

5-BROMODEOXYURIDIN REZISZTENS DOHÁNYMUTÁNSOK IZOLÁLÁSA
ÉS JELLEMZÉSE SZÖVETTENYÉSZETBEN

írta:

Márton László
tud.smtárs.

készült:

MTA
Szegedi Biológiai Központ
Növényélettani Intézet

1975

S Z E G E D

TARTALOMJEGYZÉK

	oldal
1. BEVEZETÉS	
1. A növényi sejtgenetika eredményeinek áttekintése	1
2. Célkitűzés	8
3. Irodalmi áttekintés: A BUdR anyagcseréje és hatása a sejtműködésre	8
2. ANYAG ÉS MÓDSZER	
1. Kísérleti növény	16
2. Kallusztenyésztés	16
3. Mutánsok tesztelése	18
4. Növényvonalak fenntartása	19
5. Sejtszám meghatározás	19
6. Kromoszóma számolás	19
7. BUdR-H-3 és timidin-H-3 felvételének és beépülésének vizsgálata	20
3. KISÉRLETI EREDMÉNYEK	
1. 5-Bromdeoxyuridin rezisztens sejtvonalak izolálása	27
2. Sejtvonalak rezisztenciája különböző mennyiségű auxint és citokinint tartalmazó táptalajon	29
3. Növények regeneráltatása a BUdR rezisztens sejtvonalakból	34
4. A BUdR rezisztencia öröklésmenetének vizsgálata	39
5. A BUdR és a timidin felvétele, beépülése szenzitív és rezisztens sejtvonalakba	42
4. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	
1. 5-Bromdeoxyuridin rezisztens sejtvonalak izolálása	50
2. Sejtvonalak rezisztenciája különböző mennyiségű auxint és citokinint tartalmazó táptalajon	50
3. Növények regeneráltatása a BUdR rezisztens sejtvonalakból	50
4. A BUdR rezisztencia öröklésmenetének vizsgálata	51
5. A BUdR felvétele és beépülése a szenzitív és a rezisztens sejtvonalakba	52
5. ÖSSZEFOGLALÁS	57
6. IRODALOMJEGYZÉK	59

1. BEVEZETÉS

1.1. A növényi sejtgenetika eredményeinek áttekintése

A növényi szövet- és sejttenyésztés, valamint a protoplaszt módszer fejlődése lehetővé tette mikrobiológiai módszerek alkalmazását magasabbrendű növények genetikájában is. Akár egyetlen növényi sejt is képes egy teljes növényre regenerálódni, így a sejtek szintjén végzett munka eredménye átvihető teljes növények szintjére és felhasználható a klasszikus genetikában, növénynemesítésben.

A növényi sejtgenetika területén egyre több laboratórium kezd dolgozni. A közelmúltban már megszülettek az első jelentős eredmények a következő területeken:

- a. paraszexuális hibridizáció,
- b. genetikai információ átvitele,
- c. biokémiai mutánsok izolálása.

a. Paraszexuális hibridizáció vagy sejtfúzió alatt azt értik, hogy szomatikus sejtekből olyan utódsejteket hoznak létre, amelyek két sejt citoplazmájának és magjának egyesüléséből keletkeznek, hasonló módon, mintha a két fuzionáló sejt hím és női ivarsejt volna.

A növényi sejtek szomatikus hibridizációjának lehetőségére az emlős sejtekkel végzett sikeres kísérletek hívták fel a figyelmet.

A növényi sejtek vastag, merev fala azonban lehetetlen-
né teszi a sejtek fuzióját. A szomatikus hibridizáció
akkor vált realitássá, amikor sikerült sejtfal nélküli
sejteket un. protoplasztokat izolálni, regeneráltatni
és tenyészteni.

Az első osztódó protoplaszt tenyészetekről Takebe,
Lalib és Melchers számoltak be 1971-ben /2/. Kísérle-
teiket dohányjal végezték, ahol már adott volt az osztó-
dó tenyészetből teljes növény regeneráltatás módszere
/3, 4/.

1974-ben két jól használható fuzió módszerrel közöl-
tek. Az egyik a polietilén-glikol /PEG/, /5/, a másik a
magas pH kezeléssel alapul /6/.

Szomatikus hibridet két dohányfaj protoplasztjainak
fuziójával először Carlson állított elő. A szomatikus
hibridek azonosak voltak a keresztezéssel kapott hibri-
dekkel. A hibrid sejtek kisselektálására a szülői sej-
tek tömegéből azt az adott lehetőséget, hogy a két do-
hányfaj hibridje tumoros, így a hibrid-sejtek hormonok
hozzáadása nélkül is képesek osztódni /7/.

A kísérletet Melchers és Labib két fényérzékeny
dohány mutáns felhasználásával ismételte meg. A mután-
sok protoplasztjait fuzionáltatta, és kapott olyan nem
fényérzékeny kolóniát, majd növényt, amelyből önbepor-
zás után kihasádtak a szülői fényérzékeny típusok, te-

hát valóban szomatikus hibridizáció következett be /8/.

Nem kereszteződő fajok szomatikus hibridjeit még nem sikerült előállítani. A kísérleteket a hatékony szelekciós rendszerek hiánya hátráltatja.

b. Idegen genetikai információ átvitelét növényi sejtekbe először intakt növények, csiranövények szintjén végezték. Erre a területre Ledoux és mtsai hívták fel a figyelmet. Bakteriális eredetű DNS-t vetettek fel különböző csiranövényekkel, majd vizsgálták mi történik az idegen DNS-el a növényben. Azt találták, hogy az exogén DNS integrálódik a gazda DNS-be és replikálódik /9, 10, 11/. Ez utóbbi következtetés helyessége nem általánosan elfogadott. Egy másik kísérletben timin igényes Arabidopsis mutánsokat korigáltak autotroffá bakteriális DNS-sel /13/.

Stroun és mtsai sikeres tumoros transzformációt írtak le *A. tumefaciens* DNS-el /12/. Sejtes rendszerben Ohiyama végzett sikeres transzformációs kísérletet, szőja sejtekbe vitte be a manit hasznosításáért felelős géneket /14/.

Doy és mtsai eredményes transzgenóvizist végeztek lambda és ϕ 80 fággal /a transzgenóvizist mint a "bevitt idegen gén fennmaradása, transzkripciója, translációja és metabolikus funkciójának megnyilvánulása" definiálták/. A lambda fág a galaktóz, a ϕ 80 fág pedig a lak-

tóz felhasználásáért felelős géneket transzdukálja specifikusan. A gének a lizogén gazda baktérium genomjából származnak. A lambda és a ϕ -80 fággal a fenti géneket felúsitva tudták a sejtekbe vinni. A kezelés után kimutatták, hogy a laktóz és a galaktóz metabolizmus enzimeit termelődnek. Erre mutat az is, hogy a sejtek képesek voltak csak laktózt vagy galaktózt tartalmazó táptalajon is növekedni /15/.

A fenti rövid áttekintésből kitűnik, hogy minden kísérletben valamilyen szelekciót alkalmaztak a sikeres genetikai manipuláció bizonyítására.

A sejttenyészetekben a sejtek működése lényegében csak az alapanyagcserére korlátozódik. A sejtgenetikai munkák során, ahol különböző sejtek megkülönböztetése szükséges, pl. sejt-fúzió után a szülő sejtek és a szomatikus hibridek vagy egy transzformációs kísérletben a transzformált sejtek és az eredeti anyag, az alapanyagcserében mutáns sejtekkel célszerű dolgozni.

c. A növényi sejt-kulturákból izolált mutánsoknál a mutáció olyan funkciót érintett, amely manifesztálódott sejttenyészetben is. Legegyszerűbb esetben a sejtek valami extra tápanyagot igényeltek a növekedéshez, pl. egy aminosavat, vagy osztódtak a vad típusu sejtek számára mérgező drog koncentráció mellett is.

A növényi mutánsok izolálásában nagy előrelépést jelentett amikor sikerült androgenetikus haploid növényeket előállítani. Először Guha és Mahesvari, *Datura* sp.-ből, majd Nitsch és Nitsch dohányportokkultúrából nevelt fel haploid növényeket. Később egymagvu pollenből is sikerült embriogenezist indukálniuk /16, 17, 18, 19/. A haploid kiindulási anyag használata igen előnyös mutáns izolálásnál. Pl. egy recesszív mutáció esetében n^{-x} gyakorisággal jelenik meg a mutáns fenotípus haploid anyagból, n^{-2x} gyakorisággal diploidból, ami rendkívül nagy különbség. Haploid anyagól diploidizációval rögtön homozigóta növényeket lehet előállítani.

Ezt az elméleti megfontolást bizonyítja, hogy Carlson 1970-ben 6 auxotrof mutánst izolált haploid dohány sejtszuszpenzióból. Ez több mint amennyit a diploid emlős sejtenyészetekből előtte összesen izoláltak. Sejtvonalai növekedésükhöz hipoxantint, biotint, paraaminobenzoésavat, arginint és lizint, vagy prolint igényeltek. Mutánsok izolálásánál 5-bromodeoxyuridines dúsítást használt, mutagén kezelés után /20/. A dúsítás lényege a következő: a kiindulási sejtek heterotrófok, így minimál táptalajon is tudnak osztódni és a táptalajban adott BUdR-t beépítik DNS-ükbe. Az auxotrof sejtek nem osztódnak minimál táptalajon, mert tápanyag igényük van, így a BUdR-t

sem építik be. 315 nm hullámhosszu fénybesugárzással a vad sejtek elpusztíthatók.

Carlson sejtvonalaiból növényeket izolált, és megállapította, hogy az auxotrófiáért egy mendeli faktor felelős.

Heimer és Filner /1970/ treonin rezisztens sejtvonalaikat izolált dohány sejtuszpenzióból /a treonin akadályozza a nitrát felvételét, ezért ha a nitrát az egyedüli nitrogén forrás, a treonin toxikus/. A mutációs frekvencia 10^{-7} körüli értéket mutatott /21/.

Wildholm 1972-ben 5-metil-triptofán rezisztens sejtvonalaikat izolált diploid sárgarépa sejtuszpenzióból. A rezisztens sejtvonalaik más triptofán analógokkal szemben is rezisztenciát mutattak. Az izolálás és a jellemzés során a sejtvonalaik elvesztették organizációs képességüket, így nem tudott belőlük növényeket regenerálni. Ezért új sejtvonalaikat izolált és ezekből már kapott növényeket, amelyek egy része rezisztens fenotípusú volt. Ezeken kívül izolált para-fluoro-fenilalanin rezisztens sejtvonalaikat is sárgarépa, valamint dohány sejtuszpenzióból, de ezekből nem tudott növényeket előállítani /22, 23/. Mind a két esetben olyan típusú rezisztenseket kapott, amelyek úgy védték ki az aminosav analóg toxikus hatását, hogy a megfelelő aminosavból sokkal többet termeltek.

Carlson 1973-ban metioninszulfoximin rezisztens sejtvonalat majd növényeket izolált dohány protoplasztokból mutagén kezelés után. Kimutatta, hogy a rezisztencia öröklődik /24/.

Binding és mtsai streptomycin rezisztens sejtvonalat izolált haploid *Petunia* kalluszból /1970/. A sejtvonalból növényeket nem tudtak előállítani /25/.

1971-ben laboratóriumunkban sikerült streptomycin rezisztens sejtvonalat izolálni haploid dohány kallusztenyészetből, majd növényeket regeneráltatni /26/. A streptomycin rezisztencia öröklődött a vizsgált SR 1 mutáns esetében. Az F_1 és F_2 nemzedék vizsgálata alapján a rezisztencia anyai öröklődésmentet mutatott. Elektronmikroszkópos vizsgálatokból kiderült, hogy míg a szenzitív sejtek kloroplasztizai streptomycin hatására elvesztik gránumos strukturájukat és mitokondriumuk elektron denezsbbé válnak, addig a rezisztens sejtekre nem hat így a streptomycin. Ez az eredmény a kloroplasztisz és a mitokondrium mutációjára utal /27, 28/.

Az előzővel párhuzamosan 5-bromodeoxyuridin rezisztens sejtvonalat is izoláltunk két dohányfaj haploid kallusztenyészetéből /29/. A sejtvonalakból növényeket regeneráltattunk, és azt találtuk, hogy egy mendelien öröklődő mutáció felelős a rezisztenciáért /30/.

1973-ban Lescure 5-bromodeoxyuridin és 8-azaguanin rezisztens sejtvonalkat izolált diploid dohány kallusztenyészetből. Szerinte mind a BUdR, mind a 8-azaguanin rezisztencia mutáció következménye, mert a sejtvonalkak nem veszítették el rezisztenciájukat drog mentes táptalajon. Növényeket azonban nem sikerült izolálni az örök-lődésmenet vizsgálatához. /31/.

1974-ben Bright és Northcote diploid juhar, majd Ohiyama szója sejtszuspenzióból izolált 5-bromodeoxyuridin rezisztens sejtvonalkat. Növényeket nem tudtak regeneráltatni a sejtvonalkából így a BUdR rezisztencia örök-lődésmenetéről ezeknél a sejtvonalkánál nincs adaunk /32, 33/.

1.2. Célkitűzés

Célunk új, sejttenyészetben megnyilvánuló genetikai markerekkel rendelkező mutánsok előállítása volt.

A disszertációban haploid dohány kallusztenyészetből 5-bromodeoxyuridin /BUdR/ rezisztens mutánsok izolálását és jellemzését dolgoztam fel.

Azért választottuk ezt a markert, mivel az emlős sejtgenetikában széles körben sikeresen alkalmazzák szelekció-re. Azt várjuk, hogy hasonló jól használható a növényi sejtgenetikában is.

1.3. Irodalmi áttekintés: A BUdR anyagcseréje és hatása a sejtműködésre

A BUdR /5-bromodeoxyuridin/ egy timidin analóg szer-

kezeti képlete a következő:

1.3.1. A BUdR beépülése

Mind az eukarióta, mind a prokarióta szervezetek beépítik a BUdR-t a timidin helyére a DNS-be. A különbség mindössze annyi, hogy a prokarióták a bázist, a bromouracilt is beépítik /34, 35/, míg az eukarióták csak a nukleozidot, a bromodeoxyuridint hasznosítják megfelelően beépítésre /37, 38, 39/. A BUdR és a BU beépülésében szereplő enzimek azonosak a timidin és timin beépülésében szerepelőkkel. Erre először azok a korai vizsgálatok mutattak rá, amelyek a BUdR és a BU kompetitív hatását mutatták ki a timin, timidin, TMP, sőt a timidin prekursorainak beépülésére /41/. Mind a prokarióták, mind az eukarióták képesek a TMP szintézisére, így az endogén TMP kompetitív a BUdR inkorporációjában. A DNS-ben a timidin csaknem 100%-ban helyettesíthető BUdR-rel, ha a belső TMP szintézist aminopterin /42/ vagy fluorodeoxyuridin /43/ hozzáadásával gátoljuk. A két drog a dUMP TMP átalakulást gátolja meg /44, 45/.

A DNS-be épült BUdR eloszlását több csoport vizsgálta az elmúlt években. Kimutatták, hogy a BUdR beépülés purin-BUdR-purin helyzetben gyakoribb mint egyéb helyzetekben /46/.

Alacsony $/10^{-9}M/$ BUdR, koncentrációt használva a BUdR a repetitív és az intermedier szekvenciákba épül be elsősorban és az unique szekvenciákba 5-10-szer kisebb mértékben /47/.

Magasabb $/10^{-4}M/$ BUdR-t alkalmazva az eloszlás egyenletes volt.

