobacco cells *Mutation Res.* 13, 199-214.

Berlin, J., Widholm, J.M. (1978) Metabolism of phenylalanine and tyrosine in tobacco cell lines resistant and sensitive to p-fluorophenylalanine *Phytochem.* 17, 65-68.

Björk, G.R., Svensson, I. (1967) Analysis of methylated constituents from RNA by thin-layer chromatography
Biochim. Biophys. Acta 138, 430-432.

Carlson, P.S. (1970) Induction and isolation of auxotrophic mutants in somatic cell cultures of *Nicotiana tabacum* Science 180, 486.

Carlson, P.S. (1973) The use of protoplasts for genetic research Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 598-602.

Chen, C.M., Eckert, R.L., Mc Chesney, J.D. (1976) Evidence for the biosynthesis of t-RNA-free cytokinin FEBS Lett. 64, 429-434.

Chen, C.M., Melitz, D.K. (1979) Cytokinin synthesis in a cell-free system from cytokinin-autotrophic tobacco tissue cultures FEBS Lett. 107, 15-20.

Chen, C.M. Petschow, B. (1978) Cytokinin biosynthesis in cultured rootless tobacco plants Plant Physiol. 62, 861-865.

Cherry, J.H., Anderson, M.A. (1971) Cytokinin-induced changes in transfer RNA species In: Plant Growth Substances 1970, 181-189. (D.J. Carr (ed.)) Springer-Verlag, Berlin.

Cocking, E.C. (1972) Plant cell protoplasts isolation and development Ann. Rev. Plant. Physiol. 23, 29-50.

Davey, M.R., Cocking, E.C. (1972) Uptake of bacteria by isolated higher plant protoplasts Nature 239, 455-456.

Dixon, R.A., Dey, P.M., Murphy, D.L., White, I.M.
(1981) Dose responses for *Colletotrichum lindemuthianum*
elicitor-mediated enzyme induction in French bean cell
suspension cultures *Planta* 151, 272-280.

Doke, N., Tomiyama, K. (1980) Suppression of the
hypersensitive response of potato tuber protoplasts to
hyphal wall components by water soluble glucans
isolated from *Phytophthora infestans* *Physiol. Plant
Pathol.* 16, 177-186.

Dravniecks, D.E., Skoog, F., Burris, F.H. (1969)
Cytokinin stimulation of de novo thiamine synthesis
in tobacco cultures *Plant Physiol.* 44, 866-870.

Dougall, D.K. (1973) Dilution plating and nutritional
considerations In: *Plant Cells* (P.F. Krusi, JR. and
M.K. Patterson, JR. eds.) pp. 261-264.

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

Erion, J.L., Fox, J.E. (1981) Purification and
properties of a protein which binds cytokinin active
6-substituted purines *Plant Physiol.* 67, 156-162.

Everett, N.P., Wang, T.L., Gould, A.R., Street, H.E.
(1981) Studies on the control of the cell cycle in
cultured plant cells II. Effect of 2,4-dichlorophenoxy-
acetic acid 2,4D *Protoplasma* 106, 15-22.

Feirabend, J. (1970) Characterization on enzyme formation
during the development of the photosynthetic apparatus
in rye seedlings *Planta* 94, 1-15.

- Ferrari, T.E., Widholm, J.M. (1973) A simple, rapid and sensitive method for estimation of DNA, RNA and protein synthesis in carrot cell cultures Anal. Biochem. 56, 346-352.
- Fududa, I.K., Ashihara, H., Komamine, A. (1981) Pyrimidine nucleotide biosynthesis in *Vinca rosea* cells: Changes in the activity of the de novo and salvaga pathways during growth in suspension culture J. Exp. Botany 32, 126, 69-79.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells Exp. Cell. Res. 50, 151-157.
- Gamborg, O.L. (1977) Somatic Cell Hybridization by Protoplast Fusion and Morphogenesis in Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application (Barz, W., Reinhard, E., Zenk, H. eds.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- Gibbs, J.L., Dougall, D.K. (1965) The growth of single cells from *Nicotiana tabacum* tissue in nutrient media containing agar Expl. Cell. Res. 40, 85-95.
- Hadacova, V., Kaminek, M., Lustinec, J. (1977) Ionenzyme patterns of tobacco callus tissues differing in their requirement for auxin and cytokinin Int. Conf. on Regulation of Developmental Processes in Plants GDR, Halle
- Hart, G.E., Bhatia, C.R. (1967) Acrylamide gel electrophoresis of soluble leaf proteins and enzymes from *Nicotiana* species Can. J. Genet. Cytol. 9, 367-374.

