

# KLOROPLASZTISZ ÁTVITEL DOHÁNY PROTOPLASZT FÚZIÓVAL

MALIGA PÁL

MTA SZBK Növényélettani Intézete, Szeged

A Szegedi Biológiai Központ (SZBK) megalakulása után az Intézet vezetőse minden — a növényi szövettenyéssel kapcsolatos — témát felkarolt. Ezt részben az indokolta, hogy tenyésztett sejtekből számos fajnál ismét növények regenerálhatók, így várható volt, hogy az elméleti kutatási eredmények később valamilyen formában a gyakorlatban is hasznosíthatók lesznek. A módszert az SZBK-ban három csoport alkalmazza. Mint az SZBK 10 éves fennállása alkalmából rendezett előadás-sorozat előadója, helyénvalónak érzem, hogy a bevezetőben megemlékezzem a többi munkacsoport által elért néhány jelentősebb eredményről is.

DUDITS Dénes és munkatársai (SZBK Genetikai Intézet) a testi sejtek fúziójával létrehozott hibridek vizsgálatára specializálta magát. Rendszertanilag közel álló fajok esetén sikerült mindkét szülő teljes kromoszóma szerelvényét hordozó répa hibrideket előállítani (4). Besugárzott petrezselyem sejtekkel történő fúzió után a nem-répa szülő kromoszómái egy kivételével elvesztek (6), míg a más genus-ba tartozó útifűvel (*Aegopodium podagraria*) való fúziót követően útifű kromoszómát nem lehetett kimutatni, csak a belőle származó néhány gén jelenlétére lehetett következtetni (5).

FÖGLEIN Ferenc és kollégái (SZBK Növényélettani Intézet) módszereket adaptáltak növények steril tenyészetben történő gyors szaporítására, amit jelenleg a MERIKLON gazdasági társulás hasznosít.

Saját csoportom „hagymányos” témája mutáns növények előállítása tenyésztett dohány sejtek szintjén történő szelekció, majd növény regeneráció útján. Érdekesebb eredményeink ezen a területen kloroplasztiszbán (8, 9, 12) és sejtmagban (10) kódolt sztreptomycin rezisztencia faktort hordozó mutánsok, valamint izoleucin igényes növények (16) előállítása. Ez utóbbiról („non-leaky” auxotróf) sokáig azt tartották, hogy virágos növényeknél a gén-duplikációk miatt nem állítható elő (15). A mutánsokat a citoplazmás organellumok protoplaszt fúzióval történő manipulációjánál hasznosítjuk, ami a jelen előadás témáját is képezi.

### *Miért kloroplasztisz átvitel?*

A fotoszintézis plasztiszokban, a légzés mitokondriumokban zajlik. Ezek a sejt-szervecskék DNS-t tartalmaznak, amely részben megszabja a sejt-szervecskék tulajdonságait, így befolyással van pl. a fotoszintézis hatékonyságára, a citoplazmás hímsterilitás kialakulására. Keresztezés során a sejtszervecskék DNS-e minden gazdaságilag jelentős növényfajban (pl. búza, kukorica) csak anyai úton öröklődik, ezért az ivaros szaporodás során organellum keverékek nem jöhetnek létre. Így nincs mód a sejt-szervecskék közötti genetikai rekombinációra, a tulajdonságok — esetleg kedvezőbb — újrakombinálására, bár erre gombáknál és algáknál számos példa ismert (7).

Ivaros ciklus nélkül, testi sejtek fúziójával — mint látni fogjuk — a probléma megkerülhető. Lehetőség van pl. a plasztiszok megtartása mellett a mitokondriumok kicserélésére, az organellumok idegen mag környezetbe juttatására és a DNS átrendeződése, rekombinációja eredményeként új típusú, addig nem létező sejtorganellumok létrehozására.