"Timidin kedvelő" helyeket találtak növényi rendszeren, Vicia faba-val végzett kísérletekben. Akármennyi BUdR-t adtak, csak 75 %-os behelyettesítést kaptak a DNS-ben. A maradék 25 % timidint csak a dUMP - TMP lépés gátlása után tudták BUdR-re cserélni. Ha ezután kevés timidint és sok BUdR-t adtak a táptalajba, a sejtek preferenciálisan a timidint építették be 25-30 % timidin behelyettesítésig /48/.

1.3.2. Az 5-bromodeoxyuridin szubsztitúció hatása a DNS fizikai jellemzőire.

A timidin BUdR-rel való behelyettesítése a behelyettesítés mértékétől függően megváltoztatja a DNS fizikai paramétereit. Ezek a változások a következők:

- a. Nő az olvadási hőmérséklet $/T_m/$, /49/,
- b. Nő a DNS sűrűsége /50, 51/,
- c. Változik a cirkuláris dikroizmus spektrum, ami a DNS szuperstrukturájának változására mutat /52/,
- d. A DNS fény és egyéb sugárzásra érzékenyebbé válik.

Ezen utóbbi tulajdonság mechanizmusa többé-kevésbé ismert. A BUdR molekula könnyen gerjesztődik már 315 nm hullámhosszu fény kvantumjaitól is és dehalogéneződik. Az így kialakuló szerkezet a cukorrészből elvont proton segítségével stabilizálódik deoxyuridinné. Ha a fenti változás DNS-be épült BUdR molekulát érint láncszakadás következik be. Hasonló reakciót eredményez a Röntgen vagy gamma sugárzás is /53/.

1.3.3. A DNS-be épült 5-bromodeoxyuridin biológiai hatásai.

a. Mutagén hatás

A BUdR toxikus hatásának egyik lényeges faktora, hogy a DNS-be épülés után pontmutációkat okoz. A mutáció mechanizmusát Benzer és Freese derítette ki bakteriofágokkal. Kimutatták, hogy a BUdR egy tautomer mutagén. A BUdR keto formája timidinként viselkedik, azonban az enol forma citidinként, ami a következő replikációban párosodási hibát okoz. /BU-A helyett BU-C pár/. Ez a bázispár sift aminopurinnal megfordítható, amely a guanin helyére épül be és adeninként viselkedve korrigálhatja a BUdR okozta hibát.

A BUdR okozta pontmutációk finomtérképezéséből kiderült, hogy kitett helyek /un. hot spots/ vannak a DNS-ben ahol nagy gyakorisággal jelenik meg mutáció, míg másutt ritkán, vagy nem. A BUdR-rel indukált mutációk eloszlása

különbözik a spontán, vagy pl. a proflavinnal indukált mutációk eloszlásától /54, 55/.

b. Sugárérzékenyítő hatás

A BUdR-t inkorporált, majd besugárzott sejtek vizsgálatából kiderült, hogy az izolált DNS molsulya /1. 1.3. 2.d/ egyenes arányban csökken a beépült BUdR mennyiségével /56/. Fotokémiai reakció következtében létrejövő DNS láncszakadás a repair kapacitás kimerülése után szinténs sejthalálhoz vezet.

Kimutatták ezen kívül, hogy a besugárzás hatására DNS-DNS keresztkötések, valamint DNS - protein kovalens keresztkötések keletkeznek /57/.

A fenti molekuláris változások eredményeként a sejtek citológiai képe drasztikusan megváltozik. Kromoszómatorések, transzlokációk és egyéb aberrációk jelennek meg nagy gyakorisággal /58/.

Nagyarányu BUdR behelyettesítés esetén az S fázis, amikor az új DNS szintetizálódik, 3-5-ször hosszabb, ugyanakkor a sejtciklus többi fázisa nem változik /59/. In vitro kísérletben a DNS polimeráz lassabban szintetizálta az új DNS molekulát ha TTP helyett BUdRTP-t adtak.

d. RNS szintézist érintő hatása

BUdR-t beépített fibroblasztok RNS szintézisét vizsgálva azt találták, hogy az RNS bázisösszetétele drasztiki-

kusan megváltozott a BUdR-rel nem kezelt sejtekéhez képest. Adeninből kevesebb, guaninból több épült be. In vitro BUdR-kromatint /BU:/BU+T/=0.33/ használva templátként azt kapták, hogy 1,2 pM ATP épül be 1,7 pM helyett, amíg 2,2 pM GTP épül be 1,7 helyett. Az UTP és CTP beépülés nem változott. A 33 %-os BUdR behelyettesítés kb. 33 %- változáshoz vezet az adenin beépülésében. Ezt úgy értelmezik, hogy az RNS szintézis során a transzkripció a BUdR behelyettesítés következtében nem az eredeti kódnak megfelelően zajlik le, így ez megváltozott aminosavszekvenciájú fehérjék szintézisére vezet /60/.

1.3.e. Regulációs változások

Számos közlemény foglalkozik a BUdR beépülés specifikus, egy-egy gén expressziót érintő hatásával. Így a BUdR gátolta a myosin szintézisét fejlődő myoblasztokban /61/, az indukálható tirozin aminotranszferáz szintézisét hepatóma sejtekben /62/, mukopoliszaharidok szintézisét amnion sejtekben /63/, melanin szintézisét és a tumorigenitást melanóma sejtekben /64/, valamint indukálta az alkalikus foszfatázokat.

A BUdR beépülés sajátos morfológiai változásokat idézett elő a humán neuroblasztoma sejteknél /65/, speciális differenciálódási folyamatot indukált tengerisün embrióknál, amelynek típusa az embriók korától függött /66/.

A BUdR fenti specifikus, a génműködést érintő hatásainak közös jellemzői:

- a/ A tulajdonság kialakulásához a BUdR beépülése szükséges,
- b/ A tulajdonság eltűnik a BUdR timidinre visszahelyettesítése után.

Cook a BUdR beépülés hatására bekövetkező regulációs változásokat két mechanizmussal magyarázta /67/:

a/ A $-CH_3$ és a $-Br$ szubsztituens közötti kis van der Waals sugár különbség egy olyan makromolekulánál, mint a DNS már jelentős "szuperstruktúra" változást okoz, és az ún. makroregulációt megváltoztatja.

b/ A protein - DNS kötések erősebbek a BUdR-rel szubsztituált DNS esetében, és a protein - DNS kötéseknek a mikroregulációban tulajdonítanak nagy jelentőséget. Baktérium rendszerben, a lac operátor lokusz /DNS/ és a tisztított lac represszor protein között a disszociáció tízszer lassabb, ha a DNS 90 % BUdR-t tartalmazott a timidin helyén /68/.

1.3.4. BUdR rezisztencia

Baktériumokból, növényi és emlős sejtenyészetekből számos BUdR rezisztens mutánst izoláltak /34, 29, 30, 31, 32, 33, 58/. Emlős sejtenyészetből izolált sejtvo-
nalak nagy részénél a rezisztencia mechanizmusát is tisztázták /69, 70/.

BUDR rezisztenciát okozott:

a/ ha a BUDR nem épült be a DNS-be mert

1. a sejt nem vette fel,
2. felvette a sejt, de a timidin kináz enzim nem működött. - A timidin kináz enzim nem szerepel az endogén TMP szintézisében, a TMP ugyanis dUMP-ból keletkezik. A timidin kináz csak timidinből és analógjából készít monofoszfátot, és teszi lehetővé a BUDR DNS-be történő beépülését.

b/ Ha a BUDR beépült a DNS-ben, azonban egy mechanizmus kivédte a DNS-be épült BUDR toxikus hatását.

Egér sejttenyészetből izoláltak olyan BUDR rezisztens sejtvonalakat, amelyek beépítették a BUDR-t azonban a BUDR indukálta kromoszóma törések száma 10-ra csökken a szenzitív sejtekhez képest /58/. Szíriai hőrceögek sejteiből pedig BUDR dependens sejtvonalakat izoláltak, amelyek 99% építettek be a timidin helyére /71,72/. A rezisztencia mechanizmusára vonatkozó adatot nem közöltek.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Kísérleti növény

Nicotiana tabacum L.cv. Petit Havanna /2n = 48/,
valamint a *Nicotiana glauca* L. /2n = 24/ diploid és
haploid alakja.

2.2. Kallusztenyésztés

2.2.1. Táptalaj összetétele és elkészítése

A Linsmayer és Skoog féle RM inorganikus táptalajt
használtuk /4/ az alábbi módosításokkal /26,27,73/:

RMO: RM alapoldat + 0,5 ml/l benziladenin " 2 mg/l indol-
ecetsav.

Felhasználása: hajtások regeneráltatásához kallusz-
tenyészetből.

RMNO: RM alapoldat + 0,04 mg/l kinetin + 0,1 mg/l 2,4-D-
-diklórfenoxiecetsav + 3 mg/l indolecetsav.

Felhasználása: differenciálatlan kallusztenyészet
előállítására hajtás vagy levél-
darabokból, valamint a sejtvonalak
fenntartására.

A növekedési görbék felvételénél, teszteknel 10 ml-es hepa-
rinos üvegeket használtunk 5 ml táptalajjal. A táptalajt
1 mg/l B₁ vitaminnal egészítettük ki. A tenyészetek fenntar-
tása 100 ml-es Erlenmeyer lombikban /50 ml táptalaj, 0,5
mg/l B₁/vitamin/ történt.

A táptalaj sterilizálása is különbözött a két eljárás

során. A heparinos üvegek esetében a dugókkal /papírvatta/ együtt lesterilizált üvegekbe steril táptalajt mértünk ki. Az üvegeket 30 perc autoklávozás után szárítószekrényben /2 óra, 120°C-on/ szárítással sterilizáltuk. A táptalaj sterilizálása 15 perces autoklávozással történt.

A tenyészetek fenntartásánál 2x töménységű tápoldatot és 2x tömény agar-agar oldatot készítettünk. Az agart 10 perces autoklávozással felolvasztottuk, és összeöntöttük a hideg tápoldattal. Így megkaptuk a kívánt 1x végkoncentrációt. A kb. 50°C-os oldatot szétoztottuk az Erlenmeyer lombikokba, majd a táptalajokat ledugóztuk és autoklávozással sterilizáltuk /15 perc/.

2.2.2. Tenyészetek indítása növényi részekből

A nem steril körülmények között nevelt növény levelét vagy hajtását előbb detergens oldattal mostuk 10 percig, majd 70%-os alkoholban áztattuk 2 percig és 0,5 %-os kereskedelmi hipo oldattal mostuk 3 percet. A hipót desztillált vízzel /5x öblítve/ távolítottuk el. Az így sterilizált növényi részeket 10-30 mg nagyságu darabokra vágtuk és a táptalaj felszínére helyeztük.

2.2.3. Tenyészetek folyamatos fenntartása

A kalliusztenyészeteket 4 hetenként passzáltuk RMNO táptalajra. A BUDR rezisztens sejtvonalakat BUDR-t tartalmazó és nem tartalmazó táptalajon egyaránt fenntartottuk. A táptalajban 30 mg/l BUDR-t használtunk a Nicotiana taba-

cum sejtvonalak esetében és 10 mg/l BUDR-t a *N. silvestris* sejtvonalaknál. Az inokulum nagysága 5 mg szövet/ml táptalaj.

2.3. Mutánsok tesztelése

2.3.1. Kallusz teszt.

A BUDR növekedést gátló hatásának vizsgálatát minden esetben a kallusztenyésztésnél említett módon előkészített heparinos üvegekben végeztük. Akár a sejtvonalak, akár a növények vagy csiranövények BUDR rezisztenciáját vizsgáltuk előbb egy teljesen differenciálatlan kallusztenyészetet indukáltunk és ebből inokuláltuk a BUDR-t tartalmazó táptalajra a tenyészeteket. Mivel a BUDR autoklávozása utáni valamint sterilre szűrés utáni hatása között nem tapasztaltunk különbséget, a továbbiakban együtt autoklávoztuk a táptalajjal.

2.3.2. Csiranövény teszt

A BUDR rezisztencia vizsgálatához először steril csiranövényeket állítottunk elő a magvak felületi sterilizálásával, majd csiréztatásával desztillált vizes agar-agar médiumon. A 10-12 napos csiranövényeket használtuk fel kallusztenyészet indítására RMNO táptalajon, így egyenként teszteltük a BUDR rezisztenciát 30 mg/l BUDR-t tartalmazó táptalajon.

A magvak sterilizálását a 2.2. pontban foglaltak alapján végeztük azaz a különbséggel, hogy minden lépés

után a magvakat nuccs-szűrővel szűrőpapíron gyűjtöttük össze.

2.4. Növényvonalak fenntartása

A fontos vonalakat, mutánsokat steril körülmények között növény alakban tartjuk fenn. 100 ml-es Erlenmeyer lombikban 50 ml "T" táptalajt /19/ használunk. A növények csucsát két-havonta passzáljuk új táptalajra, ahol egy hét múlva meggyökeresednek.

2.5. Sejtszám meghatározás

Nash és Davies módszerével végeztük /74/. 5 ml 5 % CrO_3 -ot tartalmazó 2 n H_2SO_4 oldatban 250 mg szövetet 24 órát inkubáltunk, majd 0,2 ml absz. alkoholt adtunk hozzá és Labortherm rázógépen maximális fordulattal egy percig rázattuk. 200 ml-re hígítottuk, majd saját gyártmányu kamrával, mikroszkóp alatt számoltuk a sejteket. Mintánként három alkalommal 10 látómezőt számoltunk le, és a számtani átlagot szoroztuk az előzetesen kiszámított faktorial.

2.6. Kromoszóma számolás

A gyökér csucsokat 4 órát kolhicineztük /0,05 % kolhicin, 2 % glukóz/ majd etanol:jégecet 3:1 arányu keverékében minimum 4 órát fixáltuk a preparátumot. Ezután 0,1 N HCl-ben, 60°C-on hidrolizáltuk a preparátumot és Feulgen reagenssel festettük 0,5-1 órát. 45 % alkoholban dörzspreparátumot készítettünk és számláltuk a kromoszómákat.

2.7. BUdR-H-3 és timidin-H-3 felvételének és beépülésének vizsgálata.

2.7.1. Módosított Schmidt-Thannhauser-Sneider módszer

A beépülés és a felvétel vizsgálatára az eredeti módszer tovább módosított formáját használtuk fel /75, 76/. A felvételt és a beépülést ugyanis egy mintában akartuk vizsgálni. Ha a King és mtsai által leírt módszert használjuk és a savoldható frakció előállításához 5 % triklórecetsavat használunk, a savoldható frakcióban a magas quench miatt lehetetlen kielégítő hatásfokkal mérni az aktivitást. Ezért a következő lépésekben végeztük el a beépülés és felvétel vizsgálatát.

- 200 mg súlyú szövetdarabot 1 ml RMNO táptalajban 5 uCi/ml timidin-6-H-3 vagy BUdR-6-H-3 jelenlétében inkubáltuk különböző ideig,
- 5-ször mostuk a mintát hideg táptalajjal, amely 50 mg/l timidint tartalmazott,
- a kalluszt homogenizáltuk Potter féle homogenizátorral
- 1,5 ml 10 %-os perklórsavat adtunk a homogenizátumhoz 0°C-on,
- két óra állás után Millipore szűrőkészülék segítségével szűrőpapír korongra szűrtük a hideg perklórsavban oldhatatlan frakciót /DNS, RNS, fehérje és más makromolekulák/.

