

A GERINCTELEN ÁLLATOK SZÖVETEINEK IN VITRO TENYÉSZTÉSE

KISS ISTVÁN

MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézete, Szeged

A gerinctelen állatok szöveteinek tenyésztését egészen az utóbbi időkig mint kevésbé gyümölcsöző tudományterületet tartották számon. Ennek oka egyrészt a gyakorlati szükségletek és a belőlük fakadó tudományos érdeklődés hiányában, másrészt a szövetek tápigényére, a táptalajokra vonatkozó információ szegényes voltában keresendő. Mivel az összes Invertebrata közül csak a rovarok szöveteinek tenyésztése fejlődött számottevő mértékben és közelíti meg napjainkban a Vertebrata szövettenyésztés színvonalát, az alábbiakban ezt fogom részletesebben ismertetni. Röviden tárgyalom a rovarszövet-tenyésztés történetét, majd áttekintést adok az utóbbi néhány év legfontosabb eredményeiből; ezután részleteiben tárgyalom azokat a speciális vonatkozásokat, amelyekben a rovar (és egyéb gerinctelen) szövetek tenyésztése eltér a gerinces (emlős) szövetek tenyésztésében alkalmazott normáktól.

1. Történeti áttekintés

A rovarszövet-tenyésztés fejlődése négy szakaszra osztható [1]. Az első sikeres rovarszövet-kultúrát GOLDSCHMIDT [13] készítette a *Hyalophora cecropia* (Lepidoptera) testiseiből. GLASER [12] nevéhez fűződik az első mesterséges táptalaj kipróbálása, amely szervesetlen sókat, hemolimfát és peptont tartalmazott.

A második szakaszra a táptalajok bonyolultabbá válása jellemző. TRAGER (47) sikeresen kultúrázott hosszabb ideig *Bombyx mori* ováriumot egy olyan táptalajban, amely szervesetlen sókat, cukrokat, tojásalbumin-hidrolizátumot és rovar-hemolimfát tartalmazott. Ebben az időszakban általánosan elterjedt a különféle szövet-extraktumok, aminosav- és vitaminpreparátumok, valamint gerinces állatoktól származó savó használata, de egyelőre még kevés sikerrel.

A harmadik szakaszt WYATT munkája vezette be [54]. Ő fejlesztette ki az első olyan tápfolyadékot, amely már részletes kémiai analízisen alapult, és a *Bombyx mori* hemolimfájának összetételét (szervesetlen ionok, aminosavak és egyéb szerves savak, cukrok, vitaminok), valamint fizikai állandóit (pH, ozmotikus nyomás) utánozta. A táptalajt 10% homológ hemolimfa egészítette ki.

Ebben a médiumban a *Bombyx mori* szövetekből (ovárium, embrió) készített primér tenyészetek hosszú ideig túléltek, és a sejtek több hónapon át aktívan osztódtak.

A WYATT-féle táptalajt GRACE [14] fejlesztette tovább egy általánosan használt Lepidoptera táptalajjává. A következő évek során számos félszintetikus táptalajt írtak le, amelyek jól használhatók különböző Diptera [10, 22, 25, 26, 37, 41], Dictyoptera [27, 31, 50] és Homoptera [5, 19] fajok szövetének tenyésztéséhez.

A negyedik szakaszban tehát a rovarszövet-tenyésztés lényegében felzárkózik az emlősszövet-tenyésztés szintjéhez, legalábbis a *Drosophila*, valamint néhány szúnyog- és lepkefaj tekintetében. A döntő fordulatot az első, korlátlanul fenntartható sejtvonal izolálása jelentette az *Antheraea eucalypti* lepkéből [14]. Azóta számos további sejtvonalat izoláltak, elsősorban Lepidoptera, Diptera, Dictyoptera és Homoptera fajokból [18].

A sejtvonalak új távlatokat nyitottak a rovar-sejtgenetika és sejtélet-tan, valamint a rovarokban élő vagy általuk terjesztett vírusok és egyéb intracelluláris paraziták tanulmányozása előtt. Egy további nagy fontosságú fejlemény a rovarok steril, csíramentes környezetben való tenyésztése, amely teljesen megoldja a primér kultúrák kontaminációjának problémáját és feleslegessé teszi az antibiotikumok használatát [36]. Mindez lehetővé tette a szervkultúrázás nagymérvű fejlődését is.