Heiner, Y.M., Filner, P. (1970) Regulation of the nitrate assimilation pathway of cultured tobacco cells II. Properties of a variant cell line Biochim. Biophys. Acta 215, 152-165.

Henderson, T.R., Shinner, C.G., Eahin, R.E. (1962) Kinetin and kinetin analogues as substrates and inhibitors of xhantine oxidase Plant Physiol. 37, 552-555.

Heszky, L. (1973) A Nicotiana tabacum L. haploid és homozigóta diploid alakjainak előállítása portok kulturában, valamint kallusz szövet-kulturában. Agrobotanika 15, 215-231.

Holstein, R.D., Burns, R.C., Hardy, R.W.F., Herbert, R.R. (1973) Establishment of symbiosis between Rhizobium and plant cells in vitro Nature 232, 173-176.

Ibrahim, R.K., Ritter, L., Cavia, E. (1975) RNA profiles and nucleotide composition of flax callus and suspension cultures Biochem. Physiol. Pflanzen. 167, 451-457.

Jervis, L. (1974) Partial purification and characterization of two Nicotiana tabacum leaf ribonucleases Phytochem. 13, 709-714.

Jervis, L., Pirie, N.W. (1974) Ribonucleases in Nicotiana tabacum leaf extracts treated with phenol Phytochem. 13, 715-721.

Jervis, L. (1974) Affinity chromatography of Nicotiana tabacum ribonucleases Phytochem. 13, 723-727.

Jones, L.E. Hildebrandt, A.C., Riker, A.J., Wu, J.H. (1960) Growth of somatic tobacco cells in microculture Am. J. Botany. 47, 468-475.

Kirby, K.S. (1968) Isolation of nucleic acids with phenolic solvents In: Methods in Enzymology Vol. XII.B. 87-99. (Grossman, L., Moldave, K., eds.) Academic Press, New York and London.

Lance, B., Reid, D.M., Thorpe, T.A. (1976) Endogenous gibberellins and growth of Tobacco callus cultures Physiol. Plant. 36, 287-292.

Lawton, M.A., Dixon, R.A., Lamb, C.J. (1980) Elicitor modulation of the turn over of L-phenylalanine ammonia-lyase in French bean cell suspension cultures Biochim. Biophys. Acta 633, 162-175.

Linsmaier, E.M., Skoog, F. (1965) Organic growth factor requirement of tobacco tissue cultures Physiol. Plantarum 18, 100-127.

Maab, H., Klämbt, D. (1981) On the biogenesis of cytokinins in roots Phaseolus vulgaris Planta 151, 353-358.

Maliga, P., Sz-Breznovits, Á., Márton, L. (1973) Streptomycin resistant plants from callus culture of haploid tobacco Nature 244, 29-30.

Maliga, P., Márton, L., Sz-Breznovits, Á. (1973) 5-Bromodeoxyuridine resistant cell lines from haploid tobacco Plant. Sci. Letters 1, 119-120.

Malmberg, R., Griesbach, R.J. (1980) The isolation of mitotic and meiotic chromosomes from plant protoplasts *Plant. Sci. Letters* 17, 141-147.

Maróti, M. (1971) *Növényi szövettenyésztés Egyetemi jegyzet*

Maróti, M. (1977) *Növényi szövettenyésztés MTA Biol. Oszt. Közl.* 20, 365-401.

Murashige, T., Skoog, T. (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures *Physiol. Plantarum* 15, 473-497.

Nagata, T., Takebe, I. (1970) Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts *Planta* 92, 301-308.

Nagata, T., Takebe, I. (1971) Planting of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium *Planta* 99, 12-20.

Nishi, A., Kato, K., Takahashi, M., Yoshida, R. (1977) Partial synchronization of carrot cell cultures by auxin deprivation *Physiol. Plant.* 39, 9-12.