A virágos növényekkel folytatott ilyen irányú kísérletek még gyermekcipőben járnak. Az egyetlen, kloroplasztiszban kódolt, tenyészetben szelektálható marker a sztreptomycin rezisztencia. Mitokondriumban lokalizált, hasonlóan szelektálható markert eddig nem írtak le. Érthető tehát, hogy az organellumok genetikai manipulációját célzó kísérleteket az általunk korábban előállított (8, 9) sztreptomycin rezisztens SRL dohány mutánsra alapoztuk. A kérdés, amit vizsgálni kezdtünk, igen egyszerű: hogyan lehet plasztiszokat az egyik sejtből a másikba átvinni anélkül, hogy a donor sejtmagból kromoszómát vinnénk át. Ez alapkutató és gyakorlati szempontból is lényeges, hiszen átalakított citoplazmás organellumok fenotípusának összehasonlítása csak azonos magháttér mellett lehetséges (hibrid magháttér több okból nem jöhet szóba), mivel néhány, a donorból átkerült kromoszóma teljesen értéktelenné teheti a termesztett növényfajtákat. Az átvitel természetesen azt jelenti, hogy a recipiensben található organellumok eltűnnek, és helyüket a donorból származó organellumok foglalják el.

### *Az átvitel elve*

A protoplaszt fúziót követően a sejtmagok vagy fuzionálnak és (mag-) hibridek jönnek létre, vagy elkülönülnek, és szülői típusú maggal rendelkező szegregáns sejtek keletkeznek. A hibridek és a magszegregánsok is kevert citoplazmával rendelkeznek. Bár eredetileg a sejtekben viszonylag nagy számú organellum található (pl. 50–100 db plasztisz egy levél sejtben), a kevert citoplazma csak rövid ideig marad fenn. A szegregáció a tapasztalat szerint random, így új mag-organellum kombinációk is keletkeznek (3).

## Új eredmények

Az irodalomban elsőként leírt organellum-átviteli kísérletekben BELLARD és munkatársai sejtes szinten egyáltalán nem alkalmaztak szelekciót, csak növényné regenerálás után tudták megkülönböztetni morfológiai és biokémiai bélyegek alapján a szülői, hibrid és transzfer kategóriákat (1, 2). Mivel a változatlan szülői típusú sejtek hányada viszonylag nagy — és minden klónból válogatás nélkül növényt kell regenerálni — ezért a rendszer rendkívül munkaigényes. GALUN és munkatársai vezették be a letális dózissal történő besugárzást a donor szülői sejttypus osztódásának gátlására (18). Mi ez utóbbi rendszert egészítettük ki a besugárzott (nem osztódó) sejtéből származó citoplazmás sztreptomycin rezisztenciára történő szelekcióval, így a fúzióból származó utódsejtek már 1 mm átmérőjű kolóniák szintjén azonosíthatókká váltak (11). A kísérletek során besugárzott *Nicotiana tabacum* (SRI) sejtekből vittük át a citoplazmás sztreptomycin rezisztencia faktort, azaz a plasztiszokat a *Nicotiana plumbaginifolia* vad dohányfajba (13). A kezeletlen, szenzitív sejtekkel történő fúzió ugyanis biztosította a besugárzott SRI plasztiszok túlélését. Megállapítottuk a donor mag eliminációját nagy gyakorisággal eredményező sugárdózisokat is (13; 1. táblázat). Jódecetsavval osztódásra képtelenné tett sejtekből is át lehetett vinni a plasztiszokat fúzióval (11), de ez a kezelés nem segítette a donor magvak eliminációját, ami a hibrid képződés nagy gyakorisága miatt kívánatos lett volna (13; 1. táblázat).