E vázlatos áttekintés után néhány irodalmi összefoglalóra szeretném felhívni a részletek iránt is érdeklődő olvasó figyelmét [5, 12, 15, 16, 17, 24, 27, 28, 38, 40, 41, 43, 44].

2. A rovarszövet-tenyésztés mai jelentősége

Az alábbiakban néhány fontos eredményt, illetve a fejlődés valószínű irányait szeretném bemutatni.

A szövettenyésztési módszereket ma főként három területen alkalmazzák:

1. sejt- és szövet-differenciálódás, valamint hormon-hatásmechanizmus tanulmányozása,
2. sejtélet-tani és sejtgenetikai kutatások,
3. vírusok és egyéb intracelluláris élősködők tanulmányozása.

Az első területről a következő eredményeket említem: a szöveti regenerációval foglalkozó tanulmányok közül kiemelkedik MARKS [32] rendszere: *Leucophaea maderae* (Madeira-csótány) lábát amputálta, majd a lábcsonk végén képződő epidermális sarjszövetből in vitro tenyészetet készített. A táptalajhoz adott 0,5–1 µg/ml alfa- vagy béta-ekdizon hatására a sarjszövet in vitro differenciálódott, kutikulát választott ki, majd átment a vedlési ciklus kezdeti fázisain is (apolízis). Ez a rendszer különösen alkalmas a vedlés hor-

monális szabályozásának, valamint az ekdizon epidermisz-sejtekre gyakorolt hatásának sejtszinten történő tanulmányozására.

Egy másik sokat ígérő terület az imágókorongok (imaginális diszkuszkok) in vitro, ekdizon hatására történő differenciálódása. A hormon először morfogenezist (evagináció), majd báb-kutikula, végül pedig adult típusú kutikula lerakódását indukálja. A teljes folyamatot *Drosophila melanogaster* lábdiskuszaival először MANDARONNAK sikerült in vitro reprodukálnia [29].

A fejlődés korai szakaszában levő *Drosophila* embrióból vett sejtek, ha megfelelő táptalajba kerülnek, folytatják a sejt differenciálódást és különféle lárvális, illetve adult szövettípusokra jellemző sejtekké fejlődnek (42, 43, 44). Legújabban a SHIELD és SANG-féle táptalaj [44] egy javított változatát használva, sikerült imaginális diszkusz-típusú sejteket is nyerni, amelyek egysejtrétegű gömbökké aggregálódtak [9]. Alfa-ekdizon hatására ezek az aggregátumok további differenciálódáson mentek keresztül, adult típusú kutikulát választottak ki. A *Drosophila* genetikai háttere, illetve genetikai manipulálhatósága óriási lehetőségeket biztosít a fejlődésgenetikai kutatások számára ezekben a rendszerekben.

A sejtelettani kutatások területéről említést érdemel LANDUREAU munkássága, aki az általa csótány-fajokból izolált sejt vonalak tápigényeit igen alaposan tanulmányozta [27].

A rovarszövet-tenyészeteket leggyakrabban patológiai célokra használják. A gerinctelenekben élő intracelluláris paraziták tanulmányozásával kapcsolatban elsősorban VAGO nevét kell megemlítenünk, aki munkatársaival nagyszámú faj esetében vizsgálta meg a különböző vírusok, Rickettsiák és Mycoplasmák tenyészthetőségét, illetve citopátiás hatását. Ezzel kapcsolatban két összefoglalóra utalok [40, 51].

Régóta ismert, hogy a növényi vírus- és Mycoplasma-fertőzéseket főként rovarok (poloskák, levéltetvek, kabócák) terjesztik. A növényi vírusok behatolnak a rovar-vektor sejtjeibe, sőt ott még szaporodnak is. E jelenség in vitro történő vizsgálata főként MARAMOROSCH és munkatársai nevéhez fűződik [30].

Általános sejtbiológiai és közegészségügyi szempontból egyaránt érdekes a Plasmodiumok szúnyog-sejtekben történő fejlődésének és szaporodásának vizsgálata [3].

3. A szövettenyésztéssel kapcsolatos problémák

Ami a gerincesek és a gerinctelenek szöveteinek in vitro tenyészthetőségét illeti, hangsúlyozni szeretném, hogy nincs olyan elvi, alapvető különbség, amely az utóbbit eleve akadályozná. Vannak viszont a kettő között speciális különbségek, s a belőlük adódó nehézségek áthidalása gyakran sajátos technikai eljárásokat igényel. A következőkben ezeket a különbségeket szeretném áttekinteni.

