

# NÖVÉNYI SZÖVETTENYÉSZTÉS

MARÓTI MIHÁLY

ELTE Biológiai Állomása, Göd

A növényi embrió-, szerv-, szövet- és sejttenyésztést ma a növényélet-, növényi sejtélet- és genetikai differenciált, speciális irányának és területének tekinthetjük. Ezt különleges objektumai mellett az is indokolja, hogy az utóbbi évtizedekben számos elméleti és gyakorlati genetikai, élettani, bioregulációs probléma megoldására sikerrel alkalmazzák.

Áttekintésünk során elsősorban a szoros értelemben vett embrió-, szerv-, szövet- és sejttenyésztésre térünk ki és csak a magasabbrendű növények izolált részeivel végzett munkákat vesszük alapul.

## I. Az izolált tenyésztés célja

A növényi részek tenyésztésének célját már mintegy 70 éve megfogalmazta HABERLANDT (1902). Világosan leszögezte, hogy a magasabbrendű növények izolált vegetatív sejtjeit azért szükséges kultúrákban tanulmányozni, hogy így vizsgálhassuk működési mechanizmusukat, amelyek így mint „elemi organizmusok” működnek. Továbbá, hogy feltárjuk azokat a kölcsönhatásokat, amelyeknek a többsejtű növény egyes sejtjei ki vannak téve. HABERLANDT előre látta, hogy — ha sikerül az izolált növényi sejtek, szövetek tenyésztése — kísérletileg tudjuk bizonyítani a fejlettebb növények valamennyi élő sejtjének addig csak feltételezett totipotenciáját. Ezzel pedig megnyitjuk az utat a sejt-differenciálódás folyamatai irányításához és reverzibilis változtatásához. Ugyanakkor tisztázódik bármely (merisztémás és differenciált) növényi sejt metabolikus anyagcseréje, a sejtekre ható környezeti, táplálkozási és hormonális tényezők szerepe is. A tenyésztés lehetősége információkat adhat a kultúrában tartott sejtpopulációk, szövettömegek és szervek kölcsönös táplálkozási, differenciálódási, organizálódási és morfogenetikus korrelációjáról is, amelyek a növényi fejlődés szabályozásának, a hormonális bioregulációnak az alapjait érintik és a biológiai kutatások legfontosabb problémáit jelentik.

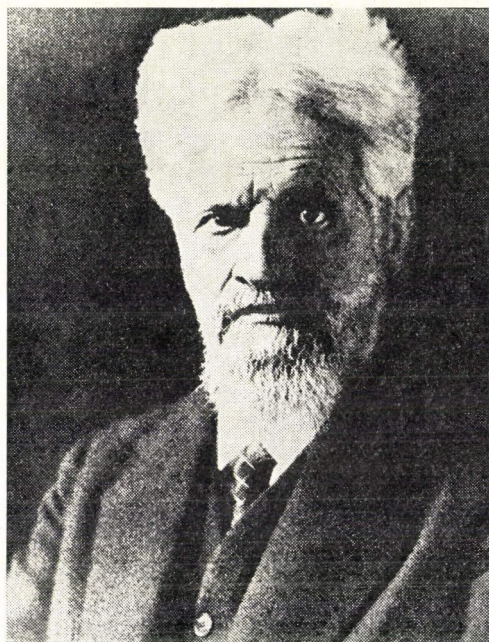
## II. A növényi részek tenyésztésének története

A növényi részek mesterséges tenyésztésének legrégebb nyomait már az időszámításunk előtti időszakban megtaláljuk. Ilyenek voltak pl. az egyes növényi részek összenövesztésének különböző formái, amelyek a mai növényi

transzplantációs kutatásoknak az előfutárai. VÖCHTING (1892) említi, hogy a kínaiak, ezektől átvéve a főníciaiak, punok, majd a görögök, rómaiak ismerték a növények, főként a gyümölcsfák nemesítési célból történő összenövesztését. A tudományág történetét — növényi vonalon — azonban legfeljebb csak az 1870-es évek végétől lehet számítani, amikor VÖCHTING a kivágott növényi frag mentumok, sejtek polaritását tanulmányozta, illetve gumók meggyökeresítésével és szövetek átültetésével kísérletezett. Arra szeretett volna feleletet kapni, vajon a regeneráció függ-e a kivágott szövetdarab nagyságától; mi okozza, hogy egyszer gyökér, máskor hajtás keletkezik a szár-gumók vágásfelületén; a fragmentum egészként fogható-e fel; a sejtek totipotenciája valószínű-e? Ezek a próbálkozások azonban még nem tekinthetők mai értelemben vett szövettenyésztésnek, mivel ezeket nem sterilen és in vitro, hanem a növényen és in vivo végezte el VÖCHTING.

### 1. Sikertelen próbálkozások

Az izolált növényi részek tenyésztése a legnehezebbel, a sejtekkel kezdődött. A növényi sejtek izolált tenyésztését in vitro, tehát mesterséges laboratóriumi körülmények között a német HABERLANDT (1902) kezdte meg és tulajdonképpen vele kezdődik a növényi szövettenyésztés története is (1. kép).



1. kép. Gottlieb Haberlandt (1854—1946). A növényi sejt- és szövettenyésztés elindítója.

A tenyésztésnek, mint módszernek a lényegét abban látta, hogy a magasabbrendű növények izolált sejtjeinek megfelelő tenyésztésével olyan eredményeket fog kapni, amelyekből a soksejtes organizmusokban lejátszódó összefüggésekre lehet majd következtetni. Ezt a lényegében helyes meglátást ma is — több évtizedes tapasztalat és sok eredmény után — elfogadhatónak tartjuk. HABERLANDT ugyan ezt nem tudta bizonyítani, mert kísérletei sikertelenek maradtak. Egyrészt ugyanis olyan növényi anyagot (pl. epidermisz, bél parenchima és paliszad sejteket, szöveteket) választott, amely már nem, vagy alig osztódott, tehát tenyésztésre nem volt alkalmas, másrészt nem ismerte még a növekedés igényeit sem táplálkozási téren, sem a külső fizikai tényezők oldaláról, még kevésbé a növekedés hormonális tényezőit (auxinokat, citokinineket, gibberellineket stb.). HABERLANDT kezdeményezései azonban nem voltak hiábavalók, mert a növényi sejtek totipotenciájának elméletét megfogalmazta és ösztönzést adott a későbbi hasonló jellegű steril tenyésztési kísérletekhez. Az embriótenyésztésben HANNIG (1904) ért el először sikereket, csaknem egyidőben HABERLANDT működésével. Több keresztes virágú faj: Raphanus (rettek), Cochlearia embrióját tenyésztette eredményesen ásványi sókat és szaharózt tartalmazó tápközegeken.

## 2. Az első sikeres tenyésztések

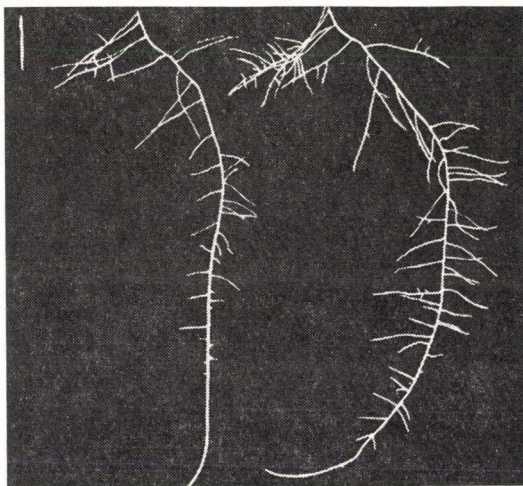
A növényi részek tenyésztésével foglalkozó kísérletek HABERLANDT és HANNIG után kb. 20 évig semmi újat sem eredményeztek, illetve sem szervek, sem szövetek, még kevésbé sejtek tenyésztése nem sikerült egzakt módon. 1922-ben azután HABERLANDT egyik tanítványa, KOTTE (1922) és az amerikai ROBBINS (1922) egymástól függetlenül sikeresen tenyésztettek mesterséges táptalajon gyökérsúcsokat. Ez tekinthető a növényi szövettenyésztés fejlődése *második szakaszának*. KOTTE Zea (kukorica) és Pisum (borsó), ROBBINS és MANEVAL (1923) pedig a Pisum (borsó), Zea (kukorica), Gossypium (gyapot) és Lupinus (csillagfürt) gyökérsúcsok növekedésével foglalkoztak. Ők figyelték meg először, hogy ha a gyökérsúcsokat új tápközegbe viszik (szubkulturálás) a növekedés folytatódhat, de a növekedés üteme fokozatosan csökken, majd megszűnik. Korlátlan idejű tenyésztést azonban még egyik kutatónak sem sikerült elérnie, jöllehet kultúráik több héten át életben maradtak és növekedtek.

Az embriótenyésztésben ugyanezen időben a francia MOLLIARD (1921) és a német LAIBACH (1925) ért el sikereket. Előbbi tápközegül a szervetlen sók kiegyensúlyozott keverékét, amelyben már mikroelemek is voltak és nagy szaharóz koncentrációkat használt. LAIBACH pedig 15%-os dextrózzal átitatott gyapoton nevelt fel Linum (len) embriókat. Fenti kutatók objektum-vá-

lasztása már szerencsésebb volt, mint elődeiké. Ők jöttek rá először, hogy szövet-, szervkultúrák létesítése csak akkor lehetséges, ha a tenyésztésbe vont sejtek, szövetek képesek még normális proliferációra, azaz osztódásra. A sikeres tenyésztés egyik feltétele tehát, hogy merisztémák legyenek a sejtek.

### 3. A szerv- és szövettenyésztés általános törvényszerűségeinek a felismerése

A tudományterület újabb, *harmadik szakasza* a harmincas évek elején kezdődött GAUTHERET francia és WHITE amerikai kutatók működésével, akik mindketten a gyökércsúcs tenyészetek korlátlan idejű növekedését kívánták elérni. GAUTHERET (1939) a különböző fajú növények gyökércsúcsai folyamatosan tenyésztésénél azt tapasztalta, hogy bármilyen táptalajon is tartotta a gyökérdarabkákat, azok kezdeti élénk növekedése csak rövid ideig tartott. WHITE (1943) kezdetben a *Triticum* (búza) csíranövény gyökércsúcsait használta teszt-anyagnak. A különböző tápközegeken belül a szerves és szervetlen komponensek arányát, a fény és hőfok hatását, a levegőztetést, a kezdő inokulum nagyságát, valamint a pH változásait is figyelembe vette a gyökérdarabkák tenyésztésénél. Azonban a legjobbnak mutatózó feltételek mellett sem nőttek 14 napnál tovább az izolált gyökércsúcsok, jóllehet ezalatt nemegyszer tetemes nagyságot értek. Különösen a szubkulturálás lassította, sőt legtöbb esetben teljesen megszüntette kísérleteiben is a növekedést.



1. ábra. A White-féle *Lycopersicon esculentum* (paradicsom) gyökértenyészete. Balra: Az inokulum, 15 mm-es csúcsdarab. Középpütt: a 27 éve folyamatosan tenyésztett „vonal”-ból lemetezett 15 mm-es inokulum 10 napos inkubáció után (1960). Jobbra: A tenyésztés kezdetén (1934) a 15 mm-es inokulum egy éves inkubáció után (23 passage). (WHITE 1943 után).

Később WHITE szénforrásként dextróz helyett szaharózt kezdett használni és ezen már sikeresen, a növekedés mértékének, ütemének a csökkenése nélkül folyamatosan tenyésztette a *Lycopersicon esculentum* (paradicsom) kimetszett gyökércsúcsát. A tenyészetek a szubkulturálás után is jól növekedtek, a keletkező oldalgyökerekből pedig klónokat is sikerült létrehozni, amelyeket 7–14 naponként tovább szubkulturált. WHITE halálakor (1968) ez a gyökércsúcs már 1726 szubkulturáláson ment át, bizonyítva a gyökércsúcs tenyésztés időbeli korlátlanágát, átlagosan napi 5 mm-es növekedési rátával. Ugyanabban az időben WHITE a szoros értelemben vett szövettenyésztés területén is sikereket ért el. A *Nicotiana glauca* és *N. langsdorffii* keresztezéséből származó hibrid növény szárának prokambiális szövetéből olyan kallusz kultúrát állított elő, amelynek sejtjei nem differenciálódtak és a folyamatos tenyésztés feltételeinek is megfelelt (1. ábra). Közben (1934–39) GAUTHERET kutatásait is siker koronázta. A *Salix caprea* (kecskefűz) és a *Populus nigra* (fekete nyár) hajtásának kambiumából Knop-oldatot, dextrózt és ciszteint tartalmazó táptalajon több hónapon át növekvő tenyészetet létesített. Ezek a tenyészetek tiamin és IES hatására azután igen jelentős gyarapodást mutattak. GAUTHERET igazi sikerét a sárgarépából kimetszett szövet tenyésztésével érte el. Ez a tenyészet olyan világhírnévre tett szert, mint a WHITE-féle paradicsomgyökér kultúra, mivel azóta is folyamatos kultúrában van, belőle számtalan klónt állítottak elő és elterjedt az egész világon. Ez a tenyészet az ún. Nobécourt-féle szervetlen sókeverékből, dextrózból, tiaminból, ciszteinből és IES-ből álló tápközegen igen jól növekedett, nem differenciálódott és alkalmas lett bármilyen hosszú idejű, ill. sokszorosán ismételt szubkulturálásra is (2. ábra).

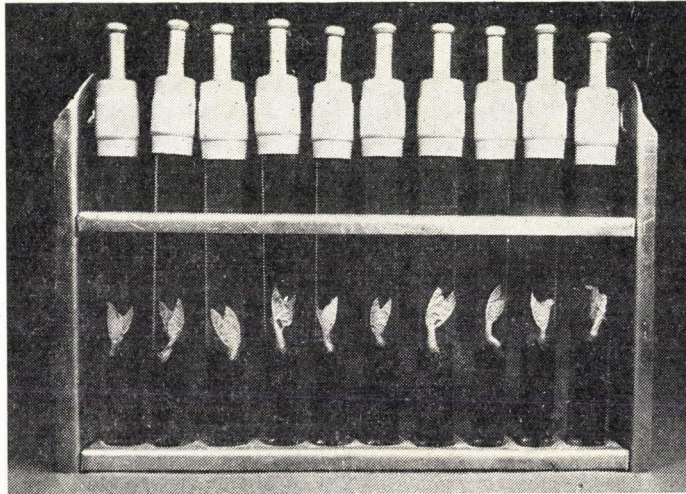
Ez utóbbi kísérletek olyan szerv- és szövetkultúrák megvalósítását jelentették, amelyek a tudományág történetének kétségkívül a legjelentősebb eredményei lettek. Nevezettek pedig a mai értelemben vett szövet- és szervtenyésztő iskolák elindítóivá váltak. Munkájuk alapján ismertté vált, hogy eredményes tenyésztéshez az ásványi sókon, szén- és nitrogénforrásokon kívül általában aminosavak (cisztein, glicin), vitamin (tiamin) és auxin (IES) is szükséges. Ezzel lényegében a ma is használatos tápközégek legfőbb összetevőit adták meg.

Időrendben ismét az embriótenyésztés eredményei következnek a steril kultúrák történetében. Az embriótenyésztés az oltási és megtermékenyítési inkompatibilitás (összeférhetetlenség) legyőzése, illetve új hibridek előállításának lehetősége viszonylag már korán ösztönözte a kutatókat. A LAIBACH által használt új technikai eljárást széles körben alkalmazták az embriókultúráknál faj és nemzetség hibridek előállítására és az embrió nyugalmi periódusának megszüntetésére.

