Doktori (Ph.D.) értekezés

In vitro embriófejlődés a gabonafélék gametofitikus sejtvonalaiból

Írta

Bakos Ferenc

ELTE Biológiai Doktori Iskola

Vezető:

Dr. Erdei Anna

Kísérletes növénybiológia program

Programvezető:

Dr. Szigeti Zoltán

Témavezető:

Dr. Barnabás Beáta

Tudományos igazgatóhelyettes

A mezőgazdasági tudomány MTA doktora

Magyar Tudományos Akadémia

Mezőgazdasági Kutatóintézete, Martonvásár

2007

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések.....5
2. Bevezetés.....6
3. Irodalmi áttekintés:.....7
3. 1. A növényi embriógenezis útjai.....7
3. 2. A növényi embriók *in vivo* fejlődése.....9
3. 3. Petesejt/zigóta eredetű embriók tenyésztése.....17
3. 4. A búza zigóták fejlődési mintázata az *in vitro* tenyészetekben.....21
3. 5. Az izolált petesejtek és zigóták biotechnológiai célú felhasználása.....22
3. 6. Az egy-sejt tenyésztési rendszer potenciális jelentősége a búza idegenfajú megporzásával aktivált petesejtjeinek felnevelésében.....24
3. 6. 1. Búza × kukorica megporzások.....24
3. 6. 2. Búza × rizs megporzások.....26
3. 7. Mikrospórák sporofitikus fejlődése: az embriógenezis hím ivarsejtvonalból kiinduló alternatív útja.....29
3. 8. A mikrospórák *in vivo* és *in vitro* fejlődési mintázata.....34
3. 9. A mikrospóra-embriógenezis a gyakorlatban és az alapkutatásban.....39
4. A kutatási célok összefoglalása.....41
5. Anyag és módszer.....42
5. 1. Növényi anyagok: árpa-, búza-, kukorica és rizsnevelés.....42
5. 2. Sejttenyésztési módszerek.....43
5. 2. 1. Árpa izolált mikrospóra tenyésztés.....43
5. 2. 2. Búza izolált mikrospóra tenyésztés.....43
5. 2. 3. A búza zigótáinak izolálása az anyai szövetekből.....44
5. 2. 4. Búza izolált zigóták felnevelése.....44
5. 2. 5. Búza × kukorica megporzásokatból származó izolált „zigóták” felnevelése.....45
5. 2. 6. Búza izolált zigótáinak hatékony felnevelése.....45
5. 2. 7. A búza × rizs keresztezésekből származó izolált „zigóták” tenyésztése.....46
5. 3. Sejttani, citokémiai és analitikai vizsgálatok.....46
5. 3. 1. Zigóták életképességének megítélése.....46
5. 3. 2. Sejtmagvak DAPI festése.....47
5. 3. 3. Ploiditásfok meghatározása.....47

5. 3. 4. Zigóta eredetű struktúrák előkészítése a mikroszkópos sejt- és szövettani vizsgálatokhoz.....47
5. 3. 5. A zigóta eredetű struktúrákból készített metszetek sejt- és szövettani vizsgálata.....49
5. 3. 5. 1. Toluidinkék-festés.....49
5. 3. 5. 2. A sejtmagvak és a sejtfalak festése DAPI-val és Calcofluor white-tal (CFW).....49
5. 3. 5. 3. A keményítőszemcsék és a fehérjetestek megfestése.....49
6. Eredmények.....50
6. 1. A búza zigóták *in vitro* tenyésztésének feltételei: a sejtizoláláskor fellépő ozmotikus stressz csökkentése és a dajkasejtekkel történő együtt-tenyésztés.....50
6. 2. Az izolált zigóták *in vitro* fejlődése.....55
6. 2. 1. A zigóták fejlődése az MMS3 tápoldatot tartalmazó tenyészetekben.....55
6. 2. 2. Az egy-sejt tenyésztési rendszer továbbfejlesztése: az *in vivo* megtermékenyített zigóták hatékony felnevelése.....56
6. 2. 3. A zigotikus embriók *in vitro* és *in vivo* fejlődésének citológiai és hisztológiai összehasonlítása.....58
6. 3. Növények *in vitro* felnevelése távoli rokonfajokkal történő megprorzások eredményeként.....70
6. 3. 1. Búza × kukorica megporzással nyert haploid növények felnevelése embriómentéssel és a korai állapotban izolált „zigóták” *in vitro* felnevelésével.....70
6. 3. 1. 1. A kukoricával megtermékenyített petesejtek *in vitro* fejlődése.....70
6. 3. 1. 2. Az embrió- és „zigótamentéses” technikák hatékonysága.....70
6. 3. 2. Búza × rizs megporzással nyert növények felnevelése a korai állapotban izolált aktivált petesejtek *in vitro* felnevelésével.....72
6. 3. 2. 1. A rizzsel megtermékenyített petesejtek *in vivo* és *in vitro* fejlődése.....72
6. 3. 2. 2. A rizzsel keresztezett búzanövények genommérete és termékenysége.....77
7. Az eredmények megvitatása.....79
7. 1. A búza zigóták izolálása és *in vitro* tenyésztése során fellépő problémák megoldása.....79
7. 1. 1. A zigóták izolálásához és tenyésztéséhez szükséges közegek.....79
7. 1. 2. A különböző dajkák jellemzői és alkalmazásuk eredményessége.....81
7. 2. A búza zigóták *in vitro* fejlődése.....83
7. 2. 1. Az *in vitro* fejlődő embriók differenciálódása.....83
7. 2. 1. 1. A zigóták első osztódása *in vivo* és *in vitro*.....83

7. 2. 1. 2. Hogyan alakulhatnak ki a szimmetrikusan osztódó zigótákból a növényben is megfigyelhető morfológiájú embriók?.....84
7. 2. 1. 3. Kalluszoknak vagy embrióknak tekintsük-e az *in vitro* fejlődő zigótákat?.....86
7. 2. 2. A tartaléktápanyagok felhalmozódása az *in vitro* fejlődő búza embriókban.....88
7. 2. 2. 1. Keményítő.....88
7. 2. 2. 2. Proteinek.....89
7. 2. 2. 3. Lipidek.....89
7. 3. Az egy-sejt tenyésztési rendszer szerepe távoli rokonfajokkal történő keresztezések megvalósításában.....90
7. 3. 1. A búza × kukorica zigóták *in vitro* felnevelése.....90
7. 3. 2. Egy teljesen új, a búza × rizs fajok közötti keresztezés megvalósítása az egy-sejt tenyésztési rendszer segítségével.....92
7. 3. 2. 1. A búza × rizs növények tulajdonságai.....94
8. Az elért tudományos eredmények összefoglalása.....97
9. Irodalomjegyzék.....98
10. Köszönetnyilvánítás.....126
11. Összegzés.....127
12. Summary (in English).....128

1. Rövidítések

2,4-D: 2,4-dikloro-fenoxi-ecetsav

ABA: „abscisic acid”, abszcizinsav

CBB: Coomassie brilliant blue (proteintestek kimutatására szolgáló festék)

CFW: Calcofluor white (cellulóz jellegű sejtfalak kimutatására szolgáló festék)

DH: „doubled haploid”, dihaploid vagy kettőshaploid: minden lókuszon homozigóta növény

DAPI: 4’,6-diamidino-2-fenil-indol (nukleinsav, főleg DNS, ill. a sejtmag festésére szolgál)

DNS: dezoxi-ribonukleinsav

EB: „early bicellular”, a pollen mitózist követő, korai kétmagvas fejlődési állapot

ELS: „embryo-like structure”, embriószerű struktúra

FDA: fluoreszcein diacetát (életképes sejtek kimutatására szolgáló festék)

GP: „green plant”, szövettenyészetekben felnevelt zöld növény

LU: „late uninucleate”, a mikrospórák késői egymagvas fejlődési állapota

MU: „mid uninucleate”, a mikrospórák közép egymagvas fejlődési állapota

NBI: „nuclear buffer I”, sejtmagvak izolálására szolgáló puffer

PAS: „periodic acid Schiff staining”, perjódsavas Schiff-festés (poliszacharidok kimutatására)

PM: „premitotic”, a mikrospórák fejlődési állapota, amikor e sejtek az első gametofitikus osztódásra, az ún. első pollen mitózisra felkészülnek

RNS: ribonukleinsav

RPM: „rotation per minute”, percenkénti fordulatszám

UV: „ultra violet”, ibolyántúli (sugárzás)

Megjegyzés: a gének vagy mutánsok rövidített neveinek magyarázata a rövidítést követően, a szövegben találhatók.

2. Bevezetés

A növényi embrió egyetlen sejtből létrejövő, a természetben az anyaszervezettől függő fiatal szervezet, amely képes új, morfológiailag és funkcionálisan teljes növényegyeddé továbbfejlődni. Az embrió előre programozott, meghatározott eseményeket adott sorrendben magában foglaló fejlődése az embriógenezis. Nyilvánvaló, hogy az embriógenezis kulcsfontosságú a leendő nemzedék létrehozásában. Jól ismert, hogy a környezeti tényezők, ill. az embriók mikrokörnyezetének függvényében az embriófejlődés nagymértékben befolyásolja a termés mennyiségét és minőségét is, ami kulcsfontosságú a növénynemesítésben és -termesztésben.

Az embriógenezis a természetben általában a megtermékenyített petesejtből indul ki, de a növényi sejt totipotenciájának és a biotechnológiának köszönhetően számos más sejtből fejlődhetnek embriók. A gyakorlatban leginkább a mikrospórákból és a különböző növényi szervek elkalluszosításából származó embriók tenyésztése bizonyult a legsikeresebbnek.

A mikrospórákból származó kettős haploid növényeknek igen nagy jelentősége van a szántóföldi növények nemesítésében, a szomatikus embriók tenyészetei pedig a kertészetben fontosak. Az embriótenyészetek biotechnológiai lehetőségei tehát igen széles körűek, és elsősorban az abiotikus és biotikus stresszekkel szembeni rezisztenciák növelésének révén a termésbiztonság, valamint a termésminőség emelésével lehet hatékonyan segíteni a növénytermesztést. E célok megvalósításához azonban a mikrospóra és szomatikus embriókon túl a zigotikus embriófejlődés reprodukálása és tanulmányozása is kulcsfontosságú az *in vitro* környezetben.

Mindezek fényében elsődleges célunk a búza izolált zigótáinak *in vitro* felnevelésére alkalmas egy-sejt technika ill. az ezt kiszolgáló tenyésztési rendszerek meghonosítása. Az anyai szövetek pótlására a mikrospórák, a fiatal termők vagy az idősebb embriók egyaránt megfelelő dajkasejtek lehetnek a zigóták *in vitro* tenyésztése során. Az *in vivo* megtermékenyített zigóták felnevelését lehetővé tevő tenyésztési módszer már jól használható mind a zigóták *in vitro* fejlődésének tanulmányozására, mind pedig a búza idegenfajú megporzásából származó utódsejtek növénnyé nevelésére (búza × kukorica megporzások), vagy akár eddig végre nem hajtott, teljesen új idegenfajú keresztezések megvalósítására (búza × rizs megporzások).

3. Irodalmi áttekintés

3. 1. A növényi embriógenezis útjai

A növényi embriók a leendő utódnemzedék kiindulópontját jelentik. Megfelelő szintű kifejlődésük, valamint túlélésük meghatározza a következő generáció sikerességét. Az embriókban már megjelennek mindazok az alapstruktúrák, így a folyamatos növekedést lehetővé tevő merisztémaszövetek, továbbá a hajtás és a gyökér kezdeményei, melyek az új generáció növényegyedeinek felépítésében részt vesznek. Az embriók tanulmányozása alapvető fontosságú, mivel e folyamat teljes körű megismerése szükséges ahhoz, hogy e fejlődési út mesterségesen kontrollálható módon, a növénytermesztés szempontjából kedvező irányban befolyásolható legyen.

Az embriógenezis legáltalánosabb kiindulási sejtje a megtermékenyített petesejt vagy más néven zigóta. Növények szexuális úton kizárólag így, a petesejt megtermékenyítését követő embriófejlődéssel jöhetnek létre. E folyamat az ún. zigotikus embriógenezis, és eredménye az anyai és apai géneket rekombinált formában tartalmazó növény.

Embriók és belőlük növények azonban nem csak a zigótából fejlődhetnek ki, hanem minden olyan sejtből, mely kompetenssé válik az embriógenezis fejlődési programjának megvalósítására. Az embriógenezisre való kompetencia azt jelenti, hogy a sejt polarizálttá válik, azaz meghatározott biokémiai grádiensek épülnek fel benne, és képes lesz az embriógenezist kiváltó hormonális vagy stressztényezők szignálként való felfogására. Haberlandt (1902) elmélete szerint elvileg minden sejt képessé tehető az embriógenezisre, ezt jelenti a növényi sejt totipotenciája. Mára bebizonyították, hogy erre ugyan nem minden, de megfelelő körülmények között valóban nagyon sokféle sejt képessé tehető (pl. szomatikus sejtek, mikrospórák, megtermékenyítetlen petesejtek). A tenyészetekbe helyezett explantátumok sejtjei dedifferenciálódhatnak, és közülük a kompetenssé váló sejtek redifferenciáció révén megkezdhetik és végrehajthatják az embriógenezis programját (Burgess, 1985). A mechanizmus, ahogyan egy sejt az embriógenezisre képessé válik, azaz ebben az értelemben aktiválódik, azonban még csak részben feltárt és jelenleg is intenzív kutatások tárgyát képezi (Fehér és mtsai, 2003; Jimenez, 2005; Maraschin és mtsai, 2005a; Sprunck és mtsai, 2005; Venglat és mtsai, 2005).

Az embriófejlődés tehát aszexuális úton is megvalósulhat, és bizonyos esetekben ez a természetben is megtörténik. Ilyen esetek pl. a haploid parthenogenezis, amikor a petesejt megtermékenyítés nélkül is embrióvá fejlődik (pl. a *Hieracium rubrum* nevű hölgymál faj, Krahulcova és mtsai, 2004). Egy másik, igen különleges eset, hogy miután a petesejt

megtermékenyül, sejtmagja felszívódik, és az eredmény az apai genom és az anyai citoplazma kombinációjából létrejövő embrió lesz. Ez a hím parthenogenezis, mely a szaharai ciprusnál (*Cupressus dupreziana* A. Camus) fordul elő (Pichot és mtsai, 2001). A természetben szintén nagyon ritka a mikrospóra-embriógenezis, amikor a portokokban a haploid mikrospórákból embriók fejlődnek (Rammana, 1974: burgonyafélék fajhibridjei; Koul és Karihaloo, 1977: *Narcissus biflorus* W. Curtis). Gyakoribb jelenség az apomixis, amikor az ovulumban a makrospóra anyasejt nem szabályos meiózisának következtében diploid sejtből, megtermékenyítés nélkül fejlődik az embrió (Asker és Jerling, 1992; Bicknell és Koltunow, 2004).

Mindezekben az esetekben az embriók mélyen az anyai szövetek belsejében helyezkednek el, ami nagymértékben megnehezíti tanulmányozásukat. A természetben ebből a szempontból egyedül az „elevenszülő" növények jelentenek kivételt, ahol nem reproduktív szervek szomatikus sejtjeiből fejlődnek ki az embriók (szomatikus embriók), mint pl. a *Malaxis* fajok levélszélein (Taylor, 1967). Ez azonban nem jelent megoldást az embriófejlődés tanulmányozására a gazdaságilag fontos növények esetében.

Az *in vitro* tenyésztési rendszereknek köszönhetően azonban olyan sejtekből is kifejlődhetnek embriók, amelyekből természetes körülmények között sohasem fejlődnének ki. Ezekre legjelentősebb példák a mikrospóra-embriógenezis, melyet már több száz fajnál megvalósítottak (Kasha és mtsai (szerk), 2006), valamint a szomatikus embriógenezis, melynek eredményeképpen szintén a fajok széles körében (több mint 70 faj) előállítottak már növényeket.

A mikrospóra és a szomatikus embrió kultúrák előnye, hogy bennük nagy számban fejlődhetnek az anyaszervezettől független, szabadon álló embriók, melyek nagyon jól használhatók a fejlődésbiológiai, élettani, analitikai és molekuláris biológiai kutatásokban. A sejttenyésztési módszerek gyors fejlődésének köszönhetően már bizonyos fajokban – bár korlátozott számban – az egyedileg izolált zigóták is felnevelhetők, így napjainkban a zigotikus embrióknak is lehetővé válik az eddiginél mélyrehatóbb vizsgálata.

Az *in vitro* környezetben fejlődő embriók morfológiai, citológiai, biokémiai és génexpressziós vizsgálatával a zigotikus embriógenezis modellezhető, ill. a különböző sejtekből kiinduló embriófejlődési rendszerek összevethetők és az embriógenezisre, mint fejlődési programra vonatkozó általános következtetések vonhatók le (Touraev és mtsai, 1995, 2001; Kasha és mtsai, 2001; Maraschin és mtsai, 2005a-d; Sprunck és mtsai, 2005). Az embriótenyésztési rendszerek különböző vegyületek hatásának tanulmányozására is kiválóan alkalmasak (Hu és mtsai, 1995; Pulido és mtsai, 2005, 2006a). Mindezek alapot nyújtanak e

fejlődési program befolyásolására (Leduc és mtsai, 1996) és ezen keresztül a termésminőség és a termésbiztonság növelésére. A petesejt eredetű embriók *in vitro* tenyésztése utat nyithat idegenfajú keresztezések megvalósításához is, hiszen segítségével a fajok közötti posztfertilizációs inkompatibilitás fontos tényezői kikerülhetők (Kranz és Dresselhaus, 1996). A szomatikus embriók *in vitro* tenyésztésével számos növény ivartalan szaporítása megoldható, míg a mikrospóra, vagy petesejt eredetű embriókból fejlődő haploid és kettős haploid növényeknek a növénynemesítésben lehet jelentős szerepük. A felsorolt eredményekből (Heszky, 2003) látható, hogy az embriók *in vitro* tenyésztése mind fejlődésbiológiai szempontból, mind gazdaságilag fontos kutatási terület.

A zigotikus és mikrospóra embriógenezist részletesen tárgyaljuk a következő alfejezetekben, a szomatikus embriógenezis azonban nem képezi a munkánk tárgyát, ezért itt csak néhány összefoglaló tanulmányra hivatkozunk (Jimenez, 2005; Mujib és Samaj (szerk.), 2006; Bajaj (szerk.), 1995).

3. 2. Növényi embriók *in vivo* fejlődése

A növényeknél az utódok létrehozásának módja a természettudományos kutatások kora előtt csupán filozófiai kérdésként vetődhetett fel. A növényi szaporodás tudományos vizsgálatához a mikroszkóp felfedezésén (Leeuwenhoek, 1677) túl következetes kísérletezésekre és megfigyelésekre is szükség volt. Amikor már mindezek a feltételek adottak voltak, csak akkor kerülhetett sor olyan lényeges felfedezésekre, mint a pollen szerepének tisztázása (Camerarius, 1694; Kölreuter, 1761), a pollenszemek tömlőhajtása a bibén (Amici, 1824), a növényi gaméták fúziója (Strasburger, 1884), a zárvatermők kettős megtermékenyítése (Nawaschin, 1898) és az embriófejlődés morfológiai leírása az egyszikűekben és a kétszikűekben (Hanstein, 1870; Johansen, 1950; Yakovlev és Joffe, 1957; Batygina, 1969). Ma már ismert, hogy az embriók genetikailag és epigenetikailag meghatározott program alapján adott mintázat szerint fejlődnek a növényben.