3.1. A táptalaj összetétele

Általános elvként fogadhatjuk el, hogy a táptalaj annál jobb, minél közelebb áll összetételét tekintve az illető faj testnedveihez, illetve hemolimfájához. A gerincesek esetében a különböző fajok szérumjának kémiai összetétele meglehetősen hasonló, ezért az általánosan használt táptalajok bármelyike alkalmas gyakorlatilag bármilyen gerinces szövet tenyésztésére. A gerinctelenek hemolimfaösszetétele sokkal változatosabb: egyrészt nagy különbségek vannak az egyes törzsek, csoportok között, másrészt — a metamorfózissal fejlődő fajok esetében — az összetétel a fejlődési stádiumoknak megfelelően is változik.

1. táblázat

Különböző Arthropoda-fajok hemolimfájának kation-összetétele

Faj	Fejlődési stádium	Ion-koncentráció meq/l				Na
		Na+	K+	Ca++	Mg++	K+
<i>Melolontha melolontha</i> (8)	adult	113,0	5,8	15,3	41,3	19,4
<i>Dytiscus marginalis</i> (8)	adult	165,1	6,4	22,5	37,5	25,9
<i>Periplaneta americana</i> (52)	adult	157,0	7,6	4,2	5,4	20,6
<i>Periplaneta americana</i> (38)	lárva	100,0	15,4	3,3	—	6,4
<i>Apis mellifera</i> (11)	adult (11)	47,1	27,1	17,1	1,0	1,7
<i>Apis mellifera</i> (8)	lárva (8)	10,9	30,5	18,2	20,5	0,3
<i>Homarus americanus</i> (6)		88,1	1,8	6,6	3,5	49,0
<i>Astacus astacus</i> (4)		82,7	1,5	13,0	2,7	66,1

Mindebből az következik, hogy a gerinctelenek szövettenyésztésében a megfelelő táptalaj sokkal nagyobb problémát jelent, mint a gerincesek esetében. Elvileg minden vizsgált fajra külön táptalajt kellene kidolgozni, a hemolimfaösszetétel alapján. Bár a gyakorlatban mégsem ennyire rossz a helyzet és néhány táptalajt (GRACE-féle Lepidoptera-táptalajt [14], ECHALIER-féle Drosophila-táptalajt [10] stb.) széles körben használnak, valóban jó eredményeket csak olyan táptalajokkal értek el, amelyek egy-egy adott fajra specializáltak. Az alábbiakban röviden sorra vesszük azokat a különbségeket, amelyek eltérést jelentenek a gerinceseknél használt táptalajokhoz képest.

3.1.1. Szervetlen ionok

A hemolimfában előforduló kationok elsősorban tápanyagként szerepelnek; jelentőségük az ozmotikus nyomás szabályozásában sokkal kisebb, mint a gerinceseknél. A Na^+/K^+ , illetve $\text{Na}^+ + \text{K}^+/\text{Ca}^{++} + \text{Mg}^{++}$ milliekvivalensek aránya változó, gyakran erősen eltér a gerincesek hasonló értékétől, amely sokkal állandóbb. A táptalajok készítéséhez általában a következő vegyületeket használják: NaCl , KCl , MgCl_2 , CaCl_2 , MgSO_4 , Na_2HPO_4 , NaHCO_3 ,

KH_2PO_4 . Kloridok helyett újabban gyakran alkalmazzák a glutaminsav, illetve glicin megfelelő sóit, ezáltal a hemolimfa Cl^- , illetve szabad aminosav-tartalmát jobban megközelítik.

3.1.2. Szerves savak

A Szent-györgyi—Krebs-ciklussal kapcsolatos szerves savak közül a citromsav, ketoglutársav, maleinsav, fumársav, borostyánkősav, oxálecetsav és piroszőlősav fordul elő a hemolimfában, koncentrációjuk akár 25—35 millimol is lehet. Funkciójuk részben a kationok megkötése, részben pedig a pufferkapacitás növelése. Bár a sejtek tápanyagként használják fel őket, jelenlétük a táptalajban nem feltétlenül szükséges.