A szervkultúrák közül a hajtás tenyészeteket aránylag később sikerült csak megvalósítani. Loo (1945–1946) tenyésztett először *Asparagus* (spárga)



2. ábra. A Gautheret-féle *Daucus carota* (sárgarépa) szövettanyészet. (GAUTHERET 1959 után.)



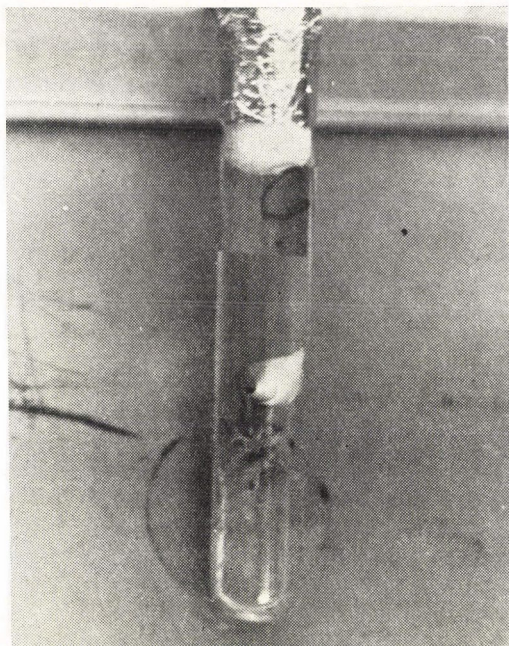
3. ábra. *Phaseolus vulgaris* (bab) csíranövényből izolált hajtás tenyészet 21 napon inkubáció után agaros tápközegen. (Eredeti.)

és *Cuscuta* (aranka) hajtáscsúcsot, amely a tenyésztés mai fogalmának is megfelelt. Később BALL (1946) *Tropaeolum* (sarkantyúka), *Lupinus* (csillagfűrt), majd WETMORE (1954) *Adiantum* (vénuzhaj), *Selaginella* (csipkeharaszt), *Lycopodium* (korpafű), *Equisetum* (zsurló), *Syringa* (orgona), *Parthenocissus* (vadszőlő) hajtás tenyészetekről számolt be. Ezek az eredmények az eddig sikertelen hajtástenyészetekkel szemben bebizonyították, hogy a hajtás is tenyészthető. Szükséges feltételeknek pedig a tápközegbe adagolt szervesetlen ionokon és szaharózon kívül a kókusztej, a gibberellinsav és főként a fény bizonyult (3. ábra).

Az izolált növényi részek tenyésztésének története során a növény főbb részeinek, a gyökérnek és hajtásnak a tenyésztésével szinte egyidőben egyes speciális részek tenyésztésére is történtek kísérletek. Így izolált leveleket, levélprimordiumokat, továbbá virágokat, virágrészeket is sikerrel tenyésztettek. Levélkezdeményekkel igen sokat ígérőnek mutatkoztak a kísérletek, mivel a kisméretű levelek majdnem a normális méretéig megnőttek és még sokáig életben maradtak „teljes” nagyságuk elérése után is.

A virág és virágrészek (portok, pollen, ovula, ovárium), valamint a termés (gyümölcs) aszeptikus tenyésztésének elveit és technikai módszereit GREGORY (1940), TAYLOR (1950), SPARROW, POND és KOJAN (1955), VASIL (1957, 1959), MAHESHWARI és LAL (1958), illetve NITSCH (1951) dolgozták ki. Különösen a portokok és pollen tenyésztésében jutottak jelentős eredményre, amelyek ma a pollenből kiinduló járulékos embriótenyésztés alapjául szolgálnak. A kísérleti objektumok kezdettől fogva a legkülönbözőbb növénycsoportok közül kerültek ki, így eredményesen tenyésztették a *Trillium* (háromszirm), *Allium* (vöröshagyma), *Cucumis* (uborka), *Aquilegia* (harangláb), *Iberis* (tatárvirág), *Althaea* (mályvarózsa), *Ranunculus* (boglárka), *Anethum* (kapor), *Nicotiana* (dohány) virágrészeit, illetve a *Lycopersicon* (paradicsom) termését steril kultúrákban (4. ábra).

A növényi részek steril tenyésztése történetének harmadik szakaszát az 50-es évekkel lehetne lezárni. Erre az időre igen sok növény embrióit, különböző szerveit, szöveteit sikerült steril kultúrákban tenyészteni. A szorosan vett szövettenyésztésben már speciális területek is elkülönültek, így WHITE (1939) a genetikai tumoros szövetek kulturálását, GAUTHERET (1939) és NOBÉCOURT (1939) a normális kalluszok vizsgálatát, WHITE (1943) a bakteriális eredetű tumorok (crown gall), BLACK (1947) és MOREL (1948) a vírus okozta tumorok tanulmányozását kezdte meg. SKOOG (1944) és CAMUS (1949) pedig az első lépéseket tették meg a kallusz szövetek morfogenetikai vizsgálata terén. Erre az időre a tápközegek összetevőinek és hatásuknak első vizsgálata és a fizikai faktorok (hő, fény) ellenőrzése is megtörtént, valamint az általános technikák és eljárások is kialakultak. Mind több laboratórium kezd izolált növényi részek tenyésztésével kapcsolatos vizsgálatokba, mivel egyes élettani és genetikai problémák megoldásában csak ez az út látszik eredményesnek.



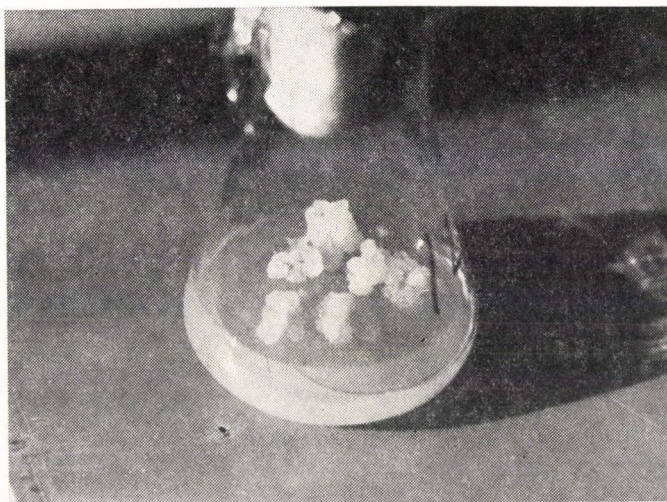
4. ábra. Dianthus (szegfű) hajtás-tenyészcsoecsúsból organizáltatott virág agaros tápközegen. (Eredeti.)

#### 4. Speciális tenyészetek kialakulása

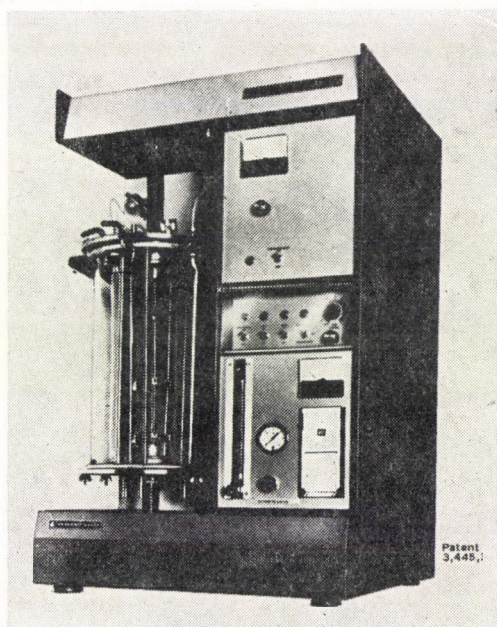
Az izolált steril tenyésztés következő, *negyedik szakaszát* az 50-es évek közepétől lehet számítani. Ennek a periódusnak legjellemzőbb vonása az irányított szerveződés kívánalma, valamint a sejtek totipotenciájának a teljes bizonyítása. A kísérleti munkák ebben az időben már a kallusz tenyészetek igen széles spektrumát mutatják. A legkülönbözőbb rendszertani egységekbe tartozó növények szöveteit, fás- és lágyszárúakét, két- és egyszikűekét (Dicotyledonopsida, Monocotyledonopsida), zárva- és nyitvatermőkét (Angiospermatophyta, Gymnospermatophyta), sőt néhány haraszt (Pteridophyta) szövetét is sikerült már tenyészteni. GAUTHERET 1959-ben már több mint száz fajból készült kallusz kultúrát tartott nyilván. Azóta ez a szám többszörösére emelkedett. A növényi teszt-objektumok gyarapodásával együttjárt a módszerek fejlődése is, amely végül is lehetővé tette az egyes sejtek tenyésztését is.

A sejttenyésztés felé az átmenetet a kallusz kultúrákból létesített szuszpenziós tenyészetek jelentették (5. ábra). Ebben folyékony tápközegen együtt növekedtek a szövetdarabok, sejtaggregátumok és kis mennyiségben magányos sejtek is. A szuszpenziós technikában STEWARD, MAPES és SMITH (1958) speciális tenyésztőrendszerrel konstruált, TULECKE és NICKELL (1959, 1960),



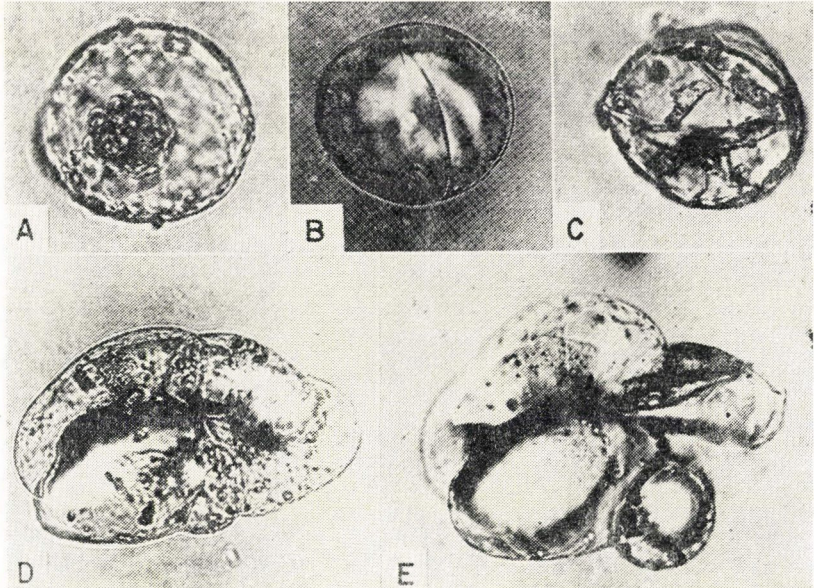


5. ábra. Sejtszuszpenziós kultúrák készítésére alkalmas Dianthus (szegfű) levél kallusz tenyésztet. (Eredeti.)



6. ábra. Automata szövetfermentor sejtszuszpenziós tenyésztésekhez.

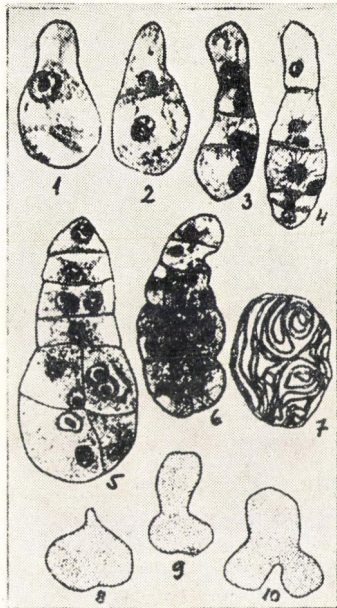
BYRNE és KOCH (1962) pedig már nagyméretű tenyésztésre is alkalmas berendezést szerkesztett. MELCHERS és BERGMAN (1959) aztán az üzemszerű tenyésztésre is alkalmas folyamatos tenyésztő-apparátus modelljét is kidolgozták. Ma pedig már ismeretesek a fermentor rendszerű automata sejt- és szövettenyésztő berendezések (6. ábra) és kemosztátok, turbidosztátok is.



7. ábra. Izolált egyesjtes tenyészet borsó gyökérből. A tenyészetet csak 16 sejtes (A—E állapotig sikerült fenntartani még 1957-ben. (TORREY 1957 után.)

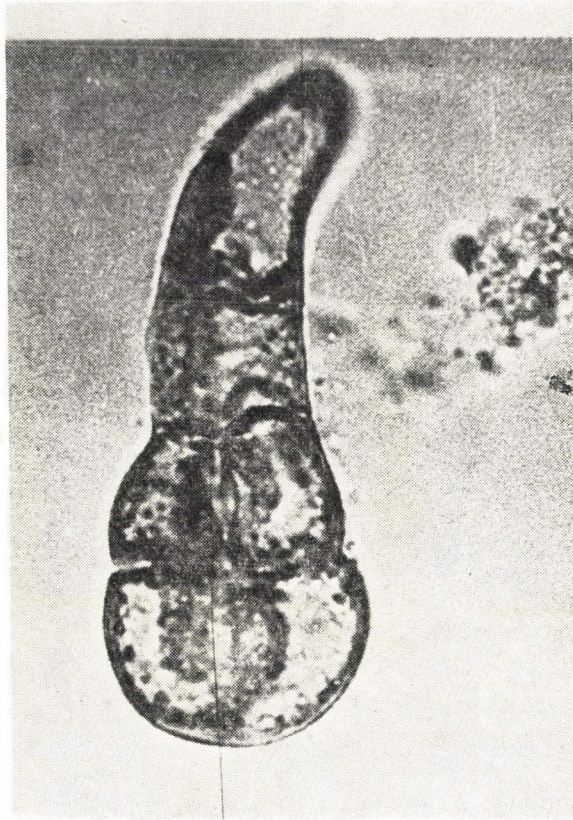
A szorosan vett izolált sejttenyésztést MUIR, HILDEBRANDT és RIKER (1954, 1958) kezdeményezték, akik *Nicotiana* (dohány) és *Tagetes* (bársonyvirág) gyökérnyakgolyva kallusz szövetéből egyes sejteket különítettek el, amelyek *in vitro* hosszabb ideig életben maradtak. Később az egyes sejtek osztódását is — amit eddig hiába próbáltak meg — sikerült kiváltani és megfigyelni a *Picea glauca* (fenyő) és *Pisum* (borsó) gyökér kallusz sejtjein (REINERT 1956, TORREY 1957). Az izolált sejttenyésztést mind szilárd (TORREY 1959), mind folyékony tápközegen (DE ROPP 1955), speciális tenyésztőkamrákban (TORREY 1957), cseppkultúrákban (JONES, HILDEBRANDT és WU 1960), üvegfelületeken (BALL 1963), tápközeg felületén való szétterítéssel (BERGMANN 1959) oldották meg. Később pedig sejtaggregátumok, illetve kolóniák és izolált egyes sejtek közös tápközegen való együttes tenyésztésével értek el sikereket az *Acer pseudoplatanus* (hegyi juhar) izolált sejtjeinek a tenyésztésében (STREET 1966, 1969) (7. ábra).

A szövet- és sejttenyésztés eredményei között néhány speciális irány különösen figyelemreméltó ebben az időszakban. Egyik az a felismerés, hogy a diploid kromoszóma szerelvényvel rendelkező vegetatív sejt a fejlettebb növénycsoportoknál is teljes növény regenerációjára képes. A különböző módszertani eljárásokkal nevelt szövetkultúráknál figyelte meg először STEWARD, MAPES és MEARS (1958), majd később REINERT (1959), HALPERIN és WETHE-



8 ábra. A diploid sejtől keletkező embrioid fejlődésének sémája (1—10: egy sejtől a torpedó stádiumig).