A zigotikus embriógenezis a bibe megporzódását követően a megtermékenyítéssel indul. A megporzódás során a bibére került pollenszemek hidratálódnak, majd pollentömlőket hajtanak. A pollentömlők behatolását a bibe felszínén jelen lévő lipidek segítik elő (Wolters-Arts és mtsai, 1998). A bibe szövetei különböző vonzó és taszító hatású kémiai szignálok segítségével irányítják a pollentömlők növekedését, miközben táplálásukat is biztosítják. Arabidopsis mutánsok elemzésével és fiziológiai vizsgálatokkal kimutatták, hogy a pollentömlők növekedésében fontos szerepe van a pektin-metilészteráznak, valamint hogy a GABA (γ-amino-vajsav, Palanivelu és mtsai, 2003), a Ca^{2+} (Higashiyama és mtsai, 2003), a

NO (nitrogén-monoxid, Prado és mtsai, 2004) és bizonyos kis méretű, transzmembrán doménnel rendelkező proteinek (Márton és mtsai, 2005) fontos szignálok. A szignálok forrása az ovulumban ill. az embriózsákban van (Shimizu és Okada, 2000) és maga a petekészülék, ill. degenerálódó szinergida is a pollentömlőt vonzó szignálokat bocsát ki (Higashiyama és mtsai, 2001; Márton és mtsai, 2005). A pollentömlők a degenerálódó szinergidán keresztül hatolnak be az embriózsákba és ott kiürítik tartalmukat. Ekkor szabaddá válnak a hímivarsejtek magvai, melyek feltehetően a szinergida és a pete- ill. központi sejtek határán lévő ún. aktin-korona segítségével továbbítódnak, és ezután fuzionálnak az említett sejtekkel (Huang és Russell, 1994 ; Zhang és Russell, 1999), majd azok magvaival (Jensen, 1964; Carmichael and Friedmann, 1995).

A növényi zigóták (gyakran már a petesejtek is) jól definiált polaritással rendelkeznek, mely hatással van a későbbi sejtosztódásokra is. Az embrió környezete (a magasabb rendű növényekben az anyai szövetek) által meghatározott polaritás kulcsfontosságú a normális embriófejlődésben, azaz az embriótengely helyes kialakításában és a szervek megfelelő differenciálódásában. A növényi zigóták polaritását és a korai sejtosztódásokat a modellként használt Fucus barnaalga fajokon tanulmányozták behatóbban (Bouget és mtsai, 1996, Belanger és Quatrano, 2000; Corellou és mtsai, 2001). E vizsgálatok során kiderült, hogy a megfelelő sejtpolaritás bár nem feltétele a zigóták/proembriók osztódásainak, elengedhetetlen az embriók normális differenciálódásához. Azt is bebizonyították, hogy a polaritás egy kalciumfüggő foszforilációs szignál-transzdukciós kaszkád eredményeképpen alakul ki. E folyamatban kulcsszerepe van az aktin filamentumok elrendeződésének és az auxin sejten belüli transzportjának (Sun és mtsai, 2004).

A növényi zigóták és embriók polaritása és differenciálódása az endogén hormonok és a környezeti tényezők által befolyásolt, megfelelően szabályozott gének összehangolt működésének eredménye (Drea és mtsai, 2005; Jenik és Barton, 2005; Okamoto és mtsai, 2005; Sprunck és mtsai, 2005; Venglat és mtsai, 2005; Weijers és Jürgens, 2005; Ning és mtsai, 2006; Raghavan, 2006a-d; He és mtsai, 2007). A zigóták említett polaritásának köszönhetően a növények többségében e sejt aszimmetrikusan osztódik, melynek eredményeképpen egy alapi és egy csúcsi sejtet tartalmazó, kétsejtes proembrió jön létre. A proembrió sejtjeinek osztódási mintázata ugyan különböző a zárvatermőkben (*Onagrad, Asterad, Chenopodiad, Caryophyllad, Piperad, Paeoniad* és *Graminad* típusok; Johansen, 1950; Yakovlev és Joffe, 1957; Batygina, 1968), de a gömbszerű proembrió kifejlődése, majd a proembrió-embrió átmenet során az egyes szervek differenciációja a kétszikűeken és egyszikűeken belül nagyon hasonló. A kétszikűekben a proembrió alapi sejtjéből a

szuszpenzor és a későbbi gyökércsúcs fejlődik, a csúcsi sejtből pedig az embrió összes többi része. Az így kifejlődő struktúra részei tehát a szuszpenzor és az „*embryo proper*" azaz maga az embrió. Magát az embriót egy egysejtsoros bőrszöveti réteg, ún. protoderma határolja, míg a szuszpenzor részt nem fedi ilyen sejtsor.

Amíg azonban nem történik meg a zigóta leánysejtjeinek differenciálódása, addig még csak proembrióról beszélhetünk. A proembrió akkor válik embrióvá, amikor sejtjeinek hosszanti differenciálódásának következtében kialakul a három merisztematikus sejtréteg, a protodermisz, a prokambium és az alapmerisztéma. Ezt a stádiumot nevezzük átmeneti fejlődési állapotnak (*transition phase*). A kétszikű zárvatermőkben ezt követően az embrió szubepidermális sejtjeiből differenciálódnak a sziklevelek (*cotyledon*), és ezek között az embrió tengelye a hajtáscsúccsal (*plumula*), a sziklevél alatti szárrésszel (*hipokotil*), és a gyökércsúccsal (*radicula*). A sziklevelek növekedésével az embrió a szív stádiumba lép. Ezt követően a már differenciálódott szervek további fejlődésének és növekedésének köszönhetően az embriók torpedó, sétabot, majd U-alakot vesznek fel. Az embriók ezzel párhuzamosan tartaléktápanyagokat halmoznak fel, majd végül nyugalmi állapotba kerülnek és a maggal együtt dehidratálódnak (Maheshwari, 1950; Gyurján, 2004).

Hasonlóan a kétszikűekhez, a búza és általában a pázsitfűfélék *in planta* embriógenezise a körte alakú, már polarizált petesejt (Naumova és Matzk, 1998) megtermékenyítését követő aszimmetrikus osztódással kezdődik (Morrison, 1955; Bennett és mtsai, 1973; Natesh és Rau, 1984; van Lammeren, 1986; Engell, 1989). Az első osztódás eredményeként két leánysejt, a csúcsi és az alapi sejt harántfallal van elválasztva egymástól. A búza esetében a két sejt térfogata és organellumainak elrendeződése és citoplazmatikus tulajdonságai meglehetősen hasonlók, bár alakjuk eltér (Bennett, 1973). A többi gabonafélében a leánysejtek közötti citológiai különbségek nagyobbak (Natesh és Rau, 1984). A csúcsi sejt hosszanti (longitudinális) irányban osztódik először, majd a proembrió további osztódásainak mintázata fajonként, sőt néha a környezeti tényezők függvényében fajon belül is (Suzuki és mtsai, 1992) eltérően alakul. Általában (pl. a kukoricára, búzára, árpára) jellemző, hogy az első osztódási ciklus ideje viszonylag hosszú, kb. egy teljes nap, majd az ezt követő osztódások ciklusonkénti ideje csökken, azaz egy nagyon gyors osztódási folyamat indul be, és jellemzi a globuláris proembriók fejlődési stádiumát. Ennek eredményeképpen eleinte csak lassan, majd ugrásszerűen megnő a proembrió sejtjeinek száma. Ellentétben a kétszikűekkel, az egyszikűekben nem különíthető el élesen az embrió a szuszpenzortól, bár a szuszpenzor tápláló és szállító funkcióját itt is el kell látni. A gabonafélék embrióira is igaz, hogy az embrió alapi részén vakuolizáltabb, transzfer funkciójú sejtek vannak, míg a többi

részt organellumokban gazdag citoplazmájú sejtek építik fel, így az embrió alapja felé egyre növekedik a sejtek mérete és vakuolizáltsága (Suzuki és mtsai, 1992).

Mire az embrió eléri az átmeneti stádiumot (*transition phase*), bunkóhoz hasonló alakú lesz (ún. *club-shaped embryo*). Ebben a stádiumban az embrió csúcsát kisméretű, citoplazmában gazdag sejtek építik fel, és az embrió alapja felé egyre növekedik a sejtek mérete és vakuolizáltsága. Ezt követően, az említett gabonafélék esetében a 6-8. nap körül differenciálódnak az embrió szervei: láthatóvá válik a hajtáscsúcs merisztémája és az ezt körülvevő rügyhüvely (*coleoptyl*) gyűrűje, ill. az embrió belsejében megjelenik a gyökércsúcs merisztéma és a koleoriza (*coleoptylar phase*). Ezután az embrió tengelyéhez képest oldalt levő rész nagyon megduzzad, kialakítva a sziklevelet (*scutellum*). Még az embrió éretté válása előtt 3-5 levélkezdemény fejlődik ki a rügyhüvely alatt, és megkezdődik az embrió nyugalmi állapotra való felkészülése. Végül, a kétszikűekhez hasonlóan, az érett embrió a szemterméssel együtt dehidratálódik és képessé válik a hosszú idejű túlélésre, majd kedvező körülmények közé kerülve a csírázásra és új növényegyed kifejlődésére (Batygina, 1969; Suzuki és mtsai, 1991, 1992, 1993, 1994, 1996).

Mikroanalitikai módszerekkel, hormon-transzport inhibitorokkal, enziminhibitorokkal, funkcióvesztést ill. –nyerést eredményező mutánsok és transzgenikus növények analízisével már részletesen, de messze nem teljeskörűen tisztázták az egyes hormonok valamint az általuk befolyásolt gének szerepét az embriógenezis folyamán.

Az egyes hormonok a génexpressziós mintázat változtatása útján szabályoznak. Az auxin a proembrió majd az embrió sejtjeinek pozíciótól függő differenciálódásában és így az egyes szervkezdemények kialakításában tölt be meghatározó szerepet (Friml és mtsai, 2003; Jenik és Barton, 2005). Az auxin sejtről sejtre szállítását az *AUX1* (sejtbe be) és *PIN* (sejtből ki) proteinek végzik. A sejtek auxinra adott válaszreakcióját az *ARF* transzkripciós faktorok (pl. *MP*: *MONOPTEROS*) teszik lehetővé, míg e válasz kiváltódását a *BDL* (*BODENLOS*) gátolja (Hamann és mtsai, 2002). Az auxin a kétsejtes proembrió csúcsi sejtjében, majd annak leánysejtjeiben halmozódik fel. A globuláris stádiumban a csúcsi részekből az auxin áthelyeződik az embrió bazális területére, ahol a gyökérmerisztéma kialakításáért felelős géneket indukál, majd ezt követően a sziklevelek csúcsaiban is felhalmozódik, és részt vesz a sziklevelek és a csúcsi merisztéma differenciációjában (Friml és mtsai, 2003; Jenik és Barton, 2005). Az auxinon felül az embriógenezisben természetesen a többi növényi hormon is részt vesz. A brasszinoszteroidok amellett, hogy elősegítik az auxin transzportját, a sejtnövekedésben fontosak (Bao és mtsai, 2004). A citokininek a korai sejtosztódások ütemét szabályozzák, majd a szállítóedények kialakításában is részt vesznek (Schmulling, 2002). A

citokininek az auxinnal ellentétes hatásúak pl. a hajtáscsúcs merisztémában (Shani és mtsai, 2006). Az auxin gátolja a citokinin-bioszintézist (Nordström és mtsai, 2004). A gibberellinek a merisztémaszövetek épségének megőrzéséhez szükségesek és az auxinnal szinergisztikusan hatnak (Fu és Harberd, 2003). Emellett az embrió tengelyének megnyúlásos növekedését idézik elő, és a csírázást és az ezzel járó tartaléktápanyag-mozgósítást siettetik (Rood és mtsai, 1987 A; Hays és mtsai, 2001). Az abszcizinsav viszont éppen ellentétes hatású: az embrió felkészül a nyugalmi állapotra és csírázása gátlódik. Ennek megfelelően az abszcizinsav elősegíti a tartaléktápanyagok felhalmozódását, és az embriót képessé teszi a dehidratáció elviselésére (White és Rivin, 2000). Az embrió kicsírázása tehát csak alacsony abszcizinsav/gibberellin aránynál lehetséges (White és mtsai, 2000).

Az embriófejlődés genetikai hátterének kutatásában a funkciómódosulást eredményező egyszerű és többszörös lúdfű-mutánsok elemzésével érték el a legtöbb eredményt (Raghavan, 2006b). A megtermékenyítés hatására, ill. a zigóta osztódásakor a génexpressziós mintázat feltárása csak napjainkban bontakozik ki. Ezekből az anyai szövetekbe mélyen beágyazott sejtekből ugyanis csak a legutóbbi időben vált lehetségessé megfelelő mennyiségű és minőségű RNS kivonása, így cDNS könyvtárak készítése és a transzkripciós profilok vizsgálata (Le és mtsai, 2005). Ilyen vizsgálatokról egyelőre csak a kukorica (Okamoto és mtsai, 2005; Yang és mtsai, 2006), a búza (Sprunck és mtsai, 2005) és a dohány (Ning és mtsai, 2006) esetében számoltak be. E vizsgálatok eredményeként kimutatták, hogy a petesejtekben nagy mennyiségben vannak jelen a transzkripcióért, valamint a proteinszintézisért és lebontásért felelős génekről átíródott mRNS-ek, ami intenzív proteinkicserélődésre (magas turn over ráta) utal (Okamoto és mtsai, 2005; Sprunck és mtsai, 2005). A petesejtek tehát intenzívebb anyagcserét mutatnak, mint azt korábban gondolták (You és Jensen, 1985; Taylor és Vasil, 1995). A petesejt proteom-analízisének eredményei is összhangban vannak e feltételezéssel, ui. a legnagyobb mennyiségben előforduló fehérjék többsége a lebontó anyagcserében részt vevő enzimek közül került ki (Okamoto és mtsai, 2004). Mindezeken felül számos, csak a petesejtben expresszálódó gént is felfedeztek (pl. új F-box proteineket, cink-ujj fehérjéket, ismeretlen fehérjéket kódoló géneket), melyek a petesejt identitásáért és a pollentömlők irányításáért lehetnek felelősek. A petesejt-specifikus gének közül különösen izgalmasak azok, melyek kisméretű, szekretálódó polipeptideket kódolnak (pl. *ZmES1-4*: Cordts és mtsai, 2001; *TaECA1-like*: Vrinten és mtsai, 1999; Kumlehn és mtsai, 2001; Fehér és mtsai, nem publikált eredmények). Ezek feltehetően receptor kináz-szerű proteinekhez kötődő szignálmolekulák, és defektusuk nő-sterilitást okoz. A petesejt intenzív szekréciós tevékenységét mutatja az is, hogy nagy mennyiségben

tartalmazza a membrán-forgalmat irányító annexin mRNS-ét (Ning és mtsai, 2005; Okamoto és mtsai, 2004).

Az állati embriókról jól ismert, hogy 8-16 sejtes állapotig az anyai gének termékei irányítják a sejtek működését. Számos publikáció megjelent a növényi embriók és endospermium korai fejlődésének anyai kontrolljáról is (Colombo és mtsai, 1997; Schauer és mtsai, 2002; Grimanelli és mtsai, 2005), azonban bizonyos fajokban (dohány, kukorica, búza) bebizonyították, hogy zigótában újonnan szintetizálódó mRNS-ek is jelen vannak és közülük több a fejlődést szabályozó szerepet tölt be (Scholten és mtsai, 2002; Okamoto és mtsai, 2005; Sprunck és mtsai, 2005; Ning és mtsai, 2006). Az viszont még nem bizonyított, hogy a zigótában átíródott mRNS-ek közül vannak az apai genomról származók is.

A megtermékenyítést követően indukálódó gének közül sok a kromatin szerveződés, a DNS metiláció és a sejtciklus szabályozásában vesz részt és a vegetatív szövetekben is expresszálódik (Sprunck és mtsai, 2005). Ezekre jellemző példák a retinoblasztóma-asszociált és a *SET*-domén proteineket kódoló gének.

Bizonyos szignál-peptideket kódoló gének mind a petesejtben, mind a kétsejtes proembrióban aktívak. Ilyenek pl. az *LPT1* (Buhot és mtsai, 2001), a patogének elleni védekezésben szerepet játszó *PR1* (pathogenesis-related: van Loon, 1990; Casacuberta és mtsai, 1991) gének és egy gibberellin által indukálódó és a fejlődésszabályozásban részt vevő gén (Aubert és mtsai, 1998).

A *WOX* (*WUSCHEL-related homeobox*) transzkripciós faktorokat kódoló gének expressziója a proembriók és embriók viszonylag kisebb sejtcsoportjaira terjed ki, és e DNS-kötő proteinek a sejtek további sorsának (differenciálódásának, elkötelezettségének) meghatározásában vesznek részt. A lúdfűben a *WOX2* gén a kétsejtes proembrió csúcsi, a *WOX8* pedig az alapi sejtjére specifikus, és e gének az embrió csúcsi-alapi mintázatának kialakulásáért felelősek. A *WOX9* gén a proembrió alapi sejtjeiben expresszálódik először, majd ez kiterjed az embrió központi részére is (Haecker és mtsai, 2004). A dohány esetében a *WOX9* gén transzkriptumát azonban már a zigótákban megtalálták. E gén tehát szerepet játszhat a zigóták polaritásának kialakításában és ennek révén már ekkor eldőlhet a leánysejtek további sorsa (Ning és mtsai, 2006). Egy másik lehetőség viszont, hogy a két leánysejt különböző sorsa csak az anyai szövetekből származó szignálok révén determinálódik (Weijers és Jürgens, 2005; vö. a búza zigóták citológiailag igen hasonló leánysejtjeivel: Kumlehn és mtsai, 1998, 1999).

A pázsitfűfélék közül eddig elsősorban a kukorica és a rizs embriók differenciálódásáról vannak elérhető információk. A kukoricában a csúcsi sejtből kifejlődő

organellumokban gazdag leánysejtekre a *ZmHox1 és ZmHox2* (*Zea mays homeobox*) transzkripciós faktorok jellemzőek. A bazális sejt leánysejtjeiben viszont a szuszpenzor markernek tekintett *ZmOCL3* (*Zea mays OUTER CELL LAYER3*) homeobox transzkripciós faktor van jelen (Clark, 1996; Ingram és mtsai, 2000).

A fiatal embriókban már kialakulnak a növény egész további fejlődését meghatározó merisztémák is (Raghavan, 2006a; Shani és mtsai, 2006). A *WUS* (*WUSCHEL*) transzkripciós faktor a hajtáscsúcs merisztéma szövetének folyamatos fennmaradásáért felelős azáltal, hogy megakadályozza a merisztémát szervező központi sejtcsoport (stem cell organizing centre) differenciálódását (Mayer és mtsai, 1998). Vele ellentétes hatásúak a *CLV* (*CLAVATA*) gének termékei, melyek korlátozzák a merisztémát szervező központ nagyságát, és hatásukra e központból kilépő merisztémasejtek az egyes szerveket létrehozó sejtekké válnak (Willemsen és Scheres, 2004; Raghavan, 2006a). Ezzel analóg szabályozó rendszer működik a gyökércsúcs merisztémájában is (Hobe és mtsai, 2003; Casmitjana-Martinez és mtsai, 2003; Fiers és mtsai, 2004; Raghavan, 2006a). Az embriók sugárirányú differenciációja során alakulnak ki az egyes szöveti rétegek, így az oldalmerisztémák és az epidermisz. Ezek differenciálódásában kulcsszerepet játszó gének közül talán a *KN* (*KNOLLE*), a *KEU* (*KEULE*), az *SCR* (*SCARECROW*) és az *SHR* (*SHORT ROOT*) funkcióját ismerjük a legjobban (Raghavan, 2006a). Az egyszikűekben (kukoricában) a *ZmOCL1* gén a protodermiszben és a hajtás-, ill. gyökércsúcs merisztéma sejtjeiben is expresszálódik; a *ZmOCL4* és *ZmOCL5* viszont a protodermisz bizonyos területeire specifikus (Ingram és mtsai, 1999; 2000). A rizsben a *Roc1* (*rice outermost cell-specific1*) expressziója már jóval a protodermisz kialakulása előtt előre jelzi e szövet kialakulását (Ito és mtsai, 2002). A morfológiailag már kifejlett embrióknak elegendő tartaléktápanyagot kell felhalmozniuk, hogy a csírázásig túléljenek, és el kell viselniük a nyugalmi állapotban fennálló dehidratált állapotot. Ezeknek a folyamatoknak a szabályozásában az egymással is kölcsönható *LEA* (*LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT*), *LEC1* (*LEAFY COTYLEDON1*), *LEC2* és *ABI* (*ABA-INSENSITIVE*) gének által kódolt proteinek a legfontosabbak (Harada, 2001; Bentsink és Koornneef, 2002; Raghavan, 2006c).