3.1.3. Szabad aminosavak

Igen nagy mennyiségben (3—21 mg/ml) fordulnak elő, elsősorban a rovarok hemolimfájában. Az ozmotikus nyomás döntő részét adják. Az egyes aminosavak koncentrációja és egymáshoz viszonyított arányuk erősen változhat. Általában az összes aminosav megtalálható, bár ezek közül csak néhány esszenciális [27]. A táptalajhoz adott szabad aminosavak nagymértékben elősegítik a sejtek túlélését és szaporodását. Sok táptalajban a szabad aminosav-tartalmat laktalbumin-hidrolizátum hozzáadásával biztosítják, s ezt egészítik még ki az esszenciális aminosavakkal.

3.1.4. Szénhidrátok

A hemolimfa fermentálható cukor- (elsősorban glukóz-) tartalma sokkal alacsonyabb, mint a gerincesek esetében. Az ízeltlábúakra jellemző a trehalóz [55], amely magas koncentrációban fordulhat elő. A táptalajokban a cukrok mint energiaszolgáltató tápanyagok szerepelnek. Koncentrációjuk a táptalajokban általában még magasabb, mint a hemolimfában (a GRACE-féle médiumban pl. 2778 mg/100 ml a teljes szénhidrát-mennyiség): ezt a sejtek jól tűrik, s ugyanakkor az energia-tartalék jóval nagyobb.

Érdekes, hogy a rovarsejtek in vitro nem igénylik a trehalóz feltétlen jelenlétét. Sőt, glukózt, fruktózt és szaharózt tartalmazó táptalajban az egyes cukrokat az előbbi sorrendnek megfelelően használják fel [16].

3.1.5. Vitaminok

A rovarszövetek in vitro elsősorban a vízben oldódó B-komplex vegyületeit igénylik, többségük esszenciális a sejtek számára. Az igényelt mennyiség olyan kicsiny, hogy 1 μg /100 ml koncentráció bőven kielégíti, 5 μg /100 ml-nél a legtöbb vitamin már gátolja a sejt szaporodást [17].

Gyakran a tenyésztethez adott hemolimfa, szérum, vagy akár maga az explantált szövetdarab elegendő vitamint tartalmaz. Rovarok számára vitamin-jellegű a m-inozitol és a koleszterol is. A szövetek vitamin-igényét élesztő-

kivonat (TC Yeastolate, Difco) hozzáadásával is lehet fedezni, ami a táptalaj elkészítését lényegesen egyszerűsíti.

3.1.6. Természetes adalékanyagok

Leggyakrabban főtális borjúsavót (FBS), illetve hemolimfát, esetleg szövetkivonatokat használnak, 1–10 % végkoncentrációban. Legkevésbé a különböző szövet- vagy embriókivonatok váltak be. A homológ (ugyanazon fajból származó) hemolimfa nagyon jól használható, de két nagy hátránya van: egyrészt nehezen gyűjthető a kis testméret miatt, másrészt erős polifenoloxidáz (tirozináz) -aktivitása van, amit csak hőkezeléssel (60°C, 3–4 perc) lehet megszüntetni. Az utóbbi időben gyakran helyettesítik rák-hemolimfával (*Homarus americanus*), azonban ez sem jó minden szövetféleséghez.

Legszelesebb körben a FBS alkalmazható, különösen sejtvonalak esetében. Egyéb gerinces savókat használat előtt hővel kell kezelni, toxicitásuk miatt.

3.1.7. pH és ozmotikus nyomás

A táptalajok mindkét tekintetben a hemolimfához igazodnak. A gerinctelenek hemolimfájának pH-ja általában 7,2 és 7,8 között van. Kivételt képeznek a rovarok, ahol pH 6 és 7 közötti értékek is gyakoriak.

Ennek megfelelően, a rovarszövet-táptalajok pH-ja általában 6,5–7 között mozog. A hemolimfa ozmotikus nyomásból adódó fagyáspont-csökkenése rovarok esetében $-0,5$ – $-0,9^{\circ}\text{C}$, tengeri gerinctelenek esetében pedig kb. $-1,8^{\circ}\text{C}$ (ez utóbbi kb. azonos a tengervíz fagyáspontcsökkenésével). Mivel az átalakulással fejlődő gerinctelenek esetében a hemolimfa pH-ja és ozmotikus értéke is változik, valószínű, hogy sejtjeik is eléggé tűrőképesek ebből a szempontból.