RELL (1964), VASIL és HILDEBRANDT (1965) és mások is igazolták, hogy nemcsak szerv organizáció indulhat meg a kallusz szövetekből, hanem egy-egy sejt járulékos embrióvá alakulhat át és szomatikus embriogenezisen keresztül belőlük virágos növények fejlődhetnek. Ezt a folyamatot később az izolált egyes sejteken is megfigyelték, ahol a járulékos embriogenezis során a gömb-, szív-, és torpedófázis éppen úgy megjelenhet, mint a normális embriogenezisben. Az utóbbi években azután számos növény különböző szerveiből (sárgarépagyökér, vadmurokgyökér, dohány szár, aprószulákgyökér, liliomrügypikkely, vöröshagyma stb.) származó kalluszok sejtjeiből regeneráltattak teljes növényt (8., 9. ábra). Később portokok steril tenyésztése során is tapasztalták, hogy a kultúrákból némelykor növények fejlődnek. GUHA és MAHESHWARI (1964, 1966), majd KONAR és NATARAJA (1965/a, 1965/b), NAKATA és TANAKA (1968) nevelt először portokból, pontosabban pollenből differenciálódó kalluszt és ebből embrioidokat, illetve növénykéket. Kísérleti növényük a *Datura* (maszlag), *Ranunculus* (boglárka), *Nicotiana* (dohány) volt. A pollen szemekkel is hasonló eredményre jutottak újabban NITSCH és NITSCH (1969), SUNDERLAND és WICHS (1969) a különböző dohányoknál, megerősítve TULECKE (1957), GUHA és MAHESHWARI (1966) és mások régebbi eredményeit. A haploid szövetekből, illetve embrioidokból spontán endomitózis útján, vagy kémiai (kolhicin) vagy fizikai (sugárzás) kezelés hatására, illetve különböző



9. ábra. Hatsejtes embriókezdemény sárgarépa sejtéből (HESZKY 1973 után.) (Nagyítás: 40 obj. és 6× proj.).

auxinok és citokininek kombinációival haploid, diploid és más ploid fokú növényeket is sikerült felnevelni, amelyek fertilis virágokat hoztak. Ezek az eredmények egyúttal a növényi diploid, de a haploid sejtek totipotenciáját is igazolják.

Ugyancsak az izolált részek történetének újabb eredményei közé kell sorolni a kallusz szövetek, illetve a belőlük regeneráltatott merisztémák és szervek felhasználását vegetatív szaporításra (meriklóozás) és vírusmentes vagy vírusszegény, továbbá patogén szervezetektől mentes növény-klónok előállítására. Mindkét technikának MOREL (1965) volt a kezdeményezője és azóta már elterjedten alkalmazzák a meriklóozást a kertészeti gyakorlatban, elsősorban az orchideáknál és a lágyszárú dísnövényeknél. Még egy érdekes felhasználási lehetőség felvetése is a szövettenyésztés történetéhez tartozik. BALL (1969) az oltási szövet-inkompatibilitás, illetve összeférhetőség eldönté-

sére az egymás mellett tenyésztett kallusz szövetek „egymásba” növésebből kívánt következtetni. Ez a kísérleti irány a vegetatív hibridizációban a homo- és heterogenerikus transzplantáció biokémiai hátterét segít majd eldönteni.

A növényi szövettenyésztés az utóbbi fél évtizedben olyan eredményeket ért el, hogy szinte új szakaszként lehetne számontartani. Az embrió tenyésztés módszereinek tökéletesítésén kívül kidolgozták az *in vitro* és *in vivo* megtermékenyített magkezdeményekből kiinduló intra- és interspecifikus hibridek előállításának és felnevelésének technikáját a *Datura*, *Cucurbita*, *Phaseolus*, *Hordeum*, *Oryza*, *Lilium*, *Lathyrus*, *Gossypium* fajoknál, illetve *Datura* x *Brugmensia*, *Hordeum* x *Secale*, *Elymus* x *Triticum*, *Tripsacum* x *Zea*, *Festuca* x *Lolium* fajhibrideknél (BAJAJ és BOPP 1971, HESZKY 1973, BEASLEY, TING, LINSKENS és BIRNBAUM 1974). A diploid és haploid sejtek spontán vagy indukált embrió- és organogenezise mechanizmusának felismerése, homozigóta diploid növények előállítási technikája pollenből és kallusz kultúrákból is erre az időre tehető (HESZKY 1975, STREET és WITHERS 1974, SUNDERLAND 1973, 1974). Lényeges előrehaladást értek el a szervtenyésztés, valamint sejt- és szövettenyésztés technikájában. Nagymértékben bővültek ismereteink a szövettenyésztetek hormonális regulációja és bioszintetikus potenciája területén. A sejt-szinkronizáció és növényi tumorkutatás, valamint a sejt és vírus interakciói vonalán is jelentős lépések történtek (KOVÁCS 1972, MEINS 1974, REINHARD 1974, SMITH 1974, YEOMAN 1974, ZAITLIN és BEACHY 1974). Ezen túl azonban olyan eredmények is születtek — különösen az utóbbi néhány évben —, amelyek egyrészt a bioreguláció speciális lehetőségeit a gyakorlati genetikai és nemesítési kutatások közelségébe hozták, másrészt pedig a laboratóriumi bioregulációs eredményeket a közvetlen termelési technológiával tudták összekapcsolni.

A genetikai kutatások előtt nagy távlatokat nyitó bioregulációs eredmény az a felismerés, hogy a növényi sejtekből ún. protoplasztok, fal nélküli csupasz protoplazma egységek alakíthatók. Ezek megfelelő körülmények között fuzionáltathatók és belőlük homoiokarionok és heterokarionok képződhetnek, amelyekből valódi intakt hibrid növények nevelhetők fel. Ez lehetővé teszi intra-, interspecifikus és esetleg intergenerikus szomatikus hibridek kialakítását. Ezek a kísérletek a hetvenes évek elején indultak el (POWER, CUMMINS és COCKING 1970, KAO, KELLER és MILLER 1970, KELLER, HARVEY, GAMBORG, MILLER és EVELEIGH 1970, COCKING 1973). Az ismert *Nicotiana glauca* és *N. langsdorffii* paraszexuális hibriden kívül sikeres heterokarionokat hoztak létre a *Vaucheria alga* és *Daucus carota* (sárgarépa) kalluszsejt, vagy a *Rhizobium japonicum* (baktérium) és a borsólevél mezofillum sejte között (BAJAJ 1974, CARLSON 1973, CARLSON, SMITH és DEARING 1972, COCKING 1973, COCKING és EVANS 1974, ERIKSSON, BONNETT, GLIMELIUS és WALLIN 1974, ZAITLIN és BEACHY 1974).

Az izolált tenyésztett sejtek kutatásában igen jelentősek azok az újabb vizsgálatok, amelyek a sejtek biokémiai mutációinak kiváltását célozzák. Az ilyen kísérletek olyan mutáns sejtek és növények előállítását is lehetővé teszik, amelyek hasznosak lehetnek a növények minőségének megváltoztatásában, betegségekkel szemben rezisztencia szelektálásában, anyagszere pályák biokémiai ellenőrzésében stb. Ezen sokat ígérő területen még csak kevés olyan eredmény ismeretes, amely a mutáció fogalmának megfelel. Ilyennek tekinthető a haploid dohánysejtek és azokból felnevelt növények rezisztenciája a 5-bromdeoxiuridinnel, a sztreptomocinnel, a DL-5-metiltriptofánnal, P-fluorfenilalaninnal szemben (MALIGA, MÁRTON és BREZNOVITS 1973, MALIGA, BREZNOVITS és MÁRTON 1973, WIDHOLM 1974).

A mutációhoz hasonlóan genetikai jelentősége van a sejtek transzformációjának, amely a növény gén-készletének bővítésével vagy megváltoztatásával nyit nagy távlatokat a kutatás előtt. A genetikai információ átadása, illetve bővítése a DNS sejtbe való transzplantálása útján valósulhat meg, amelyhez tenyésztett sejtek (és protoplasztok) a legalkalmasabbak. Itt is csak kezdeti eredmények vannak még, így pl. egyes fágok sejtbe juttatásával elérték, hogy a *Lycopersicon esculentum* kallusz szövete az egyedüli szénforrásként alkalmazott laktózon vagy galaktózon is növekedett, amelyek normális körülmények között nem voltak kielégítő szénforrások. Az idevonatkozó kísérletek fontos problémái ma még a donorforrások, a recipiens anyagok kiválasztása és főként a hatást specifikusan kimutató jelzőrendszerek megtalálása is (BAJAJ 1974, HOLL, GAMBORG, OHYMA és PELCHER 1974, REINHARD 1974).

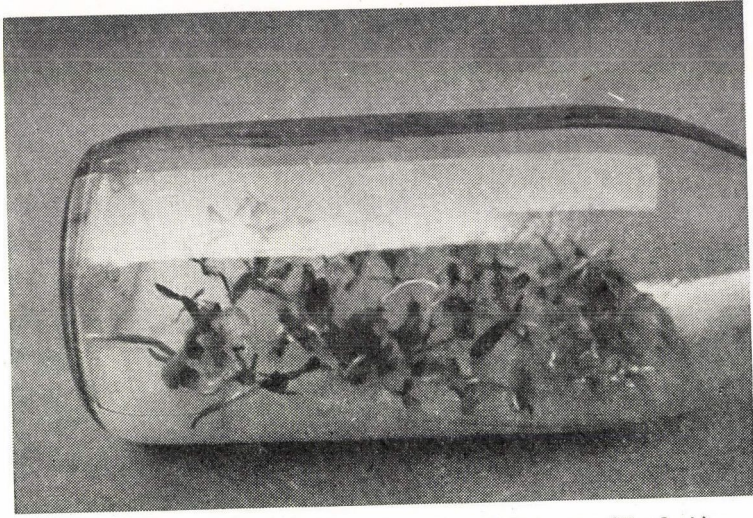
Az utóbbi fél évtized a növényi szövetfejlődés hormonális regulációjában elért eredményekből olyan vegetatív és patogén-mentes elit szaporító eljárás technológiáját tudta kifejleszteni, amely egyrészt a nagyüzemi kertészeti szaporítás, másrészt vírus- és mikroorganizmusoktól mentes tenyésztés egyik legtöbbet ígérő útja. Üzemszerű meriklónozással eddig mintegy 57 család 150 fajtát, köztük több mint 20 orchidea fajt szaporítottak. Vírus- és baktériummentes meriklónos szaporítással pedig kb. 25 növényfajnál értek el sikereket, elsősorban a légyszárú dísnövényeknél (szegfű, muskátli, dália). Sokat ígérőnek látszanak azok a kezdeményezések, amelyek a gyümölcsfák és cserjék (alma, cseresznye, málna stb.) vírusmentes vegetatív elszaporítását célozzák (BAJAJ és BOPP 1971, MARÓTI, VÁGUJFALVI és DOMOKOS 1972, MARÓTI, GERBÁR és NATTÁN 1973, MURASHIGE 1974) (10–13. ábra).



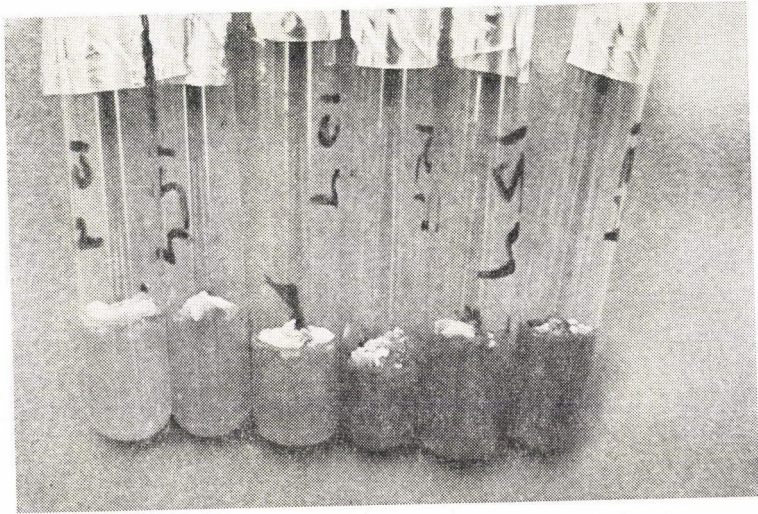
10. ábra. Tenyészőcsúcsból izolált szegfű meriklonok agaros tápközegen 6 hetes inkubáció után. (Eredeti.)



11. ábra. Tenyészőcsúcsból izolált szegfű meriklonok vírusmentes szaporító anyag előállítására. (Eredeti.)



12. ábra. Orchidea meriklonok agaros tápközegen. (Eredeti.)



13. ábra. Gyümölcsfák hajtás tenyészcúcsából létesített kallusz tenyészetek vírusmentes szaporító anyag előállítására. (Eredeti.)



### III. Sejttenyészetek

Az izolált tenyésztési technika a legtöbbet ígérő eredményeket a szorosan vett sejttenyésztéssel érte el az utóbbi időben, ezért nem lesz érdektelen ennek a speciális területnek az áttekintése. Módszertanilag a sejttenyésztéseket szuszpenziós és izolált kultúrákra szokták felosztani.

#### 1. Szuszpenziós kultúrák

A szuszpenziós kultúrákat általában már meglevő kalluszsövetből indítják el úgy, hogy ismert szövetmennyiséget szűrés, vagy centrifugálás után átvisznek folyékony tápközegre. A sejteknek és szövetdaraboknak kalluszból való leválasztását, valamint a megfelelő egysejtes szuszpenzió fenntartását nagyban elősegíti, ha a folyékony tápközegben nagy koncentrációjú auxin is van, vagy megfelelő egyensúlyt alakítunk ki az auxin és élesztőkivonat, az auxin és kókusztej vagy az auxin és kinetin között (STEWART 1970).

Az is ismert módja a szuszpenziós kultúrák létesítésének, hogy a steril szervekből kivágott darabokat sterilen homogenizálják, majd folyékony tápközegbe helyezik.

A szuszpenziós kultúrákat rendszerint 25 C°-on inkubálják sötétben, vagy kis intenzitású fénynél. A lombikos, kémcsöves kultúrák folyamatos forgatását a legegyszerűbben horizontális keverővel végzik, amely percenként 50—200 fordulatot végez, mialatt mindegyik edény 5—6 cm átmérőjű kört ír le. Kidolgoztak növényi sejtek szinkronozált és folyamatos tenyésztéséhez megfelelő automatizált és programozható tenyésztő berendezést, amely kemosztát- és turbidosztátként működik és nagy mennyiségű (4—20/l) szuszpenzió előállítására is alkalmas (SHORT, BROWN és STREET 1969, RAJASEKHAR, EDWARDS, WILSON és STREET 1971, STREET 1973a, STREET, KING és MASFIELD 1971, WILSON, KING és STREET 1971).