Az embriózsákban a petesejt mellett a másik női gaméta, a központi sejt is megtermékenyül, és belőle az embrió számára létfontosságú, tápláló és raktározó szerepű endospermium is kifejlődik (Smart és O'Brien, 1983; Gyurján, 2004; Raghavan, 2006d). Celluláris típusú endospermium alakul ki, ha a megtermékenyített központi sejt magjának osztódását citokinézis is kíséri. Amennyiben azonban csak a magvak osztódnak, de nem alakulnak ki sejtfalak, nukleáris típusú endospermiumról beszélünk. A sejtesedés ebben az

esetben is megtörténik, de csak később és fokozatosan: a magok között sejtfalak szintetizálódnak a perifériától a központi vakuólum irányába. A gabonafélék endospermiuma ez utóbbi típusba sorolható. A sejtesedést követően az S-fázis ciklin dependens kináz megnövekedett aktivitása és az M-fázis ciklin dependens kináz gátlása eredményeként sokszoros ploidiaszintű sejtek jönnek létre. E genomamplifikáció funkcióját nem bizonyították, de valószínűleg a nagy mennyiségű tartaléktápanyag szintéziséhez szükséges intenzív anyagcserét ill. transzkripciót teszi lehetővé. Nem kizárt az sem, hogy a magas fokú endopoliploiditásnak a nukleotidraktározás is célja.

A gabonaféléknél az endospermium fő tömegét keményítőraktározó sejtek alkotják, melyekben azonban protein (glutelinek, prolaminok, albuminok és globulinok) és esetenként lipidfelhalmozódás is történik. A külső sejtréteg, az ún. aleuronréteg proteintestjeiben nagy mennyiségben van jelen a csírázáskor működésbe lépő α-amiláz. Az embriót körülvevő régió és a bazális endospermium transzfer réteg sejtjei vakuolizáltak és nem halmoznak fel tartaléktápanyagokat, szállító ill. az embriót tápláló szerepük van.

Az endospermiumban a szülői genomok transzkripciójának egyensúlyáért a DNS-metilációban szerepet játszó *MEA* (*MEDEA*), ill. *MET1* (*METHYLTRANSFERASE1*) és *DME* glükoziláz gének felelősek (Xiao és mtsai, 2003). A sejtek differenciációját helytől függően más-más gének szabályozzák: az embriót körülvevő területre jellemző az *Esr* (*EMBRYO SURROUNDING REGION*: Opsahl-Ferstad és mtsai, 1997) és a sporofitikusan fejlődő kukorica mikrospórákban felfedezett *ZmAE1* (*Zea mays ANDROGENIC EMBRYOS1*: Magnard és mtsai, 2000) gének expressziója. A bazális endospermium transzfer réteg differenciációjában játszik szerepet a *ZmMRP1* (*Zem mays MYB-RELATED PROTEIN1*: Gómez és mtsai, 2002), míg a *BETL* (*BASAL ENDOSPERM TRANSFER LAYER*: Hueros és mtsai, 1999b) fehérjék főleg a patogének elleni védekezésben játszanak szerepet. differenciációját felelősek. Az aleuronréteg kialakításában a *CR4* (*CRINKLY4*), *DEK1* (*DEFECTIVE KERNEL1*) és *SAL1* (*SUPERNUMERARY ALEURONE1*) gének kulcsfontosságúak (Shen és mtsai, 2003). A keményítős endospermium normális működéséért felelős génekről számos *sex* (*shrunken endosperm expressing xenia*) és *dex* (*defective endosperm expressing xenia*) mutáns ismerete nyújt információkat (Bosnes és mtsai, 1992). Természetesen mindezeken felül számos, a tartaléktápanyagok felhalmozódást lehetővé tevő gén működésére is szükség van az endospermiumban.

A fentiekben bemutatott szakirodalomból látható, hogy a növényekben az embriók fejlődése egy finoman szabályozott, meghatározott sorrendű eseményeket magában foglaló összetett folyamat, melynek kutatásához komoly segítséget nyújt a zigóták in vitro tenyésztése.

3. 3. Petesejt/zigóta eredetű embriók tenyésztése

Ahhoz, hogy a zigóták *in vitro* felnevelésére alkalmas tenyészetek az embriógenezis tanulmányozására jól használhatók legyenek, olyan optimális körülményeket kell biztosítani a mesterséges környezetben fejlődő zigótáknak, hogy az embriógenezis folyamatát ne zavarjuk meg. E feltétel teljesülésének nagyon jó fokmérője, ha az *in planta* és *in vitro* fejlődő embriók morfológiáját összehasonlítjuk. Elérendő cél tehát, hogy olyan tenyészeteket tudjunk előállítani, melyben az embriók fejlődése minél jobban megközelíti a következőkben ismertetett természetes utat.

Embriók *in vitro* körülmények közötti tenyésztésében Hannig (1904) aratta az első sikert, aki retek és torma magjaiból izolált embriókat nevelt életképes növényekké makroelemeket és szacharózt tartalmazó táptalajon. Ezt követően egyre több fajból és egyre fiatalabb embriókat tudtak *in vitro* környezetben termékeny növénnyé nevelni. Miután felismerték, hogy a növényi, elsősorban endospermiumból készült kivonatok kedvezően hatnak az embriók fejlődésére, még jobban kiszélesedett az *in vitro* környezetben felnevelhető embriók köre. 1942-ben már egészen fiatal embriókat is fel tudtak nevelni kókusztejet tartalmazó tápoldatokban (csattanó maszlag, *Datura stramonium*, van Overbeek és mtsai), néhány évvel később pedig már sor került az első gabonaféle proembrióinak *in vitro* felnevelésére is (árpa, Kent és Brink, 1947). Mivel azonban a proembriókat nagyon nehéz, az annál is fiatalabb zigótákat pedig abban az időben még lehetetlen volt sértetlenül izolálni, az ovulumok tenyésztésével is próbálkoztak. E módszerrel elsőként a kerti mák (*Papaver somniferum*, L.) zigótáit és proembrióit sikerült felnevelni (Maheshwari, 1958). Gabonafélék közül az árpa zigóták növénnyé nevelését valósították meg így először (Töpfer és Steinbiss, 1985). A későbbiekben azonban már több magasabbrendű növény ivarsejtjeit ill. osztódás előtti zigótáit tudták életképes állapotban izolálni (Wagner és mtsai, 1989; Theunis és mtsai, 1991; Kovács és mtsai, 1994), és így elérhető céllá vált az *in vitro* megtermékenyítés (Kranz és mtsai, 1990; Faure és mtsai, 1993) és az embriók kiindulási állapotból történő *in vitro* felnevelése. Izolált zigótákból *in vitro* tenyésztéssel elsőként épp a gabonafélék esetében neveltek fel növényeket. Kranz és Lörz (1993) az *in vitro* megtermékenyítéssel előállított kukorica zigótákat, majd Holm és mtsai (1994) az árpából és a búzából izolált, *in vivo* megtermékenyített petesejteket nevelték termékeny növénnyé *in vitro* körülmények között. Alig egy évvel később Kovács és mtsai (1995) az *in vitro* megtermékenyítéssel nyert búza zigótákat is további fejlődésre késztették, melynek eredményeképpen soksejtes struktúrákat kaptak. Ezt követően Leduc és mtsai (1996) a kukoricából izolált zigótákba mikroinjektálással

glükuronidáz riportergént, valamint az antocián bioszintézisét szabályozó gént jutattak, és kimutatták ezek tranziens expresszióját. Holm és munkatársainak (2000) már transzgénikus növényeket is sikerült előállítaniuk árpa zigóták konstitutív promóterhez kapcsolt β-glükuronidáz génnel történő mikroinjektálásával és azt követő *in vitro* felnevelésével. A stabil transzformáns növények gyakorisága azonban nagyon alacsony volt (2 növény/599 injektált zigóta). Izolált búza zigótáknak az ovulumba történő visszaültetésével is fel lehet nevelni növényeket, de ez még a többi módszerhez képest is igen precíz és hosszadalmas munkát igénylő folyamat (Kumlehn és mtsai, 1997, 1998). Mára már a rizs (Zhang és mtsai, 1999) és a dohány (He és mtsai, 2004) izolált zigótáit, továbbá a genetikai modellnövénynek tekintett lúdfű (Sauer és Friml, 2004) ovulumban tenyésztett zigótáit is növénnyé nevelték *in vitro* körülmények között. Sőt, nemcsak zigótából, azaz megtermékenyítéssel aktivált petesejtből, hanem a parthenogenezisre képes, ún. Salmon-búzából izolált, megtermékenyítetlen petesejtekből is lehetséges *in vitro* körülmények között az embrióvá, majd növénnyé fejlődés (Kumlehn és mtsai, 2001).

Bár az izolált zigóták és más módon osztódásra bírt (ún. aktivált) petesejtek potenciális biotechnológiai jelentőségét már régen felismerték (Holm és mtsai, 1994), és az előbbiekben említett, nagyon érdekes és biztató megfigyelések már jó néhány évvel ezelőtt megszülettek, egyelőre még nem sikerült e területen a gyakorlatban is hasznosítható jelentős eredményt elérni. E cél eléréséhez valószínűleg nem lehet elkerülni az egyedileg izolált sejtek felnevelését célzó, ún. egy-sejt tenyésztési rendszer továbbfejlesztését, hogy könnyebben kivitelezhető legyen.

A minden értelemben heterotrófnak tekinthető izolált zigóták (és proembriók) speciális környezeti igényeit és *in vitro* tenyészthetőségük bonyolultságát mutatja, hogy e sejteket egyelőre csak dajkaként szolgáló egyéb növényi részekkel együtt lehet felnevelni. Dajkasejtek híján az izolált zigóták csupán néhány osztódási ciklusra képesek és így legfeljebb további növekedésre képtelen mikrokalluszok fejlődhetnek belőlük (Holm és mtsai, 1994). Mindez közvetett bizonyítékul szolgál arra, hogy a dajkasejtek a növekedést és differenciálódást serkentő anyagokat bocsátanak ki a tápközegbe. Természetes körülmények között a fejlődő zigóták számára ezeket az anyagokat az endospermium és az anyai szövetek biztosítják. Ezeknek az anyagoknak megismerése és koncentrációjuk pontos meghatározása az embriózsákban lényegesen megkönnyítené az embriók *in vitro* tenyésztését, hiszen olyan tápoldatot lehetne tervezni, amely hűen utánozná az anyai szövetek által létrehozott környezetet. Éppen ezért már több ízben is végeztek analitikai vizsgálatokat az embrió és környezetének összetételének felfedése érdekében. Carman és mtsai (1996) a búzaszem, Mäes

és mtsai (1999) a búza ovulum szénhidrát-, aminosav- és szervetlen iontartalmát, valamint a pH-ját és az ozmotikus koncentrációt határozták meg az embriófejlődés egymást követő szakaszaiban. Ilyen jellegű tanulmányok eredményei alapján új tápoldatot terveztek, amivel a búza szomatikus embriók felnevelésének hatékonyságát jelentősen lehetett javítani (Carman, 1995). Viszonylag újabban, hasonló kísérleti elrendezéssel megvizsgálták a búza szemtermésben jelen lévő főbb hormonokat és cukrokat is (Hess és mtsai, 2002). Bár mindezeket a vizsgálatokat úgy tervezték, hogy az analitikai eredmények minél jobban közelítsék az embriót körülvevő ovulumnedv összetételét ill. lehetővé tegyék az extrapolálást, nem lehetett megakadályozni e folyadéknak a környező szövetek sejtes elemeivel történő szennyeződését. Ez különösen az embriófejlődés kezdeti szakaszában volt probléma, ami egyébként az *in vitro* körülmények között a legkritikusabb periódus. Így az embriózsákot, azaz a fejlődő embrió közvetlen környezetét nem sikerült pontosan megismerni. Ezen a tényen nem változtat önmagában az sem, hogy a búzaszemben az embrió, ill. a tőle meghatározott távolságokra lévő helyek O_2 tartalmának meghatározását nagyon pontosan elvégezték (Carman és Bishop, 2004). A búzán kívül még a tömjénfenyő (*Pinus taeda* L.) esetében végeztek hasonló vizsgálatokat, melyek eredményeit szintén kamatoztatni lehetett a szomatikus embriókból történő növényfejlődés hatékonyságának növelése révén (Pullmann és Buchanan, 2003; Pullman és mtsai, 2003). A növekedést serkentő vagy szabályozó egyéb, bonyolultabb összetételű anyagokról (oligoszacharidok, fehérjék, glikoproteinek) is vannak ma már információk, igaz, ezek egyelőre csak közvetettek, mivel nem az *in planta* embriók közvetlen környezetéből azonosították őket, hanem az izolált mikrospóra tenyészetekből vett tápoldatmintákból (ld. A mikrospórák *in vitro* tenyésztése c. fejezetben).

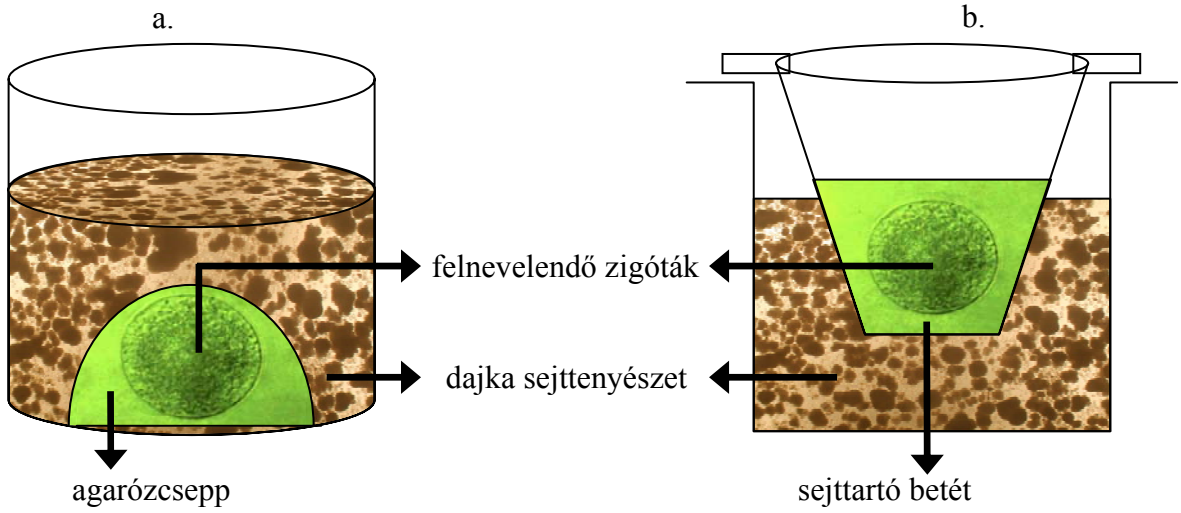
Mára már elég jól ismerjük a legfontosabb hormonok szerepét az embrió egyes fejlődési szakaszaiban (ld. A Növényi embriók *in vivo* fejlődése c. fejezetet), így ez a tudás a hormonok fizikai jelenlétének pontosabb feltárásával együtt hozzájárulhat az *in vitro* embrionevelési módszerek hatékonyabbá tételéhez, ill. a zigóták *in vitro* felnevelésére alkalmas szintetikus tápoldatok előállításához.

Az eddig elért sok értékes analitikai eredmény ellenére mai tudásunk azonban még nem elegendő egy olyan szintetikus tápoldat megtervezésére, mely a gyakorlatban jól használható lenne zigotikus embriók *in vitro* felnevelésére. Ebben egy másik megközelítés, a jól használható dajkasejtek által a tápoldatba kiválasztott anyagok módszeres kémiai analízise is további segítségünkre lehet a jövőben.

Amíg a zigóták *in vitro* felneveléséhez nem áll rendelkezésre szintetikus tápoldat, a zigóták fejlődéséhez szükséges növekedést serkentő anyagokat dajkasejtekkel történő együtt-

tenyésztéssel kell biztosítani (áttekintő cikk: Kranz és Kumlehn, 1999). E speciális tenyészetekben mindkét sejttípus számára optimális tápközeg szükséges, hiszen a dajkasejteknek is fejlődniük, növekedniük kell (Holm és mtsai, 1994). Ahhoz, hogy a tápoldatot kondícionáljuk, azaz elegendő növekedésszabályozó anyaggal ellássuk, a dajkákat bizonyos ideig önállóan kell tenyészteni az *in vitro* zigótanevelés megkezdése előtt (előtenyésztés). Mivel a fejlődő embriókat meg is kell figyelni, ezért olyan tenyésztési rendszerre van szükség, melyben a zigóták elkülöníthetőek a dajkasejtektől.

E két kritériumnak úgy lehet megfelelni, hogy az izolált zigótákat alacsony olvadáspontú agarózba ágyazzák, így helyzetüket fixálják, és a megszilárdult agarózcsepp köré öntik a dajkasejteket tartalmazó tápoldatot (Kumlehn és mtsai, 1999; 1a ábra). Mivel azonban az agaróz befolyásolja a sejtek fiziológiai állapotát és így fejlődésüket is (Caumont és mtsai, 1997; Kumlehn és mtsai, 1999), a tenyésztés szempontjából célszerűbb egy, a sejtek fizikai keveredését megakadályozó membránnal elválasztani a zigótákat a dajkasejtektől. Ez úgy oldható meg, hogy a zigótákat egy, a dajkatenyészetet tartalmazó edénybe illeszthető betétbe helyezik, aminek az alján néhány µm-es pórusméretű membrán van (Kumlehn és mtsai, 1998; 1b ábra). Ez a membrán nem engedi át a sejteket, de rajta keresztül a tápoldat nagyobb molekulái is átjuthatnak. A két oldalon lévő közeg konvekció révén gyakorlatilag nem keveredik, csak diffúzióval, ami jóval lassabb folyamat.



1. ábra. A búza (és más növényfajok) izolált zigótáinak *in vitro* felnevelésére szolgáló egy-sejt tenyésztési rendszerek. Az anyai szövetektől megfosztott, izolált sejtek számára szükséges növekedésszabályozó anyagokat dajkasejtek segítségével kell biztosítani. Ugyanakkor, a felnevelendő zigóták nem keveredhetnek össze a dajkákként szolgáló sejtekkel. Mindezt általában kétféle elrendezésben (a. és b.) oldják meg.

Dajkasejtekként intenzíven növekedő sejteket alkalmaztak: a kukorica éretlen embrióinak elkalluszosításából származó sejtszuszpenziót (Kranz és Lörz, 1993), vagy pedig izolált mikrospóra tenyészeteket, melyek maguk is embriogén úton fejlődnek (árpa: Holm és mtsai, 1994; Kumlehn és mtsai, 1998, 1999; Leduc és mtsai, 1996; kukorica: Leduc és mtsai, 1996). A búza zigóták felneveléséhez eddig csak az 1-2 hétig előtenyésztett árpa izolált mikrospóra tenyészeteket alkalmazták sikerrel. Mindezek a dajkasejtek, különösen az izolált mikrospórák tenyésztése önmagában is meglehetősen munkaigényes, ezért egyszerűbben tenyészthető, de optimális dajkahatású explantátumok segítségével addig is jelentősen megkönnyíthető a zigóták *in vitro* felnevelése, amíg ez nem oldható meg könnyen összeállítható szintetikus tápoldatokkal.