3.2. A szövet kiválasztása

Az explantálandó szövetféleség kiválasztása természetesen a kísérleti céloktól függ. Amennyiben a cél a szöveti struktúra megtartása (differenciált szövetek működésének tanulmányozása, organogenezis vizsgálata esetén), szervkultúrázási (organotipikus) eljárásokat alkalmazunk, a szövet sejtekre való bontása nélkül. Ilyen jellegű tenyészetek természetesen nem alkalmasak pl. sejtvonalak izolálására. Ha célunk osztódó sejt-tömeg nyerése, olyan szövetet kell kiválasztani, amiben már eredetileg is vannak osztódó sejtek (ovárium, embrió, esetleg frissen kikelt lárva). Általában szükséges a szöveti szerkezet fellazítása, a sejtek kiszabadítása is (hisztiotipikus vagy „igazi” sejt-kultúrák). Permanens sejtvonalak kialakulása ilyen tenyészetekben remélhető [14].

3.3. Csíramentesség

A gerincesek esetében jól bevált steril kimetszési technika gerinctelenek esetében nehezen, vagy egyáltalán nem alkalmazható. A kicsiny testméret nagy fajlagos felületet eredményez, s a testfelület általában erősen szennyeződött baktériumokkal és gombákkal. Bár a hemolimfa és a belső szövetek csíramentese, a tracheák és az emésztőrendszer már nem az, és boncolás közben ezeket nehéz elkerülni. A rovarok testfelületének sterilizálását különböző fertőtlenítőszerrel (nátrium-hipoklorit, kálium-permanganát, hidrogén-peroxid, szublimát, etilalkohol, formalin, kvaterner-ammónium-bázisok, stb.) néhány százalékos oldatával végzik, amelybe az elkábított állatokat 5–10 percre belemerítik. Technikailag körülményesebb, de tökéletes megoldást nyújt az állatok steril környezetben való felnevelése [36]. Ilyenkor a petéket felületi sterilizálásnak vetik alá a fentebb említett módszerekkel, majd steril edényben, steril táptalajra helyezik. Különösen hasznos ez az eljárás az aprótestű rovarok (pl. levéltetvek) esetében, ahol a steril boncolás már lehetetlen [38].

3.4. Az explantátum előkészítése

Sejtkultúrák készítéséhez a sejteket ki kell szabadítani a szöveti szerkezetből. Ez mechanikai vagy kémiai kezeléssel érhető el. A gerincesek szöveteinél széles körben alkalmazott tripszines kezelésre (0,25% tripszinnel 37°C-on) a gerinctelenek, különösen a rovarok szövetei nagyon érzékenyek [35]. 0,1% tripszin 25°C-on néhány perc alatt még nem károsítja a sejteket, viszont a szövetdarabot csak fellazítja, a sejtek nem szabadulnak ki teljesen [20]. Laza embrionális szövetek mechanikailag (ismételt pipettázás vagy óvatos homogenizálás) is sejtekre bonthatók [21]. Egyéb kémiai módszerek pl. az éticsiga (*Helix pomatia*) hepatopankreászából készített enzimkivonat használata tripszin helyett [35], valamint a tripszines emésztés kombinációja hialuronidáz [2] vagy EDTA [28] kezeléssel.

3.5. A tenyésztés módja

Tekintettel arra, hogy az explantátum általában kisméretű, a primér kultúrák is kevés, 50–100 µl táptalaj felhasználásával, függő- vagy ülőcsepp formájában készülnek. Nagyobb testű gerinctelenek (pl. puhatestűek) esetében már a szokásos szövettenyésztési eljárások is alkalmazhatók. A gerincesek szöveteivel készült primér kultúrákban elterjedten alkalmazzák a kiültetett szövetdarabnak az aljzathoz történő „ragasztását” csirke-plazmaalvadék segítségével. gerinctelenek szövetkultúráiban ez az eljárás nem vált be. A gerinctelenekből izolált permanens sejtvonalak fenntartása az egyéb sejtvonalakhoz hasonlóan történik.

3.6. *A gázfázis összetétele*

A használt táptalajokat a legtöbb esetben foszfátok pufferelik, nem pedig karbonát-bikarbonát, ezért szükségtelen a széndioxid magas koncentrációjának fenntartása a gázfázisban. Egyébként az O_2 és CO_2 koncentrációjának széles határok közötti változtatása nem befolyásolja lényegesen pl. a rovarszövetek in vitro életképességét [17].