A szuszpenziós kultúrák átoltása, tehát a folyamatosság fenntartása fontos követelménye a tenyésztésnek. Úgy készítenek szubkultúrákat, hogy szabályos időközökben kis mennyiségű inokulumokat visznek át a régi szuszpenzióból egy másik friss tápközegre. Kívánatos ennek az átviendő sejt, vagy szövet mennyiségnek nagyságrendi szétválasztása is gyakran. Ezt ismert pórusnagyságú nylon-szövettel vagy esetleg gézen való átszűréssel, de megfelelő átmérőjű pipettával, injekciós fecskendővel is el lehet végezni. Az átvitt inokulumnak minden esetben elegendő sejt-sűrűséget, sejtszámot kell tartalmaznia, hogy növekedése folytatódjon. Jelenlegi ismereteink mellett azonban nem tudjuk pontosan meghatározni az optimális sejtsűrűséget. A Street-iskola pl. *Acer pseudoplatanus* (hegyi juhar) sejtek folyamatos szuszpenziós kultúráinál  $18 \cdot 10^3$  sejt/ml inokulummal indul el. A kritikus szintnél több sejtre, nagyobb sűrűségi értékekre van szükség ahhoz, hogy lerövidítsük vagy ki-

küszöböljük a nyugalmi fázist. A kisméretű inokulumnak a kezdeti növekedésre gyakorolt lassító hatása csak akkor nem jelentkezik, ha elégséges mennyiségű ún. „kondicionált”, sejttenyésztésre már használt tápközeget viszünk át a sejtanyaggal együtt.

A sejtuszuspenziók növekedésének, fejlődésének mérésére a friss súlygyarapodását használták, az ún. növekedési értéket vagy relatív növekedést, amely a végső és kiinduló friss súly hányadosa (NICKELL és TULECKE 1960). REINERT és MERKEL (1962) pedig a tenyészetek mitózis-indexét vette a növekedés mértékének. A növényi sejt kultúrák növekedési rátáját azonban sem a súlygyarapodási változások, sem a mitózis-index nem fejezik ki pontosan. Ezért más anyagcsere mutatók analizését, így a légzés intenzitás mérését, a nukleinsavak és proteinek változásának ellenőrzését, különböző enzimaktivitások mérését is elvégzik ma már a növekedés rátájának a megállapításához.

Kultúrában a diploid szerelvényű sejtekből gyakran tetra-, sőt még oktoploid sejt populáció is kialakulhat. Számos olyan megfigyelés is ismeretes, hogy a kulturálás közben a sejtmagok térfogatának gyarapodása és ezzel kapcsolatban a mag DNS tartalmának növekedése is előfordult már akár a ploidiás változásával, akár anélkül (LIST 1963).

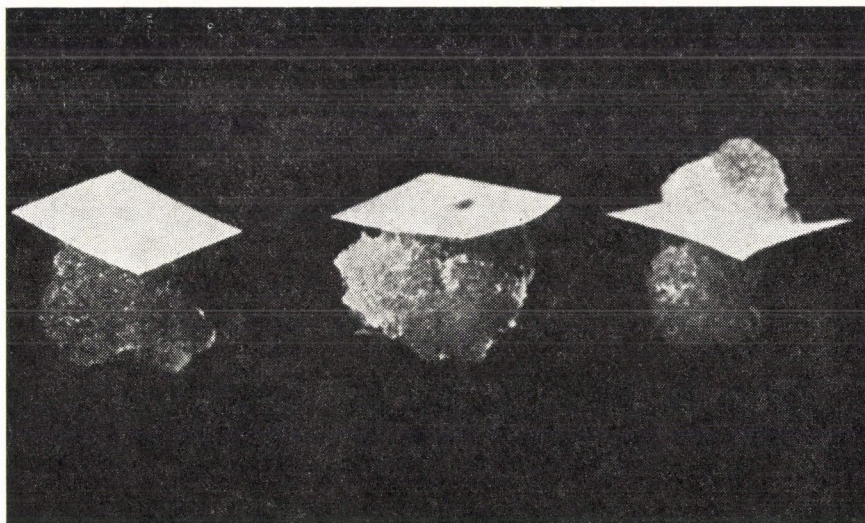
A szuszpenziós sejttenyészetek anyagcseréjének vizsgálatában a már említett kemo- és turbidosztátos technika mellett az utóbbi években megvalósított szinkron tenyésztési eljárás jelentett előrelépést. Bebizonyosodott, hogy a fejlettebb növényi szervezetek izolált sejtjeinek osztódása is halmozható fizikai faktorokkal. A növényi sejtek osztódási ütemének szabályozásánál nincs szelekción, csak indukciós szinkronizmus. Természetesen előforduló szinkronizmus a növényi sejteknél ritka, ilyen pl. a mikrospóra keletkezésének a mechanizmusa. Leggyakoribb indukciós tényezők a regulátorok, tápközegek és a fény. Az *Acer pseudoplatanus* (hegyi juhar) szuszpenziós sejtjei új tápközegre víve, 5–6 egymás utáni szinkronosztódást mutattak. A *Helianthus tuberosus* (csicsóka) izolált raktározó gumó szövete sejtjeinek 35%-a egyszerre osztódott 2,4-D hatására. Különböző fajok szuszpenziós sejtjeinél, amelyeket fényről sötétbe helyeztek, 60%-os osztódási szinkronizmust értek el és a mitózis index 45%-ot is elért. A sejt populáció ilyen jellegű és méretű „homogenizálása” már alkalmas a sejtosztódási mechanizmusok, a sejtciklusban keletkező makromolekulák (DNS, RNS, protein) szintézisének tanulmányozására. Ennek során megállapították, hogy az enzimek a sejt ciklus különböző szakaszában, főként a protein szintézissel egyidőben keletkeznek. A sejtosztódás egy szelektív gén-aktiválás folyamatán keresztül zajlik le. A genom egymás utáni sorozatos aktiválódása egy időzített jel reakciójaként következik be a sejten belül (KING és STREET 1973, STREET 1973a, STREET 1973b, YEOMAN 1973, YEOMAN 1974, YEOMAN és STREET 1973). Megállapították azt is, hogy az in vitro sejttenyészetekben a DNS szintézist fokozott RNS és protein szintézis előzi meg a sejt ciklus S-szakaszában. A RNS-ből

felszabaduló nukleotidák mind a DNS-be, mind a RNS-be ismételtelen beépülhetnek. A DNS kettőzés a szuszpenziós kultúrák inkubációjának 4–6. napja között történik általában. A mitózis minden szakaszát gének, vagy hormonok szabályozzák. Ez utóbbiak közül az auxinok elsősorban a DNS és DNS-polimeráz szintézisét serkentik. A 2,4-D a DNS kettőzést normális mitózisban gátolja, de endomitózisban serkenti. Ezen ellentétes hatás mechanizmusa még további kutatást igényel. A citokininek, elsősorban a kinetin mitózis aktivátor, de a DNS duplikációját nem serkenti. A gibberellinsav ( $GS_3$ ) hatása részben ellentétes a 2,4-D-ével, mivel a DNS szintézist serkenti a mitózis ciklusban. A DNS tartalom és az *in vitro*, szövettanyészetből kiinduló virágzás között párhuzamos korreláció ismerhető fel. A DNS replikációját még a szénhidrátok és befolyásolják (MARETZKI, THOM és NICKELL 1974, NAGL 1974, SZWEYKOWSKA 1974).

## 2. Izolált sejtek tenyésztése

A sejt-szuszenziós kísérletek felkeltették az érdeklődést az egyes, magános sejtek tenyésztése iránt is. A fejlettebb növények szöveteiből azonban technikailag csak igen nehezen sikerült különálló (szoliter) sejteket izolálni. Ezek táplálkozási igényei is ismeretlenek voltak, és az egyes sejtek fejlődése útjának megfigyelése, ellenőrzése is nehézséget jelentett.

A magasabbrendű növények egyes sejtjeinek tenyésztését mintegy húsz éve sikerült először megvalósítani. Izolált magános sejteket különítettek el a *Nicotiana* (dohány) és *Tagetes* (bársonyvirág) fajok gyökérnyakgolyva laza, törékeny kallusz szöveteiből, s ezeket egyenként  $8 \times 8$  mm-es, olyan szűrőpapír-négyzetek felső felületére helyezték, amelyeknek alsó felülete jól érintkezik ugyanennek a szövet törzsnek aktív növekedésben levő „dajka” kalluszával (MUIR, HILDENRANDT és RIKER 1954). A sejtek nagy része csak néhányszor osztódott, kisebb része azonban tovább osztódott és kis kallusz tömegeket hozott létre a szűrőpapír felszínén (14. ábra). TORREY (1957) kimutatta, hogy úgy is kialakíthatunk egyetlen sejtől tenyészetet, hogy a szűrőpapírt kis pórusú ( $0,5-0,75 \mu$  lyukméretű) hártával helyettesítjük. Ezekkel a megoldásokkal csak igen csekély számú sejtet lehetett tenyészteni. Ezenkívül nehezen lehetett mikroszkopikus úton egyszerre megfigyelni az „anya” sejtet és azokat az osztódásokat, amelyek a kallusz szövet kiindulásához vezetnek. JONES, HILDEBRANDT, RIKER és WU (1960) egy dohányhibrid (*Nicotiana tabacum*  $\times$  *N. glutinosa*) elkülönített kallusz sejtjeinek gyarapodását vizsgálták semleges ásványi olajjal lezárt mikrokamrában folyékony tápközegen. Csak akkor következett be sejtosztódás, ha a cseppben nagyszámú sejt (kb. 30) volt, vagy ha a tápközeg „kondicionált” volt. BALL (1963) a *Sequoia sempervirens* szuszpenziós kultúráiból származó magányos sejteket üvegfelületre rögzítette. Így lehetővé vált az ilyen feltapadt sejtek növeke-

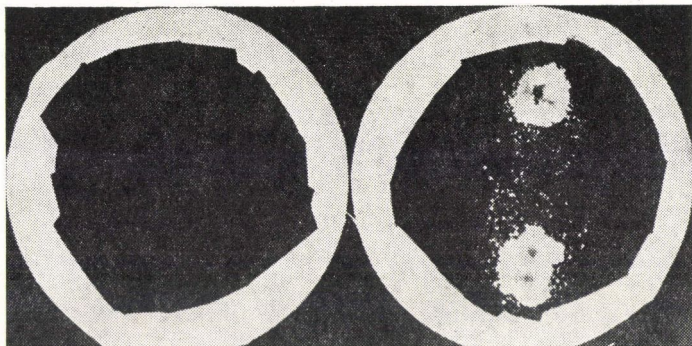


14. ábra. Izolált sejtenyésztési módszer: a dajka-technika. A kallusz szövetre helyezett sejt az áteresztő hártján sejtkolóniává nő. (STREET és ÖPIK 1970 után.)

désének és osztódásának a megfigyelése olyan kamrákban, amelyekben folyékony tápközeget cirkuláltattak át. Ez a mikrokamrás technika alkalmas izolált sejtek mikroszkópos megfigyelésére, de ezzel a módszerrel sem könnyű terjedelmes sejtpopulációk tanulmányozása, s nem lehet kielégítő eredménnyel egyetlen sejtől eredő klónokat kialakítani (DE ROPP 1955).

A sejtenyésztés megközelítésének újabb módját, a szétszélesztést BERGMANN (1959, 1960) fejlesztette ki agarral (0,6%) szilárdított tápközegen. A *Nicotiana tabacum* (var. Samsun) (dohány) és a *Phaseolus vulgaris* (var. Early Golden Cluster, bab) szuszpenziós kultúráiból kiindulva olyan filtrátumot készített, amelynek 90%-a szabad sejtekből állott és ezt terítette el azután a lágy agar felszínén. Itt a sejtek 20%-a ismételtén osztódott, ezek kis kolóniákká alakultak, amelyeket ismét eredményesen lehetett átvinni agar tápközeget tartalmazó csövekbe. Később a *Convolvulus arvensis* (apró szulák) és *Haplopappus gracilis* szuszpenziós kultúrájából is sikerült sejttenyészetet, illetve egy sejtől kolóniát kialakítani (TORREY és REINERT 1961, BLAKELY és STEWARD 1961). A STREET-laboratórium és mások szuszpenziós kultúrából aszeptikus szűrőssel és centrifugálással állítottak elő sejttenyészethez inokulumot. A Petri-csészében vékonyan elterített tápközegen a sejtek 25 C°-on sötétben vagy szórt fényben inkubálódtak. Közben fotomikrográfiásan ellenőrizték a sejtek osztódását, illetve a sejtkolóniák kialakulását.

Az elterítéses technika sokat ígérőnek látszik a sejtosztódást szabályozó tényezők felmérésében. A kísérleti eredmények azt mutatják, hogy az



15. ábra. Az agaros tápközegen szélesztett *Acer pseudoplatanus* sejtek 28 napos inkubációban csak akkor osztódnak, ha ugyanazon faj nagyobb méretű sejtaggregátumai közelében helyezkednek el. (STREET és ÖPIK 1970 után.)

osztódó és látható sejtkolóniákat fejlesztő sejtek százalékos aránya csökken, sőt teljesen el is tűnik, ha az elterített sejtek sűrűségét fokozatosan bizonyos kritikus szint alá csökkentjük. Ha a sejt egységeket elterítés előtt friss tápközeggel mossuk át és így nem viszünk át „kondicionált” tápközegget, az osztódások előfordulása és a kolóniák kialakulása szintén csökken. Ha nagyméretű sejt kolóniákat (aggregátumokat) viszünk a lemezekre, ezek előmozdítják a szomszédos szabad sejtek és kis sejtesoportok osztódását is (15. ábra). Azt is észrevették, hogy a kallusz szövetből eredő szuszpenzió annál több kolóniát fejleszt, minél kevesebb szubkulturáláson esett át (KING és STREET 1973, STREET 1973a, 1973b, STREET és HENSHAW 1966).

### 3. Tenyésztett sejtek szerkezete, osztódása, differenciálódása

Mind a szuszpenziós, mind a magányos sejtek növekedését, fejlődését és differenciációját (morfogenezisét) a sejtek szerkezete, osztódási mechanizmusa is szabályozza. Mindkét kultúrában a sejtek alakja, nagysága igen különböző. NICKELL (1956) a *Phaseolus vulgaris* (bab) szuszpenziós kultúráiban főleg gömb alakú, 12–40  $\mu$  átmérőjű sejteket talált, de palack formájú (95  $\times$  45  $\mu$ ) sejtek is előfordultak. Normális és hibrid dohányból származó szuszpenziókban 300  $\times$  2500  $\mu$  nagyságú sejteket is mértek. Ugyanezek a tenyészetek kevés spirális vastagodású, elfásodott falú tracheidákat is tartalmaztak.

A sejtek alakja egyrészt a sejtek eredetének, másrészt az osztódás mechanizmusának is függvénye a faji különbségeken és a korrelációs viszonyokon kívül. STEWARD, MAPES és SMITH (1958) szerint a gömb alakú szabad sejtek tipikusan az equatoriális sík mentén osztódnak és így néhány sejtből

álló egységeket adnak (16. ábra). Láttak továbbá olyan megnagyobbodott és többé-kevésbé izodiametrikus sejtet is, rendszerint aggregátumok felszíni sejtjei között, amelyből fonalas kinövések fejlődnek ki. Sárgarépa és más fajok felületi szuszpenziós kultúráiban találtak olyan gömb alakú sejtet, amelyekből papillák nőttek ki, és amelyekbe azután az „anya-sejtből” származó citoplazma és mag helyezkedett el. Az ilyen papillák azután megnagyobbodhatnak és alapjuknál elválhatnak úgy, hogy új sejtek keletkeznek olyan folyamat útján, ami emlékeztet az élesztő sejtek „bimbózására” (17. ábra).