- a szűretet /PCS oldható frakció/ KOH-dal közömbösítettük, a kicsapódó $KClO_4$ -ot lecentrifugáltuk, majd a felüluszból megmértük az aktivitást. Ezt tekintettük felvételnak.
- A hideg PCS oldhatatlan frakciót 5 %-os PCS-el mostuk, majd szűrőpapírral együtt 2 ml 0,3 N KOH-ot tartalmazó centrifugacsőbe tettük, és $37^{\circ}C$ -on 18 órát inkubáltuk, hogy lehidrolizáljuk az RNS-t.
- lecentrifugáltuk, majd 50 %-os triklórecetsavval pH 1,6-ra állítottuk és 0,003 M $MgCl_2$ jelenlétében két térfogat $20^{\circ}C$ -os abs. alkoholt adtunk.
- két órát mélyhűtőben tartottuk, majd a csapadékot üvegrost filterre szűrtük /Whatman GF/C/, mostuk hideg 70%-os alkohollal.
- A csapadékot a filterrel együtt scintillációs számlálóban értékeltük /rádioaktivitás mérése: l. 2.7.5. pont alatt/.

2.7.2. Fehérjementes nukleinsav preparátum készítése

A fehérjementes össz nukleinsav preparálás során Kirby /77/ módszerét követtük, amelynek lényege a következő:

- Homogenizálás 10x térfogat kivonópufferben. A pufferoldat összetétele: 0,01 M Tris-HCl, pH 7,6; 1 % TNS /Triizopropil-naftalin-szulfát/; 6 % PAS /para-amino-szalicilsav; 0,05 M NaCl;
- deproteinizálás egyenlő térfogatu fenol-krezollal /80 %

- fenol, 10 % m-krezol; 0,01% 8-OH-kinolin, 10 % viz/
- centrifugálás, majd a felső fázist leszivatni, és 0,15
térfogot 3 M NaCl hozzáadása után ismét egyenlő térfo-
gatu fenol-krezollal fehérjementesíteni.
- centrifugálni, és a felső fázist leszivatni, majd két
térfogot absz. alkohollal kicsapni a nukleinsavakat
/egy éjszaka állás mélyhűtőben/,
- a csapadékot összegyűjteni és mosni 70 %-os alkohollal.
Amennyiben a BUdR-H-3 vagy timidin-H-3 beépülést vizsgál-
tuk, és poliakrilamid gél-elektroforéziseel választottuk
szét az egyes nukleinsavakat 1 g kalluszból indultunk ki,
amelyet 5 ml RMNO táptalajban 5 uCi/ml aktivitás mellett
48 órát sötétben inkubáltunk. A használt izotóp prepará-
tumok: 5-bromodeoxyuridin-6-H-3, 2,2 Ci/mM, Amersham,
thymidin-6-H-3, 2,2 Ci/mM UVVVR, Csehszlovákia.

2.7.3. Poliakrilamid gél-elektroforézis

A fentiekben leírt módon elkészített össz-nuklein-
sav preparátumot Loening /78/ módszerével választottuk
szét, és értékeltük.

Törzsoldatok: 1. Akrilamid: 15 g akrilamid,
+ 0,75 g bis-akrilamid
100 ml-re feltöltve.
2. Puffer: 180 mM Tris
150 mM NaH_2PO_4
5 mM Na_2EDTA

pH 7,7 /HCl/

3. TEMED: N,N,N',N'-tetrametil-
-etiléndiamin

4. Ammóniumperszulfát: 10 % frissen
feloldva.

- Gél összeállítása:

1. törzsoldat	2,5	ml
2. "	3,1	ml
H ₂ O	9,8	ml
3. törzsoldat	12,5	ul
4. "	125	ul

Légtelenítés vakuumban, majd dializáló
hűvellyel lekötött végű 100 x 10 x 6,5
mm plexi csövekbe töltés.

- A csövek szabad végére, a gél fölé az oxidáció megakadályozására vizet rétegeztünk. 30 perc múlva a gél kialakul, a polimerizáció befejeződik.
- Az elektroforézis tankba alul - felül 0,2 %-os nátrium lauril-szulfáttal kiegészített 5x hígított puffert öntöttünk, megfelelő magasságig, és 30 percet 5 mA/cső áramerősséggel /Shandon tápegység/ előfuttatást végeztünk.
- 100 ul 5x hígított, 5 % ribonukleáz-mentes szaharózzal kiegészített pufferben feloldottuk az előző fejezetben leírt módon elkészített össz nukleinsav preparátumot, megmértük az abszorbanciát 260 nm-nél, és 1-2 OD koncentrikációs mikropipettával a géltre rétegeztünk.
- Az elektroforézis tank elektródjait ismét úgy kötöttük be, hogy a felülre a negatív, alulra a pozitív elektród kerüljön. A preparátumokat 5 mA/cső áramerősséggel 3,5

órát futtatuk.

- A csöveket kiemeltük és a dializáló hüvely eltávolítása után a géleket desztillált vízbe kifújtuk majd 2 órát áztattuk desztillált vízben melyet félóránként cseréltünk;
- CHRÓMOSCAN-készülékben felvettük a relatív abszorban-
cia megoszlást a gélben.
- A géleket részcsőbe helyeztük, rögzítettük és szárazjég-
gel megfagyasztottuk;
- A félfagyott, már nem rideg állapotú gél 1 mm-es dara-
bokra szeleteltük JOYCE gélseletelő készülékkel.
- A szeleteket 0,5 ml tömény hidrogénperoxid oldatban 12
órát hidrolizáltuk, és mértük a radioaktivitását /0,2 ml
oldatból/.

2.7.4. A bromouracil vékonyréteg kromatográfiás elválasz- tása a DNS sósavas hidrolizátumából

A BUDR-6-H-3 jelölés után a DNS-t kétféle módon
izoláltuk:

/a/ A 2.7.1. pontban leírt preparálást úgy foly-
tattuk, hogy az üveg-filterre szűrt és a DNS-t valamint
egy kevés proteint tartalmazó frakciót forró 5 %-os tri-
klórecetsavval extraháltuk, az extraktumot bepároltuk,
6 N HCl-ben felvettük és lezárt ampullában 100°C-on 3 órát
hidrolizáltuk /79/.

/b/ A 2.7.2. pontban leírt módon kapott összes nukleinsav preparátumból eltávolítottuk az DNS-t és fehérjét. Az anyagot feloldottuk, 0,5 M NaCl, 0,01 M Tris, pH 8, és 50 µg/ml RN-ázal kezeltük /hőkezelt, Worthington, Co./ 1 órát 37°C-on. Az inkubálás után Na₂EDTA-t 0,01 M, és SDS-t /nátrium lauril-szulfát/ 0,5 %, adtunk az oldathoz majd 60°C-on pronázzal /25 µg/ml/ kezeltük.

1,5 óra után az oldatot kloroform-amilalkohol /25:1/ keverékével fehérjementesítettük /10 perc rázás 25°C-on, majd centrifugálás/. A DNS a felüluszóban maradt, míg a kicsapódott fehérje az interfázisban helyezkedett el.

A felüluszóból 0°C-on, absz. alkohollal kicsaptuk a DNS-t, üvegbotra csavartuk, szárítottuk, és az előző pontban leírtak alapján hidrolizáltuk. A hidrolizátumot bepárlócsészében bepároltuk, majd 0,1 M HCl-ben feloldottuk? kapillárisal MN 300 cellulóz, Kieselgél HF₂₅₄ /8:2/ összetételű 20x20 cm méretű 0,25 mm vastagságú rétegre vittük fel /80/. Két dimenzióban futtatuk /81/: I - n-butanol, metanol, víz, ammónia, /60:20:20:1/; II - 1 M nátrium-hidrogénfoszfát, 1,2 M ammóniumsulfát, i-propanol, /132:74:1/.

A foltok láthatóvá tételére 45 µg/kromatogram brómuracilt, uracilt, timint, adenint, guanint, adtunk. Így UV-ban a világos háttérben jól azonosítható foltokat kaptunk. A bázisoknak megfelelő foltokat kikapartuk és a

rádoaktivitást meghatároztuk.

2.7.5. Rádoaktivitás mérése /H-3/

/a/ Vizes oldatból.

Az aktivitást tartalmazó oldatból 0,20 ml-t 5 ml dioxános oldatba, Packard küvettákba töltöttük, és scintillációs számlálóval értékeltük /Packard Tri-Carb készülék/. A dioxános scintillációs oldat összetétele:

20 ml	etilénglikol
100 ml	metanol
4 g	PPO /2,5-difeniloxazol/
0,2 g	POPOP /1,4-bis/2-/5-fenil/-oxazol/benzol/
60 g	naftalin

1 literre feltölteni dioxánnal.

/b/ Vizmentes mintákban.

Az aktivitást tartalmazó csapadékot vagy oldatot üvegrost-filterre /Whatman GF/C/ szárítottuk infralámpával. A filtereket küvettákba tettük és 5 ml toluolos scintillációs folyadékot mértünk rá. Az aktivitást Packard Tri-Carb scintillációs számlálóval határoztuk meg.

A toluolos scintillációs oldat összetétele:

5 g	PPO
0,3 g	POPOP

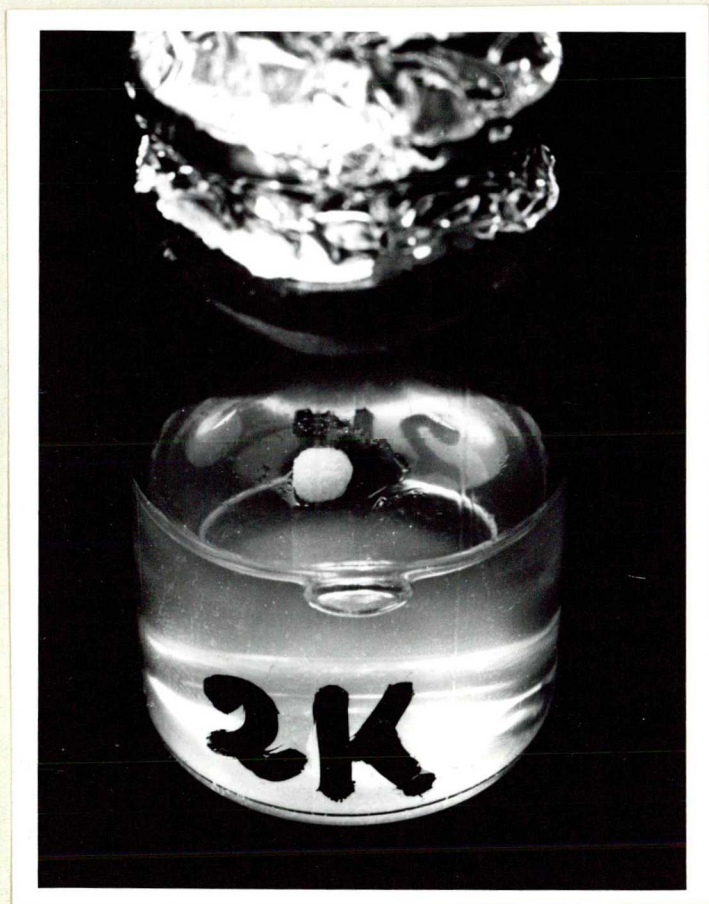
1000 ml toluolban.

3. KISÉRLETI EREDMÉNYEK

3.1. 5-bromodeoxyuridin rezisztens sejtvonalak izolálása

Laboratóriumunkban elsőként sikerült BUdR rezisztens sejtvonalakot izolálni növényi anyagból. A BUdR rezisztens sejtvonalakot 30 mg/l /N. tabacum/ és 3 mg/l /N. silvestris/ BUdR-nel kiegészített RMNO táptalajon izoláltuk. A szelekciót haploid *Nicotiana tabacum* és *N. silvestris* növények primer kallusztenyészetekben végeztük. Nagyszámu tenyészetet indítottunk 10 ml-es heparinos üvegekben /30 mg inokulum/, melyeket három hétig, 27°C-on, sötétben inkubáltunk. Többségükben nem kaptunk osztódást. Néhány tenyészetben jól osztódó fehér színű régiót találtunk a nem osztódó, pusztuló, barna színű kalluszon /1. ábra/. Az osztódó régiókat izoláltuk és továbbvittük BUdR-t tartalmazó táptalajra, ahol jól növekedtek.

A BUdR-RMNO táptalajra inokulált szenzitív kallusztenyészetekből izolált osztódó kolóniák nem mindegyike mutatott stabil rezisztenciát a további tesztelés során. A haploid *N. silvestris* kallusznál 100 tenyészetből 17 BUdR rezisztens kolóniát izoláltunk, de csak 4 bizonyult stabil rezisztensnek. 100 tenyészetben /3 g kallusz/; kb. 3×10^6 sejt/ 4 rezisztens vonalat izoláltunk, így a rezisztensek gyakorisága $1,3 \times 10^{-6}$ volt a kiindulási



1. ábra: BUDR rezisztens mutánsok szelekciója
A fehér kallusz a necrotizáló inokulumon egy
rezisztens sejt-kolonia.
Szelekció: 30 mg/l BUDR-en /leírás 3.1. feje-
zetben/.

sejtszámhoz viszonyítva. A rezisztens sejtek gyakoriságát a haploid *N. tabacum* tenyészetekben hasonlónak találtuk.

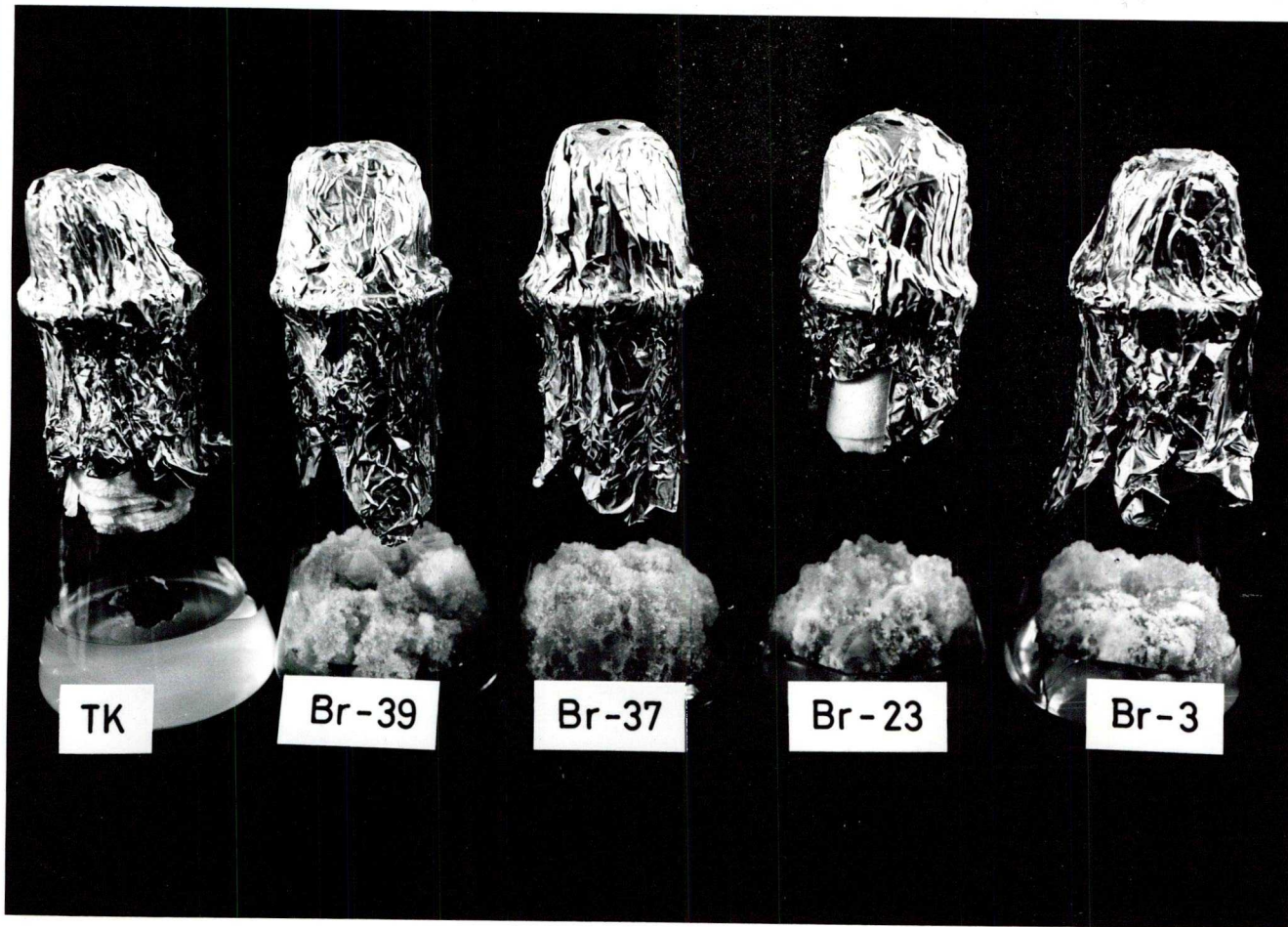
Végül is *N. tabacum*-ból a BR 3, BR 23, BR 37, BR 39 jelzésű; *N. silvestris*-ből Si 4, Si 5, Si 7, Si 17 jelzésű BUdR rezisztens sejtvonalat kaptuk, amelyeket 1972-óta folyamatosan fenntartunk. /2. a és 2.b ábrák/.