3.7. *Hőmérséklet*

A gerinctelenek változó testhőmérsékletű állatok. Ennek megfelelően, szöveteik in vitro tenyésztése is $37^\circ C$ -nál alacsonyabb hőmérsékleten történik. A rovarszövet-kultúrákat általában $25^\circ C$ körül tartják, de nem magasabban, mint $30^\circ C$. Tengeri gerinctelenek szövetkultúrái még alacsonyabb hőmérsékletet ($15-23^\circ C$) igényelnek.

4. *A sejtek viselkedése a tenyésztésben*

Ha a táptalaj megfelelő, a gerinctelenek sejtjei ugyanúgy viselkednek primér kultúrában, mint a gerincesekéi. Az aljzathoz tapadt explantátumból 24—48 órán belül erős sejtmigráció indul meg. A differenciált szöveti jellegeket mutató sejtek általában néhány napon belül elpusztulnak, és kevésbé differenciált („fibroblaszt-szerű”, ill. epiteliális) sejtek szaporodnak el a kultúrában. Gyakran amoeboid jellegű, erősen fagocitáló sejtek is megjelennek. A rovarszövettenyészetek jellegzetessége a lapos, epiteliális sejtek egy rétegéből álló kisebb-nagyobb hólyagok, gömbök megjelenése. Embrionális sejtek a kultúrázás első szakaszában gyakran aggregálódnak [21], és kisebb-nagyobb mértékű sejtdifferenciálódásra is képesek [9, 42]. Néhány hét múlva a sejtek az ismételt táptalajcsere ellenére is pusztulni kezdenek, és a kultúra 2—3 hónapon belül degenerálódik. Ez a végső szakasz az az idő, amikor egy új sejtvonal megjelenhet a kultúrában. A permanens rovar-sejtvonalak a gerincesekből izolált sejtvonalakhoz teljesen hasonlatosak: epiteliális vagy fibroblasztszerű sejtekből állanak, egy sejtréteget (monolayer) alkotnak, gyakran poliploidok, és különböző táptalajokhoz adaptálhatók. A Lepidoptera- és moszkító-sejtvonalak klónoozhatók is.

IRODALOM

1. AIZAWA, K.: In „Invertebrate Tissue Culture” (C. Vago, ed.) Vol. 1, p 212 Academic Press, New York (1971).
2. AIZAWA, K. és VAGO, C.: C. R. Acad. Sci. **249**, 928 (1959).
3. BALL, G. H.: In „Invertebrate Tissue Culture” (C. Vago, ed.) Vol. 2, p. 321 (1971).
4. BOGUCKI, M.: Arch. Int. Physiol. **33**, 172 (1934).
5. CHIU, R. J. és BLACK, L. M.: Nature (London) **215**, 1076 (1967).