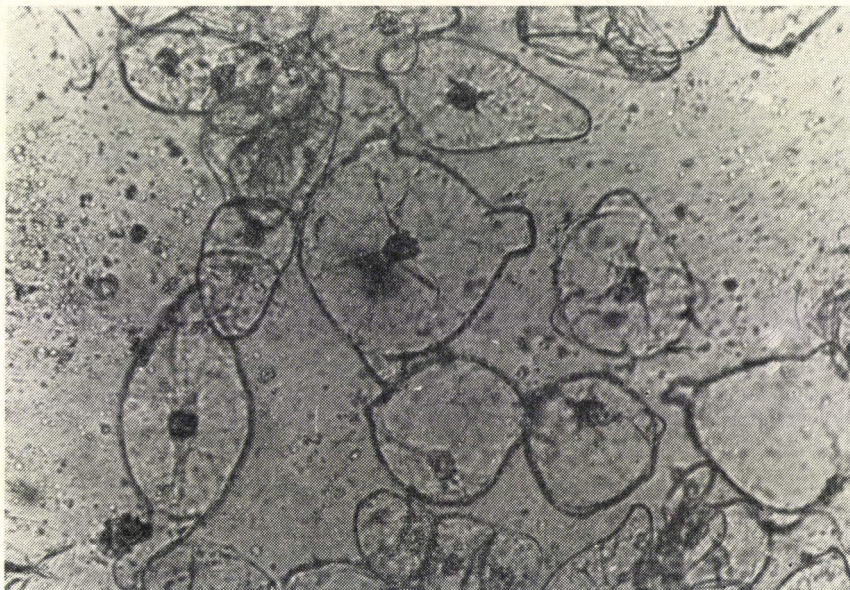
A kísérletekből megállapítható, hogy a sejtek felületi és szuszpenziós kultúrákban a növekedés és alak igen széles variációit mutatják, amelyek megjelenésük és viselkedésük tekintetében nem mindig azonosíthatók a normális szövetekben vagy merisztémákban megismert sejt típusokkal. Azt is megfigyelték, hogy az óriás sejtekben a mitokondriumok végeikkel kapcsolódhatnak egymáshoz és így 2–12 egységből álló, fonalszerű képződményt alkotnak, amelyek a citoplazma külső határhártyáján helyezkednek el. Ezek bizonyos mozgásjelenségei előregedésüket és közeli elhalásukat is jelzik (SOROKIN 1965). A szuszpenziós kultúrák szabad sejtjeinek általában egy nagy központi vakuolájuk van és aktív citoplazma áramlást mutatnak, amely kiterjed a citoplazma vakuolákon túli széleire is, ahol a mag helyezkedhet el.

A tenyésztett sejtek fejlődésének feltételeit segítették tisztázni azok a vizsgálatok is, amelyek a sejtek nitrogén és szénhidrát anyagszerével, valamint a citokininnek pontosabb szerepével foglalkoztak (HAHLBROCK 1974, SZWEYKOWSKA 1974). Különösen figyelemreméltó az a megállapítás, hogy a növény különböző tájairól excizált sejtek tízszeresen eltérő növekedési reakciót is mutathatnak ugyanazon szénhidrát hatására, amelyet a tenyésztés során kialakult genetikai módosulással hoznak kapcsolatba. A sejtuszuszpenziók az inkubáció 4–6. napján igénylik a legtöbb energiaforrást, ekkor két vagy többszörösére is megnő a légzésintenzitás ( $O_2$ /sejt/perc). A sejt növekedés megszűnése után a szuszpenziós sejtek glukózban bővelkedő poliszacharidákat exudálnak a tápközegbe, de protein, lignin exudációt is megfigyeltek (MARETZKI, THOM és NICKELL 1974).

A citokininnek közül a kinetin sejt-reguláló szerepének tanulmányozása is fontos megállapításokra vezetett. Kimutatták, hogy a kinetin mind a mitózishoz, mind citokinezishez szükséges, elsősorban a folyamatok indukálásához. Hiányában a metafázis igen elhúzódik, amiből arra következtetnek, hogy talán a mitózis apparátushoz szükséges specifikus protein szintézisében van szerepe. Azt is tapasztalták, hogy kinetin nélkül a szuszpenziókban a mitózisok néhány nap múlva teljesen megszűnnek, ha a DNS szintézis nem is gátlődik. Ez arra mutat, hogy nem a DNS szintézisen keresztül hat az osztódásra. Jelentős hatást gyakorol a sejtek differenciálódására is, fokozza a



16. ábra. Egy sejtől alakult embrioid-szerű sejtaggregátum *Nicotiana tabacum* szuszpenziós kultúrájából. (Eredeti.)



17. ábra. Sejt-„bimbózásra” emlékeztető papillák a *Nicotiana tabacum* felületi kultúrában nőtt sejtjein. (Eredeti.)

lignin szintézist, a keményítő akkumulációt, a vakuolizálódást. A sejt organelumaira is hat, nagy riboszóma sűrűséget okoz, fokozza az endoplazmás retikulumok számát, növeli a plasztidok tilakoidjait, segíti a proplasztok átalakulását, a klorofill képződését. A mitózis indukálásán kívül szerepe van a sejtek hajtás-iniciációjában, de gátolja az embriogenezisüket (SZWEYKOWSKA 1974).

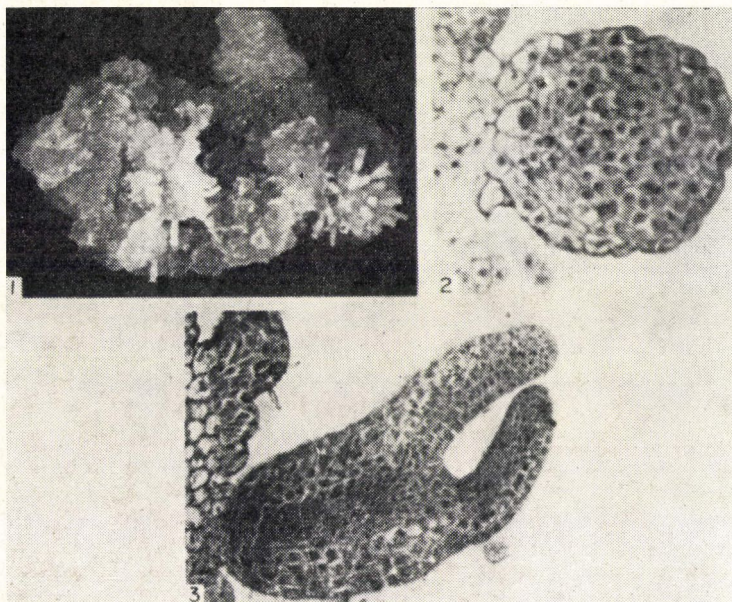
#### 4. Sejttenyészetek organo- és embriogenezise, fúziója

A növényi szövettenyésztés legújabb és nagy perspektívákat ígérő eredményei közé tartoznak a diploid és haploid sejtek organo- és embriogenezisével és a protoplasztokkal végzett vizsgálatok, mint már említettük.

A diploid sejtől a teljes növénné váló organizálódás egyik lehetséges módja az alábbi lehet mai tudásunk szerint. A magányos vagy aggregátumban lévő diploid sejt sokszoros osztódás révén kallusz tömeget hoz létre. Ennek egyik sejtje bipoláris struktúrájú lesz és a két pólus ennek megfelelően osztódik tovább. Így a hajtás- vagy gyökérvésztesztő pont, illetve merisztémás góc spontán vagy kiváltott differenciálódása egyszerre indul meg. Ezek a növekedési pontok azután osztódások révén továbbfejlődnek és azonnal leveles hajtást és gyökeret is képeznek. Az így kifejlődött embrió-, majd csíranövény-szerű képződmény elkülönül a kallusztól és továbbnövekszik, hogy független, autotróf növénné váljék. Ezt a módot járulékos embriogenezisnek nevezzük (VASIL, HILDEBRANDT és RIKER 1964). A *Nicotiana* (dohány), *Daucus* (sárgarépa), *Ranunculus* (boglárka) diploid sejtjeinek embriogenezisének kívül több egyszikű faj sejtjeinek embriogenezisének is ismertették az utóbbi években, így az *Asparagus officinalis*-ét (spárga, WILMAR és HELLENDOORN 1968), a *Lilium longiflorum*-ét (liliom, SHERIDAN 1968), sőt a Gramineae-k eddig lehetetlennek tartott embriogenezisének is.

A *Ranunculus* (boglárka) és *Atropa* (nadragulya), valamint a sárgarépa szuszpenziós sejttenyészetével újabban több oldalról is megerősítették a diploid sejtek embriogenezisének lehetőségét (STREET és WITHERS 1974). Mikroszkopikus és elektronmikroszkopikus szerkezet-vizsgálatokkal kimutatták, hogy 2,4-D tartalmú folyékony tápközegen a sárgarépa sejtek intenzív osztódással sejtaggregátumokat képeznek. Ezeket 2,4-D hiányos táptalajra helyezve, az osztódások lecsökkennek és a felületi, dús plazmájú sejtekből hamarosan embrioidok indulnak fejlődésnek. Ezeket a sejteket embriogén sejteknek is nevezzük. Ezeknek az osztódását legalábbis kezdetben nem lehet megkülönböztetni a sejtek aggregátumokat gyarapító osztódásától. Az embriogén sejtek biokémiai tartalma azonban eltér a sejtaggregátumok belső, vakuolás sejtjeinek tartalmától. Az előbbieket sűrű citoplazmája, nagy magja

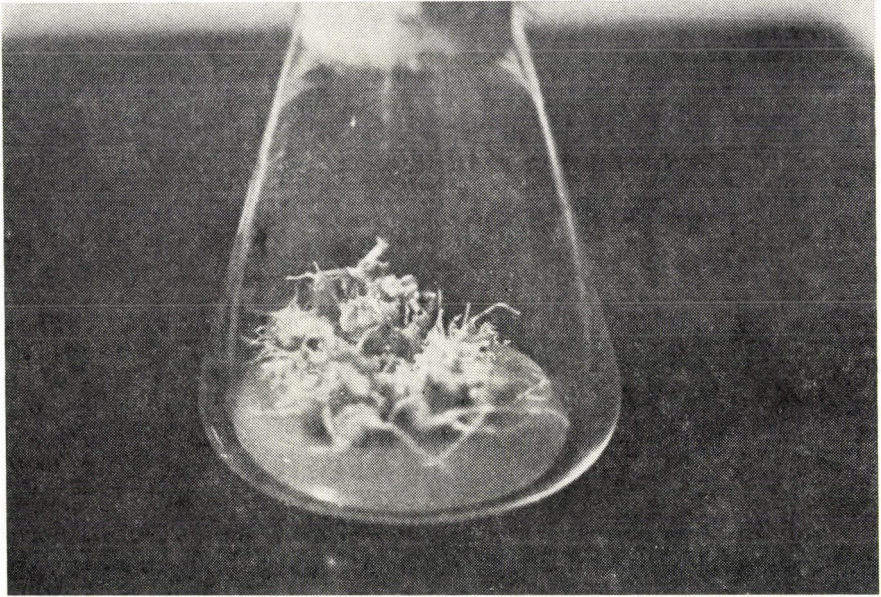




18. ábra. *Ranunculus* (boglárka) virágrügyből létesített kallusz tenyészet embriogenezise. 1. A sejtaggregátum egyes diploid sejtjei embrioidokká alakulnak. 2. A járulékos (szomatikus) embriogenezis egyik stádiuma: gömb állapot. 3. Az embriogenezis torpedó stádiuma. (KONAR és NATARAJA 1965 után.)

erősen festődik és RNS tartalmuk, valamint dehidrogenáz aktivitásuk nagyobb, mint a belső sejtéké. Sejtmag hártájuk is erősen pórusos. Az embriogén sejteket a szomszédos felületi sejtektől, amelyekből nem lesz embrioid, relatíve vastag, plazmodezma nélküli falak választják el.

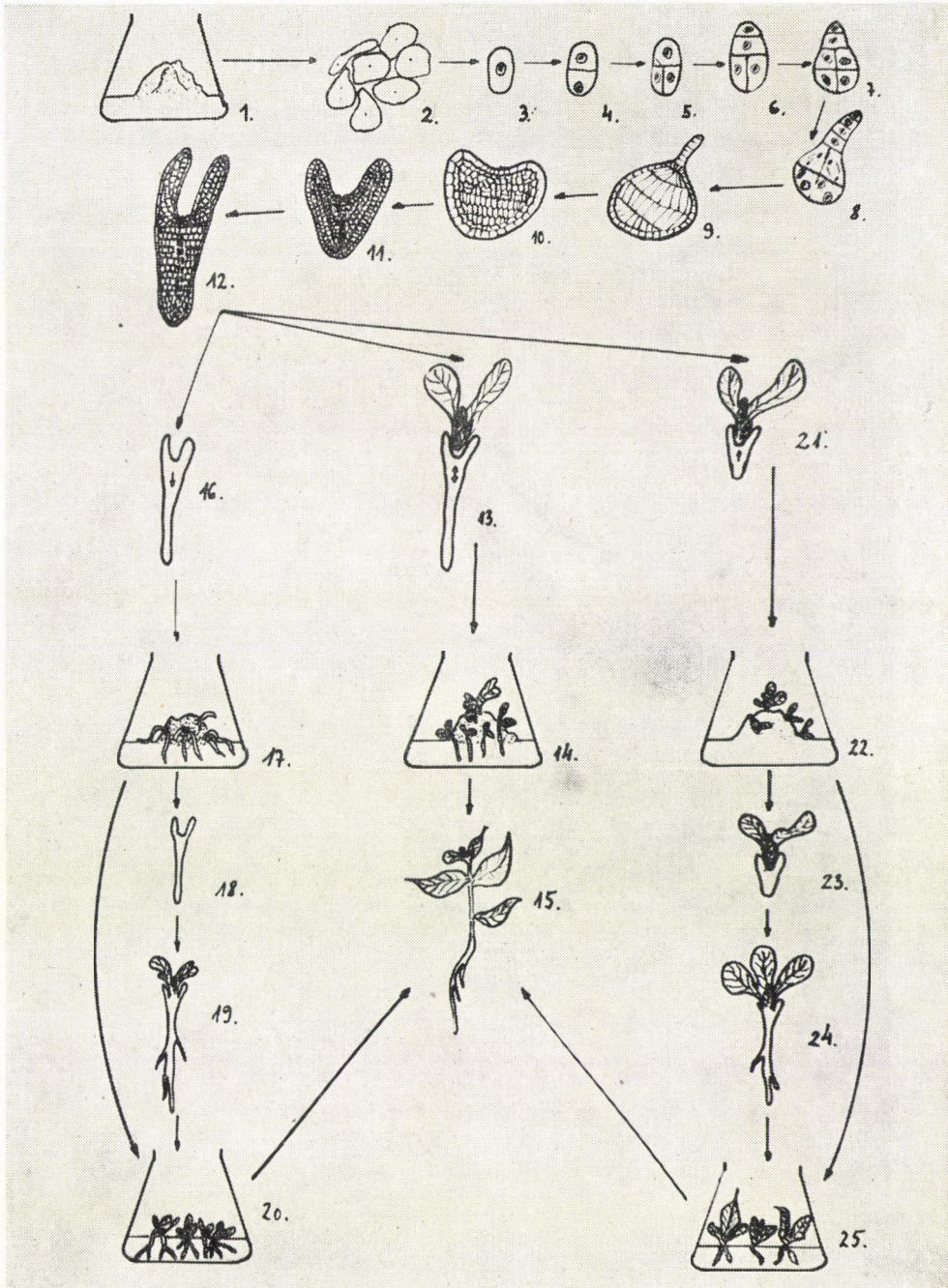
Az embriogén sejtekből osztódással hamarosan gömb alakú proembrioidok alakulnak. A szomatikus embriogenezis legalábbis a gömb-stádiumig, de legtöbbször a szív- és torpedó stádiumban is közel azonos a zigótás embriogenezissel mind morfológiai, mind anatómiai vonatkozásban (18. ábra). Így mindkét eredetű embrióban a gömb-stádium elérése után hamarosan kialakulnak a felületi epidermisz sejtek és proplasztiszok, amelyek azután fényre kerülve pl. az embrioidoknál hamarosan megzöldülnek. Mivel a szövetnövekedést jelentő sejtosztódást az embriogén sejtek osztódásától ma még sem morfológiailag, sem anatómiailag nem lehet pontosan megkülönböztetni, valószínűleg molekuláris szinten kell a különbséget kutatni. Ehhez pedig kívánatos lenne szinkronizált embriogenezist kiváltani (STREET és WITHERS 1974) és a spontán embriogenezisre is alkalmas teszt-anyagot találni. Ilyen kísérletekre alkalmasnak látszik a *Ruta graveolens* szár kallusza, amely azonos tápközegen igen könnyen organizál embrioidokat és intakt növényeket is (MARÓTI, VÁGÚJFALVI és DOMOKOS 1972). (19. ábra.)