3.2. Sejtvonalak rezisztenciája különböző mennyiségű auxint és citokinint tartalmazó táptalajon

Előzetes eredményeink arra mutattak, hogy a BUdR rezisztencia mértéke függ a táptalajban jelenlévő hormonok relatív mennyiségétől, ezért mind RMO mind RMNO táptalajon elvégeztük a rezisztencia tesztelését.

Az eredmények szerint:

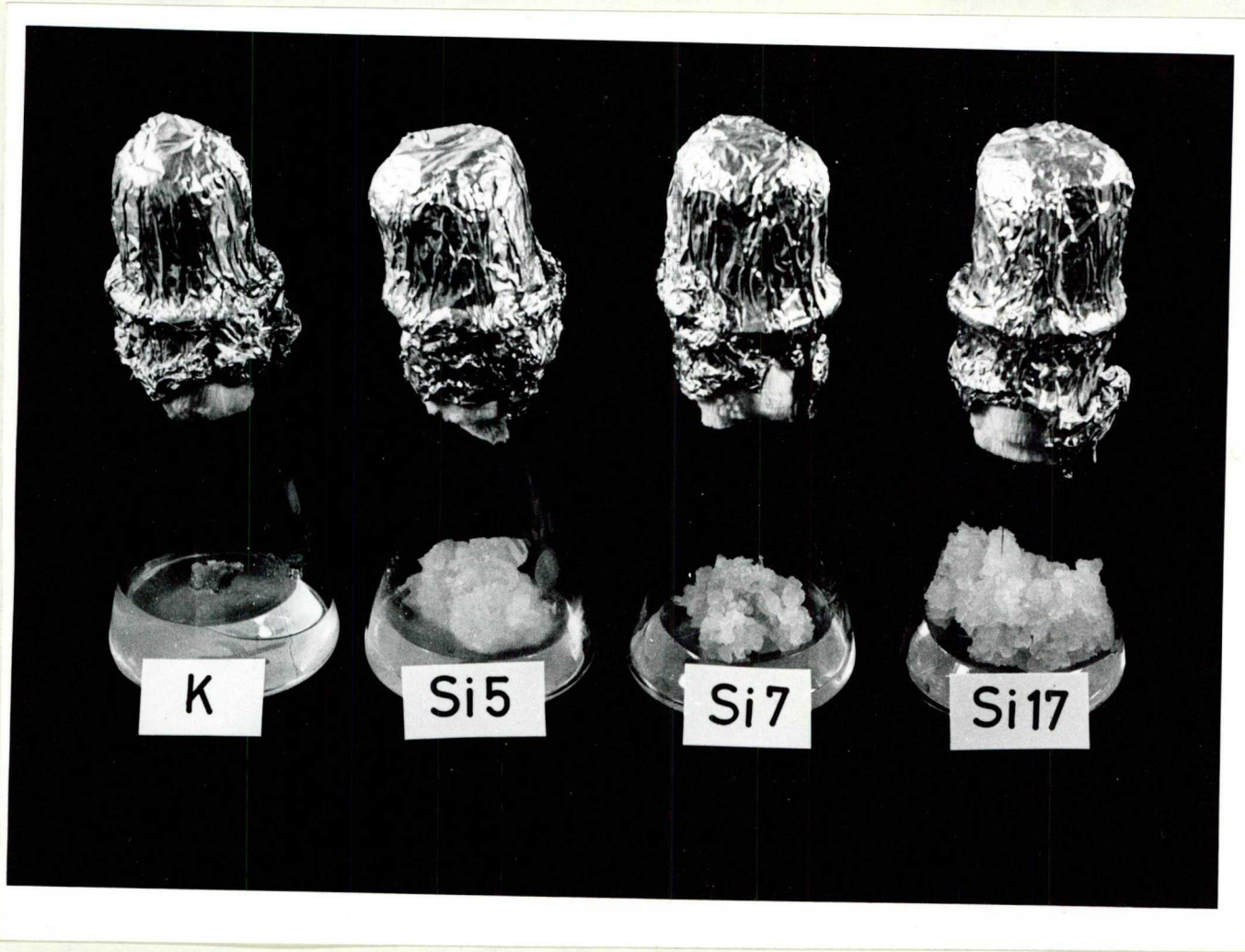
- 1/ A BUdR érzékenység a rezisztens és a szenzitív tenyészeteknél is 10-szer nagyobb RMO táptalajon mint RMNO-n /3. ábra/.
- 2/ Az izoláláshoz használt 3 mg/l illetve 30 mg/l BUdR koncentrációnál jóval magasabbat is elviselnek a rezisztens sejtvonalak RMNO táptalajon. /4. ábra/



2.a. ábra: *N. tabacum* BUdR rezisztens sejtvonalak rezisztenciájának bemutatása.

A tenyészetek 4 hétig nőttek 30 mg/l BUdR-t tartalmazó táptalajon.

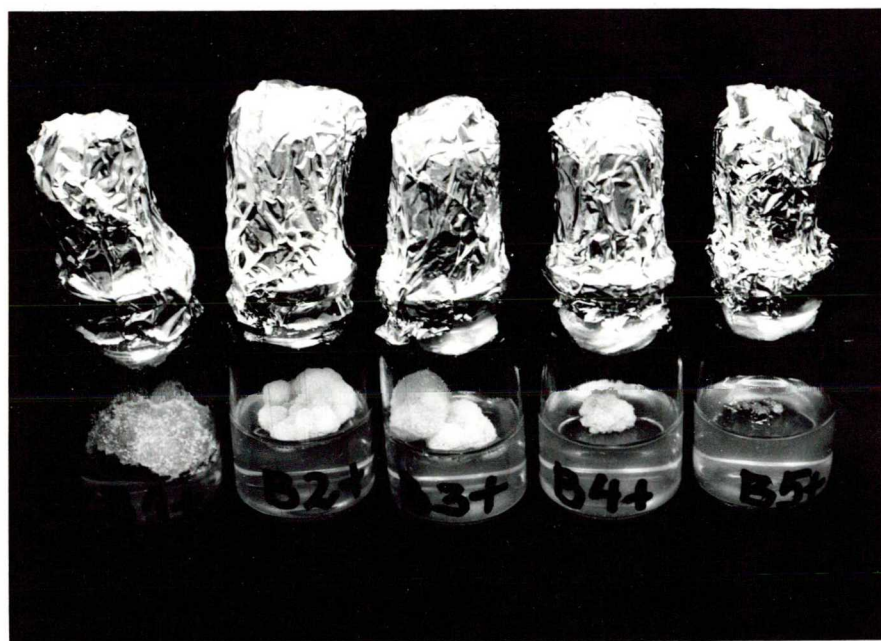
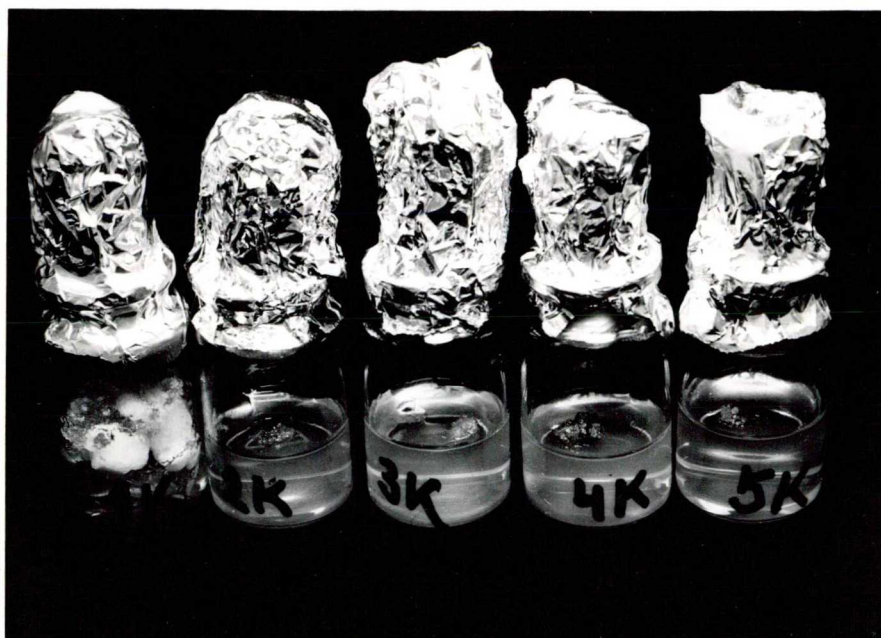
TK = szenzitív kontroll.



2.b. ábra: *N. silvestris*
BÜdR rezisztens sejtvonalak
rezisztenciájának bemutatá-
sa.

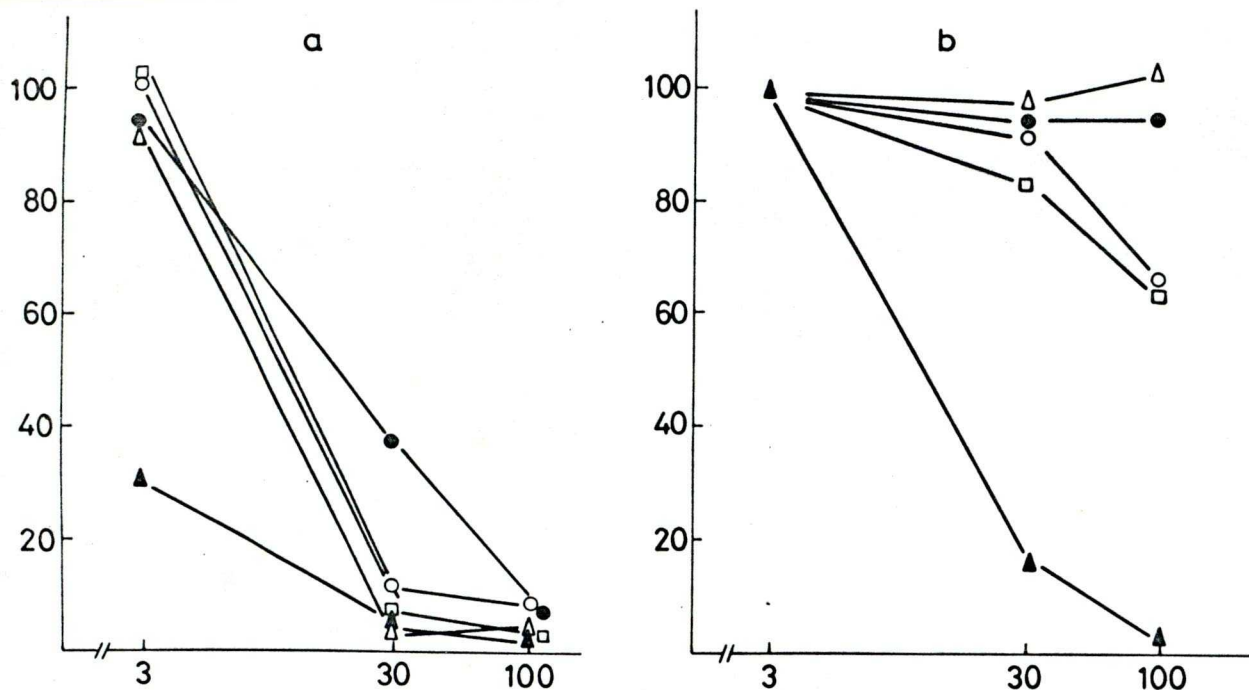
A tenyészetek 20 mg/l BÜdR-t
tartalmazó táptalajon nőttek.

K = szenzitív kontroll



3. ábra: A BR 3 sejtvonallal BUdR rezisztenciájának ellenőrzése.

A szenzitív /fent/ és a rezisztens /lent/ négy hétig nőtt BUdR-EMNO táptalajon. Balról-jobbra: 0, 30, 100, 300 és 1000 mg/l BUdR a táptalajban.



4. ábra: A BUdR rezisztens N. tabacum sejtvonalak rezisztencia tesztje RMO /a/ és RMNO /b/ táptalajon.

ordináta: A tenyészetek sulya négy hét után a BUdR mentes táptalajon nőtt kallusz sulyának százalékában.

abscissza: BUdR koncentráció /mg/l/ a táptalajban.

Sejtvonalak jelölése: BUdR szenzitív /▲/; BR 3 /△/; BR 23 /□/; BR 39 /○/; BR 37 /●/.

3.3. Növények regeneráltatása a BUDR rezisztens sejt- vonalakból

Miután a növekedési tesztekben meggyőződünk arról, hogy a sejtvonalak rezisztenciája stabil az ötödik inokulálás után /kb. 4 hónap/, növényeket regeneráltattunk. Ezért a rezisztens kulturákat RMO táptalajra oltottuk. 4-5 hét után a tenyészetekben hajtások fejlődtek. A hajtásokat levágtuk és "T" táptalajon meggyökerestettük. A vonalakat azóta növény formájában steril körülmények között tartjuk fent, vagy szükség esetén kiültetjük az üvegházba.

Csak a BR 23 sejtvonala organizálódott jól. A többi sejtvonalból csak néhány életképes növényt sikerült izolálni /I. Táblázat/.