A zigotikus embriók in vitro tenyésztésében elért eredmények áttekintésekor arra kerestük a választ, hogy milyen tenyésztési elrendezésben lehetséges az izolált búza zigótákat felnevelni, és dajkákként milyen növényi sejteket alkalmaztak már sikerrel. Ennek megfelelően az egy-sejt technika adaptálásához a megporzást követően 3-20 órával izolált zigóták in vitro tenyésztését végeztük el különböző tápoldatokban. Dajkákként pedig új, kevésbé munkaigényes módszerrel tenyészthető növényi részeket is leteszteltünk, így az árpa és búza mikrospórákon felül a búza könnyen izolálható fiatal termőit és 8-10 napos embrióit.

3. 4. A búza zigóták fejlődési mintázata az *in vitro* tenyészetekben

A búza zigóták *in vitro* fejlődése alapjában véve jól megfeleltethető az *in planta* embriógenezissel, bár az izolált zigóták kezdeti fejlődése néhány szempontból eltér a növényben megfigyelhetőtől. A petesejtek és zigóták az izolálás során elveszítik eredeti körtealakjukat (Kovács és mtsai, 1994). A sejtalak megváltozása az izolálás folyamán azért történhet meg, mert a petesejtek fala nem teljes, és izolálásukkor a megfelelő protoplasztok válnak szabaddá, melyek fizikailag membránnal körülvett cseppekként viselkednek, tehát gömbalakot vesznek fel. Ez a folyamat valószínűleg bizonyos mértékig megzavarja a sejtek eredeti polaritását, amit az mutat, hogy az első osztódás – legalábbis látszólag – szimmetrikus, így a létrejövő leánysejtek morfológiailag igen hasonlók (Kumlehn és mtsai, 1998; 1999; Kranz és Kumlehn, 1999). Az embriógenezis kezdeti szakaszára jellemző, az *in planta* állapothoz képest megfigyelhető morfológiai különbségek sok esetben a szomatikus embriógenezis indukcióját követően is előfordulnak (Raghavan, 1997). A tenyésztés 14. napjára viszont már gyakran a növényben is megfigyelhető átmeneti állapotú, ún. bunkó alakú embriók fejlődnek ki (Kumlehn és mtsai, 1998). Igaz, ezek a növényben rövidebb idő, mintegy 5-6 nap alatt kifejlődnek (Batygina, 1969). E stádiumot követően *in vitro*

körülmények között is gyakran az *in planta* embriókhoz hasonló, esetenként azokkal gyakorlatilag azonos morfológiát mutató struktúrák fordulnak elő. A tenyészetekben azonban az embriók nem kerülnek nyugalomba és nem száradnak ki, mint egyébként a növényen, hanem késedelem nélkül kicsíráznak és termékeny növényekké fejlődnek (Holm és mtsai, 1994; Kumlehn és mtsai, 1998). Ez a különbség inkább fiziológiai, mintsem fejlődésbiológiai, ugyanis a növénnyel ellentétben az *in vitro* tenyészetekben nincs dehidratációval járó nyugalmi állapot, és nincsen az ezt kísérő ABA-szint emelkedés. Ez a jelenség közös a többi *in vitro* embrionevelési rendszerrel (mikrospóra-embriógenezis, szomatikus embriógenezis; Hause és Hause, 1996)

A fentiekben ismertetettek alapján látható, hogy a zigóták in vitro fejlődése a búza esetében jól közelíti a természetes, in planta fejlődési utat. Mivel a zigótákból magas hatékonysággal lehet növényeket felnevelni, e tenyésztési rendszer alkalmas lehet a biotechnológiában hasznosítható eredmények elérésére. Mindezeken felül, a zigóták in vitro fejlődésének tanulmányozása alapkutatási szempontból is fontos lehet. Ezért az in planta embriók fejlődési mintázatának in vitro reprodukálása és tanulmányozása, valamint az egy-sejt tenyésztés minél egyszerűbb módon történő megvalósítása intézetünkben is alapvető cél.

3. 5. Az izolált petesejtek és zigóták biotechnológiai célú felhasználása

Az izolált petesejtek és zigóták fontosságát bizonyítja, hogy több irányban is intenzív kutatások folynak annak érdekében, hogy e sejteket fontos alapkutatási és gyakorlati célok megvalósítására felhasználhassák (Scholten és Kranz, 2001; Barnabás és mtsai, 2002; Peng és mtsai, 2005; Sprunck és mtsai, 2005; Ning és mtsai, 2006; Yang és mtsai, 2006; He és mtsai, 2007). Mindehhez a legtöbb esetben e sejtek *in vitro* felnevelésére is szükség van. A legfontosabb célok a petesejtek és zigóták mikroinjektálásával vagy a gaméták *in vitro* fúziójával valósíthatóak meg. Ugyanilyen fontos az izolált gametofitikus sejtek génexpressziójának és fehérjetermékeik vizsgálata is.

Mivel a zigótákat (és petesejteket) általában protoplasztokként lehet izolálni, és több óráig is eltart mire sejtfaluk (újra)szintetizálódik, kézenfekvő e sejtek mikroinjektálása. A zigóták és petesejtek mikroinjektálása a genetikai transzformálás egy alternatív útja (Holm és mtsai, 2000; Scholten és Kranz, 2001; Pónya és mtsai, 1999a), mellyel elkerülhető a szelekciós markergének használata. E technikát azonban még optimalizálni kell, mert hatékonysága egyelőre még nem megfelelő. Mikroinjektálással sejtszervecskék (Matthys-Rochon és mtsai, 1994), egész kromoszómák (Griesbach, 1987), vagy biokémiai folyamatok tanulmányozására alkalmas festékek is bevihetők a sejtekbe. Ez utóbbi módszerrel nagyon

precízen tanulmányozhatók a megtermékenyítés folyamatai, így pl. a citoplazma Ca^{2+} szintjének változásai (Pu és Robinson, 1998), az aktin-citoszkeleton (Pónya és Barnabás, 2001), és az endoplazmatikus retikulum (Pónya és mtsai, 2004) szerveződése.

Izolált hímivarsejtek és GFP-fúziós génkonstrukciókkal mikroinjektált petesejtek *in vitro* fúziójával és az ezt követő egy-sejt tenyésztéssel elvileg lehetőség van a megtermékenyítésben és az embriófejlődésben szerepet játszó fehérjék nyomon követésére, mely jelentősen hozzájárulna e folyamatok megértéséhez (Scholten és Kranz, 2001). E cél megvalósításához szükséges lépések (mikroinjektálás, *in vitro* sejtfúzió, egy-sejt tenyésztés) külön-külön már végrehajthatók, de ezeknek ugyanazon a sejteken történő alkalmazása még nem megoldott. Az *in vitro* sejtfúzió másik fontos alkalmazási területe az idegen fajú ivarsejtek egyesítése. Távoli rokon fajok ivarsejtjeinek fúziójával, majd a keletkezett struktúrák *in vitro* felnevelésével ugyanis értékes hibridek előállítására van kilátás (Kranz és Dresselhaus, 1996). Ezek a hibridek a búzából egyébként hiányzó rezisztenciáért felelős, vagy egyéb hasznos gének nagyszerű forrásai lehetnek. Bár az idegenfajú keresztezések terén egyelőre csak az embriókultúrákkal, azaz 2-3 héttel az idegenfajú megporzást követően kimenekített embriók tenyésztésével értek el a biotechnológiában valóban hasznosítható eredményeket (Friebe és mtsai, 1996), az *in vivo* vagy *in vitro* körülmények közötti megtermékenyítést követő egy-sejt tenyésztés várhatóan komoly növekedést okoz a jövőben a megvalósítható idegenfajú keresztezési kombinációk számában.

A legutóbbi években rengeteg információ került napvilágra a gabonafélék *in vivo* és *in vitro* fejlődő embrióinak génexpressziós mintázatáról (Le és mtsai, 2005; Okamoto és mtsai, 2004, 2005; Sprunck és mtsai, 2005; Weijers és Jürgens, 2005; a korábbi eredményeket összegző publikációk: Mordhorst és mtsai, 1997; Raghavan, 1997; ld. még a Növényi embriók *in vivo* fejlődése c. fejezetet). A jelenlegi kutatásoknak az egyik legfőbb iránya az embriógenezis korai szakaszára specifikus gének funkcióinak feltárása (Willemsen és Scheres, 2004). E vizsgálatok eredményei várhatóan a gyakorlat számára is kézzelfoghatóak lesznek, hiszen a számunkra érdekessé váló gének expressziója módosítható lesz, és így a fejlődés iránya kontrollálhatóvá válik (pl. parthenogenezis indukciója, esetleg a keresztezhetőség kiszélesítése).

Az izolált zigóták tehát sok területen felhasználhatók, in vitro tenyésztésükkel pedig jelentősen tovább bővíthető e kör. Láthattuk azt is, hogy az egy-sejt tenyésztési rendszer igen fontos szerepet tölthet be a fajidegen keresztezésekből származó utódok felnevelésében, azonban jelenlegi tudásunk szerint egyelőre még egyetlen gametikus fajhibridet sem állítottak elő ezzel a módszerrel. A távoli rokon fajok közötti keresztezések ily módon történő

megvalósítását tehát kutatásaink egyik fő irányvonalának tekintettük, ezért ezek kivitelezhetőségét, jelentőségét és az egy-sejt tenyésztési rendszerhez kapcsolódását önálló alfejezetben ismertetjük.

3. 6. Az egy-sejt tenyésztési rendszer potenciális jelentősége a búza idegenfajú megporzásával aktivált petesejtjeinek felnevelésében

A petesejt aktiválódása az embriógenezis programjának beindulását jelenti. A búza petesejtből történő embriófejlődés azonban nemcsak fajazonos megtermékenyítés, hanem idegenfajú megporzás eredménye is lehet (Heszky, 1972; Sitch és Snape, 1987; Laurie és Bennett, 1988; O'Donoughue és Bennett, 1994; Saïdi és mtsai, 1998; Wedzony és mtsai, 1998; Berzonsky és mtsai, 2003). Az aktivált petesejtet akkor nevezhetjük zigótának, amennyiben megtörténik a megtermékenyítés, azaz az azonos vagy különböző fajhoz tartozó gaméták fúziója és mindkét szülő teljes genetikai anyaga átöröklődik az első osztódás eredményeként kialakuló leánysejtekbe. A búza × kukorica megporzásokkal foglalkozó szakirodalomban elterjedten használják a zigóta terminust, de mivel az apai genetikai anyag átöröklődése az utódsejtekbe csak részben teljesül (Laurie és Bennett, 1989, 1990), talán precízebb az aktivált petesejt fogalmának használata. A búza × rizs megporzásokkal kapcsolatban pedig még semmilyen erre vonatkozó információ nem áll rendelkezésre. Mindezeknek megfelelően az általunk vizsgált búza × kukorica és búza × rizs megporzások esetében a (potenciálisan) fejlődésnek induló petesejteket aktivált petesejteknek, vagy „zigótáknak" nevezzük.

Idegen fajok közötti megporzások, ill. keresztezések végrehajtásához fontos a fajok genomiális hátterének, kromoszómaszámának ismerete. Csak a munkánkban előforduló fajokat említve: az allopoliploid búza három, egymástól némileg különböző (homeológ) 7 kromoszómapáros genommal rendelkezik, ennek megfelelően 3×7×2, azaz 42 kromoszómája van. A teljes búza genom nagyon nagy, összesen mintegy 7000 Megabázispárból áll (1 Mb=1 000 000 bázispár). A búzához képest a kukorica diploid genomja kisebb: kb. 3000 Mb, ami 10×2, azaz 20 kromoszómát jelent. A szinttén diploid rizs teljes genommérete az előbbieknél jóval kisebb, kb. 430 Mb, és 12×2 kromoszómát tartalmaz.

3. 6. 1. Búza × kukorica megporzások

A búza × kukorica megporzások a ginogenikus haploidok előállításának egyik legfontosabb módszerét jelentik. A mikrospóra embriógenezissel történő haploidelőállításhoz képest e technika kevésbé függ a búza genotípusától, így megbízható, azonban alacsonyabb

hatékonyságú (a megporzott termők 1-18 %-ából nevelhető fel haploid növény: Laurie és Bennett, 1988; Zhang és mtsai, 1996; Verma és mtsai, 1999; Sharma és mtsai, 2002; Garcia-llamas és mtsai, 2004).

A búza × kukorica megporzás eredményeként a pollentömlők fejlődését és az embriózsákban bekövetkező citológiai és citogenetikai változásokat a korai fázisban már részletesen vizsgálták (Laurie és Bennett, 1989, 1990; Wedzony és van Lammeren, 1996; Zhang és mtsai, 1996). Megfigyelték, hogy a pollentömlők csökkent növekedési sebessége és gyakori rendellenessége ellenére akár 69 %-ban is bekövetkezik a petesejtek megtermékenyülése (az ivarsejtfúzió; Wedzony és van Lammeren, 1996). Ezek a megtermékenyített petesejtek osztódásnak indulnak, de ennek során az apai kromoszómák nem, vagy csak részben jutnak el a mitotikus orsó két pólusára, így általában néhány ciklus alatt eliminálódnak (Laurie és Bennett, 1989, 1990; Mochida és mtsai, 2004). A folyamat eredményeként haploid embriók fejlődnek. A központi sejt szintén megtermékenyülhet, bizonyos esetekben pedig a kettős megtermékenyítés is megvalósul (Laurie és Bennett, 1989; Zhang és mtsai, 1996). Azonban, ha meg is termékenyül a központi sejt, az anyai és az apai genom normálistól eltérő aránya lehetetlenné teszi az endospermium szabályos fejlődését (Lin, 1984; Haig és Westoby, 1991). Mindez az embriók alultápláltságát okozva fejlődésüket hátráltatja és közülük egyre több elpusztul az idő előrehaladtával (Zenkteler, 1980; Wedzony és van Lammeren, 1996; Zhang és mtsai, 1996). Ezért az embriókat ki kell menekíteni a számukra egyre kedvezőtlenebbé váló anyai környezetből (*embryo rescue*; Laurie és Bennett, 1988; Molnár-Láng és Sutka, 1994). Annak ellenére, hogy az embrióknak már jelentős része elpusztul a 14. napra (Laurie és Bennett, 1988; Wedzony és van Lammeren, 1996; Zhang és mtsai, 1996), azokat szinte minden esetben viszonylag későn, 2-3 hetes korukban izolálják az anyai szövetekből. Ennek legfőbb oka, hogy az ilyen korú – igaz, a fejlődésben gyakran már jócskán elmaradt – embriók jelentős részét (20-50 %) egyszerű tenyésztési rendszerben fel lehet nevelni (Laurie és Bennett, 1988; Molnár-Láng és Sutka, 1994; Singh és mtsai, 2001; Sharma és mtsai, 2002). Amennyiben nem mentik ki az embriókat, a funkcióképes endospermium hiánya miatt szinte mindegyikük elpusztul, mielőtt beérhetne (Laurie és Bennett, 1988).

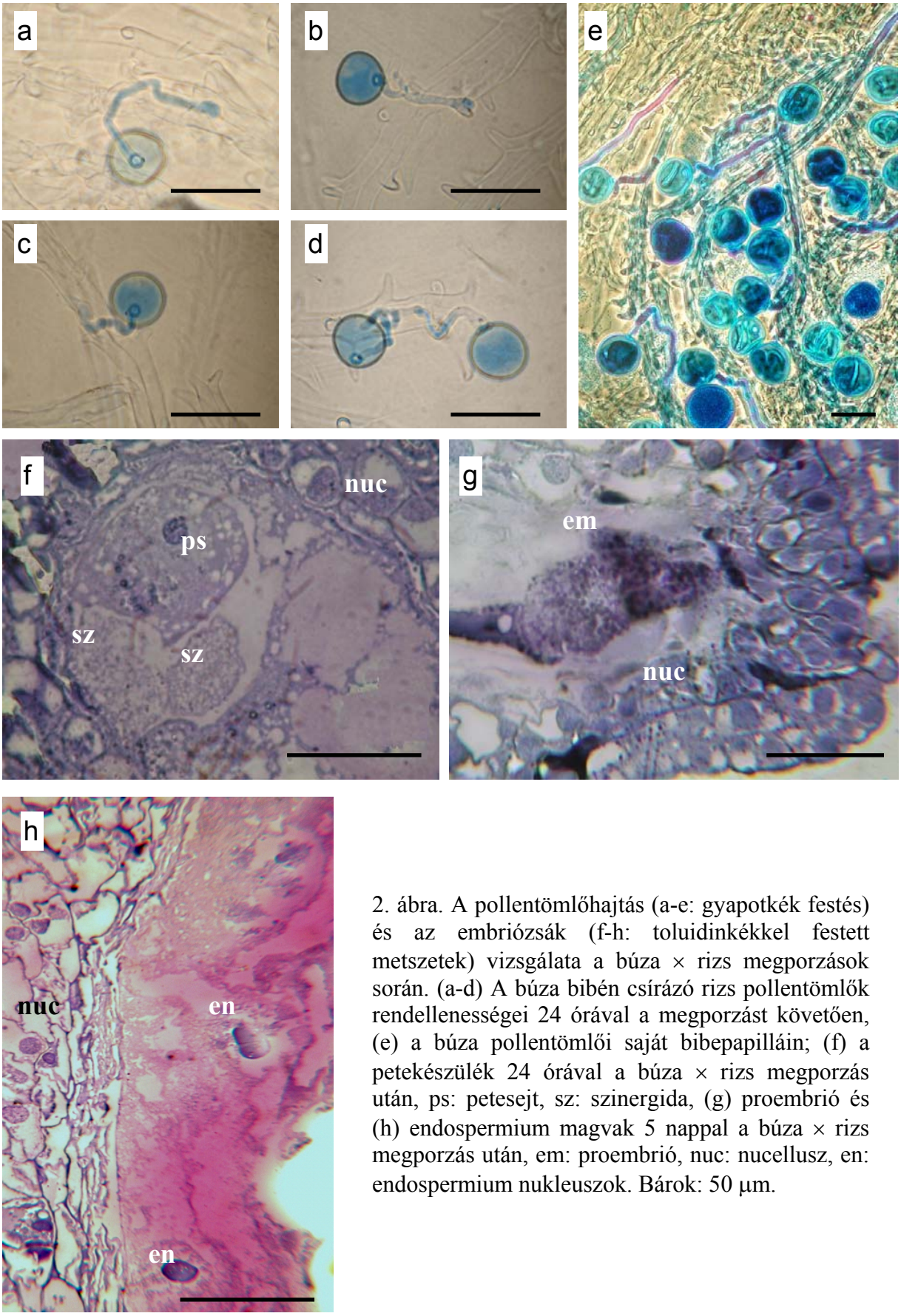
Mivel – amint láttuk – az embriómentés szokásos idejéig is sok embrió elpusztul, indokolt lehet a búza × kukorica aktivált petesejtek, ill. „zigóták" korai kimenekítése is. Amennyiben a kimentett „zigótákat" az egy-sejt tenyésztési rendszerben fel lehet nevelni, *in vitro* fejlődésük is nyomon követhető.