A kétféle kezelés kombinációjával sikerült szelekciós marker felhasználását nem igénylő, hatékony, irányított átviteli rendszert kidolgozni (17). A fényérzékeny plasztiszt hordozó *N. tabacum* donort letális besugárzással, a recipienst (vad típusú *N. plumbaginifolia*) jódecetsavval kezeltük. A fúziót követően csak a két faj protoplasztjainak összeolvadásából származó sejtek

1. táblázat

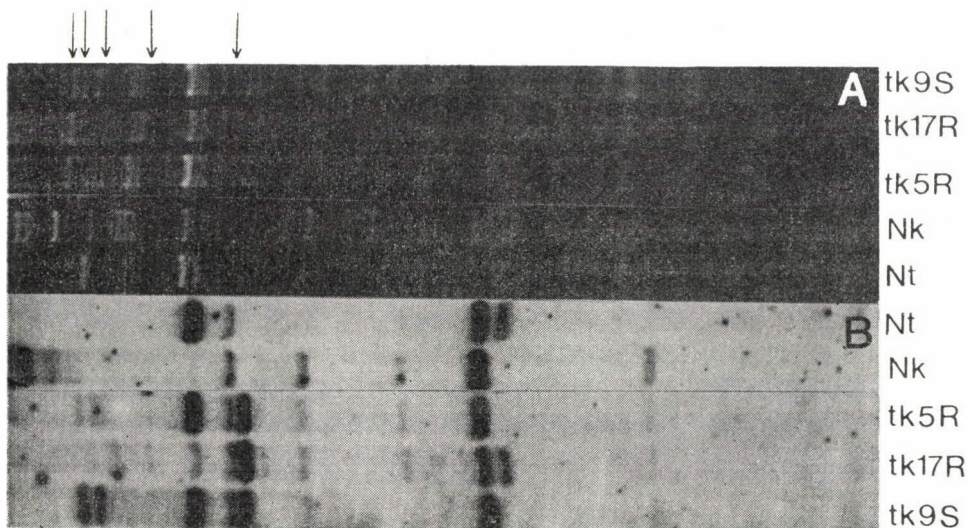
*N. tabacum* plasztiszok átvitele *N. plumbaginifolia*<sup>§</sup> magháttérbe inaktivált sejtéből származó sztreptomycin rezisztenciára történő szelekcióval

| <sup>60</sup> Co sugárdózis<br>(J kg <sup>-1</sup> ) | Vizsgált klónok<br>száma | Klónok száma, melyekből növényt sikerült regenerálni* |         |         |        | Plasztisz átvitel<br>gyakorisága<br>(%) § |
|------------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------|---------|---------|--------|-------------------------------------------|
|                                                      |                          | H                                                     | H és Nt | H és Np | Np     |                                           |
| 0 <sup>+</sup>                                       | 100                      | 69 (5)                                                | 3 (0)   | 1 (1)   | 1 (1)  | 0                                         |
| 50                                                   | 38                       | 10 (0)                                                | 0       | 6 (0)   | 11 (5) | 44                                        |
| 120                                                  | 41                       | 15 (0)                                                | 0       | 0       | 20 (0) | 57                                        |
| 210                                                  | 33                       | 5 (0)                                                 | 0       | 0       | 26 (0) | 84                                        |
| 300                                                  | 35                       | 9 (0)                                                 | 0       | 0       | 21 (1) | 69                                        |

\* H = hibrid; Nt = *N. tabacum*, Np = *N. plumbaginifolia*. A zárójelben azon klónok száma található, melyekből szenzitív és rezisztens növényt is kaptunk.

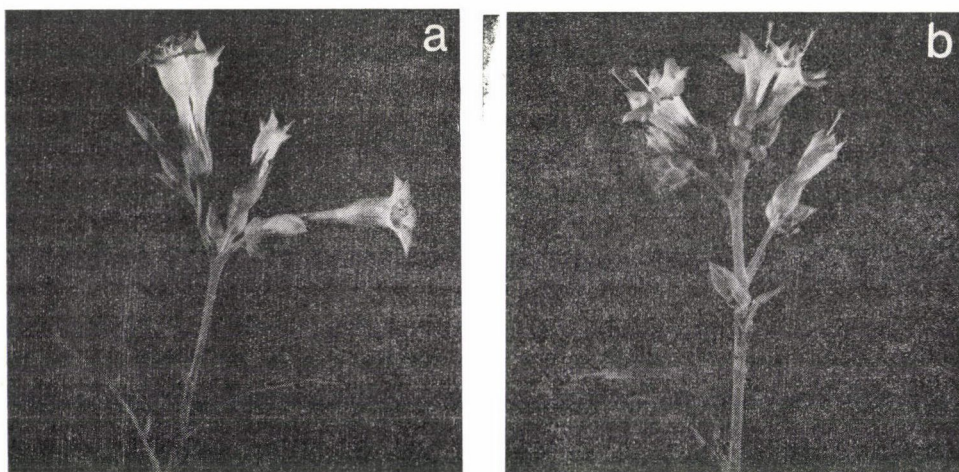
<sup>+</sup> SRI protoplasztokat 10 mM jódecetsavval kezeltünk.