I. Táblázat

Növények regeneráltatása a BUDR rezisztens sejtvonalakból

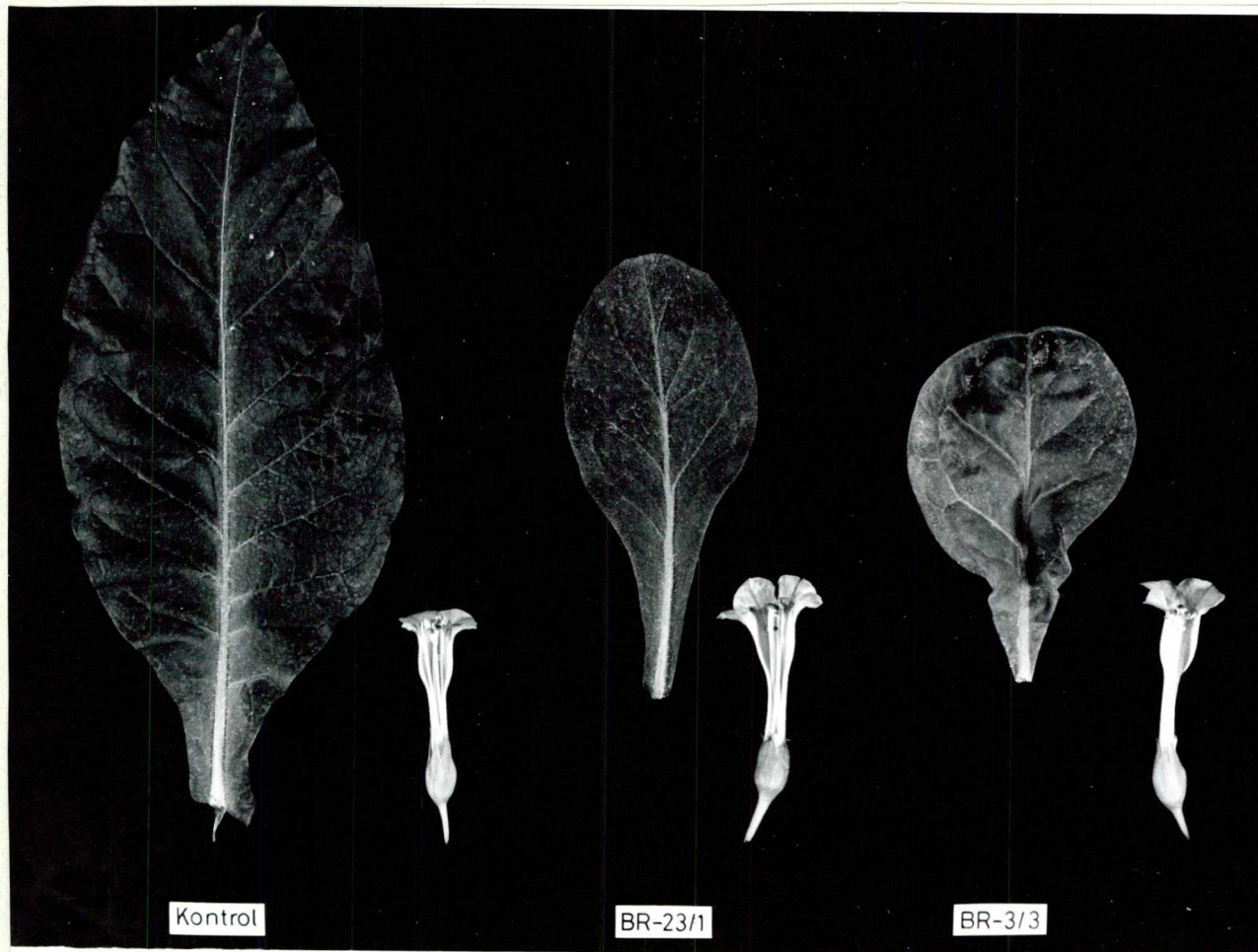
Sejtvonala jelzése	Izolált növények száma	Életképes növények száma	Ebből rezisztens
BR 23	20	19	14
BR 3	10	1	1
BR 37	40	1	1
BR 39	40	-	-

Minden hajtást egyedileg kezeltünk. A növények elnevezésében az első szám a sejtvonalat jelenti, amelyből regeneráltattuk, a második az izolátum egyedi száma. Pl. a BR 3/3 a BR 3 sejtvonalból regeneráltatott 3. számú hajtás.

A BR 23 sejtvonalból regeneráltatott növények átlagos magassága a felét sem éri el az eredetinek. Leveleik visszásan tojásdadok, kifejezetten szőrösök, márványozottak. Virágaik között rendszertelenül aberrációk jelennek meg, piros-fehér csíkozott, egy vagy több porzóból szircslevél alakul ki, a porzók rövidebbek mint a bibe. /Az eredeti növényeknél a levél lándzsa alakú, gyengén szőrös, egyszínű; a virág egyszínű rózsaszín, a porzók azonos magasságúak a bibével; 5. ábra/. A virágoknál nagyfokú sterilitást tapasztaltunk. A növények triploidiok.

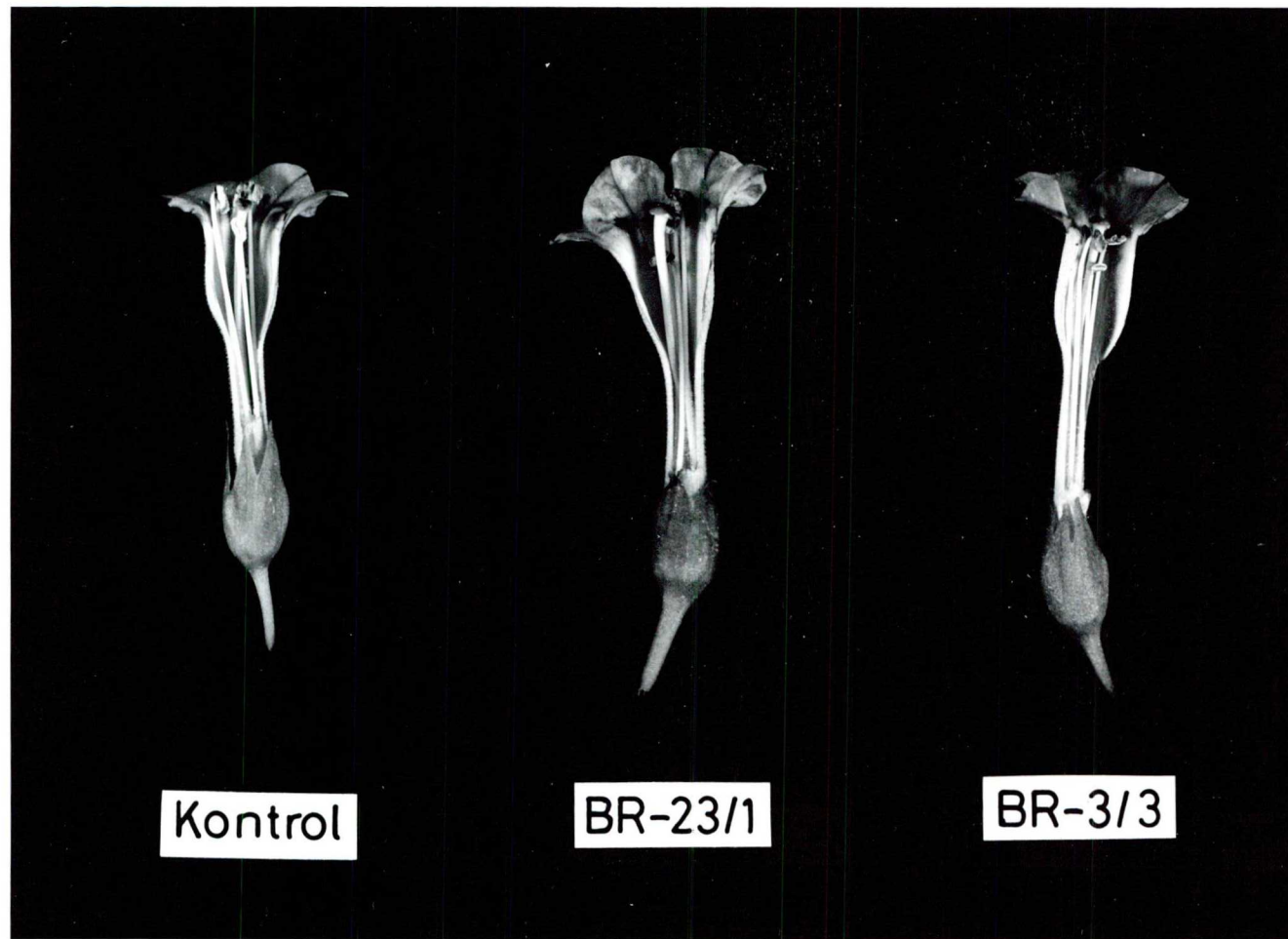
A BR 3/3 és a BR 37/21 növény morfológiája torz /5. ábra/. Csak a BR 3/3 növény virágozott növényházban, de magot nem sikerült kapni. Mindkét növény triploid, / 6. ábra /.

A regeneráltatott növények rezisztenciáját szövettenyésztésben ellenőriztük. A növényekből primer kallusztenyészeteket indítottunk **EMNO** táptalajon, majd a négy hetes tenyészeteket használtuk fel a **BUDR** rezisztencia tesztekben. A tesztek eredményét az I. táblázatban tüntettem fel. Látható, hogy nem minden növény /a belőle in-



5.a. ábra:

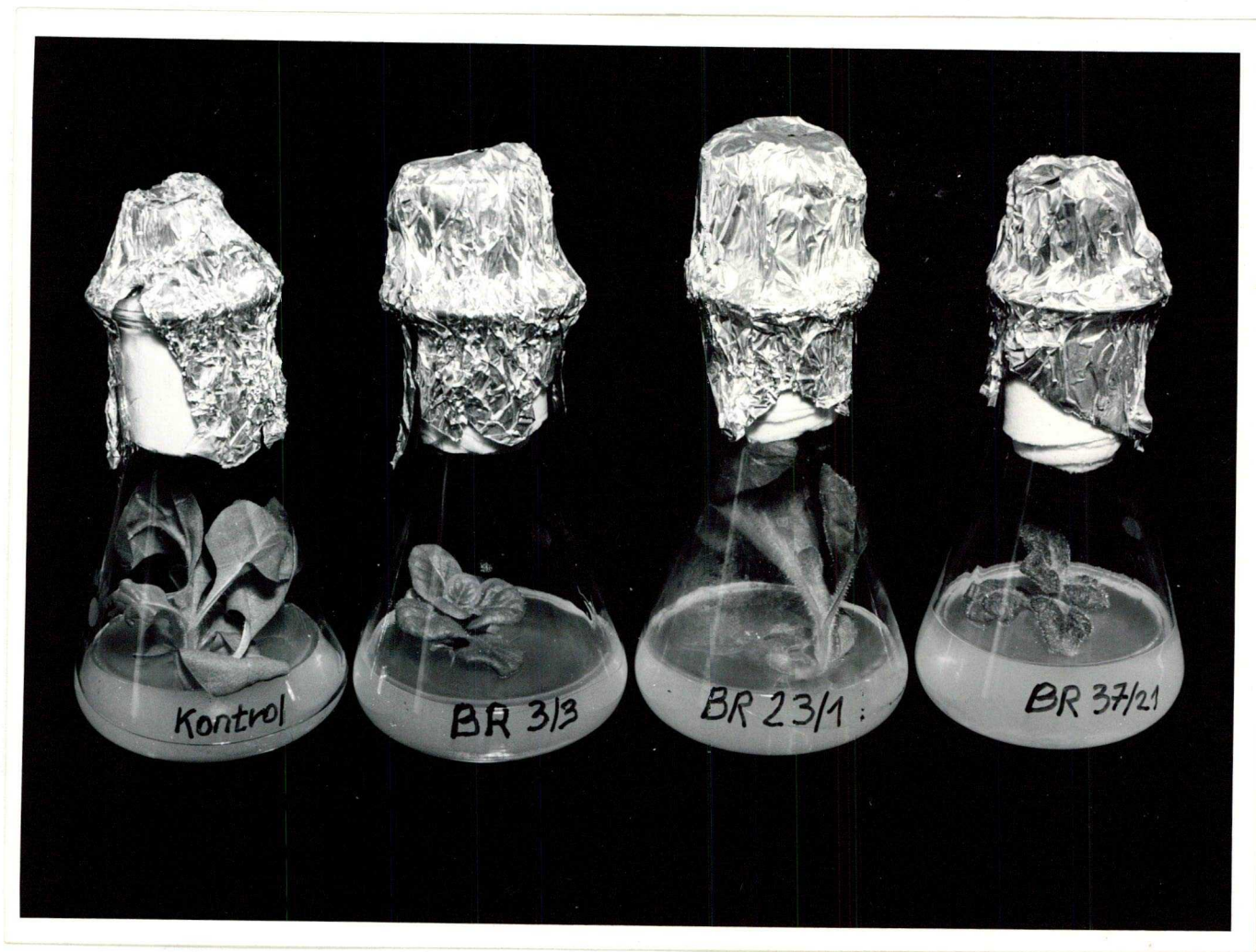
A BUDR rezisztens növények levél- és virágmorfológiája.
Üvegházi anyag.



5.b. ábra:

A BUDR rezisztens növények
virágmorfológiája.

Üvegházi anyag.



6. ábra:

BUdR rezisztens sejtvonalak
ból regeneráltatott növények
steril körülmények között.

ditott kallusz/volt rezisztens. A BUDR rezisztens növények a sejtvonalakhoz hasonló mértékben tolerálták a BUDR-t /7. ábra/.

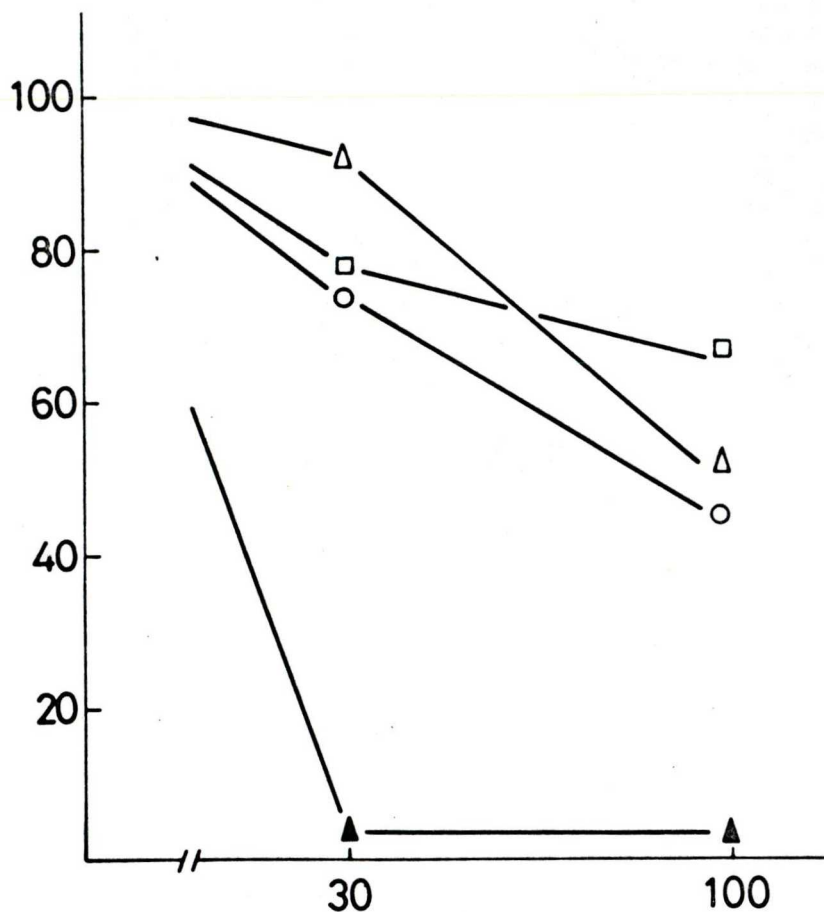
3.4. A BUDR rezisztencia öröklésmenetének vizsgálata

Az üvegházban virágzó BR 23/1 és a BR 23/5 növényeket keresztetünk az eredeti szenzitív növényekkel annak eldöntésére, hogy a BUDR rezisztencia öröklődik-e, és ha öröklődik, akkor milyen öröklésmenetet mutat.