A búza × kukorica megporzással foglalkozó munkák áttekintésével arra kerestünk választ, hogy (1) milyen gátjai vannak az ilyen módon aktivált petesejtek in vivo fejlődésének, (2) és hogy ezekből a sejtekből milyen módon nevelhetők fel a haploid növények. Nem találtunk azonban arra vonatkozó információt, hogy lehetséges-e a búza × búza zigótákhoz hasonlóan a búza × kukorica „zigótáknak" a korai kimenekítése és azt követő in vitro felnevelése. Az egy-sejt tenyésztési rendszer segítségével megkíséreltük tehát a búza × kukorica megporzásokat követően izolált „zigóták" növénnyé nevelését, miközben nyomon követtük in vitro fejlődésüket. Kontrollként az eredeti embriómentési technikával is neveltünk növényeket, hogy összevethessük a két módszer hatékonyságát. A „zigótamentéses" kísérleteink célja az volt, hogy kiderítsük: lehetséges-e ezzel a módszerrel a haploid növényelőállítás hatékonyságát emelése?

3. 6. 2. Búza × rizs megporzások

A búza × kukorica és más idegenfajú keresztezésekben az embriómentésen alapuló technika eddigi sikeressége (Sharma, 1995) és a „zigóták" korai kimentésének lehetősége ismeretében a petesejt aktivációját a búza × rizs közötti, eddig még meg nem valósított keresztezésben is érdemes vizsgálni. A csoportunkban korábban végzett kutatómunka során (Barnabás és Tímár, nem publikált eredmények) megállapították, hogy a rizs pollenek 10-48%-a kicsírázik a búza bibéjén. A pollentömlők azonban nagyon lassan növekedtek. Gyakran 24 óra alatt sem jutottak el a bibepapillák aljáig; emellett számos rendellenességet mutattak: zsákosodás (2a. ábra), villaszerű elágazás (2b. ábra), fordított (2c. ábra) és véletlenszerű (2d. ábra) növekedési irány. Mindezekkel a rendellenességekkel szemben a búza pollenek egészséges növekedésű pollentömlőket hajtottak a búza bibéjén (2e. ábra).

A búza embriózsákok vizsgálatakor 24 órával a rizzsel történő megporzás után még nem lehetett megfigyelni a pollentömlőknek az embriózsákba hatolását és más jel sem utalt a megtermékenyítésre vagy a petesejt aktivációjára (2f. ábra). Az embriózsákokat 5 napos korukban vizsgálva viszont egyetlen esetben már megfigyelhető volt egy néhánysejtes proembrió (2g. ábra). Egy másik esetben pedig az embriózsák perifériáján endospermium magvakat találtak, azonban – ellentétben a normál búzával – e terület sejtesedése elmaradt (2h. ábra).



2. ábra. A pollentömlőhajtás (a-e: gyapotkék festés) és az embriózsák (f-h: toluidinkékkel festett metszetek) vizsgálata a búza × rizs megporzások során. (a-d) A búza bibén csírázó rizs pollentömlők rendellenességei 24 órával a megporzást követően, (e) a búza pollentömlői saját bibepapilláin; (f) a petekészülék 24 órával a búza × rizs megporzás után, ps: petesejt, sz: szinergida, (g) proembrió és (h) endospermium magvak 5 nappal a búza × rizs megporzás után, em: proembrió, nuc: nucellusz, en: endospermium nukleuszok. Bárok: 50 μm.

Az egy-sejt tenyésztési technika feltehetően minden olyan esetben lehetővé teszi utódnövények felnevelését, amikor a petesejt aktivációja megtörténik és az embrió fejlődését az endospermium rendellenessége vagy hiánya gátolja. Amint láttuk, a petesejt-aktiváció lehetőségét a fentiekben ismertetett kutatómunka megerősítette, így a búza × rizs megporzás eredményeként utódnövények várhatóan felnevelhetők ebben a tenyésztési rendszerben.

Mivel jelenlegi tudásunk szerint még nem hajtottak végre sikeres búza × rizs keresztezést, a búza rizzsel történő megporzását követően a végeredmény szempontjából több lehetőség is elképzelhető az eddig megvalósított távoli rokon fajok közötti keresztezések tapasztalataiból kiindulva (Islam és Shepherd, 1990; Ahokas, 1994; Sharma, 1995; Friebe és mtsai, 1996; Brar és Khush, 1997; Molnár-Láng és mtsai, 2000; Cai és mtsai, 2005). Így nem kizárható, hogy a búza petesejtje megtermékenyül, és a rizsgenomot teljesen vagy részlegesen tartalmazó hibrid vagy hibridszerű utód fejlődik. Ebben az esetben van esély arra, hogy a rizsből a búzába átvigyünk kedvező tulajdonságokért felelős géneket. Megtörténhet az is, hogy a megtermékenyítést követően a rizsgenom teljes mértékben eliminálódik, és az utód haploid búzanövény lesz. További lehetőség, hogy a megtermékenyülés nem valósul meg, de a búza petesejtje aktiválódik és fejlődésnek indul. Szakirodalomból ismert ui., hogy a petesejtek speciális esetekben megtermékenyítés nélkül is aktiválódhatnak. Erre példák a parthenogenetikusan fejlődő alloplazmatikus Salmon búza petesejtjei (Kumlehn és mtsai, 2001), vagy a *Solanum tuberosum* × *Solanum phureja* keresztezés, melynek során a *S. tuberosum* petesejtje megtermékenyítés nélkül is osztódásnak indulhat (Liu és Douches, 1993). Ez utóbbi esetben *S. phureja* pollenjének egyetlen hímivarsejtje a központi sejtet termékenyíti meg, és annak osztódása révén szabadul fel az a szignál, ami a petesejtet aktiválja. Az ismertetetten felül más olyan szignálok is elképzelhetők, amelyek megtermékenyítés nélkül is osztódásra késztetik, tehát aktiválják a petesejtet. A búza × rizs keresztezés lehetséges kimeneteleit elemezve, végül az is előfordulhat, hogy a petesejt nem aktiválódik, és így nem is fejlődik embrióvá. Ekkor csak az *in vitro* gaméta- (Kranz és Dresselhaus, 1996) vagy szomatikus fúziót (Kisaka és mtsai, 1998; Liu és mtsai, 2005; Szarka és mtsai, 2002) követő egy-sejt tenyésztés vezethet eredményre.

Az ismertetettek alapján elmondható tehát, hogy a klasszikus embriómentés mellett az egy-sejt tenyésztési technikának is kiemelkedő szerepe lehet az idegenporzással aktivált búza petesejtek felnevelésében. Ezért a búza × rizs megporzásokat követően az aktivált petesejteket dajkák segítségével az általunk adaptált egy sejt tenyésztési rendszerben, az idősebb (2 hetes) embriókat pedig a klasszikus embriótenyésztési módszerrel neveltük, miközben nyomon követtük in vitro fejlődésüket. A búza × rizs keresztezések célja az volt, hogy utódnövényeket

állítsunk elő egy eddig még nem vizsgált keresztezési kombinációból. Amennyiben a rizsből az utódokba történik génátvitel, akkor e keresztezés a növénynemesítés szempontjából lehet jelentős. Amennyiben – a búza × kukorica keresztezésekhez hasonlóan – teljes mértékben eliminálódik a rizs-szülő genomja, akkor fejlődésbiológiailag, esetleg haploid növények előállítása szempontjából tarthat érdeklődésre számot e munka.

3. 7. Mikrospórák sporofitikus fejlődése: az embriógenezis hím ivarsejtvonalból kiinduló alternatív útja

Mikrospórák *in vitro* tenyésztésével már mintegy 300 fajból sikerült embriókat nyerni és azokat haploid vagy kettős haploid növényekké felnevelni. E tenyésztési módszer egyre több növényfaj és fajta esetében válik rutinszerűvé, így jelentősége egyre jobban növekszik. A zigóták *in vitro* felnevelése is gyakran az izolált mikrospóra tenyészetek segítségével történik.

Természetes körülmények között a mikrospórák a pollenszemek, azaz a haploid hím gametofiton nemzedék kiinduló sejtjei. A pollenszemek rendeltetése, hogy eljuttassák a hím ivarsejteket az embriózsákban lévő petesejthez és a központi sejthez, hogy megvalósulhasson a kettős megtermékenyítés és az azt követő embrió- és endospermium-fejlődés. Speciális, *in vitro* körülmények között azonban a mikrospórák kompetenssé válhatnak az embriógenezisre, és közvetlenül növényekké fejlődhetnek (mikrospóra-embriógenezis). E különös fejlődési utat Guha és Maheshwari 1964-ben fedezték fel, amikor kék maszlag (*Datura innoxia* Mill.) portokjait táptalajon inkubálták, és 6-7 hét múlva embriószerű struktúrák jelentek meg a tenyészetben. Hamarosan bebizonyították, hogy ezek az embriók haploidok, tehát a mikrospórákból származnak (Guha és Maheshwari, 1966). Amennyiben a portokfal sejtjeiből fejlődtek volna ki ezek az embriók, akkor kizárólag diploid növényeket eredményeztek volna. Ezt követően a mikrospóra-embriógenezis hamarosan a tudományos érdeklődés középpontjába került, és mind több növény haploid alakját előállították ezen az úton. A gabonafélék közül elsőként a rizsből (Niizeki és Oono, 1968), majd hamarosan az árpából (Kasha és Kao, 1970) és a búzából (Ouyang és mtsai, 1973) is létrehoztak haploid növényeket. Valamivel később kiderült, hogy e fejlődési út bizonyos fajoknál a természetben is előfordul, bár igen kis gyakorisággal (Rammana, 1974; Koul és Karihaloo, 1977). Hazánkban elsőként Heszky és Mesch (1976) vizsgálták a gabonafélék mikrospóráinak *in vitro*, sporofitikus fejlődését.

A mikrospóra-embriógenezis feltétele, hogy leálljon a mikrospórák gametofitikus fejlődése és így megtörténhessen a sporofitikus fejlődés indukálódása (Guha és Maheshwari, 1964; áttekintő cikk: Maraschin és mtsai, 2005a; ld még A mikrospórák *in vivo* és *in vitro*

fejlődési mintázata c. fejezetet is). E fejlődési út eredményeképpen embriószerű struktúrák tömegét nyerhetjük, melyekből növények regenerálódnak. Ezek a mikrospóra eredetű struktúrák eredendően haploidok, azonban az *in vitro* tenyésztés során spontán módon (Kasha és mtsai, 2001) vagy szükség esetén antimitotikus szerekkel történő kezelés hatására endoreduplikáción mehetnek keresztül, így jelentős számú dihaploid (DH) növényekhez juthatunk (Barnabás és mtsai, 1991, 1999). A mikrospórákból így előállított DH növényeknek óriási jelentőségük van, melyet külön alfejezetben ismertetünk.

Az, hogy ez a speciális fejlődési pálya, a mikrospórák embriógenezise lehetséges, feltételezhetően annak köszönhető, hogy egy ősibb rendszerben, mely bizonyos algáknál, ill. a moháknál és a harasztoknál ma is megfigyelhető, a mikrospórának (ill. a makrospórának) megfelelő haploid meiospórából is soksejtes test fejlődik. Ez a fejlődési út tehát párhuzamba vonható a mikrospórák haploid növénnyé történő fejlődésével (Bonet és mtsai, 1998). E hipotézis igazolásához vagy cáfolásához azonban még további molekuláris biológiai vizsgálatok szükségesek, melyek feltárják az alacsonyabb rendű növények haploid spóráinak és a zárvatermők embriogén úton fejlődő, indukált mikrospóráinak génexpressziós mintázatai közötti hasonlóságokat és különbségeket.

A mikrospórák embriogén fejlődése révén mára már a mezőgazdasági szempontból legfontosabb fajok többségéből sikerült haploid ill. DH növényeket előállítani. A legjelentősebb hazai eredményeket a dohány (Heszky, 1974), a rizs (Heszky és Pauk, 1976), a búza (Bedő és mtsai, 1988; Pauk és mtsai, 1988), a kukorica (Mórocz, 1991; Szarka és mtsai, 1999), az árpa (Monostori és Pauk, 1995), a paprika (Mitykó és mtsai, 1995), a szőlő (Mozsár és Viczián, 1996) és a tritikálé (Karsai és Bedő, 1997; Monostori és mtsai, 1998) esetében érték el.

A mikrospórákat normális, gametofitikus fejlődési útjukról bizonyos stresszkezelésekkel lehet letéríteni. Amennyiben a stresszkezelés megfelelő, ez egyben a sporofitikus fejlődés indukciójával is együtt jár (Touraev és mtsai, 1997a). E stresszkezelést előkezelésnek (pretreatment) is nevezik, mert ezt követően, a már indukálódott mikrospórák sporofitikus fejlődéséhez tulajdonképpen egy újabb kezelés, azaz egészen más körülmények közötti tenyésztés szükséges. Fajonként eltérő stressz szükséges a mikrospóra-embriógenezis hatékony indukciójához és az azt követő növényregenerációhoz. A leggyakrabban alkalmazott stresszek: a hidegkezelés (kukorica, Gaillard és mtsai, 1991), a hőstressz (paprika, Bárány és mtsai, 2001), az auxin vagy az éheztetés (árpa: Hoekstra és mtsai, 1996), a colchicinkezelés (búza, Barnabás és mtsai, 1991; kukorica, Obert és Barnabás, 2004), a nitrogén-éhezés (dohány, Kyo és Harada, 1986), vagy a kemikáliákkal előidézett stressz (búza, Zheng és

mtsai, 2001). A leghatékonyabb módszerek általában e stresszek adott kombinációit alkalmazzák, pl. éheztetés és ozmotikus stressz (árpa Hoekstra és mtsai, 1992; Cistué és mtsai, 2003), vagy éheztetés és hőstressz (búza: Indrianto és mtsai, 1999; Touraev és mtsai, 1996). Mindezek a stresszhatások egy – még csak részben feltárt – szignál transzdukciós folyamatot indítanak el, mely lehetővé teszi a sporofitikus fejlődési irányt (Touraev és mtsai, 1997a, 2001; Maraschin és mtsai, 2005a).

A stresszkezelést követően a mikrospórák sporofitikus fejlődése csak cukorban és egyéb tápanyagokban gazdag tápoldatokban folytatódik. Az így előkezelt mikrospórák kétféle tenyésztési rendszerben nevelhetők tovább: 1. Portokkultúrákban, melyekben az előkezelt, egész portokokat legtöbbször szilárd táptalajra helyezik. 2. Izolált mikrospóra kultúrákban, melyekben a portokokból az előkezelés után kinyert mikrospórákat legtöbbször folyékony tápoldatban nevelik. A portokkultúrák és a mikrospóra tenyészetek hatékonysága növényfajonként illetve genotípusonként eltérő lehet, és mindkét módszernek számos előnye és hátránya van. A portokkultúrák hátránya, hogy a diploid portokfal jelenléte miatt kevésbé kontrollálható a regenerált növények eredete, és nehezebb a mikrospórákból fejlődő struktúrák megfigyelése (Kasha és mtsai, 1997). Előnye viszont, hogy e tenyésztési rendszer már a legtöbb gazdaságilag fontos növényfaj esetében jól kidolgozott, és hatékonyan alkalmazható számos növényfajtánál. Az izolált mikrospóra tenyészetek hátránya, hogy ez az eljárás jóval bonyolultabb és időigényesebb. Korábban az is jelentős hátrányt jelentett a portoktenyészetekkel szemben, hogy a mikrospórákból továbbfejlődő struktúrák aránya gyakran jóval kisebb volt (Castillo és mtsai, 2000). Ezért e sejttenyésztési módszert tovább finomították (áttekintő cikkek: Touraev és mtsai, 2001; Zheng, 2003), és mára már az izolált mikrospóra kultúrák hatékonysága eléri, sok esetben meg is haladja a portoktenyészetekét. E tenyésztési módszer előnye viszont, hogy még mindig rengeteg tartalékot rejt magában: megfelelően optimalizálva a portokkultúrákhoz képest jóval nagyobb számú embriószerű struktúrát és regeneráns növényt eredményezhet, mivel a mikrospórák tápanyagellátása sokkal kedvezőbb lehet, a rendelkezésükre álló hely pedig sokkal nagyobb (Hoekstra és mtsai, 1992; Touraev és mtsai, 2001). Az izolált mikrospóra kultúrák használata az embriogén fejlődés mélyebb megértéséhez is elengedhetetlen, ugyanis a tápoldatba tett, vizsgálni kívánt vegyületek közvetlen hatást gyakorolnak a mikrospórákra. A portokkultúrákkal szemben további nagy előny, hogy a mikrospórák egyedi fejlődése is nyomon követhető (Indrianto és mtsai, 2001).

Bármelyik tenyésztési módszert alkalmazzuk is, az indukálódott mikrospórák és a regenerált zöld növények aránya nagyon sokféle tényezőtől függ. Öröklött tényezőt jelent a

növényfaj (Mentewab és mtsai, 1997) és a növényfajta (Zamani és mtsai, 2003; Holme és mtsai, 1999; Ascough és mtsai, 2006), melynek hátterében a genetikailag (Agache és mtsai, 1989; Torp és mtsai, 2001) és a citoplazmában (Sági és Barnabás, 1989) meghatározott tulajdonságok állnak. A mikrospóra-embriógenezis környezeti tényezőin pedig a tenyésztési feltételeket értjük. Így a mikrospórák *in vitro* fejlődésének gyakorisága (életképesség, sporofitikus indukció, regeneráció aránya) és minősége (zöld vagy albínó növényekké fejlődés; embriógenezis, kallogenezis; esetleg pollenérés a gametofitikus fejlődési út továbbfolytatódása következtében: Takács és mtsai, 1998) erősen függ az előkezelés típusától (Hu és Kasha, 1999), a tápközeg összetételétől (Karsai és mtsai, 1994; Indrianto és mtsai, 1999), a mikrospóra izolálás módjától (Hu és mtsai, 1995; Puolimatka és Pauk, 1999; Ritala és mtsai, 2001), a tenyészet sejtsűrűségétől (Castillo és mtsai, 2000), szezonális hatásoktól (tavasszal és nyáron jóval nagyobb számú DH növényt lehet előállítani egyébként ugyanolyan körülmények között tartott tenyészetekből, Ritala és mtsai, 2001), és különböző, dajkaként funkcionáló egyéb növényi részekkel történő együt-tenyésztéstől (Bruins és mtsai, 1996; Hu és Kasha, 1997; Puolimatka és Pauk, 1999).

A tápközegben lévő vegyületek közül bizonyos anyagok kulcsfontosságúak a mikrospóra eredetű embriók fejlődésének irányításában. Ilyen anyagok a tápoldatba adagolt (exogén) és a növényi sejtek által termelt (endogén) hormonok (Gorbunova és mtsai, 2001). Az auxinok az indukciós fázisban fontosak, és befolyásolják a mikrospóra eredetű struktúrák későbbi regenerációját. A mikrospórák indukciója és később zöld növénnyé fejlődése szempontjából a legkedvezőbb hatású auxinoknak a fenil-ecetsav és a naftil-ecetsav bizonyultak (Ziauddin és mtsai, 1992; Castillo és mtsai, 2000). A citokininek elsősorban az embriószerű struktúrák növénnyé fejlődésében játszanak fontos szerepet. Így a regenerációs táptalajhoz adott citokininek bizonyos esetekben jelentősen javítják a növényregeneráció hatékonyságát (Pauk és mtsai, 1991). Az abszcizinsav a sporofitikus fejlődés megindításában segíthet, mivel növeli a stresszkezelést túlélő mikrospórák számát, és akadályozza a mikrospórák pollenné fejlődését (Hoekstra és mtsai, 1997; Van Bergen és mtsai, 1999). A mikrospórák sporofitikus fejlődése és növénnyé regenerációja bizonyos esetekben optimálisabb az exogén hormonoktól mentes tápoldatban, ami arra utal, hogy az embriógenezis indukciójához gyakran az endogén hormonszintek (auxin, citokininek) is megfelelőek (Monostori és mtsai, 2003). Mivel a szintetikus vagy a magas koncentrációban alkalmazott hormonok nem kívánt genetikai változásokat is okozhatnak a sejttenyészetekben, az eddigi kutatások alapján az a konszenzus körvonalazódik, hogy a legkisebb, még optimális hormonkoncentrációkat alkalmazzák (Monostori és mtsai, 2003; Zheng, 2003).