6. COLE, W. H.: *J. Gen. Physiol.* **23**, 575 (1940).
7. DAY, M. F. és GRACE, T. D. C.: *Rev. Entomol.* **4**, 17 (1959).
8. DUCHATEAU, G., FLORKIN, M. és LECLERCQ, J.: *Arch. Int. Physiol.* **61**, 518 (1963).
9. DÜBENDORFER, A., SHIELDS, G. és SANG, J. H.: *J. Embr. exp. Morph.* **33**, 487 (1975)
10. ECHALIER, G. és OHANESSIAN, A.: *In vitro* **6**, 162 (1970).
11. FLORKIN, M. és JEUNIAUX, C.: *Life Sci.* **12**, 982 (1963).
12. GLASER, R. W.: *Psyche* **24**, 1 (1917).
13. GOLDSCHMIDT, R.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **1**, 220 (1915).
14. GRACE, T. D. C.: *Nature (London)* **195**, 788 (1962).
15. GRACE, T. D. C. és BRZOSTOWSKI, H. W.: *J. Insect Physiol.* **12**, 625 (1966).
16. GRACE, T. D. C.: *Aust. J. Biol. Sci.* **11**, 407 (1958).
17. HARTZELL, A.: *Proc. Int. Congr. Entomol.* 10th, 1956. Vol. **2**, 319 (1958).
18. HINK, W. F.: „Invertebrate Tissue Culture” (C. Vago, ed.), 2. köt. 363. old. Academic Press, New York (1971).
19. HIRUMI, H. és MARAMOROSCH, K.: *Science* **144**, 1465 (1964).
20. HIRUMI, H. és MARAMOROSCH, K.: *Exp. Cell Res.* **36**, 625 (1964).
21. HORIKAWA, M. és FOX, A. S.: *Science* **145**, 1437 (1964).
22. HORIKAWA, M., LING, L. és FOX, A. S.: *Nature (London)* **210**, 183 (1966).
23. JONES, B. M.: „Cells and Tissues in Culture” (E. N.) Willmer, ed.), 3. köt., 397. old. Academic Press, New York (1966).
24. JONES, B. M.: *Biol. Rev.* **37**, 512 (1962).
25. KAKPAKOV, V. T., GVOZDEV, V. A., P³ATOVA, T. P. és POLUKAROVA, L. G.: *Genetika* **5**, 67 (1969).
26. KITAMURA, S.: *Kobe J. Med. Sci.* **16**, 41 (1970).
27. LANDUREAU, J. C. és JOLLÉS, P.: *Exp. Cell Res.* **54**, 391 (1969).
28. LESSEPS, R. J.: *Science* **148**, 502 (1965).
29. MANDARON, P.: *Wilhelm Roux' Archiv* **169**, 353 (1974).
30. MARAMOROSCH, K.: *Proc. Int. Cong. Entomol.* 11th. 1960, 2. köt. 801 old. (1962).
31. MARKS, E. P. és REINECKE, J. P.: *J. Kans. Entomol. Soc.* **38**, 179 (1965).
32. MARKS, E. P.: *Proc. Third Int. Colloq. Invert. Tissue Cult.* 221 old. (1971).
33. MARTIGNONI, M. E.: *Experientia* **16**, 125 (1960).
34. MARTIGNONI, M. E.: *Proc. Biol. Colloq. (Oregon State Univ.)* **23**, 89 (1962).
35. MARTIGNONI, M. E., ZITCER, E. M. és WAGNER, R. P.: *Science* **128**, 360 (1958).
36. MEYNADIER, G.: „Invertebrate Tissue Culture” (C. Vago, ed.), 1. köt. 141 old. Academic Press, New York (1971).
37. MITSUHASHI, J. és MARAMOROSCH, K.: *Contrib. Boyce Thompson Inst.* **22**, 435 (1964).
38. MITSUHASHI, J. és MARAMOROSCH, K.: *Contrib. Boyce Thompson Inst.* **22**, 165 (1963).
39. MITSUHASHI, J.: „Invertebrate Tissue Culture” (C. Vago, ed.), 2. köt. 343 old. (1971).
40. ŘEHÁČEK, J.: „Invertebrate Tissue Culture” (C. Vago, ed.), 2. köt. 280 old. (1971).
41. SCHNEIDER, I.: *J. Cell Biol.* **42**, 603 (1969).
42. SEECOF, R. L., ALLEAUME, N., TEPLITZ, R. L. és GERSON, I.: *Expl. Cell. Res.* **69**, 161 (1971).
43. SEECOF, R. L., DONADY, J. J. és TEPLITZ, R. L.: *Cell Differentiation* **2**, 143 (1973).
44. SHIELD, G. és SANG, J. H.: *J. Embryol. exp. Morphol.* **23**, 53 (1970).
45. SMITH, K. M.: „Insect Virology”, Academic Press, New York (1967).
46. TOBIAS, J. M.: *J. Cell. Comp. Physiol.* **31**, 143 (1948).
47. TRAGER, W.: *J. Exp. Med.* **61**, 501 (1935).
48. VAGO, C.: *Entomophaga* **4**, 23 (1959).
49. VAGO, C.: *Methods Virol.* **1**, 567 (1967).
50. VAGO, C. és QUIOT, J. M.: *Ann. Zool. Ecol. Anim.* **1**, 281 (1969).
51. VAGO, C.: „Invertebrate Tissue Culture” (C. Vago, ed.), Academic Press, New York. 2. köt. 246 old. (1971).
52. VAN ASPEREN, K. és VAN ESCH, K.: (1956).
53. VAUGHN, J. L.: „Insect Viruses” (K. Maramorosch, ed.), 108 old. Springer, Berlin (1968).
54. WYATT, S. S.: *J. Gen. Physiol.* **39**, 841 (1956).
55. WYATT, G. R. és KALF, G. F.: *J. Gen. Physiol.* **40**, 833 (1957).