A kapott magokat steril körülmények között csíráztattuk, majd a csíranövényekből primer kallusztenyészeteket indítottunk. A 4-5 hetes tenyészeteket /kb. 2 g/ használtuk fel a BUDR rezisztencia-tesztekre. A teszt eredményét a II. táblázatban adom meg.

A csíranövény eredetű kalluszból a BUDR rezisztencia tesztekben a következő fenotípusokat találtuk.

1. Szenzitív; nem képes nőni 30 mg/l BUDR tartalmú RMNO táptalajon.
2. Közepesen rezisztens; Az első tesztben 30 mg/l BUDR mellett jól nő /70-90 % friss súly a BUDR mentes RMNO-hoz képest/, azonban BUDR táptalajról ismét BUDR táptalajra inokulálva rosszul nő, /15-25 % friss súly/.
3. Rezisztens; a második, harmadik egymást követő tesztben is jól nő BUDR táptalajról BUDR táptalajra inokulálva.



7. ábra: BUdR rezisztens növényekből regeneráltatott növények rezisztenciájának ellenőrzése kalusztenyészetben, BUdR-RMNO táptalajon.

ordináta: A tenyészetek sulya négy hét után a BUdR mentes táptalajon nőtt tenyészetek sulyának százalékában.

abscissa: BUdR koncentráció / mg/l / a táptalajban.

jelölések: BR 23/1 / Δ /; BR 37/1 / □ /; BR 3/3 / ○ /;

BUdR szenzitív kontroll / ▲ /.

A fenti 3 fenotípus a szenzitív, heterozigóta, és homo-
zigóta genotípusra utal.

II. Táblázat

BUDR rezisztencia öröklődésének vizsgálata a BR 23 sejt-
vonalból regeneráltatott növényeknél.

	Vizsgált _egyedszám	Erősen rezisztens	Közepesen rezisztens	Szen- zitiv
BS /0/	20	0	0	20
BR 23/5 /0/	10	7	3	-
BR 23/1 /0/	10	8	1	1
BR 23/5 ♀ × BS o	10	0	7	3
BS ♀ × 23/5 o	20	0	6	14
BS ♀ × 23/1 o	20	0	5	15

	Növekedés a BUDR mentes táptalajon nőtt kallusz súlyának százalékában		
Első teszt BUDR táptalajon	65 - 95	50 - 95	5 - 20
Második teszt BUDR táptalajon	60 - 90	12 - 26	0

BS: N. tabacum /BUDR szenzitív/;

/0/: Űnbeporzás.

3.5. A BUdR és a timidin felvétele, beépülése szenzitiv és rezisztens sejtvonalakba

3.5.1. BUdR-6-H-3 és timidin-6-H-3 felvétel és beépülés vizsgálata STS módszerrel

Kísérleteinkben felvételnek a jelzett timidinnel és BUdR-el inkubált tenyészetek homogenizátumának hideg perklórsav oldható frakciójában mért aktivitást tekintettük, míg beépülésnek a hideg perklórsavban nem oldódó, 0.3 M KOH-ban oldódó, onnan pH 2-nél alkohollal kicsapható frakció aktivitását /lásd. 2.7.1./

Az aktivitás mérése alapján a BUdR rezisztens sejtvonalak mindegyike felvette és beépítette a DNS-be mind a BUdR-t, mind a timidint, a szenzitiv sejtvonálhoz hasonló mértékben /III. táblázat/.

Annak eldöntésére, hogy a sejtek előnyben részesítik-e a timidint a BUdR-al szemben, a BUdR-6-H-3 mellett hideg timidint vagy BUdR-t adtunk az inkubációs médiumhoz.

Azt az eredményt kaptuk, hogy azonos spec. aktivitás és aktivitás, valamint molárisan azonos mennyiségű hideg timidint és BUdR-t használva mind a BUdR, mind pedig a timidin közel azonos mértékben csökkentette a BUdR-6-H-3 felvételét és beépülését. /IV. táblázat/

III. Táblázat

A BUdR-6-H-3 felvétele és beépülése a szenzitív BR 3,
BR 23; BR 39 tenyészetek DNS frakciójába /cpm x 10⁻²/

		<u>Inkubációs idő</u>		
		<u>5^h</u>	<u>24^h</u>	<u>48^h</u>
BS	felvétel	1691	1427	1635
	beépülés	7	12	29
BR 3	felvétel	438	1705	-
	beépülés	9	11	-
BR23	felvétel	2613	2098	1691
	beépülés	3	9	62
BR39	felvétel	2244	1722	3725
	beépülés	3	37	56

A kísérlethez 5 uCi/ml 3-H Timidint /2,2 Ci/mM/ és
5 uCi/ml 3-H BUdR-t /2,2 Ci/mM/ használtunk.

3.5.2. A BUdR-6-H-3 és a timidin-6-H-3 beépülés vizsgálata poliakrilamid gél elektroforézissel.

A kísérleteket BUdR mentes táptalajon előnevelt, 10-14 napos BUdR rezisztens és szenzitív tenyészetekből indítottuk. Hogy a BUdR és a timidin beépülést összehasonlíthassuk egy-egy sejtvonalnál, a kb. 2 g súlyú tenyészeteket megfeleztük, egyik felét timidin-6-H-3-al, a másikat BUdR-6-H-3-al inkubáltuk. 48 óra inkubálás után fehérjementes össz nukleinsav preparátumot készítettünk /2.7.2./ amelyet poliakrilamid gél elektroforézissel szétválasztottunk komponenseire /2.7.3./

IV. Táblázat

A Timidin-6-H-3 és a BUdR-6-H-3 felvétele és beépülése a BR 37 sejtvonal DNS-frakciójába,
valamint a Timidin és BUdR kompetíciójának vizsgálata STS módszerrel /10⁻² cpm/100 mg
friss súly/

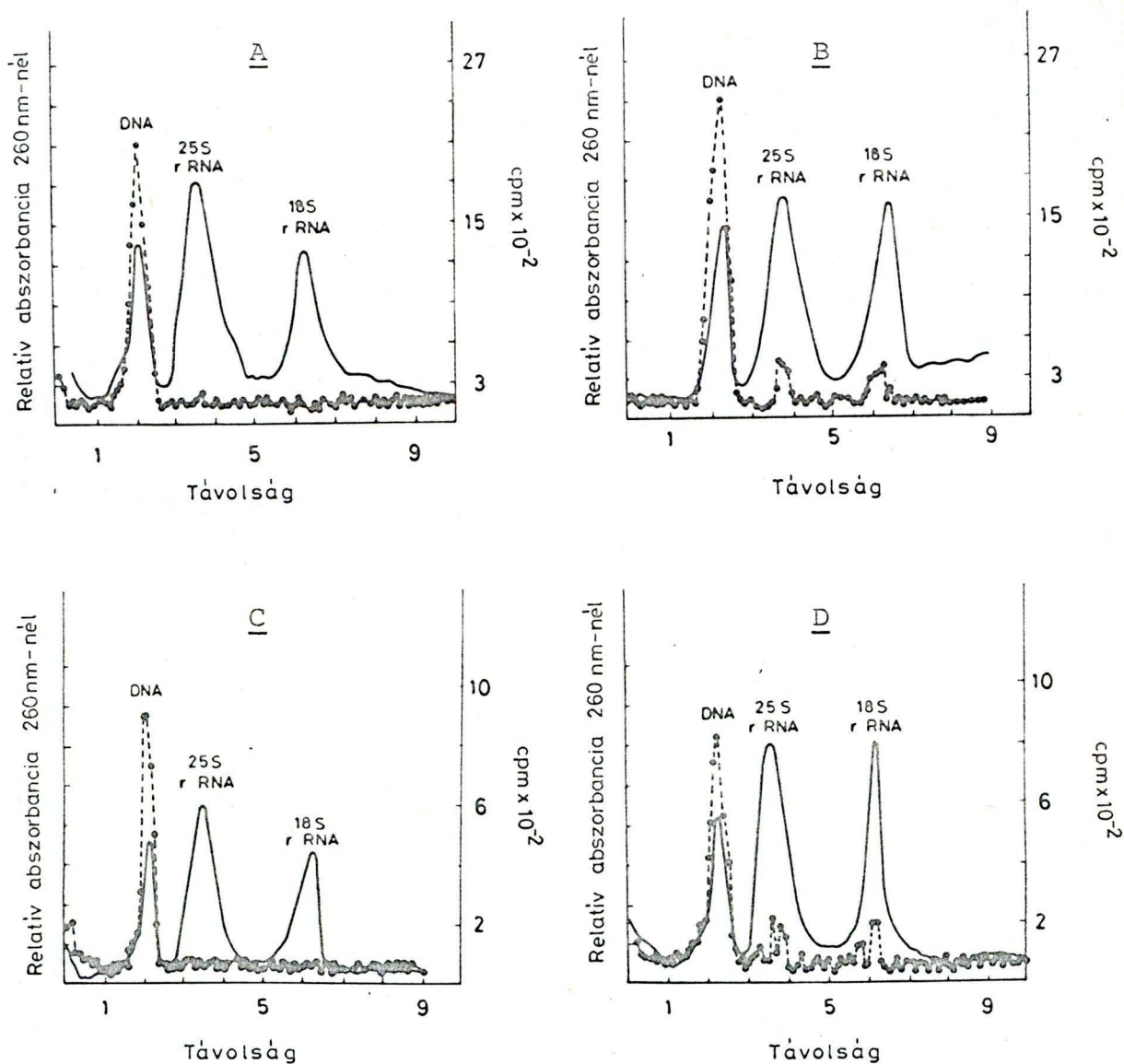
Inkubációs idő	BUdR-6-H-3		BUdR-6-H-3 + 50 uM BUdR		BUdR-6-H-3 + 50 uM timidin		Timidin-6-H-3	
	felvétel	beépülés	felvétel	beépülés	felvétel	beépülés	felvétel	beépülés
5 ^h	1366	7	528	3	326	2	447	4
24 ^h	2176	139	640	12	920	10	1620	101
48 ^h	1232	133	1065	10	824	10	2027	124

A kísérlethez 5 uCi/ml BUdR-6-H-3 /2.5 Ci/mM/ és
5 uCi/ml Timidin-6-H-3 /2.5 Ci/mM/ használtunk.

A nukleinsav frakciókat a gél hosszában felvett abszorpciós görbe /260 nm-nél/ alapján azonosítottuk. A futtatási időt úgy választottuk meg, hogy csak a DNS, 25 S rRNS, 18 S rRNS maradt a gélben, a kisebb molekulásulýu frakció kifutott. Az RMNO táptalajon nevelt kallusz olyan kevés 23 S rRNS-t és 16 S rRNS-t tartalmaz /kevés kloroplasztisz van jelen; fehér színű/, hogy nem ad csucst /8. ábra/. Az egyes frakciókba épült aktivitást a gél teljes felszeletelése után a szeletekben egyenként mért aktivitás alapján határoztuk meg. A kiértékelésnél a DNS UV abszorpciós görbéje alá eső területet kiszámítottuk, amely egyenesen arányos a DNS mennyiségével 0.2 - 0.8 A között. A DNS-t tartalmazó gélszakasz szeleteiben mért aktivitás összegét területegységre vonatkoztatva adtuk meg, amely így egységnyi DNS mennyiségre vonatkozik. /V. Táblázat/

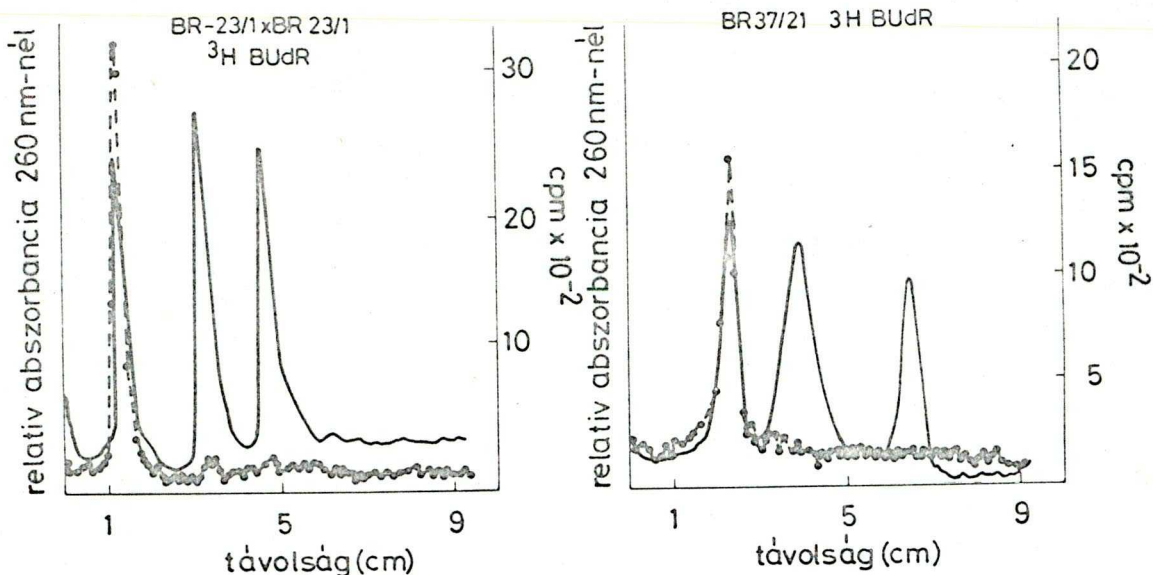
A triciált BUdR-el vagy timidinnel történt jelölés után számottevő aktivitást csak a DNS csucsban találtunk /8. és 9. ábrák/. A jelölődés mértéke különbözött az egyes sejtvonalak esetében, azonban mindegyik azonosnak tekinthető aktivitást épített be BUdR-6-H-3 és timidin-6-H-3-ból /V. táblázat/.

A sejtvonalakból izolált növények, valamint a BR 23/1 növény önmegtermékenyítéséből származó F₁ növény tenyészetei is hasonlóan viselkedtek /8. ábra és V. táblázat/.



8. ábra: Aktivitás megoszlása timidin-6-H-3 /A, C/ BUdR-6-H-3 /B, D/ jelölés után a BUdR szenzitív /A, B/ és a BR 23 rezisztens /C, D/ kalluszból izolált nukleinsav frakciókban.

A folyamatos vonal az abszorbanca /260 nm/, a szaggatott az aktivitás eloszlását mutatja a gélben elektroforézis után.



9. ábra: Az aktivitás megoszlása BUdR-6-H-3 jelölés után a BR 23/1 x BR 23/1 /F₁/ és BR 37/21 növények kallusztenyészetéből izolált nukleinsav frakciókban.

A folyamatos vonal az abszorbancia /260 nm/, a szaggatott vonal az aktivitás megoszlását mutatja a gélben az elektroforézis után.