A mikrospórák sporofitikus fejlődését más, egyelőre még kevésbé ismert anyagok is befolyásolják, melyeket a növényi sejtek termelnek. Ez következik ugyanis abból a megfigyelésből, hogy a már indukálódott búza mikrospórákat egészen a legutóbbi időkig csak úgy tudták továbbnevelni, ha a sejttenyészetben valamilyen dajkahatású diploid szövet (leginkább éretlen termő) is jelen volt (Puolimatka és mtsai, 1996; Puolimatka és Pauk, 1999). Az éretlen termők feltételezhetően a növekedést serkentő anyagokat bocsátanak ki magukból. E növekedésserkentő anyagok mibenlétéről fontos információt ad az a legutóbbi felfedezés, hogy a búza mikrospórák arabinogalaktánokat (AG) vagy proteineket (AGP) tartalmazó növényi kivonatok (AG: Larcoll, AGP: gumiarábikum) jelenlétében képesek voltak az önálló fejlődésre (Letarte és mtsai, 2006). Az arabinogalaktán proteinekről már korábban kimutatták, hogy elősegítik az embriogén fejlődést, mely hiányukban nem is lehetséges (Bordeires és mtsai, 2004). Az arabinogalaktán proteinek növekedést serkentő hatása nem fajspecifikus, így pl. az árpa mikrospórák által kibocsátott AGP-k a kukorica mikrospórák embriogén fejlődését is elősegítik (Paire és mtsai, 2003). Mindenesetre, az AGP tartalmú növényi kivonatokkal, de termők nélkül kevesebb embriószerű struktúra volt képes kifejlődni a mikrospórákból, mint a dajkákat tartalmazó kivonatmentes tenyészetekben (Letarte és mtsai, 2006). Ez arra utal, hogy a termők más olyan anyagokat is szekretálnak, ami kedvezően hat a növekedésre. Az éretlen termőkkel történő együtt-tenyésztés egyébként több, rekalcitráns árpafajta esetén is eredményesnek bizonyult, bár jól válaszoló árpa genotípusok esetén a mikrospórák sporofitikus fejlődéséhez ez nem szükséges (Li és Devaux, 2001).

Maguk, a mikrospórák szintén termelnek a növekedést serkentő anyagokat. Ezzel magyarázható, hogy sokkal nagyobb gyakorisággal fejlődnek embriogén struktúrák a nagyobb sejtsűrűségű, milliliterenként 100000 mikrospórát tartalmazó tenyészetekben, mint a 10000/ml-es sejtsűrűségűekben (Vrinten és mtsai, 1999). E növekedési faktorok jelenlétére utal az is, hogy a mikrospórák kedvező hatást gyakorolnak a zigóták *in vitro* fejlődésére is (Kranz és Kumlehn, 1999). Az önállóan tenyésztett izolált zigóták ugyanis nem képesek embriogén fejlődésre (Holm és mtsai, 1994).

Az említett arabinogalaktán proteineken felül néhány további, a növekedésre ill. embriófejlődésre kedvező hatást gyakorló anyagot is azonosítottak. Ezek között vannak oligoszacharidok, melyek a sejtfalakból enzimek hatására szabadulnak fel. Ilyenek a lipid-kitin-oligoszacharidok (LCO, Dyachock és mtsai, 2002). A peptidek családjába tartoznak a fitoszulfokinek (Hanai és mtsai, 2000) és a RALF (Rapid Alkinization Factor) polipeptid (Pearce és mtsai, 2001). Egyéb, különböző szerepű szekretált fehérjéket is felfedeztek és vizsgáltak. Ilyenek a PR (Pathogenesis-related) proteinek (van Loon, 1990), az EP1, EP2, EP3

(Extracellular proteins; van Engelen és de Vries, 1993), a thaumatinok (Osmond és mtsai, 2001), a Chia4-Pa kitináz (Wiveger és mtsai, 2003; Borderies és mtsai, 2004) és a β-1,3 glükanáz (Borderies és mtsai, 2004). Mindezek az anyagok nagyon jelentősek lehetnek az izolált mikrospóra tenyészetek hatékonyságának növelésében, különösen a jelenleg alig válaszoló genotípusoknál.

A fentiekben ismertetett kutatási eredmények hozzájárultak ahhoz, hogy az intézetünkben már rutinszerűen alkalmazott búza portoktenyésztésen felül adaptáljuk az izolált mikrospóra tenyésztést is. E módszer lehetőséget adott arra, hogy az árpa és a búza mikrospóra kultúrákat ill. a búza önállóan tenyésztett termőit dajkaként felhasználjuk a búza zigóták in vitro felneveléséhez.

3. 8. A mikrospórák *in vivo* és *in vitro* fejlődési mintázata

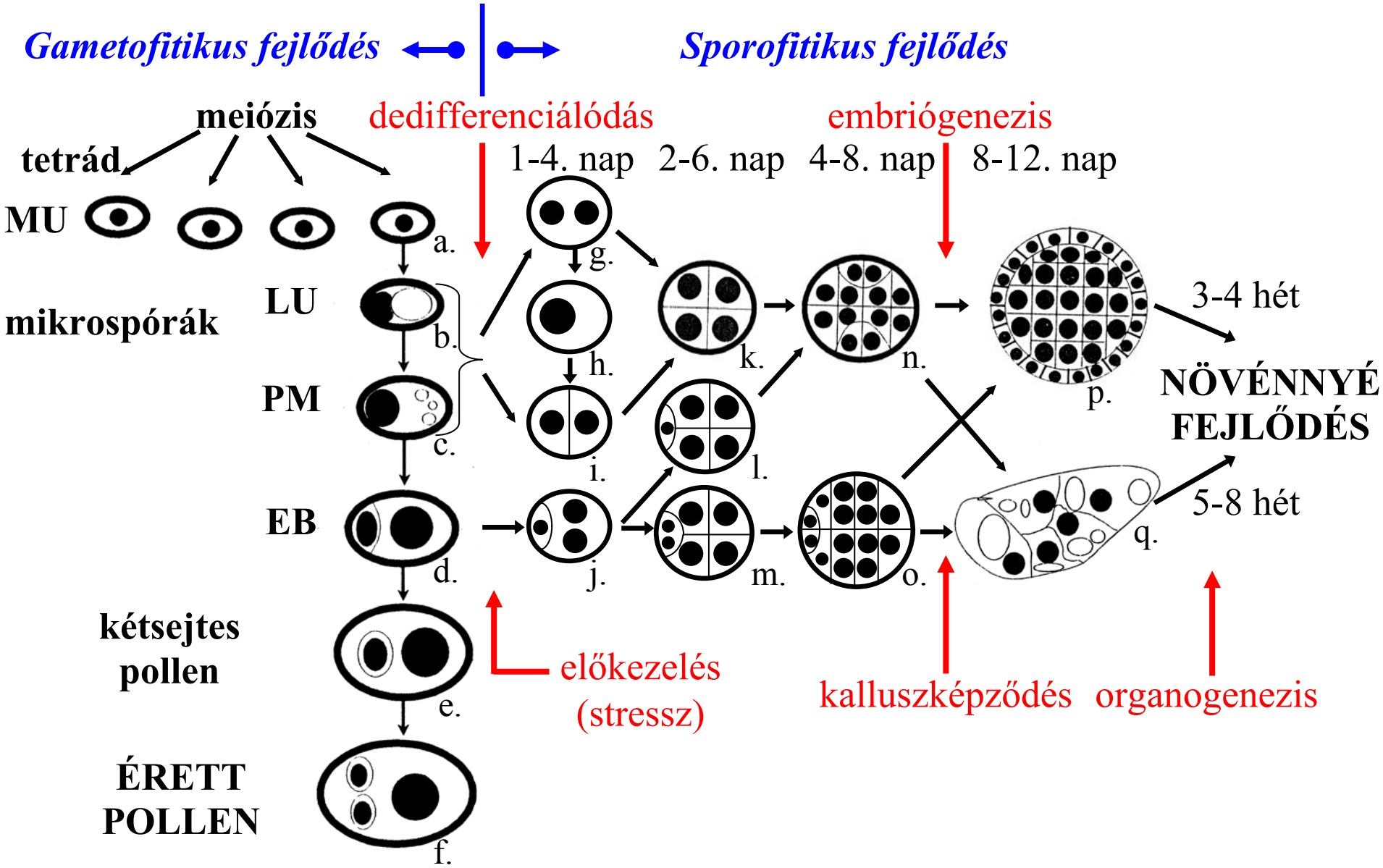
Ahhoz, hogy a mikrospóra kultúrákban különböző anyagok hatását vizsgálni lehessen, ismerni kell a mikrospórák *in vitro* sporofitikus fejlődését a kontroll, azaz jó minőségű kezeletlen tenyészetekben. Ma már több fajban (árpa: Bolik és Koop, 1991; Maraschin és mtsai, 2005c; búza: Indrianto és mtsai, 2001; kukorica: Massonneau és mtsai, 2005) lehetőség van az egyes mikrospórák fejlődésének külön-külön történő nyomon követésére, így a mikrospórák *in vitro* fejlődési mintázatai már jól ismertek.

A stresszkezeléssel sporofitikus fejlődésre indukálható mikrospórák/pollenek általában az *in planta* fejlődésnek a középső egymagvas, de méginkább a kései egymagvas, a premitotikus vagy korai kétsejtes állapotában vannak (Barnabás és mtsai, 2001b; Maraschin és mtsai, 2005a). A mikrospóra anyasejtek meiotikus osztódásával kialakuló tetrádok függetlenné váló sejtjei a mikrospórák (Shivanna és Johri, 1985). E mikrospóráknak organellumokban gazdag a citoplazmájuk, ami csak apró vakuólumokat tartalmaz a közép-egymagvas (mid uninucleate, MU) fejlődési állapotban. A sejtmag a mikrospóra közepén helyezkedik el (3a. ábra), de a vakuólumok polarizált irányú növekedése miatt a sejtfal felé kezd elmozdulni. Mire e sejtek elérik a késői egymagvas (late uninucleate, LU) állapotot, lumenüket egyetlen hatalmas vakuólum tölti ki, citoplazmájuk vékony réteget képez a sejtfalhoz tapadva, s ebben helyezkedik el a sejtmag is, mégpedig az exinén megfigyelhető pórussal szemben (3b. ábra). E mikrospórák a premitotikus (PM) fejlődési állapotban (3c. ábra) felkészülnek egy sejtosztódásra, az ún. első pollen-mitózisra, így elérik a korai kétsejtes (early binucleate, EB) fejlődési állapotot. E két sejt közül a vegetatív sejt alkotja az így kialakult pollen fő tömegét, a generatív sejt pedig a pollen széléhez tapad. A vegetatív sejt magja nagyobb, s benne a DNS kevésbé kondenzált állapotú, mint a generatív sejté. Eleinte

csak a sejtmembránok választják el e két sejtet egymástól, de a generatív sejt hamarosan egy kallóz sejtfalat szintetizál, mely az intinéhez kapcsolódik (3d. ábra). Ezt követően a generatív sejt a vegetatív sejt belsejébe kerül, és megkezdődik a pollentömlő növekedéséhez a későbbiekben szükséges keményítő felhalmozása. Ettől az állapottól kezdve azonban már nem indukálható a sporofitikus fejlődés (3e. ábra). Végül a generatív sejt osztódik (3f. ábra).

A stresszkezelés után a gametofitikus fejlődésben leállított, sporofitikus fejlődésre indukálódott embriogén mikrospórákra sajátos, a legtöbb faj esetén csillagszerű (star-like) citoplazmaszerkezet a jellemző. Ez a csillagszerű sejtmorfológia sok esetben a szomatikus embriógenezis kiindulási sejtjeire is jellemző (Dubois és mtsai, 1991; Indrianto és mtsai, 2001), sőt, az *in vitro* tenyésztett zigótáknál is megfigyelhető (Kranz és mtsai, 1995; Pónya és mtsai, 1999b). Előfordul, hogy nem csillagszerű, hanem citoplazmában gazdag, de keményítőszemeket ugyancsak nem tartalmazó mikrospórák is embriószerű struktúrákká fejlődnek (Kumlehn és Lörz, 1999; Indrianto és mtsai, 2001). Mindenesetre, az eddigi tapasztalatok alapján úgy tűnik, hogy a mikrospórákban egyfajta radiális polaritás létrejötte, azaz a sejtmag, a citoplazma és a vakuólumok sugárirányú elrendeződése és az ezzel járó magas szimmetriafoka kedvező a későbbi sporofitikus fejlődés megindulásához (Maraschin és mtsai, 2005a). A sporofitikus útra felkészült mikrospórákon kívül előfordulnak a tenyészetben a stresszkezelés során elpusztult, vagy nem indukálódott, azaz a gametofitikus útra jellemző polaritású mikrospórák is, melyek a későbbiekben az *in vivo* fejlődéshez hasonlóan keményítőt halmoznak fel. Jó minőségű tenyészetben azonban ezek száma viszonylag csekély. Megjegyezendő azonban, hogy bizonyos esetekben éppen a gametofitikus fejlődés *in vitro* megvalósítása a cél (*in vitro* pollenné nevelés, pl. Tupy és mtsai, 1991, Touraev és mtsai, 1997b).

Az sporofitikus fejlődésre indukálódott mikrospórákban intenzív mag- és sejtosztódás indul meg (Sunderland és Evans, 1980; Indrianto és mtsai, 2001; Hu és Kasha, 1999; Hause és Hause, 1996; Barnabás és mtsai, 2001b). Ennek során a kései egymagvas mikrospórák gyakran szimmetrikusan osztódnak az előkezelést követő néhány napon belül (Sunderland és Evans, 1980; Barnabás és mtsai, 1999), így a mikrospórából két egyforma méretű sejtmagot tartalmazó pollenszem fejlődik (3g. és i. ábrák). E két mag további osztódásával jönnek létre a több egyforma sejtmagot tartalmazó pollenek (sokmagvas pollenszemek, 3k. ábra).



3. ábra. A mikrospórák gametofitikus és sporofitikus fejlődési útjait bemutató sematikus ábra. MU: „mid uninucleate", azaz középső állapotú egymagvas, LU: „late uninucleate", azaz késői egymagvas, PM: „premitotic", azaz az első pollen mitózisra felkészült mikrospórák; EB: „early bicellular", azaz korai állapotú kétsejtes pollen. Az egyes fejlődési utak részletes magyarázatát ld. a szövegben.

A magosztódásokkal egy időben, esetleg azt követően új sejtfalak szintetizálódnak, létrehozva az ún. soksejtes pollenszemeket (3n. ábra). A sokmagvas, ill. soksejtes pollenszemeknek még ép a külső sejtfala, az exinéje. Előfordulnak olyan sporofitikusan fejlődő pollenek is, amelyekben a magosztódásokat követően sem alakulnak ki tökéletes, a leánysejteket egymástól elzáró teljes sejtfalak, vagy egyáltalán nem is történik sejtfalszintézis (Chen és mtsai, 1984). Az ilyen struktúrákból azonban nem fejlődnek embriók (Hause és Hahn, 1998). Sok esetben az első mitózis aszimmetrikus, melynek eredményeként az *in vivo* fejlődéshez hasonlóan egy generatív és egy vegetatív típusú sejtmag alakul ki (Sunderland és mtsai, 1979; Maraschin és mtsai, 2005b). Ezt követően általában vagy csak a vegetatív típusú sejt (3j. és l. ábrák), vagy mindkét sejt osztódik (3m. és o. ábrák). Általában azonban a generatív sejt osztódásával indulhat az embriófejlődés (Raghavan, 1976). Harmadik lehetőség, hogy a két sejtmag fuzionál (Kasha és mtsai, 2001; Testillano és mtsai, 2004; González-Melendi és mtsai, 2005), mielőtt megindulnának a további sejtosztódások, így az eredetileg haploid kromoszóma állomány spontán megduplázódik, és ún. dihaploid (DH) mikrospórák keletkeznek (3h. ábra) (Hu és Kasha, 1999; Kasha és mtsai, 2001; Touraev és mtsai, 1997a; Zaki és Dickinson, 1991). További fejlődési utak is léteznek, de csak ritkán és bizonyos növényfajoknál (Raghavan, 1997). A különböző típusú osztódások gyakran egyazon tenyészetben is megfigyelhetők. Gyakoriságuk nemcsak faj és genotípusfüggő, hanem függ az előkezelés típusától is (Kasha és mtsai, 2001; Indrianto és mtsai, 2001). Gabonaféléknél az ismertetett utakon 2-8 nap alatt fejlődnek ki a soksejtes pollenszemek, s további 3-6 nap szükséges ahhoz, hogy a sokasodó sejtek nyomására a mikrospóra külső fala, az exine, felhasadjon. Az embriogén soksejtes pollenek citoplazmában gazdag sejtekből állnak. E struktúrák polarizáltak, ugyanis többnyire az exine pórusa közelében keményítőszemcséket tartalmazó sejtek vannak, míg a többi sejt nem tartalmaz keményítőt. A későbbiekben mindig a keményítőtartalmú sejtekkel szemben levő oldalon hasad fel az exine (Indrianto és mtsai, 2001). Az exine felhasadásának helye alatt, legalábbis az árpa esetében, gyakran toluidinkékkel igen erősen festődő citoplazmájú, kis méretű sejtek vannak, melyek valószínűleg a hasonló morfológiájú generatív típusú sejt leszármazottjai (Pulido és mtsai, 2005). Az exine felhasadása után ezek a kis méretű sejtek apoptózissal elpusztulnak és leválnak (Maraschin és mtsai, 2005b, c). A mikrospóra fő tömegét adó nagyobb méretű sejtekből pedig szabályos embriók ill. embriószerű struktúrák (ezeket kisméretű és relatíve nagy sejtmagvú, organellumokban gazdag sejtek építik fel, 3p. ábra), vagy kalluszok (ezek vakuolizált, nagy méretű és citoplazmában szegény sejteket tartalmaznak, 3q. ábra) fejlődnek.

Ezek a tenyésztés 4-5. hetétől kezdve kicsíráznak, ill. a kalluszok organogenezissel haploid és DH növényekké regenerálódnak (Indrianto és mtsai, 2001, Maraschin és mtsai, 2005b).

Sajnos, genotípustól ill. a tenyésztési körülményektől is függően (Caredda és mtsai, 2004; Touraev és mtsai, 2001) a regeneráns növények egy része a plasztisz-genom részleges delécióját (Mouritzen és Holm, 1994), vagy az L2 protein hiánya miatt albínó. Az L2 protein a plasztiszokra jellemző riboszomális fehérje, amely a plasztiszokban történő fehérjeszintézishez nélkülözhetetlen (Hess és mtsai, 1993). Az albínó regeneránsok genotípus- és tenyésztési protokollfüggése valószínűleg azzal magyarázható, hogy a plasztiszok fent említett abnormalitásai felléphetnek az *in planta* pollenfejlődés korai szakaszában vagy az előkezelés során (Caredda és mtsai, 2000, 2004). Mivel az albínó növények semmilyen biotechnológiai célra nem használhatók fel, ezért arányukat csökkenteni kell.