§ Regeneráló klónok gyakorisága, melyekből *N. tabacum* plasztiszokat tartalmazó *N. plumbaginifolia* növényeket kaptunk.



1. ábra. MtDNS átalakulása *N. tabacum* és *N. knightiana* szomatikus hibridekben. Az átrendeződés eredményeként létrejött, szülőkből nem található BamHI restrikciós fragmenteket nyíl jelzi (A). A riboszomális RNS géneket hordozó fragmenteket *E. coli* rRNS gént tartalmazó próbával történő hibridizációval mutattuk ki (B). A fragmentek szeparálása elektroforézissel 0,7%-os agar gélben történt. Nt és Nk a szülői mintázatot jelöli; tk9S, tk17R, tk5R különböző szomatikus hibrid vonalak

osztódtak. A besugárzás, a várákozásnak megfelelően, az esetek jelentős részében a besugárzott mag elvesztését eredményezte. A besugárzott plasztiszok kompetíciós képessége viszont a jódecetsavval kezeltéknél lényegesen jobb



2. ábra. *N. tabacum* növény (A) és egy *N. tabacum* magszegregáns (B). A szegregáns *N. tabacum* plasztiszt és rekombináns mitokondriumot hordoz. Feltűnő a virágok közötti morfológiai eltérés, ami a mitokondrium DNS-ben történt változások következménye

volt, így a heterokarion eredetű kolóniák nagy gyakorisággal recipiens magot és donor plasztiszt tartalmaztak.

Citológiai adatok azt mutatják, hogy a besugárzott sejtekből történő kloroplaszt átvitel során a recipiensbe nem kerültek át donor kromoszómák (13).

Kloroplasztisz DNS rekombinációt transzfer és szomatikus hibridizációs kísérletekben sem másnak, sem nekünk nem sikerült kimutatni. A mitokondrium DNS (mtDNS) átalakulása a fúziót követően tapasztalatunk szerint a fajkombináció függvénye: A *N. tabacum* és *N. knightiana* kombinációnál minden klónban bekövetkezett (14; 1. ábra). A *N. tabacum* és *N. sylvestris* kombinációban eddig nem találtunk mtDNS átrendeződést (nem közölt). A mtDNS átalakulása a virágmorfológia megváltozásával járhat (2. ábra).

### *Tervek, munkahipotézisek, perspektívák*

A további kísérletek célja elsősorban módszerek kidolgozása új típusú citoplazmával rendelkező növények előállítására, melyek közül néhány remélhetőleg felülmúlja majd a kiindulási növényeket valamilyen gazdaságilag értékes tulajdonság (fotoszintézis, energiaháztartás, növekedés) tekintetében. E módszerek kiaknázása megkívánja, hogy a kísérleteket megfelelő időben megkezdjük a népgazdaság szempontjából kiemelkedően fontos gabonafélékkel, búzával és kukoricával is, amire még nem állnak rendelkezésre megfelelő szövettenyésztési módszerek. A hasznosítás terén szerény kezdetként, a debreceni Dohánykutató Intézettel együttműködve, megkezdjük egy termesztett dohány hímsteril formájának előállítását. Ez a hagyományos 6–8 év helyett 2 évet vesz igénybe. A hímsteril forma hibrid vetőmag előállítás során anyai szülőként szerepel majd, így szükségtelessé válik a porzók eddigi kézzel történő eltávolítása.