V. Táblázat

A Timidin-6-H-3 és BUdR-6-H-3 beépülés összehasonlítása a DNS görbe alatti terület egységére vonatkoztatva

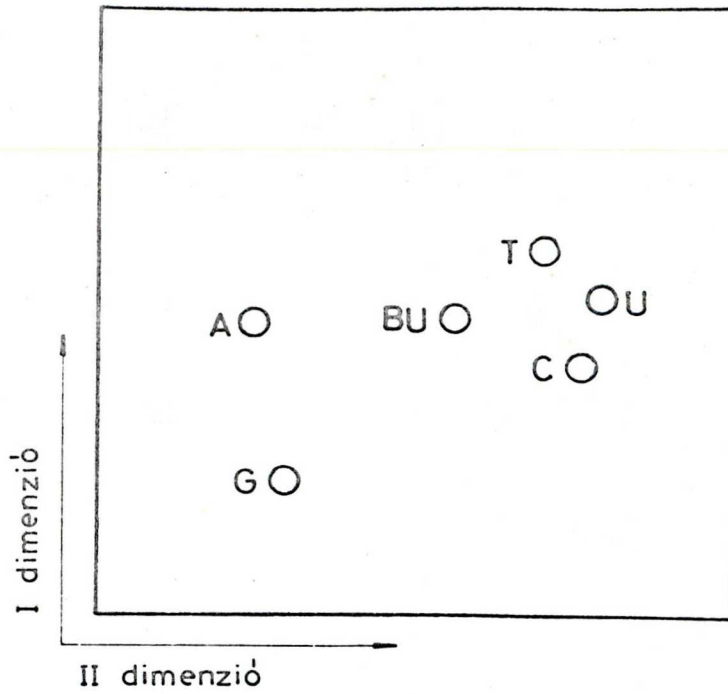
Sejtvonal	$\frac{\text{cpm}}{\text{cm}^2}$	
	Timidin-6-H-3	BUdR-6-H-3
BS	1905	1530
BR 3	509	609
BR 23	1150	1107
BR 37	1302	2972
BR 39	686	540
BR 37/21	-	1230
BR 23/ 1 /ö/	-	1774

3.5.3. A BUdR jelenlétének igazolása a DNS-ben bázis-analizissel.

Megvizsgáltuk, hogy a DNS-ben kimutatható-e az in-takt jelölt BUdR, vagy csak a BUdR átalakulása után a jelölés épült be. Ezért RNS mentes DNS preparátumot készítettünk, 6 N HCl-ban lehidrolizáltuk bázisokig. A hidrolizátumot két dimenzióban vékonyrétegen megfuttattuk és analizáltuk.

A BUdR-6-H-3 beépüléséhez csak 1 g szövetet használtunk, amelyben nincs olyan mennyiségű DNS ami lehidrolizálva látható bázis-foltokat adna. Az azonosítás megkönnyítésére hordozókat, nukleinsav bázisokat futtattunk az aktív hidrolizátummal együtt /az egyes nukleinsav bázisok foltjainak pozícióját egy kifejlesztett kromatogrammon - a 10. ábrán - mutatom be/.

Az UV-ban azonosított foltokat kikapartuk, és megmértük az adenin, guanin, citozin, timin, bromouracil és uracil foltok aktivitását. Csak a bromouracil és az uracil foltban találtunk jelentős aktivitást. Az adatokat részletesen a VI. táblázatban adom meg.



10. ábra: Nukleinsav bázisok elválasztása vékonyréteg kromatográfiával /lásd. 2.7.4./

A=Adenin; G=guanin; C=citozin; T=timin; BU=brómuracil; U=uracil.

VI. TÁBLÁZAT

A ³H BUdR beépülés után az aktivitás megoszlása a DNS sósavas hidrolizátumának 2 dimenziós vékonyréteg kromatogramjában.

Sejtvonal	A foltokban talált cpm					
	A	G	C	T	BU	U
BS	-	9	16	49	254	210
BR3	6	6	36	59	262	166
BR23	14	17	56	276	860	570
BR37	2	3	85	98	397	322
BR39	4	-	42	78	249	220

4. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

4.1. 5-bromodeoxyuridin rezisztens sejtvonalak izolálása

A BUdR rezisztens sejtvonalakokat a lehető legegyszerűbb differenciálatlan sejtpopulációból szelektáltuk. Ilyen típusú tenyészeteket RMNO táptalajon lehet előállítani, ezért itt végeztük a mutánsok izolálását.

A BUdR mutagén hatására vonatkozóan nincs adatunk, mivel a szelekció és a mutagenezis ebben a rendszerben nem választható el.

4.2. A sejtvonalak rezisztenciája különböző mennyiségű auxint és citokinint tartalmazó táptalajon

A BR-3, BR-23, BR-37, BR-39 jelzésű N. tabacum eredetű rezisztens sejtvonalak között nem találtunk különbséget a BUdR tartalmu táptalajon mutatott növekedésben. Az RMNO és RMO táptalajon tolerált BUdR koncentrációk lényegesen különböztek. A jelenség magyarázatát nem ismerjük.

4.3. Növények regeneráltatása a BUdR rezisztens sejtvonalakból

A rezisztens sejtvonalakból a lehető legrövidebb időn belül növényeket regeneráltattunk. Ismert ugyanis, hogy a kallusz vagy szuszpenzió kulturák ploidiája gyorsan változik /89/; euploidia, aneuploidia, citológiai

aberrációk alakulnak ki és ez a regenerációs képesség gyors csökkenéséhez vezet.

A viszonylag korai növény regeneráltatás ellenére /4 hónap után/ csak a BR 23 sejtvonala organizációs képessége volt megfelelő. Az eredetileg haploid sejtek poliploidizálódtak. A sejtvonalakból előállított növények triploidok / $3n = 72$ / voltak. A triploidia következménye a nagyfokú szterilitás és a morfológiai eltérések.

A sejtvonalat növény formában tartjuk fenn, így a regeneráció óta újabb változásokat nem tapasztaltunk. A szenzitív növények jelenléte a BR 23 sejtvonalból regeneráltatott növények között arra mutat, hogy a BR 23 kallusz kimérés volt.

4.4. A BUdR rezisztencia öröklésmenetének vizsgálata

A keresztezések, de különösen az önmegporzás kivételét megnehezítette a triploidia, illetve az ebből adódó nagyfokú sterilitás. A kapott viszonylag kis számú utód analíziséből az alábbiakra következtettünk:

1. A BR 23 sejtvonalból regeneráltatott növények önmegtermékenyítéséből származó utódok rezisztens fenotípusúak, így a BUdR rezisztencia öröklődik.
2. A rezisztens és szenzitív növények mindkét irányú keresztezéséből kaptunk rezisztenseket, így a rezisztenciáért egy mendeli faktor felelős.
3. A rezisztens és szenzitív növények keresztezéséből származó utódok átmeneti erősségű rezisz-

tenciát mutattak, ezért a rezisztencia heterozigótában ko-domináns.

4. A rezisztens és szenzitív növények keresztezéséből kaptunk szenzitív növényeket, az önmegtermékenyítésből pedig közepesen rezisztens, sőt szenzitív növényt, ezért a BR 23/1 és a BR 23/5 növény heterozigóta vagy/és mozaikos a BUdR rezisztenciára.

A BR 23 BUdR rezisztens sejtvonalból izolált növények jellegzetes morfológiája is öröklött /márványozott, szőrös levél/, azonban függetlenül a BUdR rezisztenciától. Minden rezisztens utód ilyen morfológiájú, azonban nem minden márványozott és szőrös levelű utód rezisztens.

Az önmegtermékenyítésből származó utódok aneuploidok, kromoszóma számuk 56 és 92 között változik.

A továbbiakban önmegtermékenyítéssel próbálunk előállítani homozigóta, rezisztens, diploid / $2n = 48$ / növényt, amellyel a teljes genetikai analízist el tudjuk végezni.

4.5. A BUdR felvétele és beépülése a szenzitív és a rezisztens sejtvonalakba

A BUdR rezisztencia mechanizmusát vizsgálva legfontosabb annak eldöntése, hogy a BUdR beépül-e a sejtek DNS-ébe vagy sem. Ezen adat ismeretében eldönthetjük,

hogy azért rezisztens a sejt mert a BUdR nem jut el a hatóhelyére a DNS-be, vagy egy mechanizmus a beépült BUdR toxikus hatását kompenzálni képes /lásd. 1.3.4./

A vizsgálatokat több módszerrel is elvégeztük, hogy ki-kerüljük az egyes módszerekből adódó bizonytalanságokat.

4.5.1. BUdR-6-H-3 és timidin-6-H-3 felvétel és beépülés vizsgálata STS módszerrel.

Az STS módszerrel kapott eredmények arra utalnak, hogy a rezisztens és szenzitív sejtvonalak azonos mértékben veszik fel és építik be a DNS-be mind a timidinből mind a BUdR-ből eredő jelölést /III. táblázat/. Nem tá-
láltunk preferenciális timidin beépülést ha egyidejűleg timidin és BUdR is volt az inkubációs táptalajban /IV. táblázat/.

Az STS módszer jól használható nagy mintaszám esetén gyors frakcionálásra. A savoldható kismolekulák, RNS, DNS, protein jól elválaszthatók és meghatározhatók.

Az STS módszer hátránya: a DNS-ként kezelt frakció fehérjével erősen szennyezett, Márpedig az eukariota sejtek nagymértékben lebontják mind a timidint mind a BUdR-t. Az egyik bomlástermék aminosav prekursor /béta-aminobutilsav/, tartalmazza a pirimidin gyűrű "6" szénatomját is /82, 83, 84, 85/.

Mivel mi 6-H-3 vegyületeket használtunk, jelentős aktivitás épült be a fehérje frakcióba. Így a DNS pre-

parátumban maradt fehérje szennyezés meghamisíthatta az eredményeket.

Mivel az STS módszernél nagy mintaszámmal és kis mintamérettel dolgoztunk, a preparáláshoz /hogya DNS kicsapódjon/ 100 ug/ml hideg hordozó DNS-t kellett adnunk. A mintában lévő DNS mennyiséget így nem használhattuk összehasonlítási alapul, csak a preparáláshoz használt kallusz friss sulyát. A kallusztényeszetek heterogenitása miatt ez megbizhatatlanabb.

Hogya a módszerből adódó hibákat kiküszöböljük, a beépülést tisztított fehérjementes DNS-el is megvizsgáltuk.

4.5.2. A BUdR-6-H-3 és a timidin-6-H-3 beépülés vizsgálata poliakrilamid gél elektroforézissel.

A poliakrilamid gél elektroforézis kísérletekben kiküszöböltük az előző módszer hiányosságait. A géltre fehérjementes nukleinsav preparátumot vittünk fel és az egyes nukleinsav frakciókat a 260 nm-nél mutatott abszorbancia alapján azonosítottuk. Tehát mind a fehérjék szennyezésből adódó, mint a nem DNS mennyiség alapján történő összehasonlítás hibáját kiküszöbölhettük.

A módszerrel sikerült megállapítani, hogya aktivitás a BUdR-6-H-3-ból és a timidin-6-H-3-ból csak a DNS-be épült be. Jelentős aktivitást a BUdR és a timidin gyors metabolizációja ellenére sem találtunk az RNS frakciókban. A jelölés mértéke sejtvonalanként eltérő. Elvileg ez az eltérő

nagyságu endogén pool vagy a különböző növekedési sebesség következménye lehet. Tapasztalataink szerint az utóbbiról van szó.

4.5.3. A BUdR jelenlétének igazolása a DNS-ben bázisanalizissal.

Az eddigiek alapján az egyértelmű, hogy BUdR-6-H-3-ból a jelölés beépül a rezisztens sejt vonalak DNS-ébe a szenzitívhez hasonlóan. Nem egyértelmű azonban, hogy a DNS-ben mért aktivitás intakt BUdR molekuláktól származik. A BUdR könnyen metabolizálódik, dehalogéneződik a sejtben vagy már kívül az izotóp-preparátumban. Deoxyuridinné alakul /UdR/ , /87,88/, amely szubsztrátja a timidin kináz enzimnek, így deoxyuridinmonofoszfát /dUMP/ keletkezik. A dUMP-ból a timidilát szintetáz timidinmonofoszfátot /TMP/ készít. A DNS-ben talált aktivitás így eredhet a BUdR átalakulásából származó timidin beépüléséből is, míg a jelenlévő BUdR be sem épül.

Amint az a VI. táblázat adataiból kiderül, a brómuracil és az uracil folt tartalmazta az aktivitás döntő részét. Az uracil folt aktivitását hozzászámítjuk a brómuracil folt aktivitásához, mert az eljárás során abból keletkezik dehalogéneződéssel /56/. A timin foltban talált aktivitás alig magasabb mint a háttér.

Az adatok alapján egyértelmű, hogy a rezisztens sejt vonalak a szenzitív kalluszhoz hasonlóan BUdR-t építenek be a DNS-be.

Az eredményeket alátámasztják a fluordoxyuridin-
nel kapott eredmények /az endogén timidin szintézisét
gátló, de a DNS-be nem be épülő analóg/.

A BUdR szenzitív sejtek elpusztulnak 10^{-5} M FUdR
jelenlétében, mert éheznek timidinre. Az FUdR hatása
felfüggeszthető a táptalajba adott timidinnel. Ha a
táptalajba timidin helyett BUdR-t adtunk a szenzitív
sejtek természetesen elpusztultak. A BUdR rezisztens
sejtvonalak ugyan úgy érzékenyek az FUdR-ra, azonban
a gátlás nem csak timidinnel hanem BUdR-rel is felfüg-
geszthető, ami jelentős BUdR beépülésre mutat.

A többi BUdR rezisztens növényi sejtvonalról kevés
adat áll rendelkezésre, így komoly összehasonlításra
nemigen van mód.

Ohyama szója sejtszuszenzióból izolált BUdR rezisz-
tens sejtvonala a szenzitív sejtekhez képest kevesebb
BUdR-t épít be a DNS-be. A rezisztencia magyarázata az,
hogy a rezisztens sejtek több timidint /TMP-t/ termelnek,
nagyobb az endogén pool, így az analóg kisebb valószínű-
séggel épül a DNS-be /90/.

Lescure BUdR rezisztens sejtvonalairól nem ismerünk
adatokat /31/. Bright és Northcote juhar sejtszuszenzi-
óból izolált BUdR rezisztens sejtvonalában timidinkináz
aktivitást talált, ami a BUdR beépülés lehetőségére u-
tal. A DNS-be épülésről azonban nem közöltek adatot /32/.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

1. Elsőként izoláltunk növényi anyagból/haploid *N. tabacum* és *N. glauca* kallasztenyésztete/ BUdR rezisztens sejtvonalakat.
2. A sejtvonalakból növényeket regeneráltattunk.
3. A rezisztens és szenzitív sejtek keresztezésével megállapítottuk, hogy a BUdR rezisztenciáért egy szemi-domináns mendeli mutáció felelős.
4. A BUdR rezisztens mutánsok felveszik és a DNS-be építik a BUdR-t. A szenzitív sejtek a BUdR beépítés következtében elpusztulnak.
Nem ismert a mechanizmus amely a rezisztens sejtek túlélését a BUdR beépülés ellenére biztosítja.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Dr. Alföldi Lajos professzornak, a Genetikai Intézet igazgatójának, valamint Dr. Farkas Gábor akadémikusnak, a Növényélettani Intézet igazgatójának a munkafeltételek optimális biztosítását és az értékes szakmai tanácsokat.

Különösen köszönettel tartozom Dr. Maliga Pál csoportvezetőnek a sok értékes szakmai tanácsért és közvetlen segítségért, valamint Szabó Gáborné és Nagy Erzsébet laboránsoknak a megbízható technikai segítségért.