Újabban, a mikrospórák *in vitro* tenyésztési módszereinek és a molekuláris technikák fejlődésének eredményeként számos információ napvilágra került a mikrospórák sporofitikus fejlődésének molekuláris hátteréről is (a téma áttekintése: Maraschin és mtsai, 2005a). A mikrospóráknak a gametofitikus fejlődésről való letérése az előkezelés során adott stresszválaszban nyilvánul meg. Ekkor számos olyan gén indukálódik, mely a proteolízisben játszik szerepet, ilyen pl. az *FtsH* metalloproteáz (Maraschin és mtsai, 2005d). Az ABA mint növényi stresszhormon által indukált gének expressziója is megnövekedik, pl. az *EcMt* (*early cistein-labeled metallothionein*, Reynolds, 2000) és az *ADH3* (*ALCOHOL DEHYDROGENASE3*, van Bergen és mtsai, 1999; Maraschin és mtsai, 2005d) génjeié. A stresszválasz részeként megváltozik a szacharóz-keményítő anyagcserében szerepet játszó gének expressziója is: számos, a szacharóz és a keményítő szintézisében részt vevő gén expressziója csökken, míg pl. a keményítő, ill. a szacharóz lebontásáért felelős maltáz ill. invertáz génjei indukálódnak (Datta és mtsai, 2002; Maraschin és mtsai, 2005d). A sejtek stresszorral szembeni ellenálló-képességét növelő fehérjék szintéziséért felelős gének is expresszálódnak, ilyenek pl. a *HSP* (*Heat shock proteins*, Schöffl és mtsai, 1999; Bárány és mtsai, 2001) vagy a *GST* (*GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE*, Vrinten és mtsai, 1999).

A stresszválaszt követően a sejtciklust szabályozó és az embriógenezis fejlődési programot irányító kulcsfontosságú gének expressziójának eredményeképpen indulnak meg a mikrospórákban a sejtosztódások. E gének, pl. az *AGL15* (*AGAMOUS-like 15*, Perry és mtsai, 1999), a *BBM* (*BABY BOOM*, Boutilier és mtsai, 2002), a *LEC1* (*LEAFY COTYLEDON1*) és *LEC2* (Harada, 2001), a *WUS* (*WUSCHEL*) és a *SERK* (*SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR_LIKE KINASE*, Schmidt és mtsai, 1997; Baudino és mtsai, 2001) a zigotikus embriókból is jól ismertek (Maraschin és mtsai, 2005a; Raghavan, 2006b). A mikrospóra

eredetű embriók különböző szöveteinek differenciálódásában kulcsfontosságúak a *14-3-3* proteincsalád tagjai (Maraschin és mtsai, 2003a,b), csakúgy, mint a zigotikus embriókban (Testerink és mtsai, 1999). Az embrió szerveinek megfelelő kialakulásához bizonyos sejtcsoportok vagy szövetek eliminációja is szükséges, mely programozott sejthalál révén történik meg (Bohzkov és mtsai, 2004; Suarez és mtsai, 2004). A programozott sejthalál szerepét a mikrospóra embriógenezisben is bizonyították (Maraschin és mtsai, 2003b).

Annak ellenére, hogy a mikrospóra embriógenezis citológiai szinten elég jól feltártnak tekinthető, még rengeteg kutatómunkára van szükség ahhoz, hogy e fejlődési út molekuláris hátterét a részletekre kiterjedően is megismerjék, és így genotípusfüggetlen módon kontrollálható legyen a mikrospóra embriógenezis indukciója. Erre azért van nagy szükség, mert ahhoz, hogy a mikrospóra tenyészeteket széleskörűen fel lehessen használni gyakorlati célokra, a gazdaságilag fontos növényfajok bármely genotípusából hatékonyan elő kell tudni állítani DH növényeket. Továbbá, a mikrospóra és a zigotikus embriógenezis biokémiájának feltárásával ismertté válnak az embriogén fejlődéshez nélkülözhetetlen szignálmolekulák és azok hatásmechanizmusai is, így várhatóan azt is megértjük, milyen anyagok milyen módon fejtenek ki dajka-hatást a tenyésztett sejtekre.

3. 9. A mikrospóra-embriógenezis a gyakorlatban és az alapkutatásban

A mikrospóra eredetű tenyészeteket (portok és izolált mikrospóra kultúrák) igen széles körben alkalmazzák mind biotechnológiai célokra (Barabás és mtsai, 1990; Touraev és mtsai, 2001; Szakács és mtsai, 2002; Heszky, 2003; Zheng, 2003; Shariatpanahi és mtsai, 2006), mind az alapkutatásban (Touraev és mtsai, 2001; Zheng és mtsai, 2003; Maluszynski és mtsai, 2003; Maraschin és mtsai, 2005a; Pulido és mtsai, 2006b). A mikrospórák *in vitro* tenyésztése a növénynemesítésben lehet a legnagyobb jelentőségű. A növénynemesítők által kiválasztott törzsek keresztezésével nyert növényekből e módszerrel nagy számú DH vonal állítható elő, amelyek már alkalmasak géntérképezésre, ill. a nemesítés szempontjai szerinti agronómiai tesztek elvégzésére és ennek eredménye alapján történő szelekcióra. A szelekció során kiválasztott vonalak pedig egyetlen nemzedék során homozigóta formában felszaporíthatók (Pauk és mtsai, 1999). E módszer gyorsabb és ebből adódóan hatékonyabb, mint a konvencionális/klasszikus nemesítés, ahol 8-10 nemzedéken keresztül végeznek önporzásokat (selfing) mire a tesztelésre alkalmas, tehát megfelelő beltenyésztettségi fokú, azaz már gyakorlatilag minden lókuszra nézve homozigóta vonalakhoz eljutnak. Már eddig is több búzafajtát (1986: Florin: DeBuyser és mtsai, 1987; 1993: GK Délibáb; 1994: Mv Szigma; 1996: Mv Madrigál, GK Ambitus és GK Szindbád: Pauk és mtsai, 1995; Lőkös-Tóth és mtsai,

1997; Bedő és mtsai, 1999) létrehoztak mikrospóra eredetű tenyészetek (portokkultúrák) segítségével.

A növénnyé regenerálható haploid sejtek, így az *in vitro* körülmények között nevelendő mikrospórák elvileg nagyon célszerű objektumai a genetikai transzformációnak is, mert így nem kiméra és jórészt homozigóta transzgénikus növényekhez juthatunk (Touraev és mtsai, 2001; Jähne és mtsai, 1994; Bolik és Koop, 1991).

Mivel potenciálisan minden egyes mikrospórából egyedi génkombinációval rendelkező növény fejlődhet, mely egy-egy önálló vonal kiindulását jelenti, e tenyésztési rendszerek eredményesen alkalmazhatók *in vitro* szelekciós kísérletekben is, tovább növelve a növénynemesítés hatékonyságát. Így például fagytűrésre (Kovács és mtsai, 1997), szárazságtűrésre (Rahman és mtsai, 1995), Al toleranciára (Nunez és mtsai, 1985; Barnabás és mtsai, 2000; Darkó és mtsai, 2002a, 2003, 2004) vagy oxidatív stressz rezisztenciára (Ambrus és mtsai, 2005, 2006; Darkó és mtsai, 2002b) szelektálhatók nemesítési szempontból értékes vonalak utódai. Az *in vitro* szelekciós kísérletek alapja, hogy a környezethez való alkalmazkodásban szerepet játszó gének expressziós mintázata nagyon hasonló a növényfejlődésnek mind a vegetatív, mind a generatív szakaszában (Frova, 1990; Seary és Mulcachy, 1990).

Az izolált mikrospóra kultúrák azért is jelentősek, mert a mikrospórákból fejlődő nagy számú embriószerű struktúra ideális kísérleti anyagot jelent az embriógenezis citológiai és molekuláris biológiai vizsgálatához (Touraev és mtsai, 1995; Vrinten és mtsai, 1999; Maraschin és mtsai, 2005a), továbbá különböző, természetes vagy mesterséges vegyületek, pl. hormonok vagy potenciálisan toxikus anyagok hatásának tanulmányozásához (Kovács és mtsai, 1994; Hu és mtsai, 1995; Liu és mtsai, 2002; Pulido és mtsai, 2005, 2006a).

Végül, munkánk szempontjából az a leglényegesebb, hogy az izolált mikrospórák az általuk termelt és a tápoldatba kibocsátott növekedést szabályozó anyagok révén dajkasejtekként is felhasználhatók zigóták *in vitro* felnevelésére (Holm és mtsai, 1994; Kumlehn és mtsai, 1998; Kranz és Kumlehn, 1999). Az egyedileg izolált zigóták ugyanis nem képesek önálló fejlődésre, mert nem állnak rendelkezésükre a természetes körülmények között az endospermium és az anyai szövetek által termelt növekedésszabályozó anyagok (Holm és mtsai, 1994; Kumlehn és mtsai, 1998; Kranz és Kumlehn, 1999). A mikrospórák fontosságát mutatja, hogy a búza izolált zigótáit eddig kizárólag mikrospóra dajka segítségével lehetett felnevelni (Kranz és Kumlehn, 1999).

Az áttekintett szakirodalom alapján látható, hogy a mikrospóra embriógenezis in vitro tanulmányozása számos lehetőséget jelent mind az alap-, mind az alkalmazott kutatásban.

4. A kutatási célok összefoglalása

A szakirodalom áttekintése alapján az alábbi célok megvalósítását tartottuk fontosnak:

A. A búza zigóták *in vitro* felnevelése: az egy-sejt tenyésztési technika meghonosítása, hatékony megvalósítása és munkaigényességének csökkentése.

B. Annak megválaszolása, hogy milyen mértékben képesek az *in vitro* tenyésztett zigóták reprodukálni az *in planta* fejlődési utat:
   - hogyan alakulnak a zigóták kezdeti sejtosztódásai,
   - milyen sejttípusok és szövetek jellemzik az *in vitro* embriókat?

C. Idegenfajú megporzások megvalósítása:
   - búza × kukorica: annak megválaszolása, hogy felnevelhetők-e idegenfajú megporzással aktivált petesejtek az egy-sejt tenyésztési rendszerben,
   - búza × rizs: utódnövények előállítása egy eddig még nem vizsgált keresztezési kombinációból, hogy jövőbeli kutatások keretében meg lehessen vizsgálni, történik-e génátvitel a rizsből az utódokba.

5. Anyag és módszer

5. 1. Növényi anyagok: árpa-, búza-, kukorica és rizsnevelés

Az árpa szemtermeséket (*Hordeum vulgare* L. *cv*. Igri) Petri csészébe tett megnedvesített szűrőpapír felületén szobahőmérsékleten csíráztattuk, majd a 3. napon Jiffy tápkockába ültettük. Az egy hetes korú növénykéket vernalizációs kamrába helyeztük 6 hétre (4°C, 10 μmol m^{-2} sec^{-1}, 8 órás megvilágítás). A növényeket vernalizálás után cserépbe ültettük és klímakamrában neveltük 13/11 °C-os nappali/éjszakai hőmérsékleten, 16 órás megvilágítás és 230 μmol m^{-2} sec^{-1} fényerő mellett.

A búzaszemeket (*Triticum aestivum* L.) az árpával azonos módon csíráztattuk, majd tápkockába ültettük és vernalizáltuk. Az Mv Pálma, az Mv Ködmön és az Mv9kr1 őszi búzafajták hidegkezelése 6 hétig, a Siete Cerros és a Chinese Spring tavaszi genotípusoké pedig 4 hétig tartott. A növényeket vernalizálás után cserépbe ültettük és klímakamrában 13/11 °C-os nappali/éjszakai hőmérsékleten, 12 órás megvilágítás és 230 μmol m^{-2} sec^{-1} fényerő mellett szárbaszökésig neveltük, majd 22/16 °C-os nappali/éjszakai hőmérsékletre helyeztük őket 16 órás megvilágítás és 270 μmol m^{-2} sec^{-1} fényerő mellett.

A kukoricaszemeket (*Zea mays*, L. *cv.* Norma SC) 26 ºC-on 6 napig csíráztattuk, majd a növényeket cserépbe ültettük és klímakamrában neveltük a Bk program segítségével (Tischner és mtsai, 1997). A klímaprogram 18/15 ºC-on (nappal/éjszaka) indult, majd a hőmérséklet kéthetenként emelkedett, és a virágzás idejére (kb. 8 hét) elérte a 24/20 ºC-ot. A napi 16 órán keresztüli megvilágítás intenzitása 375 μmol/m^2s volt.

A rizsszemeket (*Oryza sativa* L. *cv.* Rigola és Bioryza), melyeket Simonné Dr. Kiss Ibolya (Halászati és Öntözési Kutatóintézet, Szarvas) bocsátott rendelkezésünkre, 26 °C-on csíráztattuk 1 hétig, majd tápkockába ültettük. A növénykék megerősödése után (további 5-7 nap) történt a cserépbe ültetés. A cserepek alá helyezett mély, vízzel teli tálcákkal biztosítottuk, hogy a talaj mindig vízzel telített legyen. A klímakamra hőmérséklete kezdetben 20/18 °C volt (nappal/éjszaka), majd hetente 1 °C-kal emelkedett, amíg el nem érte a 28/26 °C-ot. A fejlődő növényeknek 400 μmol m^{-2} s^{-1} fényintenzitással világítottunk naponta 12 órát.

5. 2. Sejttenyésztési módszerek

5. 2. 1. Árpa izolált mikrospóra tenyésztés

Az árpa mikrospóra tenyészetek indítása Olsen (1991) módszere alapján történt, kisebb módosításokkal. A kései egymagvas fejlettségi állapotú mikrospórákat tartalmazó kalászok portokjait steril körülmények között izoláltuk és 0,3 M mannitololdatba helyeztük, majd 3 napig 26 °C-on sötétben inkubáltuk. Ezt követően a mikrospórákat a turmixgéphez hasonló Waring Microblendor segítségével 18 ml 0,3 M mannitololdatban izoláltuk, alkalmanként 7-10 kalász portokjaiból. Az izolálás időtartama 3×5 másodperc volt, először „magas", majd kétszer „alacsony" fokozaton. Az egyes őrlések között a készülék mikrospórákat tartalmazó feltétjét összeráztuk, hogy a feltétet lezáró fóliára tapadt portokokat eltávolítsuk, növelve ezzel a kinyerhető mikrospórák számát. A folyamat eredményeként kapott szuszpenziót 100 μm pórusméretű nylonhálón átszűrtük, így eltávolítottuk a portokfal maradványait. Az átszűrt szuszpenziót 50 g-vel 5 percig centrifugáltuk, majd eltávolítottuk a felülúszót, és a pelletet 3 ml 0,3 M mannitololdatban újraszuszpendáltuk. Az így nyert mikrospóra szuszpenziót 2 db 15ml-es centrifugacsőben 7-7 ml 21 %-os maltózoldat felületére rétegeztük és grádiens-centrifugálással tisztítottuk tovább (85 g, 10 perc, Mordhorst és Lörz, 1993). Ezt követően a két oldat határán elhelyezkedő mikrospórákat összegyűjtöttük, és MMS3 tápoldat: víz = 3:1 arányú keverékével 12 ml-re felöntöttük, majd ismét lecentrifugáltuk (50 g, 5 perc). A felülúszó eltávolítása után a mikrospórákat 2 ml MMS3 tápoldatot tartalmazó tenyészetekbe osztottuk szét, melyekben az élő mikrospórák sűrűsége 100000/ml volt. Az MMS3 egy MS-alapú, szénforrásként maltózt tartalmazó tápoldat (Hu és Kasha, 1997). Csak azokat a tenyészeteket használtuk dajkaként az izolált búza zigóták felneveléséhez, melyekben az életképes mikrospórák kezdeti aránya meghaladta a 80 %-ot.

5. 2. 2. Búza izolált mikrospóra tenyésztés

Az izolált mikrospóra tenyészetekhez az Mv Pálma búzafajtát használtuk. A zigóták számára dajkákként alkalmazott mikrospóra tenyészeteket az árpa mikrospóra tenyészetekkel lényegében azonos módon készítettük el. Az eltérés csak annyi volt, hogy az előkezelés során az alufóliába csomagolt kalászokat 2 hétig 4 °C-on tartottuk, ill. a mikrospóra izolálás során 0,4 M mannitololdatot használtunk, és a tenyészetekbe ml-enként 10 éretlen termőt helyeztünk (Bakos és mtsai, 2003a). Az „éretlen", ill. „fiatal" termőkön a virágzáshoz (antézis) képest 3-5 nappal fiatalabb termőket értjük.

5. 2. 3. A búza zigótáinak izolálása az anyai szövetekből

A búza (Siete Cerros, Mv Pálma, Mv Ködmön, Mv9kr1, Chinese Spring genotípusok) kalászait 4-7 nappal az antézis előtt kasztráltuk, és izoláltuk. A megporzásokat az antézisnak megfelelő időben végeztük. A búza saját vagy idegen fajjal (kukorica, rizs) megtermékenyített petesejtjeit a Kovács és mtsai (1994) által kidolgozott „mikrosebészeti" eljárással izoláltuk. Röviden: a megtermékenyített petesejtet tartalmazó termőt borotvapengével keresztbe vágtuk az embriózsáknak a csírakapuhoz (*micropyle*) közelebb eső harmadának síkjában, majd rovartűk segítségével az ovulumnak ezt az alsó harmadát az izoláló oldatban (ld. később) kifejtettük. Ezekből az ovulumdarabokból a rovartűk segítségével az oldatba úsztattuk a zigótákat vagy petesejteket.

5. 2. 4. Búza izolált zigóták felnevelése

A búza zigóták *in vitro* felnevelésének módszerének tökéletesítésekor a kísérletek során a Siete Cerros búzafajtát használtuk. A zigótákat a megtermékenyítés után 6-18 órával, 0,6 M mannitol + 2 mM $CaCl_2$ tartalmú oldatban izoláltuk. A dajkatenyészetekbe (egyenként 0,5 ml) egy-egy db 9 mm átmérőjű Millicell insert (Falcon) nevű betétet helyeztünk, melynek az alján 3 μm-es pórusátmérőjű polikarbonát membrán van (2b. ábra). E membránon a sejtek nem, de a tápoldat oldott alkotórészei átjutnak, így e betét segítségével megvalósítható különböző típusú sejtek együtt-tenyésztése. Mindegyik betétbe 50 μl izolálóoldatot, majd további 2-3 μl oldat segítségével 4-8 zigótát tettünk az izolálásukat követő legfeljebb fél órán belül. A tenyészeteket 26 °C-on, védve az erős megvilágítástól, de nem teljesen sötétben tartottuk. A dajkasejteket minden esetben előtenyésztettük, MMS3 tápoldatban. Dajkákként árpa és búza izolált mikrospóra tenyészeteket (Kumlehn és mtsai (1998) eredményeinek megfelelően 7-10 napig előtenyésztve), valamint a búza 6-12 napos korban kipreparált embrióit vagy fiatal, megporzatlan termőit (3-4 napig előtenyésztve) használtuk. A termők esetén a 14. napon a megporzatlan termőket a zigótákkal azonos korú szemekre cseréltük ki. Tenyészetenként 5-5 db embriót, vagy fiatal termőt ill. 4 db búzaszemet használtunk. A zigótákból fejlődő embriók 3-5 hét alatt érték el az 1-2 mm-es méretet. Az embriókat ekkor helyeztük át szilárd B5 táptalajra (Gamborg és mtsai, 1968), ahol azok néhány nap alatt kicsíráztak. A jól fejlett növénykéket befőttesüvegben lévő B5 táptalajra átültettük, majd 4 héten át vernalizáltuk. A vernalizációt követő napon a növénykéket tápkockába, majd egy héttel később talajba ültettük és a magról vetett búza növényekkel azonos módon, klímakamrában felneveltük (Bakos és mtsai, 2003a, b).