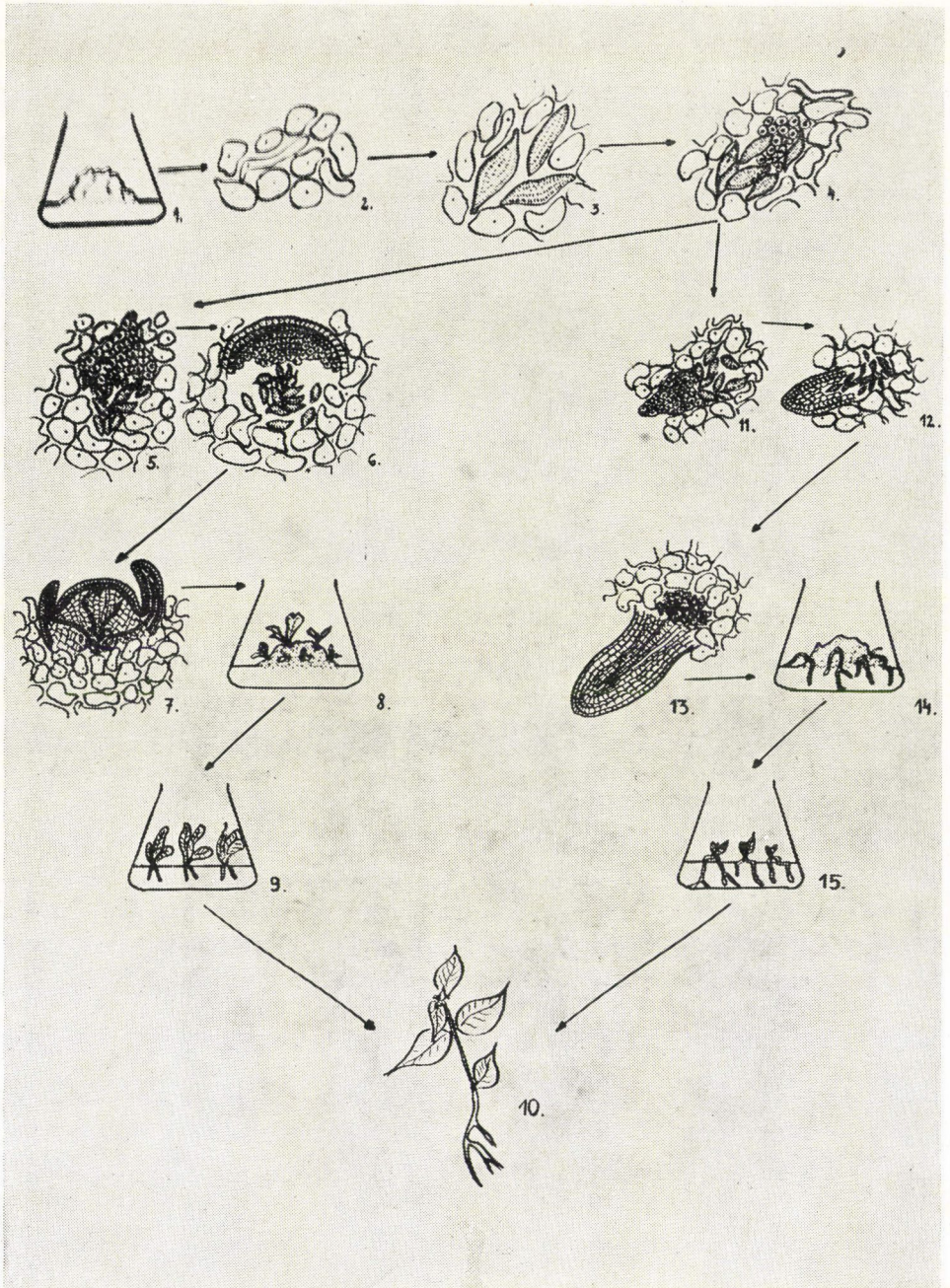
19. ábra. *Ruta graveolens* szárból létesített kallusz kultúrákból egyszerre indulnak fejlődésnek a gyökerek és hajtások. (Eredeti.)

A diploid vegetatív sejtekből intakt növény keletkezésének másik módja az, amikor a kallusz sejtömegéből egy sejt olyan osztódási sorozat elindítója lesz, amelyből egy apikális merisztéma centrum alakul ki. Ebből azután gyökér vagy hajtás iniciális, majd a megfelelő szerv keletkezik. Az egyik kialakulása rendszerint hamarosan indukálja a hiányzó szerv kifejlődését is. Ezt a módot organogenezisnek nevezzük és végeredménye ugyancsak teljes növényke, mint az embriogenezisnél (HESZKY 1973a, 1975). (20–22. ábra). Számos növénynél igen könnyen kiváltható a gyökér vagy hajtás, esetleg mindkét szerv szerveződése, így pl. az *Amorphophallus*, *Armoracia rusticana* (torma), *Cichorium intybus* (katáng), *Convolvulus* (szulák), *Crepis capillaris* (zörgőfű), *Daucus carota* (sárgarépa), *Haplopappus*, *Helianthus tuberosus* (csicsóka), *Lunaria annua* (holdviola), *Medicago* (lucerna), *Nicotiana tabacum* (dohány), *Plumbago indica*, *Scorzonera hispanica* (feketegyökér), *Sequoia*, *Solanum dulcamara* (ebszőlő), *Taraxacum* (gyermekláncfű) stb. kallusz kultúráiból (REINERT 1973).

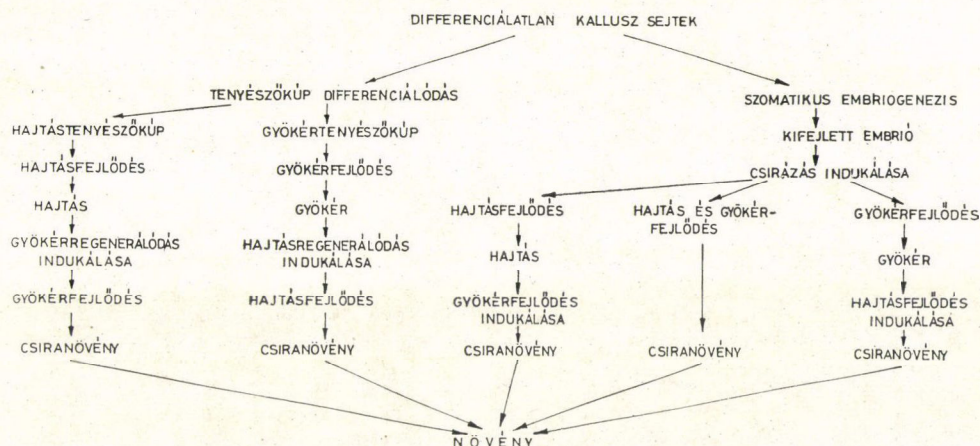
A szomatikus diploid sejtek totipotenciájának bizonyítása után hamarosan a pollenekkel is igazolták, hogy a genetikailag rögzített faji tulajdonságokat a haploid sejtek is teljes egészében birtokolják. Már az ötvenes évek elején mintegy 30 zárvatermő és 17 nyitvatermő faj pollenjét vizsgálva, észrevették, hogy egyik-másik faj pollenjéből sikeres kallusztenyészet indít-



20. ábra. A szomatikus embriogenezis vázlatja. 1—12: A kallusz sejtéből kialakul az embrió. 13—15: Az embrióból teljes növény lesz. 16—20: Az embrióból előbb a gyökér indul fejlődésnek, majd intakt növényé alakul. 21—25: Az embrióból előbb a hajtás indul fejlődésnek, majd intakt növény alakul. (Heszky 1975 után.)

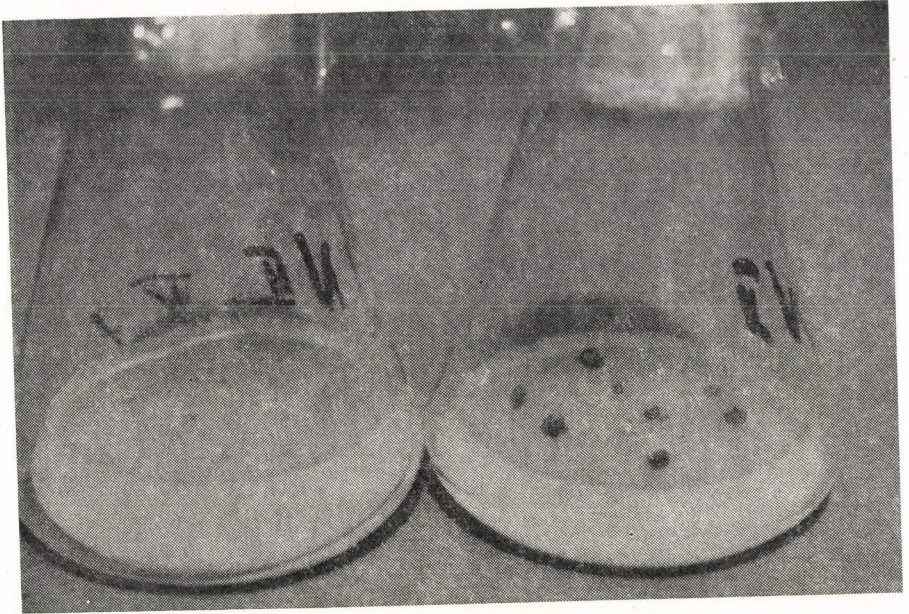


21. ábra. Az organogenezis vázlatja. 1—4: A differenciálatlan kallszúból merisztéma alakul. 5—9: A merisztémából előbb hajtás differenciálódik, majd gyökér és teljes növénné (10) alakul. 11—15: A merisztémából előbb gyökér differenciálódik, majd hajtás és teljes növénné (10) alakul. (HESZKY 1975 után.)

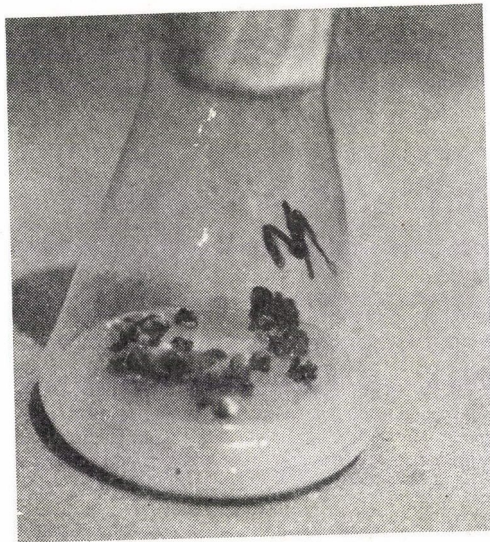


22. ábra. Az organogenezis és szomatikus embriogenezis lehetséges útjai a kallusztól az intakt növényig. (HESZKY 1975 után.)

ható el (KONAR 1963). Először a *Ginkgo biloba* csírázó pollenjéből hoztak létre ilyen szövettényészeteket élesztőkivonattal, 2,4-D-vel és IES-sel kiegészített tápközegen (TULECKE 1953, 1957). Később hasonló kultúrákat létesítettek *Taxus* (tiszafa) és *Torreya*, *Ephedra* (csikófark) pollenjéből is. Kezdetben csak nyitvatermő fajokon sikerült a haploid szövet dedifferenciálódását elindítani, de később a zárvatermő fajok pollenjeiből is készítettek kallusz szövettényészeteket (GUHA és MAHESHWARI 1966). (23a, 23b ábra.) Ezekben kókusztej és kinetin hatására embrioidok is fejlődnek. A dohány haploid alakjának előállítását először NAKATA és TANAKA (1968) próbálta meg, különböző tápközegeken nevelve a portokból kiinduló és embrioidokat is organizáló kultúrákat. A dohányok alkalmas tesztnek bizonyultak a további kísérletekben, mert NITSCH és NITSCH (1969) hamarosan közölte, hogy *Nicotiana tabacum*, *N. glauca*, *N. glauca*, *N. glauca* és *N. glauca* pollentényészetével folytak sikeres kísérletek haploid növények előállítására és sikeresen neveltek is belőlük virágzásig egyedeket. Majd a *Datura innoxia* (maszlag) pollenjéből is neveltek fel virágzó növényt (NITSCH 1971). A haploid növények, bár normális virágokat hoztak, nem kötöttek magokat sterilitásuk miatt. A sterilitás feloldása spontán vagy indukált (sugárzás, kolhicin) rediploidizációval történt. Portokból, illetve pollenből ma már számos növényfaj haploid alakját sikerült előállítani, így többek között *Datura*-ból (maszlag, GUHA és MAHESHWARI 1966), *Nicotiana*-ból (dohány, NITSCH és NITSCH 1969), *Atropa*-ból (nadrágulya, ZENKTELER 1971), *Lycopersicon*-ból (paradicsom, SHARP, RASKIN és SOMMER 1972), és az egyszikűek közül az *Oryza*-ból (rizs, NIIZEKI és OONO 1968), *Festuca-Lolium* (csenkesz-angolperje) hibridekből (NITSCH 1970), *Triti-*

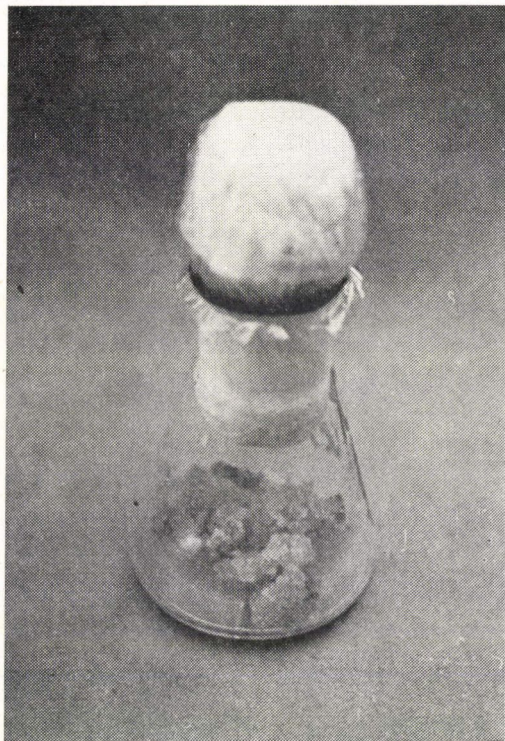


a



b

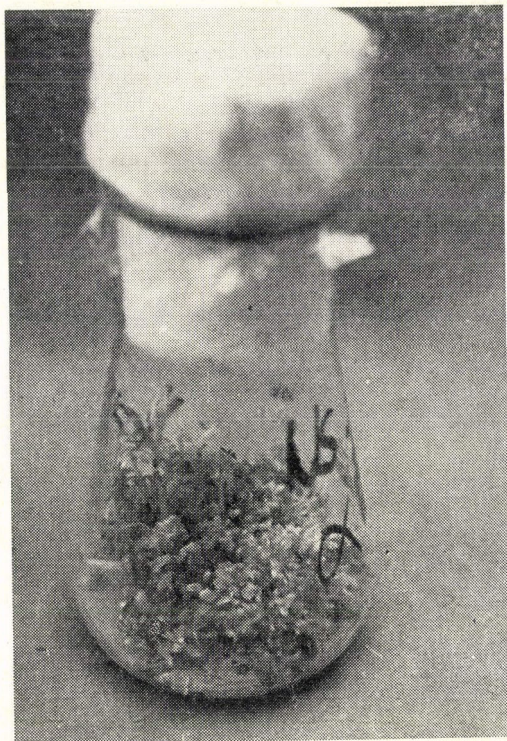
23. ábra. *Digitalis lanata* (gyűszűvirág) portok kultúrái: a) A portok izoláláskor és egyhónapos inkubáció után. b) Hathónapos inkubáció után a portokok kalluszt fejlesztenek. (Eredeti.)