6. IRODALOMJEGYZÉK

1. CHALEFF, R.S., CARLSON, P.S. /1974/: Somatic cell genetics of higher plants.
Ann. Rev. Gen. 8, 267-278.
2. TAKEBE, I., LABIB, G., MELCHERS, G. /1971/: Regenerations of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco.
Naturwissenschaften 58, 318.
3. MURASHIGE, T., SKOOG, F. /1962/: A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures.
Physiol. Plant. 15, 473.
4. LINSMAYER, E.M., SKOOG, F. /1965/: Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures
Physiol. Plant, 18, 100.
5. KAO, K.N., MICHAYLUK, M.R. /1974/: A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplast.
Planta, 115, 355.
6. KELLER, W.A., MELCHERS, G. /1973/: The effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion.
Z. Naturforsch. 28c, 373.
7. CARLSON, P.S., SMITH, H.H., DEARING, R.D. /1972/: Parasexual interspecific plant hybridization.
Proc.Nat. Acad.Sci. USA, 69, 2252-2294.
8. MELCHERS, G., LABIB, G. /1974/: Somatic hybridization of plants by fusion of protoplast.
Molec. gen. Genet. 135, 227.
9. LEDOUX, L., HUART, R. /1968/: Integration and replication of *M. lyspodecticus* DNS in DNS of germinating barley.
Nature, 218, 1256.
10. LEDOUX, L. JACOLES, M., /1969/: Fate of exogenous-DNA during growth and development of Arabidopsis.
Arab.Inf. Serv. Göttingen, 6, 7.
11. LEDOUX, L., HUART, R. /1969/: Fate of exogenous bacterial DNA in barley seedlings.
J. Mol. Biol. 43, 243.

12. STROUN, N., ANKER, A., GAHAN, P., ROSSIER, A., GREPPIN, H. /1971/: Natural release of bacterial nucleic acids into plant cells and crown gall induction.
In: Informative Molecules in Biological Systems /Ed. Ledoux, L./ 193, North Holland Publ. Co.
13. LEDOUX, L. HUART, R., JACOBS, M. /1971/: Informative molecules in Biological Systems.
/Ed. Ledoux, L. /159-175. North Holland Publ. Co.
14. OYAMA, K., GAMBORG, O.L., MILLER, R.A. /1972/: Uptake of exogenous DNS by plant protoplast.
Can. J. Bot. 50, 2077-2080.
15. DOY, L.N., GRESSHOFF, P.M., ROLFE, B.G. /1973/: Biological and molecular evidence for the transgenesis of genes from bacteria to plant cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 723.
16. GUHA, S., MAHESVARI, S.C. /1964/: In vitro production of embryos from anthers of *Datura*.
Nature, 204, 497.
17. GUHA, S., MAHESVARI, S.C. /1966/: Cell division and differentiation of embryos in pollen grains of *Datura* in vitro.
Nature, 219, 97.
18. NITSCH, S.P., NITSCH, C. /1969/: Haploid plants from pollen grains.
Science, 162, 85-87.
19. NITSCH, S.P. /1969/: Experimental androgenesis in *Nicotiana*.
Phytomorphology, 19, 389-408.
20. CARLSON, P.S. /1970/: Induction and isolation of auxotrophic mutants in somatic cell cultures of *Nicotiana tabacum*.
Science, 168, 487.
21. HEIMER, S.M., SMITH, D.H. /1970/: Regulation of the nitrate assimilation pathway of cultured tobacco cells.
Biochim. Biophys. Acta, 215, 152.
22. WIDHOLM, I.N. /1972/: Anthranilate synthetase from 5-methyl tryptophan susceptible and resistant cultured *Daucus carota* cells.
Biochim. Biophys. Acta, 279, 48-57.

23. WIDHOLM, J.N. /1972/: Thyptophan biosynthesis in *N. tabacum* and carota cell cultures: site of action of inhibitory thyptophan analogs. *Biochim. Biophys. Acta*, 261, 44-51.
24. CARLSON, P.S. /1973/: Methionine-sulfoximine-resistant mutants of tobacco. *Science*, 180, 1366-1368.
25. BINDING, H. /1972/: Selektion in Kalluskulturen mit haploid Zellen. *Z. Pflanzenzücht.* 67, 33-35.
26. MALIGA, P., Sz.-BREZNOVITS, Á. , MÁRTON, L. /1973/: Streptomycin-resistant plants from callus culture of haploid tobacco. *Nature New Biol.* 244, 29-30.
27. MALIGA, P., Sz.-BREZNOVITS, Á., MÁRTON, L., JOÓ, F.: /1975/: Non-Mendelian streptomycin-resistant tobacco mutant with altered chloroplasts and mitochondria. *Nature*, 255, 401-403.
28. Sz.-BREZNOVITS, Á. /1975/: Egy streptomycin rezisztens dohánymutáns in vitro előállítására és jellemzése.
/Doktori értekezés/
29. MALIGA, P., MÁRTON, L., SZ.-BREZNOVITS, Á. /1973/: 5-Bromodeoxyuridin-resistant cell lines from haploid tobacco. *Plant Sci. Letters*, 1, 119-121.
30. MÁRTON, L., MALIGA, P. /1975/: Control of resistance in tobacco cells to 5-bromodeoxyuridine by simple Mendelian factor. *Plant Sci. Letters*. /in press/
31. LESCURE, A.M. /1973/: Selection of markers of resistance to base analogues in somatic cell cultures of *Nicotiana tabacum*. *Plant Sci. Letters*, 1, 375-383.
32. BRIGHT, S.W.J., NORTHCOLE, D.H. /1974/: Protoplast regeneration from normal and bromodeoxyuridine-resistant sycamore callus. *J. Cell. Sci.* 15, 99-109.

33. OHYAMA, K. /1974/: Properties of 5-bromodeoxyuridine resistant lines of higher plant cells in liquid culture.
Expt. Cell Res. 89, 31-38.
34. ZAMENHOF, S., GRIBOFF, G. /1954/: E. coli containing 5-bromuracil in its deoxyribonucleic acid.
Nature, 174, 307.
35. BORDOS, T.J., LEVIN, G.M., HERR, R.R., GORDON, H.L. /1955/: Synthesis of compounds related to thymine. II. Effect of thymine antagonists on the biosynthesis of DNA.
J. Amer. Chem. Soc. 77, 4279.
37. EIDINOFF, M.L., CHEONG, L., RICH, M.A. /1959/: Incorporation of unnatural pyrimidine bases into DNS of mammalian cells.
Science, 129, 1550-1551.
38. CHEONG, L., RICH, M.A., EIDINOFF, M.F. /1960/: Introduction of the 5 halogenated uracil moiety into DNA of mamalian cells in culture.
J.Biol. Chem. 1441-1447, 235.
39. SORMOVA, Z., SEBESTA, K., BAVEROVA, J., MELICHAR, O., SORM, F. /1960/: Stimulation of plant development by same uracil analogues.
Experientia, 16, 189.
40. HALAKA, M.T. /1959/: Mode of action of 5-bromodeoxyuridin mammalian cells in culture.
J.Biol. Chem. 234, 3072.
41. EIDINOFF, M.L., KNOLL, J.E., MARANO, B.J., KLEIN, D. /1959/: Pyrimidine studies. II. Effect of 5-bromodeoxyuridine and related nucleosides on incorporation of precursors into nucleic acid pyrimidines.
Cancer Res. 19, 738.
42. FREESE, E. /1959/: The specific mutagenic effect of base analogues on phage T₄.
J.Mol. Biol. 1, 87.
43. LORKIEWICZ, Z., SZYBALSKI, W. /1960/: Genetic effects of halogenated thymidine analogues incorporated during thymidilate synthetase inhibition.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 2, 413.

44. RUDNER, R. /1960/: Mutation as an error in base pairing.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 3, 275.
45. BICK, M., DAVIDSON, R.L. /1974/: Total substitution of 5-bromodeoxyuridine to thymidine in the DNA of a bromodeoxyuridine dependent cell line.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 2082.
46. SHAPIRO, H.S. CHARGAFF, E. /1960/: Severe distortion by 5-bromouracil of the sequence characteristics of a bacterial DNA.
Nature, 188, 62.
47. SCHWARTZ, S.A., HORIO, D., KIRSTEN, W.H. /1974/: Non random incorporation of 5-bromodeoxyuridine in rat cell DNA.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 61, 927.
48. HAUT, W.F., TAYLOR, J.H. /1967/: Studies of bromouracil deoxyriboside substitution in DNA of bean root /Vicia faba/.
J. Molec. Biol. 26, 389.
49. KIT, S., HSU, T.C. /1961/: Relative stability to thermal denaturation of deoxyribonucleic acid preparations containing bromodeoxyuridine.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 5, 120.
50. MESELSON, M., STAHL, F.W., VINOGRAD, J. /1957/: Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradients.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 43, 581.
51. SZYBALSKI, W., OPORA-KUBINSKA, Z., LORKIEWICZ, Z., EPHRATI-ELIZUR, E., ZEMENHEOFF, S. /1960/: Transforming activity of DNA labelled with 5-bromodeoxyuracil.
Nature, 188, 743.
52. AUGENLICHT, L., NICOLINI, L., BASERGA, R. /1974/: Circular dichroism and thermal denaturation studies of chromatin and DNA from BUdR treated mouse fibroblast.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 59, 920.
53. SMITH, K.C., HANAWALT, P.C. /1969/: Photochemistry of the nucleic acids. In: Molecular photobiology.
Acad. Press. New York. 57.

54. BENZER, S., FREESE, E. /1958/: Induction of specific mutations with 5-bromouracil.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 44, 112.
55. FREESE, E. /1959/: The difference between spontaneous and base analogues induced mutations of phage T₄.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 45, 622.
56. DJORDJEVIC, B., SZYBALSKY, W. /1960/: Genetics of human cells lines III. Incorporation of 5-bromodeoxyuridin and 5-jododeoxyuridin into the DNA of human cells and its effect on radiation sensitivity.
57. SMITH, K.C., HANAWALT, D.C. /1969/: Photochemistry of the nucleic acids. In: Molecular photo-biology, Acad. Press. New York. 79.
58. HSU, T.C., SOMERS, C.E. /1962/: Properties of L. cells resistant to 5-bromodeoxyuridine.
Exp. Cell Res. 26, 404.
59. TOLIVER, A., SIMON, E.H. /1967/: DNA synthesis in 5-bromouracil tolerant He La cells. In autoradiographic study.
Exp. Cell Res. 45, 603.
60. HILL, B.T., TSUBOI, A., BASERGA, R. /1974/: Effect of 5-bromodeoxyuridin on chromatin transcription in confluent fibroblasts.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 455.
61. STOCKDALE, F., OKAZAKI, K., NAMEROFF, M., HOLTZER, H. /1964/: 5-bromodeoxyuridin effect on miogenesis in vitro.
Science, 146, 533.
62. STELLWAGEN, R.H., TOMKINS, G.H. /1971/: Preferential inhibition by 5-bromodeoxyuridin of the synthesis of tyrosine aminotransferase in hepatoma cells.
J. Mol. Biol. 56, 167.
63. MAYNE, R., SANGER, J.W., HOLTZER, H. /1971/: Inhibition of mucopolysaccharide synthesis by 5-bromodeoxyuridin.
Devl. Biol. 25, 547.

64. SILAGI, S., BRUCE, S.A. /1970/: Supression of malignancy and differentiation in melanotic melanome cells.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 66, 72.
65. PRASAD, K.N., MENDEL, B., KUMAR, S. /1973/: Human neuroblastoma cell culture: Effect of 5-bromodeoxyuridine on morphological differentiation and levels of neural enzymes.
P.S.E.B.M., 144, 38.
66. GONTCHAROFF, M., MAZIA, D. /1967/: Developmental consequences of introduction of bromouracil into the DNA of sea urchin embryos during early division stages.
Exp. Cell Res. 46, 315.
67. COOK, P.R. /1974/: On the inheritance of differentiated traits. VIII. Some speculation: The action of bromodeoxyuridin.
Biol. Rev. 49, 70.
68. LIN, S.-Y., RIGGS, A.O. /1972/: Lac operator analogues: BUdR substitution in the lac operator effects the rate of dissociation of the lac repressors.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 2574.
69. KIT, S., DUBBS, D.R., PIEKARSKI, L.J. HSU, T.C. /1963/: Deletion of thymidine kinase activity from L. cells resistant to bromodeoxyuridin.
Exp. Cell Res. 31, 297.
70. BRESLOW, R.E., GOLDSKY, R.A. /1969/: Isolation and characterization of thymidine transport mutants of chinese hamster cells.
Exp. Cell Res. 55, 339.
71. DAVIDSON, R.L. BICK, M. /1973/: New mutation in mammalian cells. - 5-bromodeoxyuridin dependence.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 139.
72. BICK, M.D., DAVIDSON, R.L. /1974/: Total substitution of bromodeoxyuridine for thymidine in the DNA of a bromodeoxyuridine-dependent cell line.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 2082.
73. MALIGA, P., SZILÁGYI, L. /1973/: Cytological investigation of haploid *N.tabacum* obtained by anther culture.
Bot. Közl. 60, 77.

74. NASH, D.T., DAVIES, M.E. /1972/: Some aspects of growth and metabolism of Paul's scarlet rose cell suspension.
J. Exp. Bot. 23, 75.
75. TANKÓ, B. /1958/: Nukleinsavak vizsgálata: Az egyesített STS módszer.
"A Kisérleti Orvostudomány Vizsgálati Módszerei"
/Szerk: Kovách A./ Akad. Kiadó, Budapest, p. 663.
76. KING, P.J., COX, B.J., FOWLER, M.W., STREET, H.E., /1974/: Metabolic event in synchronised cell cultures of *Acer pseudoplatanus*.
Planta /Berlin/ 117, 109.
77. KIRBY, K.S. /1965/: Isolation and characterization of ribosomal ribonucleic acid.
Bioch. J. 96, 266.
78. LOENING, U.E. /1967/: The fractionation of high-molecular-weight ribonucleic acid by polyacrilamide-gel electrophoresis.
Biochem. J. 102, 251.
79. TANKÓ, B. /1958/: Nukleinsavak vizsgálata; A DNS összetételének vizsgálata.
"A Kisérleti Orvostudomány vizsgálati Módszerei" IV. /Szerk: Kovách A./ Akad. Kiadó, Budapest, p. 580.
80. BOND, P.S. /1968/: A two-dimensional thin layer chromatographic technique for separation of admixtures of 5-bromouracil and DNA bases.
J. Chromatogr. 34, 554.
81. FINK, K., ADAMS, W.S. /1966/: Paper chromatographic data for purines, pyrimidines and derivatives in a variety of solvents.
J. Chromatogr. 22, 118.
82. EVANS, W.R., AXELRAD, B. /1961/: Pyrimidine metabolism in germinating seedlings.
Plant Physiol. 36, 9.
83. TAKATS, S.T., SMELLIE, M.S. /1963/: Thymidine degradation products in plant tissues labelled with tritiated thymidine.
J. Cell Biol. 17, 59.

84. ROSS, C. /1965/: Comparison of incorporation and metabolism of RNA pyrimidine nucleotide precursors in leaf tissues.
Plant Physiol. 40, 65.
85. ZILBERSTEIN, A., ARZEE, T., GRESSEI, J. /1973/:
Thymidine incorporation into Phorbol DNA: I.
Adenosine effect on degradation by the
thymidine phosphorylase system.
Cell differ. 2, 205.
86. ZILBERSTEIN, A., ANEE, T., GRESSEL, K. /1973/:
Thymidine incorporation into Phorbol DNA. II.
Adenosine enhancement in vivo, total in-
corporation versus autoradiography.
Cell differ. 2, 213.
87. WASTERNACK, L. /1975/: Degradation of pyrimidins in
Euglena gracilis. I. Studies with intact cells.
Plant Sci. Letters, 4, 353.
88. BROCKMAN, R.W., ANDERSON, E.P. /1963/: Pyrimidine ana-
logues.
In: Metabolic inhibitors. I. /eds: Hachster, R.M.
and Quastel, J.H./ Acad. Press New York. p.261.
89. SUNDERLAND, V. /1973/: Nuclear cytology
In: Plant tissues and cell culture.
/ed. Street, H.E./ Backwell, Oxford, p. 161.
90. OHYAMA, K. /1975/: Személyes közlés.