Tervezzük plasztiszok átvitelét távoli fajok között, és plasztisz-DNS rekombináció indukciójára szolgáló eljárások kifejlesztését.

Az előző fejezet végén felvetett jelenség egyik lehetséges magyarázata, hogy létezik valamilyen fajspecifikus felismerő rendszer, amely megszabja, bekövetkezzék-e átrendeződés vagy rekombináció a mtDNS-ben. Eddigi tapasztalataink szerint a mtDNS megváltozása, azonos magháttér mellett, összefüggésbe hozható a plasztiszok típusával. Ez felveti azt a lehetőséget, hogy a mtDNS átalakulását a plasztisz determinálja. Ezek további vizsgálatra érdemes, kísérletesen részben megalapozott munkahipotézisek, melyek vizsgálata folyamatban van. Az új típusú mtDNS vizsgálatával szeretnénk meghatározni a hímsterilitásért felelős régiókat, és azokat klónozás után megkísérلjük termékeny növényekbe bejuttatni. Vizsgáljuk plasztiszra történő szelekció esetén a mitokondriumok együttes átvitelének gyakoriságát is.

## IRODALOM

1. BELLARD, G., PELLETIER, G., VEDEL, F.: *Molec. Gen. Genet.* **165**, 231—237 (1978).
2. BELLARD, G., VEDEL, F., PELLETIER, G.: *Nature* **281**, 401—403 (1979).
3. CHEN, K., WILDMAN, S. G., SMITH, H. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5109—5112 (1977).
4. DUDITS, D., HADLACZKY, GY., LÉVI, E., FEJÉR, O., HAYDU, Zs., LÁZÁR, G.: *Theor. Appl. Genet.* **51**, 127—132 (1977).
5. DUDITS, D., HADLACZKY, GY., BAJSZÁR, GY., KONCZ, Cs., LÁZÁR, G., HORVÁTH, G.: *Plant Sci. Lett.* **15**, 101—112 (1979).
6. DUDITS, D., FEJÉR, O., HADLACZKY, GY., KONCZ, Cs., LÁZÁR, G., HORVÁTH, G.: *Molec. Gen. Genet.* **179**, 283—288 (1980).
7. GILLHAM, N. W.: *Organelle heredity*. Raven Press, New York (1978).
8. MALIGA, P., SZ.—BREZNOVITS, Á., MÁRTON, L.: *Nature New Biol.* **224**, 29—30 (1973).
9. MALIGA, P., SZ.—BREZNOVITS, Á., MÁRTON, L.: *Nature* **255**, 401—402 (1975).
10. MALIGA, P.: *Theor. Appl. Genet.* **60**, 1—3 (1981).
11. MEDGYESY, P., MENCZEL, L., MALIGA, P.: *Mol. Gen. Genet.* **179**, 693—698 (1980).
12. MENCZEL, L., NAGY, F., KISS, Zs., MALIGA, P.: *Theor. Appl. Genet.* **59**, 191—195 (1981).
13. MENCZEL, L., GALIBA, G., NAGY, F., MALIGA, P.: *Genetics* (1981). (Megjelenés alatt)
14. NAGY, F., TÖRÖK, I., MALIGA, P.: *Molec. Gen. Genet.* **183**, 437—440 (1981).
15. RÉDEI, G. P.: *Ann. Rev. Genet.* **9**, 111—127 (1975).
16. SIDOROV, V. A., MENCZEL, L., NAGY, F., MALIGA, P.: *Planta* **152**, 341—345 (1981).
17. SIDOROV, A., MENCZEL, L., MALIGA, P.: *Nature* **293**, 87 (1981).
18. ZELCER, A., AVIV, D., GALUN, E.: *Z. pflanzenphysiol.* **90**, 397—407 (1978).