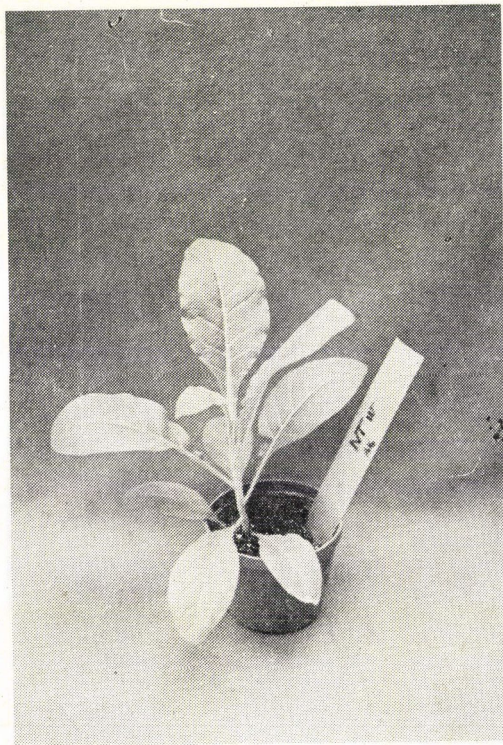
24. ábra. *Datura stramonium* (maszlag) portok kulturái pár hét alatt differenciálatlan kalluszt fejlesztenek. (Eredeti.)

cum-ból (búza, FUJII 1970), *Lolium*-ból (angolperje, CLAPHAM 1971), *Hordeum*-ból (árpa, CLAPHAM 1971, 1973), *Setaria*-ból (muhar, BAN, KOKUBU és MIYAJI 1971). (24—26. ábra).

A pollen és portok tenyésztéssel az utóbbi években igen jelentős eredményeket értek el a haploid és homozigota diploid növények előállításában. Úgy tűnik, hogy ma a portok kulturák módszere az egyik legbiztosabb és leggyorsabb út a homozigota növények előállításához gén-duplázódás által. (BURK, GWYNN és CHAPLIN 1972, ENGVILD 1973, HESZKY 1973b, NITSCH és MORREL 1973, RAJNA és IYER 1973, RAQUIN és PILET 1972, RASHID és STREET 1973, SUNDERLAND 1973, SUNDERLAND 1974, SUNDERLAND és DUNWELL 1974). Haploid növény vagy kallusz kialakítása pollen és portok kulturából általában a pollen fejlettségi állapotának és a tápközegnek a függvénye. A proembrioidok rendszerint egyszerű táptalajon külső növekedési regulatorok nélkül is kifejlődnek. Az embriogenezis leggyakrabban az első gametofita mitózis előtt (az osztódási ciklusban: S és G<sub>2</sub> fázis), vagy alatt (M fázis), esetleg után (G<sub>1</sub> fázis) indul meg. Az izolált portok, illetve pollenek mikrosz-



25. ábra. A *Nicotiana silvestris* portok kultúrái elkalluszosodnak, majd hamarosan hajtásokat fejlesztenek. (Eredeti.)



26. ábra. A *Nicotiana tabacum* (Wisconsin 38) portok kultúráiból kallusz, majd intakt haploid növény fejlődik. (Eredeti.)



kópos és elektronmikroszkópos vizsgálata alapján megállapították, hogy az embriogenezisnek több alternatív útja lehetséges. Ezek egyazon növénynél is megvalósulhatnak, de egy fajra egyik út jellemző is lehet. Amelyik fajban a több út lehetősége is megvan, ezek között bizonyos versengés (kompetíció) léphet fel, amelynek következtében az egyik mód jut túlsúlyba és a valóban kialakult embrioidok már csak az egyik mód eredményeként fejlődnek növényekké. A megfigyelések tanulsága szerint egyes fajoknál először a haploid proembrioidok kezdenek szerveződni, utána a diploid és a magasabb szintű embrioidok. Gyakran bizonyos „versengés” is felismerhető a különböző ploid szintű embrioidok kialakult arányaiban. Ha azonban az embrioidok a mitózis utáni pollenből kezdenek szerveződni, csak kevés haploid embrioid alakul ki és túlsúlyba kerülnek a nem haploid alakok (SUNDERLAND és DUNWELL 1974). Egyes kísérleti adatokból arra is következtetni lehet, hogy a portokok megfelelő hidegkezelésével egyrészt szinte szinkronizálni lehetett a pollen sejtek osztódását és másrészt a diploid proembrioidok szerveződésének elindítását (NITSCH és NORREEL 1973).

A haploid és homozigóta diploid növények előállításának nem egyedüli módja a pollenből, illetve portokból közvetlen indukált proembrioidok, illetve embrioid és intakt növény. Gyakran a pollenből vagy portokból először különböző ploid fokú kallusz sejtpopuláció fejlődik. A haploid növényből előállított kallusz sejtekben is végbemehet endomitózis és a DNS endoreduplikációja, vagy a sejtek fúziója, tehát kialakulhat ebből is homozigóta diploid növény. A heterogén kalluszból a diploid sejtek gyorsabban proliferálnak, mint a más ploid fokú sejtek, ezért a mozaikos kalluszból számos diploid növényt lehet felnevelni. Ha a kallusz nem a pollenből, vagy nemcsak a pollenből, hanem a portok szöveteiből, pl. a tapetum sejtekből is fejlődik, heterozigóta diploid növények is kifejlődhetnek. A portok szövet anyagának bizonyos esetekben jelentős szerepet tulajdonítanak az embrioidok kialakításában is (HESZKY és PAÁL 1972). A gyakorlati nemesítés szempontjából, mivel a portok és pollen kultúrákból nyert androgén haploid növények magról nem szaporíthatók, fontos a haploid vonal fenntartása is. Ezt a haploid növényke hajtáscsúcsának izolálásával és továbbnevelésével megoldották (KIMBER és RILEY 1963, NITSCH 1969, SUNDERLAND 1970, MALIGA és SZILÁGYI 1973). A pollenből vagy haploid növényből létesített kallusz kultúrák sejtjei gyakran heterogének a ploid szint tekintetében, ezért alkalmasak arra is, hogy különböző ploid fokú növénykéket állítsunk elő belőlük, de egyúttal az ilyen növénykékből éppen sejtjeik mozaikossága miatt, elkalluszosítással bármely ploid szintű sejtenyészetet is lehet létesíteni, ez pedig a nemesítés igen nagy segítsége (HESZKY 1973b, 1975).

A sejtenyésztes legújabb eredményeit a protoplasztokkal érte el. Ezek a növény különböző szerveiből, kallusz szövetéből vagy a pollenből előállí-



27. ábra. A zab és kukorica (←) gyökér sejtjeiből fúzionáltatott protoplaszt. (Nagyítás: 380 ×. POWER, CUMMINS és COCKING 1970 után.)

tott sejtfal nélküli csupasz sejtek (27. ábra). A sejtfalakat a plazmolizált sejtekről különböző faloldó enzimkeverékekkel (pl. celluláz, pektináz) távolítják el megfelelő inkubálás után (pl. 37° C-on 4–6 óráig) lassú centrifugálás (100 g alatt) segítségével. Az izolált csupasz sejtek, protoplasztok nátriumsók hatására (pl. 0,25 M NaNO<sub>3</sub>) összeolvadnak, fuzionálnak, majd falat regenerálnak és osztódnak. A protoplasztok izolálására, fúziójára számos technikai eljárást dolgoztak ki, ezek közül ma az ún. polietilén-glükol-os (PEG) módszer látszik a legmegfelelőbbnek. Úgy tűnik, hogy a megfelelő enzimeken kívül a sikeres fúzióban fontos szerepe van a tápközeg ozmotikus nyomásának, a szénhidrátok és nátrium koncentrációjának, valamint a pH-nak és a kálium mennyiségének. Ez az eljárás alkalmasnak látszik homo-és heterokarionok létesítésére, amelyből intakt növények nevelhetők fel. Segítségével létrehozták az első paraszexuális hibridet a *Nicotiana glauca* és *N. langsdoffii* között és ez biztató kezdet arra, hogy az intraspecifikus vegetatív hibriden kívül interspecifikus és intergenerikus szomatikus hibridek előállítása is lehetővé válik. (28. ábra).

A protoplasztok előállításának és felhasználásának lehetőségei szinte korlátlanok. Kimutatták, hogy felvetethetők a protoplasztokkal különböző mikro- és makromolekulák. Ezek közül az RNS és DNS, illetve a sejtmag



28. ábra. A *Nicotiana glauca* és *N. langsdorffii* levélsejtjei protoplasztjainak szomatikus hibridizálásából keletkezett paraszexuális növény. (CARLSON, SMITH és DEARING 1972 után.)

felvétele látszik a legjelentősebbnek. A magasabb szervezetségű növények transzformációs kísérleteihez a protoplasztok alkalmasabbak, mint a szövettenyészetek, mivel homogénebb a kiindulási objektum és könnyebben szinkronizálhatók, továbbá a ploidia fok is egyforma és a sejtfal hiánya miatt sokkal nagyobb a felvevő kapacitásuk is. A teljes genom vagy egy részének bevitele a NS-k vagy a sejtmag által (pl. *Petunia hybrida* sejtmag a *P. hybrida*, *Zea mays*, *Nicotiana glauca* protoplasztjaiba) lehetővé válik és sejt-modifikáció is előidézhető (BAJAJ 1974, COCKING 1973). Számos mutációt is állítottak már élő protoplasztokból (CARLSON 1973).

A protoplasztok igen alkalmasak a vírus- és baktériumkutatások sejt-szintre történő kiterjesztésére is. Megállapították, hogy mind a levél mezofillum, mind a termés (paradicsom) izolált protoplasztjai felveszik a TMV-t (dohány mozaik vírus) és igen jól megfigyelhető rajtuk az infekció mechanizmusa, a citoplazmában való szaporodásuk. A nitrogén-fixáló *Rhizobium japonicum* baktériumot a borsólevél protoplasztjaiba, alga kloroplasztokat pedig különböző növények protoplasztjaiba sikerült bejuttatni. A protoplaszt-kutatás az alábbi területeken ígér eredményeket: 1. Inkompatibilis és rokonságilag távoli növények protoplasztja fúziója révén szomatikus paraszexuális hibridek előállítás; 2. N-fixáló baktériumok és kék-zöld algák nem hüvelyesek

protoplasztjaiba való bejuttatása; 3. Rezisztencia indukáció bevitele a protoplasztba genom által; 4. Mutánsok indukálása és detektálása; 5. Elégtelenül vagy gyengén fotoszintetizáló rendszerbe idegen kloroplaszt transzplantálása; 6. Protoplaszt kultúrákból klónok előállítása vegetatív szaporítás céljából, végül; 7. teljes vagy részleges genom bevitele transzformáció, mutáció, modifikáció kiváltása céljából különböző fajok protoplasztjaiba (POWER, CUMMINS és COCKING 1970, KELLER, HARVEY, GAMBORG, MILLER és EVELEIGH 1970, CARLSON, SMITH és DEARING 1972, COCKING 1973, CARLSON 1973, BAJAJ 1974, COCKING és EVANS 1974, ERIKSSON, BONNETT, GLIMELIUS és WALLIN 1974, ZAITLIN és BEACHY 1974, WIDHOLM 1974, HOLL, GAMBORG, OHYMA és PELCHER 1974).

### Összefoglalás

A növényi szövettenyésztés alig háromnegyed százados múltra tekinthet vissza. Eredményei és perspektívái alapján azonban ma már olyan új tudományterületként ismerjük, amely nélkül egyes életfolyamatok, pl. a növényi totipotencia nem lett volna bizonyítható. Segítségével mind a diploid, mind a haploid növényi sejtek organo- és embriogenezise megismerhetővé és bizonyíthatóvá vált. A szövettenyésztés elvei és módszerei egyrészt a valódi szomatikus interspecifikus és intergenerikus hibridek előállításának lehetőségeit teremtették meg, másrészt pedig a felismert bioregulációs törvényszerűségek olyan gyakorlati vegetatív szaporítási és mikroorganizmustól mentes elit szaporító eljárások alapjait szolgálták, amelyek a nagyüzemi szaporításokat is lehetővé teszik.

A növényi szövettenyésztés fejlődésében négy szakaszt lehet megkülönböztetni: 1. A sikertelen próbálkozások ideje (—1920); 2. Az első sikeres szervtenyésztés (gyökér) ideje (1920—1935); 3. A szerv- és szövettenyésztés általános törvényszerűségeinek felismerése (1935—1955); 4. A növényi sejtek tenyésztetőségének és totipotenciájának, organo- és embriogenezisének, mutációjának és transzformációjának bebizonyítása, a sejtek bioregulációjának gyakorlati alkalmazása (1955—).

A növényi sejtenyésztés az izolált növényi részek steril tenyésztésének legnehezebb területe. Lényegében a szövettenyésztés speciális részeként fogható fel és két módszertani formája alakult ki: a szuszpenziós tenyészetek és magányos sejtek tenyésztésének technikája. A sejtenyészetek különösen alkalmasak a sejtek anyagcseréjének, növekedési és fejlődési mechanizmusuk megállapítására, de jól felhasználhatók a sejtek transzformálására és genetikai információk átvitelére is.

(Az előadás felolvasásáért dr. Heszky László tud. munkatársnak, a technikai segítségért pedig Lévi Éva tud. segédmunkatársnak fejezem ki köszönetemet.)