Nitsch, J.P., Nitsch, C. (1969) Haploid plants from pollen grains *Science* 163, 85-87.

Ohyama, K., Gamborg, O.L., Miller, R.A. (1972) Uptake of exogenous DNA by plant protoplasts *Can. J. Botany* 50, 2077-2080.

Pilet, P.E., Braun, R. (1967) The interrelation of RNA auxin oxidases in Lentil roots *Physiol. Plant.* 20, 870-878.

Peterson, L.G. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable Anal. Biochem. 83, 346-356.

Rácz, I., Király, I., Lasttity, D. (1978) Effect of light on the nucleotide composition of rRNA of wheat seedlings Planta 142, 263-267.

Smith, H.H. (1974) Model systems for somatic cell plant genetics Bioscience 24, 269-276.

Smith, H. (1977) The molecular biology of plant cells Botanical Monographs Vol. 14. Blackwell Scientific Publications

Solymosi, F., Fedorcsák, J., Gulyás, A., Farkas, G.L. (1968) A new method based on the use of diethyl-pyrocabonate as a nuclease inhibitor for the extraction of undegraded nucleic acid from plant tissues Eur. J. Biochem. 5, 520-527.

Szabados, L., Hadlaczky, Gy., Dudits, D. (1981) Uptake of isolated plant chromosomes by plant protoplasts Planta 151, 141-145.

Szilágyi, L., Nagy, A. (1977) Comparative analysis of green and spontaneous albino mutant lines of *Nicotiana sylvestris* Acta Bot. Acad. Scient. Hung. 23/1-2/, 219-227.

Takebe, I., Nagata, T. (1973) Culture of isolated tobacco mesophyll protoplasts Collog. Intern. Centre. Natl. Rech. Sci. Paris 212, 175-181.

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

Udvardy, J., Farkas, G.L., Marre, E., Forti, G. (1967) The effects of sucrose and light on level of soluble and particle bound ribonuclease activities in excised *Avena* leaves *Physiol. Plant.* 20, 781-788.

Van Staden, J. (1979) The effect of adenine and mevalonic acid on the endogenous cytokinins of a cytokinin dependent strain of soya bean callus *Ann. Bot.* 44, 671-675.

Van Sittert, N.J., Ledebouer, A.M., Van Ryn, C.J.S., Boon, E., Schilperoort, R.A. (1975) RNA from callus cultures and leaves of *Nicotiana tabacum* *Phytochem.* 14, 637-646.

Vasil, V., Vasil, I.K. (1972) Growth and cell division in isolated protoplasts in microchambers *Collog. Intern. Centre Natl. Rech. Sci. (Paris)* 212, 139-149.

Vetter, J. (1974) The auxin induced growth of tobacco callus tissue I. Correlation between growth and RN-ase activity *Biochem. Physiol. Pflanzen* 165, 114-118.

Wang, T.L., Everett, N.P., Gould, A.R., Street, H.E. (1981) Studies on the control of the cell cycle in cultured plant cells III. The effects of cytokinin *Protoplasma* 106, 23-35.

Widholm, J.M. (1972) Tryptophan biosynthesis in *Nicotiana tabacum* and *Daucus carota* cell cultures: Site of action of inhibitory tryptophan analogs *Biochim. Biophys. Acta* 261, 44-51.

Widholm, J.M. (1976) Selection of cultured carrot and tobacco cells resistant to lysine, methionine and proline analogs *Can. J. Bot.* 54, 1523-1529.

Wetter, L.R. (1977) Isoenzyme patterns in Soybean-Nicotiana hybrid-cell lines *Molec. Gen. Genet.* 150, 231-235.

Wollgieun, R., Lerbs, S., Munsche, D. (1976) Synthesis of ribosomal RNA in chloroplasts from tobacco leaves of different age *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 170, 381-387.

Wray, J.L., Brice, R.E., Fowden, L. (1974) Development of amino-acyl tRNA synthetases in cultured *Nicotiana tabacum* cells *Phytochemistry* 13, 697-701.

Yeoman, M.M. (1970) Early development in callus cultures *Intern. Rev. Cytol.* 29, 383-409.