## IRODALOM

1. BAJAJ, Y. P. S.: *Euphytica* **23**, 633–649 (1974).
2. BAJAJ, Y. P. S., BOPP, M.: *Angew. Bot.* **45**, 115–151 (1971).
3. BALL, E.: *Am. J. Bot.* **33**, 301–318 (1946).
4. BALL, E.: *Nature London* **197**, 103–104 (1963).
5. BALL, E.: *Bull. Torrey bot. Club.* **96**, 52–62 (1969).
6. BAN, J., KOKUBU, T., MIYAJI, J.: *Bull. Fac. Agric. Kagosima Univ.* **21**, 77–84 (1971).
7. BEASLEY, C. A., TING, I. P., LINSKENS, A. E., BIRNBAUM, E. H.: 169–190. In: Street, H. E.: *Tissue culture and plant science 1974*. Acad. Press London (1974).
8. BERGMANN, L.: *Nature* **184**, 648–649 (1959).
9. BERGMANN, L.: *J. Gen. Physiol.* **43**, 841–851 (1960).
10. BERTHELET, A.: *Bull. Soc. Chim. Biol.* **16**, 1553–1557 (1934).
11. BLACK, L. M.: *GROWTH* **10**, Suppl. 79–84 (1947).
12. BLAKELY, L. M., STEWARD, F. C.: *Am. J. Bot.* **48**, 351–358 (1961).
13. BURK, L. G., GWYNN, G. R., CHAPLIN, J. F.: *Heredity* **63**, 355–360 (1972).
14. BYRNE, A. F., KOCH, R. B.: *Science* **135**, 215–216 (1962).
15. CAMUS, G.: *Rev. Cytol. Biol. Vég.* **11**, 1–195 (1949).
16. CARLSON, P. S.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 598–602 (1973).
17. CARLSON, P. S., SMITH, H. H., DEARING, R. D.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 2292–2294 (1972).
18. CLAPHAM, D.: *Pflanzenzüchtg.* **65**, 285–292 (1971).
19. CLAPHAM, D.: *Z. Pflanzenzüchtg.* **69**, 142–155 (1973).
20. COCKING, E. C.: 327–341. In: *Colloq. Int. CNRS. Protoplastes of fusion de cellules somatiques végétales*. Int. Nat. Rech. Agr. Paris (1973).
21. COCKING, E. C., EVANS, P. K.: 100–120. In: Street, H. E.: *Plant tissue and cell culture*. Blackwell Sci. Publ. Oxford (1974).
22. DE ROPP, R. S.: *Proc. Roy. Soc. B.* **144**, 86–93 (1955).
23. ENGVILD, K. C.: *Hereditas* **74**, 144–147 (1973).
24. ERIKSON, T., BONNET, H., GLIMELIUS, KRISTINA, WALLIN, ANITA: 213–229. In: Street, H. E.: *Tissue culture and plant science 1974*. Acad. Press London (1974).
25. FUJI, T.: *Wheat Inf. Serv. Kyoto Univ.* **31**, 1–4 (1970).
26. GAUTHERET, R. J.: *C. R. Ac. Sc.* **208**, 118–120 (1939).
27. GAUTHERET, R. J.: *La culture des tissus végétaux*. Masson et Sci. Paris (1959).
28. GREGORY, W. C.: *Am. J. Bot.* **27**, 687–692 (1940).
29. GUHA, S., MAHESHWARI, S. C.: *Nature London* **204**, 497 (1964).
30. GUHA, S., MAHESHWARI, S. C.: *Phytomorph.* **17**, 457–459 (1966).
31. HABERLANDT, G.: *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, Math. Naturwiss. Kl.* **111**, 69–92 (1902).
32. HAHLBROCK, K.: 363–378. In: Street, H. E.: *Tissue culture and plant science 1974*. Acad. Press London (1974).
33. HALPERIN, W., WETHERELL, D. F.: *Am. J. Bot.* **51**, 274–283 (1964).
34. HANNIG, E.: *Bot. Z.* **62**, 45–80 (1904).
35. HESZKY, L.: *Acta Bot. Acad. Sci. Hung.* **18**, 303–305 (1973a).
36. HESZKY, L.: *Agrobotanika* **15**, 215–232 (1973b).
37. HESZKY, L.: *Acta Agronom. Acad. Sci. Hung.* **24**, 123–141 (1975).
38. HESZKY, L., PAÁL, H.: *Bot. Közl.* **59**, 125–127 (1972).
39. HOLL, F. B., GAMBORG, O. L., OHYAMA, L., PELCHER, L.: 301–328. In: Street, H. E.: *Tissue culture and plant science 1974*. Acad. Press London (1974).
40. JONES, L. E., HILDEBRANDT, A. C., RIKER, A. J., WU, J. H.: *Am. J. Bot.* **47**, 468–475 (1960).
41. KAO, K. N., KELLER, W. A., MILLER, R. A.: *Exp. Cell Res.* **62**, 338–340 (1970).
42. KELLER, W. A., HARVEY, R., GAMBORG, O. I., MILLER, R. A., EVELEIGH, D. E.: *Nature* **226**, 280–282 (1970).
43. KIMBER, G., RILEY, H.: *Bot. Rev.* **29**, 480–531 (1963).
44. KING, P. J., STREET, H. E.: 269–337. In: Street, H. E.: *Plant tissue and cell culture*. Blackwell Sci. Publ. Oxford (1974).
45. KONAR, R. N.: *Phytomorphology* **13**, 170–174 (1963).
46. KONAR, R. N., NATARAJA, K.: *Phytomorphology* **15**, 206–211 (1965a).
47. KONAR, R. N., NATARAJA, K.: *Phytomorphology* **15**, 132–137 (1965b).
48. KOTTE, W.: *Beitr. allgem. Bot.* **2**, 413–434 (1922).
49. KOVÁCS, E.: *Bot. Közl.* **59**, 251–260 (1972).
50. LAIBACH, F.: *Z. Bot.* **17**, 417–459 (1925).

51. LIST, A.: *Am. J. Bot.* **50**, 320–329 (1923).
52. LOO, S. W.: *Am. J. Bot.* **32**, 13–17 (1945).
53. LOO, S. W.: *Am. J. Bot.* **33**, 295–300 (1946).
54. MAHESHWARI, N., LAL, N.: *Nature London* **181**, 631–632 (1958).
55. MALIGA, P., BREZNOVITS, A. SZ., MÁRTON, L.: *Nature New Biol.* **244**, 290 (1973).
56. MALIGA, P., MÁRTON, L., BREZNOVITS, A. SZ.: *Plant Sci. Letters* **1**, 119–121 (1973).
57. MALIGA, P., SZILÁGYI, L.: *Bot. Közl.* **60**, 77–82 (1973).
58. MARETZKI, A., THOM, M., NICKELL, L. G.: 329–361. In: Street, H. E.: *Tissue culture and plant science 1974*. Acad. Press London (1974).
59. MARÓTI, M., GERBÁR, J., NÁTTÁN, A.: *Bot. Közl.* **60**, 265–268 (1973).
60. MARÓTI, M., VÁGUJFALVI, D., DOMOKOS, M.: *Bot. Közl.* **59**, 135–137 (1972).
61. MEINS, F.: 233–264. In: Street, H. E.: *Tissue culture and plant science 1974*. Acad. Press London (1974).
62. MELCHERS, G., BERGMANN, L.: *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* **71**, 459–473 (1959).
63. MOLLIARD, M.: *C. R. Soc. Biol. Paris* **84**, 770–772 (1921).
64. MOREL, G.: *Ann. Épiphyt.* **14**, 1–112 (1948).
65. MOREL, G.: *Cymb. Soc. News.* **20**, 3–11 (1965).
66. MUIR, W. H., HILDEBRANDT, A. C., RIKER, A. J.: *Science* **119**, 877–878 (1954).
67. MUIR, W. H., HILDEBRANDT, A. C., RIKER, A. J.: *Am. J. Bot.* **45**, 589–597 (1958).
68. MURASHIGE, T.: *Ann. Rev. Plant Physiol.* **25**, 135–166 (1964).
69. NAGL, W.: 19–42. In: Street, H. E.: *Tissue culture and plant science 1974*. Acad. Press London (1974).
70. NAKATA, K., TANAKA, M.: *Jap. Journ. Gen.* **43**, 55–71 (1968).
71. NICKELL, L. G., TULECKE, W.: *J. Biochem. Microbiol. Tech. Eng.* **2**, 287 (1960).
72. NITSCH, J. P.: *Am. J. Bot.* **38**, 566–577 (1951).
73. NITSCH, J. P.: *Phytomorphology* **19**, 389–404 (1969).
74. NITSCH, J. P.: 281–294. In: *Les cultures de tissus de plantes*. Edit. Centre Nat. Recherche Sci. Paris (1971).
75. NITSCH, J. P., NITSCH, C.: *Science* **163**, 85–87 (1969).
76. NITSCH, C., NORREEL, B.: *C. Acad. Sci. Paris* **276**, 303–306 (1973).
77. NITSCH, W.: *Naturwiss.* **57**, 199–200 (1970).
78. NIIZEKI, H., OONO, W.: *Proc. Jap. Acad.* **44**, 544–557 (1968).
79. POWER, I. B., CUMMINS, S. E., COCKING, E. C.: *Nature* **225**, 1016–1018 (1970).
80. RAJNA, S. K., IYER, R. D.: *Planta* **70**, 275–280 (1973).
81. RAJASEKHAR, E. W., EDWARDS, M., WILSON, S. B., STREET, H. E.: *J. Exp. Bot.* **22**, 177–207 (1971).
82. RAQUIN, C., PILET, V.: *C. R. Acad. Sci. Paris* **274**, 1019–1022 (1972).
83. RASHID, A., STREET, H. E.: *Planta* **113**, 263–270 (1973).
84. REINERT, J.: *Science* **123**, 457–458 (1956).
85. REINERT, J.: *Planta* **53**, 318–333 (1959).
86. REINERT, J.: 338–355. In: Street, H. E.: *Plant tissue and cell culture*. Blackwell Sci. Publ. Oxford (1973).
87. REINHARD, E.: 433–462. In: Street, H. E.: *Tissue culture and plant science 1974*. Acad. Press London (1974).
88. ROBBINS, W. J.: *Bot. Gaz.* **73**, 376–390 (1922).
89. ROBBINS, W. J., MANEVAL, W. E.: *Bot. Gaz.* **76**, 274–287 (1923).
90. SHARP, W. P., RASKIN, R. S., SOMMER, H. E.: *Planta* **104**, 357–361 (1972).
91. SHERIDAN, W.: *Planta* **82**, 189–192 (1968).
92. SHORT, K. C., BROWN, E. G., STREET, H. E.: *J. Exp. Bot.* **20**, 572–578 (1969).
93. SKOOG, E.: *Am. J. Bot.* **31**, 19–24 (1944).
94. SMITH, H. H.: *Bio. Science* **24**, 269–276 (1974).
95. SOROKIN, H. P.: *Am. J. Bot.* **42**, 225 (1955).
96. SPARROW, A. H., POND, V., KOJAN, S.: *Am. J. Bot.* **42**, 384–394 (1955).
97. STEWARD, P. C.: *Roy Soc. Proc. B.* **175**, 1–30 (1970).
98. STEWARD, F. C., MAPES, M. O., SMITH, J.: *Am. J. Bot.* **45**, 693–703 (1958).
99. STREET, H. E.: 533–629. In: Wilmer, E. N.: *Cells and tissues in culture*. Acad. Press London (1966).
100. STREET, H. E.: 3–224. In: Steward, F. C.: *Plant physiology VB*. Acad. Press New York (1969).
101. STREET, H. E.: 59–99. In: Street, H. E.: *Plant tissue and cell culture*. Blackwell Sci. Publ. Oxford (1973a).
102. STREET, H. E.: 191–204. In: Street, H. E.: *Plant tissue and cell culture*. Blackwell Sci. Publ. Oxford (1973b).

103. STREET, H. E., HENSHAW, G. G.: 459–532. In: Wilmer, E. N.: Cells and tissue in culture Acad. Press London (1966).
104. STREET, H. E., KING, P. J., MANSFIELD, K. J.: 17–40. In: Les cultures de tissus de plants. Edit. Centre. Nat. Rech. Sci. Paris (1971).
105. STREET, H. E., ÖPIK, H.: The physiology of flowering plants. Arnold London (1970).
106. STREET, H. E., WITHERES, LYNSEY, A.: 71–96. In: Street, H. E.: Tissue culture and plant science 1974. Acad. Press London (1974).
107. SUNDERLAND, N.: New Scientist **46**, 124–144 (1970).
108. SUNDERLAND, N.: 205–239. In: Street, H. E.: Plant tissue and cell culture. Blackwell Sci. Publ. Oxford (1973).
109. SUNDERLAND, N.: 91–122. In: Proc. Internat. Symp. of haploids in higher plants. Univ. Guelph (1974).
110. SUNDERLAND, N., DUNWELL, J. M.: 141–168. In: Street, H. E.: Tissue culture and plant science 1974. Acad. Press London (1974).
111. SUNDERLAND, N., WICKS, P. M.: Nature **224**, 1227–1229 (1969).
112. SZWEYKOWSKA, A.: 461–475. In: Street, H. E.: Tissue culture and plant science 1974. Acad. Press London (1974).
113. TAYLOR, J. H.: Am. J. Bot. **37**, 137–143 (1950).
114. TORREY, J. G.: Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. **43**, 887–891 (1951).
115. TORREY, J. G.: 189–222. In: Rudnick, D.: Cell, organism and milieu. Ronald Press New York (1959).
116. TORREY, J. G., REINERT, J.: Plant Physiol. **36**, 483–491 (1961).
117. TORREY, J. G., REINERT, J., MERKEL, M.: Am. J. Bot. **49**, 420–425 (1962).
118. TULECKE, W.: Science **117**, 599–600 (1953).
119. TULECKE, W.: Am. J. Bot. **44**, 602–608 (1957).
120. TULECKE, W., NICKELL, L. G.: Science **130**, 863–864 (1959).
121. VASIL, I. K.: Phytomorphology **7**, 138–149 (1957).
122. VASIL, I. K.: J. Exp. Bot. **10**, 399–408 (1959).
123. VASIL, I. K., HILDEBRANDT, A. C.: Science **147**, 1454–1455 (1965).
124. VASIL, I. K., HILDEBRANDT, A. C., RIKER, A. J.: Science **146**, 76–77 (1964).
125. VÖCHTING, H.: Über Transplantation am Pflanzenkörper. Untersuchungen zur Physiologie und Pathologie. H. Laupp Tübingen (1892).
126. WETMORE, R. H.: Brookhaven Symp. Biol. **6**, 22–40 (1954).
127. WHITE, P. R.: Am. J. Bot. **26**, 59–64 (1939).
128. WHITE, P. R.: A handbook of plant tissue culture. J. Cattell Lancaster, Pa. (1943).
129. WIDHOLM, J. M.: 287–300. In: Street, H. E.: Tissue culture and plant science 1974. Acad. Press London (1974).
130. WILMAR, C. HELLEDOORN, M.: Nature **217**, 369–370 (1968).
131. WILSON, S. B., KING, P. J., STREET, H. E.: Exp. Bot. **27**, 177–207 (1971).
132. YARWOOD, C. E.: Bot. Rev. **12**, 1–56 (1964).
133. YEOMAN, M. M.: 31–58. In: Street, H. E.: Plant tissue and cell culture. Blackwell Sci. Publ. Oxford (1973).
134. YEOMAN, M. M.: 1–17. In: Street, H. E.: Tissue culture and plant science 1974. Acad. Press London (1974).
135. YEOMAN, M. M., STREET, H. E.: 121–160. In: Street, H. E.: Plant tissue and cell culture. Blackwell Sci. Publ. Oxford (1973).
136. ZAITLIN, M., BEACHY, R. N.: 265–286. In: Street, H. E.: Tissue culture and plant science 1974. Acad. Press London (1974).