5. 2. 5. Búza × kukorica megporzásokból származó izolált „zigóták” felnevelése

A kasztrált és izolált búzakalászokat az antézisnak megfelelő időben poroztuk a kukoricával. A keresztezések során az Mv Ködmön és az Mv Pálma búzafajtákat a Norma SC kukoricafajtával poroztunk be. A megporzást követő napon minden termőt egy csepp 3 mg/l 2,4-D és 100 mg/l $AgNO_3$ tartalmú oldattal kezeltünk, hogy az anyai szövetek parthenokarp fejlődését megindítsuk (O’Donoughue és Bennett, 1994). Az ily módon megtermékenyített petesejteket két nappal az idegenporzás után izoláltuk Kovács és mtsai (1994) módszere alapján. Az izolált sejteket az azonos fajjal megtermékenyített búza zigótákkal azonos módon, dajkaként fiatal termőket használva tenyésztettük és neveltük fel (Bakos és mtsai, 2003b, 2005). Kontrollként a hagyományos embriómentési technikát is alkalmaztuk, amikor az idegenporzásból származó embriókat 14 napos korban izoláltuk és B5 táptalajra helyeztük dajkasejtek nélkül.

5. 2. 6. Búza izolált zigótáinak hatékony felnevelése

A búza zigótatenyésztési módszer további optimalizálásának köszönhetően egy hatékonyabb tenyésztési eljárást is sikerült kidolgoznunk. E technikával a megporzást követően 3-4 órával izolált zigótákat 6 lyukú (∅=3 cm) lemezen levő dajkatenyészetekbe helyeztünk, a fentiekben ismertetett Millicell betétekbe (lyukanként 1-2 betét). A dajkatenyészetek 3-4 napig halvány fényen, N6Z tápoldatban (Kumlehn és mtsai, 1998) előtenyészett éretlen búza termőket tartalmaztak. A megfelelő termők az előtenyésztés során kissé megzöldültek (15-20 ovárium/1,5ml tápoldat). A zigóták izolálásához 0,18 M glükóz + 0,36 M mannitol + 2 mM $CaCl_2$ oldatot használtunk. Ebből az oldatból a zigóták áthelyezése előtt a betétbe pipettáztunk 50 µl-t, és csak ezután a sejteket. A zigótákat is tartalmazó tenyészeteket már sötétben tároltuk, 26ºC-on. Amikor az ováriumok kora elérte a 14-18. napot, a tápoldatból 600 µl-t ill. az ováriumok többségét eltávolítottuk (csak 3-4 db régi termőt hagyunk meg). Mindezek helyett 1 ml frissebb, 3-7 napig kondicionált N6Z tápoldatot és az ebben tenyésztett ováriumokat tettünk a tenyészetbe. Ilyen körülmények között a zigótákból 3-4 hét alatt legalább 1 mm-es embriók fejlődtek. Ezeket szilárd N6D táptalajra (Kumlehn és mtsai, 1998) helyeztük, és 26 ºC-on, fényen tartottuk, ahol az embriók néhány nap alatt kicsíráztak. Az ezt követő növénynevelés a korábban ismertetett eljárás szerint történt.

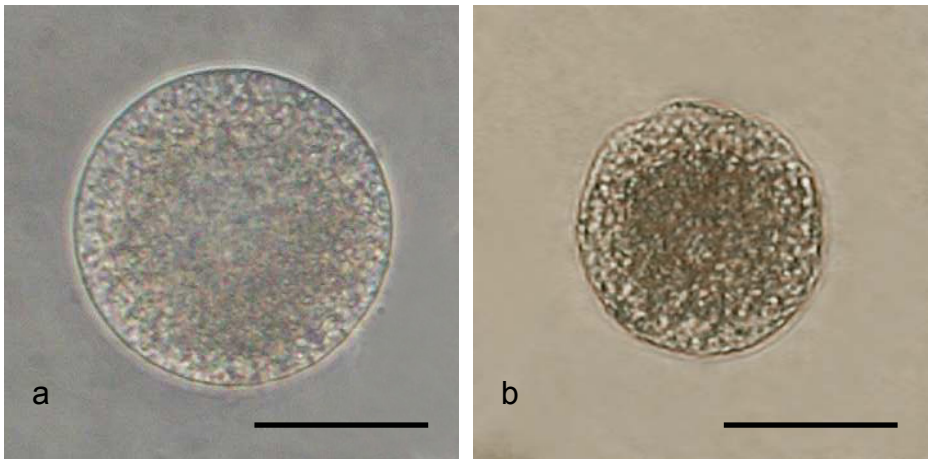
5. 2. 7. A búza × rizs keresztezésekből származó izolált „zigóták” tenyésztése

Az ismertetett kísérletek során az Mv9kr1 és a Chinese Spring, recesszív keresztezhetőségi géneket tartalmazó búza genotípusokat a Bioryza és Rigola rizsfajtákkal poroztuk meg. A búza × rizs megporzásokat a búza × kukorica megporzásokkal azonos módon végeztük el, de a 3 mg/l 2,4-D és 100 mg/l $AgNO_3$ tartalmú oldattal csak azokat a termőket kezeltük, melyekből a zigóta/embrió kimentését 1 napnál idősebb korban kíséreltük meg. Az embriómentés folyamatát is a búza × kukorica megporzásoknál leírtak szerint végeztük el, azonban a petesejtekből kifejlődő struktúrákat 1, 2, 3 és 4 napos korukban is izoláltuk. Ezeket a kimentett „zigótákat” a már tovább optimalizált egy-sejt tenyésztési módszerrel, N6Z tápoldatban a búza fiatal termőivel együtt neveltük. A petesejt eredetű struktúrák egy részét DAPI-val megfestettük közvetlenül az izolálás után.

5. 3.Sejttani, citokémiai és analitikai vizsgálatok

5. 3. 1. Zigóták életképességének megítélése

Mivel a zigóták száma nagyon korlátozott, nem volt célszerű e sejteket elpusztítani azzal, hogy megfestjük őket az életképesség meghatározása végett. A zigóták életképessége nagyon jól látható az izolált sejtek morfológiai bélyegei alapján is (Kumlehn és mtsai, 1998, 1999; Bakos és mtsai, 2003b): az élő zigóták membránja ép, így e sejtek szabályos gömb alakúak, méretük 50 μm körüli, sejtmagjuk középen helyezkedik el, organellumokban gazdag citoplazmájuk a sejtmagot minden irányból, de polarizáltan veszi körül. A sejt szélén kisméretű vakuólumok vannak, melyek mennyisége szintén polaritást mutat (4a. ábra).



4. ábra. (a) élő és (b) elpusztult zigóta a sejtizolálás után 1 órával. Bárok: 25 μm.

Az elpusztult zigóták mérete kisebb, és sötét színük jól mutatja az organellumok összecsapzódását (4b. ábra). A zigóták megfigyelését egy M35 (Zeiss, Germany) inverz mikroszkópon végeztük. A sejtmorfológia alapján megítélt életképességi arány egy kísérletben (3×20 zigóta) teljes azonosságot mutatott az FDA-festés (Widholm, 1972) eredményével (nem mutatott adatok).

5. 3. 2. Sejtmagvak DAPI festése

A zigóták sejtmagvainak DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) festését (Vergne és mtsai, 1987) közvetlenül végeztük: a 10 µl térfogatú izolálóoldat-cseppben lévő zigótákhoz 5 µl 0,1 % Triton X-100-tartalmú 1 µg/ml-es DAPI oldatot pipettáztunk, és a sejteket 1-2 percen belül megfigyeltük a fluoreszcens mikroszkópban.

5. 3. 3. Ploiditásfok meghatározása

A sejtmagokat úgy izoláltuk, hogy a növényenként 1-1 hajtásról levágott kb. 1-2 cm^2 alapterületű levéldarabot 0,5 ml NBI pufferben (nuclear buffer I, Galbraith és mtsai, 1983) borotvapengével törmelékké szabdaltuk, majd 30 µm pórusméretű nylonhálón átszűrtük. Az így nyert sejtmag szuszpenziót 13 µl 0,5 mg/ml koncentrációjú propidium-jodid oldat hozzáadásával festettük meg (min. 3 perc). A ploiditásméréseket egy Becton Dickinson FACScan flow cytometer-rel végeztük és az adatokat Cell Quest szoftver segítségével értékeltük ki (Szakács és Barnabás, 2004). Kontrollként a vizsgált növény anyai szülőpartnerével megegyező genotípusú, hasonló korú, magról csíráztatott búzanövények leveleit használtuk.

5. 3. 4. Zigóta eredetű struktúrák előkészítése a mikroszkópos sejt- és szövettani vizsgálatokhoz

Az izolált zigótákból a dajkatenyészetekben fejlődő struktúrákat 26, 50, 98 órával, ill. 7, 12 és 20 nappal a megporzást követően fixáltuk a zigóták *in vitro* fejlődésének sejt- és szövettani vizsgálata céljából. Összehasonlításképpen megtermékenyítetlen, az antézis idején izolált petesejteket (a sejtizolálás után egy órával), valamint a megporzás után 26 és 50 órával ovulumokat, ill.14 napos szemeket is fixáltunk.

A 14 napos szemek kivételével a minták fixáláshoz és az azt követő mosási lépésekhez a kukorica petesejtek és zigóták fixálására leírt oldatot használtuk (Hoshino és mtsai, 2004) azzal a módosítással, hogy a 600 mM mannitol helyett a 450 mM glükóz szerepelt

ozmotikumként. E módosított, ún. MSB oldat alkotóin felül a fixálóoldat 4 % paraformaldehidet és 0,1 % glutáraldehidet tartalmazott még.

A kisebb mintákat (petesejtek, *in vitro* tenyésztett 26, 50, 98 órás és 7 napos zigotikus proembriók, ill. embriók) először tápoldatcseppbe helyeztük egy 5,5 cm átmérőjű Petricsészében. A csepp köré vizes összecsavart papírvattát helyeztünk, hogy így, a páradús környezet biztosításával csökkentsük a csepp párolgását a fixálási folyamat során. A cseppben a tápoldatot óvatos pipettázással fokozatosan fixálóra cseréltük, majd a minták lefedve 2 órát álltak a fixálócseppben. Ezt követően a fixálót a leírt módon a fixáló ágensek nélküli módosított MSB oldatra cseréltük. Ezután a kb. 20 µl térfogatú csepphez 7 µl langyosra hűlt, de még folyékony 4 %-os alacsony olvadáspontú agarózt (szintén a módosított MSB oldatban) adtunk és ezt óvatosan, de jól összekevertük a cseppel. E pipettázásos műveletek során a petesejteket/zigóta eredetű struktúrákat egy inverz mikroszkóppal mindvégig figyelemmel kísértük, hogy azok ne szóródjanak szét túlságosan a cseppben, és ne veszhessenek el az oldat eltávolításakor. Az így kapott megszilárdult cseppeket borotvapengével 1-2 mm-es kockaszerű darabokra vágtuk, ügyelve, hogy a vágásokkal ne szabadítsuk ki vagy sértsük meg a beágyazott struktúrákat. Az így kapott agarózkockákat kíméletes keverés közben (kb. 20 RPM a síkrázógépen) kis üvegcsövekben még kétszer 30 percig mostuk 1-1 ml módosított MSB oldattal, majd alkoholsor segítségével (1-1 óra inkubáció) dehidratáltuk, és végül a gyártó által javasolt protokoll szerint Unicryl (BioCell) műgyantába ágyaztuk.

A közepes méretű, kb. 1-2 mm-es mintákat (12 és 20 napos *in vitro* fejlődött embriószerű struktúrák, 26 és 50 órás ovulumok) szintén az előzőekben leírt oldatsor segítségével ágyaztuk műgyantába, de e mintákat nem ágyaztuk be agarózba, és mindvégig kis üvegcsövekben dolgoztunk. Minden egyes oldatban legalább 2 órán keresztül inkubáltuk a mintákat.

A 14 napos búzaszemeket félbevágtuk és csak az embriót tartalmazó felét ágyaztuk be. A beágyazás az 1-2 mm-es mintákhoz hasonlóan történt, de módosított MSB oldat helyett 0,05 M Na-kakodilát puffert használtunk, és a megfelelő átitatás érdekében 3 napig fixáltuk (naponta új fixálóban) majd ezt követően minden oldatban 2 napig inkubáltuk a félbevágott szemeket.

Az Unicryl műgyantával átitatott mintákat 200 µl-es Beam kapszulákban UV fény segítségével -20°C-on polimerizáltuk. A mikroszkópos vizsgálatokhoz a félvékony (1 µm-es) metszeteket egy Ultracut E (Reichert-Jung) ultramikrotom segítségével készítettük.

5. 3. 5. A zigóta eredetű struktúrákból készített metszetek sejt- és szövettani vizsgálata

5. 3. 5. 1. Toluidinkék-festés

A metszetekre toluidinkék oldatot (Sárkány és Szalai, 1957) cseppentettünk, majd metszetmelegítőn 20 másodpercig melegítettük a mintát. Végül desztillált vízzel lemostuk a festéket. A metszeteket megszáradás után DEPEX-szel fedtük le és fénymikroszkóppal vizsgáltuk.

5. 3. 5. 2. A sejtmagvak és a sejtfalak festése DAPI-val és Calcofluor white-tal (CFW)

A metszeteket 20 μg/ml DAPI és 1mg/ml Calcofluor white tartalmú oldatban 3 percig inkubáltuk, majd a festékeket desztillált vízzel leöblítettük. A deszt víz elpárolgása után a metszeteket Vectashield mounting medium-mal (Vector) fedtük le és a fluoreszcens mikroszkóppal azonnal megfigyeltük.

5. 3. 5. 3. A keményítőszemcsék és a fehérjetestek megfestése

A metszeteket a PAS-festést (perjódsavas Schiff-festés; McManus, 1948) követően Coomassie Brilliant Blue-val (CBB), Cawood és mtsai módszerét (1978) módosítva (Pulido és mtsai, 2006b) festettük meg. Végül a metszeteket light green festékkel kontrasztfestettük (McManus, 1948). A PAS festés eredményeképpen a keményítőszemcsék élénk bíborszinűre, a sejtfalak pedig világos rózsaszínre festődnek. A Coomassie blue festéssel a tartalékfehérjéket tartalmazó proteintestek festődnek kékre. A kontrasztfestékként alkalmazott light green a sejtmagvakat zöldre, a citoplazmát pedig halványzöldre festi.

A PAS festés során a poliszacharidokat 1 %-os perjódsav oldatban oxidációval feltártuk (20 perc), majd csapvizes mosást követően a szabaddá váló aldehidcsoportok Schiff reakciója révén a Schiff festékoldatban megfestettük (7 perc). A Schiff festékoldat 0,5 % bázikus fuxint tartalmaz 1 % kálium-metabiszulfit és 0,05 M HCl mellett. A nem kötődött fuxint az 1 % kálium-metabiszulfitot tartalmazó 0,05 M HCl oldattal mostuk ki (2 × 8 perc). Ezt követően a metszeteket háromszor desztillált vízzel leöblítettük, majd 30 percre 0,25 % Coomassie Brilliant Blue R250 abszolút metanol : víz : jégecet 9:9:2 arányú elegyével készült oldatába helyeztük. A fölösleges festéket az oldószerként használt eleggyel mostuk ki (3 × 5 perc). Újabb desztillált vizes öblítés után a metszeteket 40 percre 2 %-os light green 1 %-os esetsavval készült oldatába tettük. Végül a Light green festék fölöslegét is eltávolítottuk desztillált vizes öblítéssel. A metszeteket megszáradás után DEPEX-szel fedtük le és fénymikroszkóppal vizsgáltuk.

6. Eredmények

6. 1. A búza zigóták *in vitro* tenyésztésének feltételei: a sejtizoláláskor fellépő ozmotikus stressz csökkentése és a dajkasejtekkel történő együtt-tenyésztés

Ismeretes, hogy az izolált zigóták növénnyé neveléséhez mind a sejtek életképes állapotban történő hatékony izolálását (Kovács és mtsai, 1994), mind a további fejlődésükhöz szükséges növekedési faktorokat biztosítani kell (Kumlehn és mtsai, 1998, 1999; Kranz és Kumlehn 1999). Célunk az volt, hogy találjunk olyan tápoldatot, melyben e sejtek izolálhatók és egyben tenyészthetők is, vagy amennyiben ez nem lehetséges, olyan oldatpárt, ami lehetővé teszi a hatékony sejtizolálást és a sejtek áthelyezésekor sem lép fel a sejtek pusztulását okozó ozmotikus sokk, valamint a dajkasejtek fejlődését is lehetővé teszi.

A zigóták *in vitro* felnevelésére szolgáló módszer adaptálása során először megvizsgáltuk, milyen tápoldatban tudjuk sikeresen tenyészteni az árpa mikrospórákat, melyeket az eddigiekben dajkasejtekként használtak a zigóták felneveléséhez. Mivel Kumlehn és mtsai (1998, 1999) a glükóztartalmú N6Z tápoldatot használták a zigóták *in vitro* tenyészeteiben, legelőször ebben a tápoldatban próbálkoztunk az árpa mikrospórák tenyésztésével. Várakozásainkkal ellentétben azonban az N6Z tápoldatra áthelyezett 7-10 napos mikrospóra eredetű struktúrák elkalluszosodtak és növekedésük abbamaradt. Ezt követően ugyanezt tapasztaltuk az olyan MMS3 tápoldattal is, mely szintén glükózt tartalmazott. (Az említett, árpa mikrospórákból fejlődő struktúrák előzőleg a maltóztartalmú MMS3 tápoldatban intenzíven fejlődtek; nem bemutatott tapasztalatok.) Ezért a teljes tápoldatok közül a továbbiakban az egy-sejt tenyésztési rendszer adaptálásakor csak a maltóztartalmú MMS3-mal kísérleteztünk, melyről ismertük, hogy optimális az árpa mikrospórák számára, azaz lehetővé teszi a mikrospórák embriókká, majd növényekké fejlődését.

Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy milyen összetételű közegben tartható életben a zigóták minél nagyobb többsége az izolálás és az azt követő tenyésztés folyamán. Laboratóriumunk korábbi tapasztalatai (Kovács és mtsai, 1994) és más irodalmi adatok (Kumlehn és mtsai, 1998, 1999; Kranz és Kumlehn 1999) szerint a zigótákat és petesejteket 0,50-0,62 M mannitoltartalmú oldatban lehetséges izolálni, viszont a mannitolban e sejtek nem képesek tartósan fejlődni. Ezért a sejtizolálás és az azt követő *in vitro* tenyésztés során a zigóták túlélését olyan oldatokban vizsgáltuk, melyek sűrűsége vagy ozmotikus nyomása közel azonos az izoláláshoz eddig is használt 0,6 M mannitololdathoz. E kísérleteket petesejtekkel is elvégeztük, mivel a bevezetésben ismertetett biotechnológiai célok érdekében

végzett kutatások egy része csak nagyszámú életképes izolált petesejt felhasználásával valósítható meg. Vizsgálataink legfontosabb eredményeit az 1. táblázat összegzi.

1. táblázat. A zigóták izolálása, 24 órás túlélése és tenyészthetősége különböző oldatokban; *dajka: árpa izolált mikrospóra tenyészet. A kékkel szedett sorok azokat az oldatokat mutatják, melyekben a zigótákat és petesejteket hatékonyan lehet izolálni, de tenyésztésre nem alkalmasak; a pirossal szedett sor a zigóták tenyésztésére használható oldatot mutatja, melyben a sejtizolálás hatékonysága alacsony (részletesen ld. a szövegben).

Izolálóoldat	izolált petesejt/zigóta	izolálást túlélő petesejt/zigóta	24 órát túlélő petesejt/zigóta	Maximális fejlődési állapot*
0,6 M glükóz +$CaCl_2$ (2mM)	37/35	73%/66%	70%/63%	mikrokallusz
0,6 M mannitol +Ca	31/41	90%/88%	87%/78%	mikrokallusz
0,6 M szacharóz +Ca	30/35	37%/31%	17%/9%	mikrokallusz
0,6 M maltóz +Ca	32/33	41%/27%	19%/12%	mikrokallusz
0,4 M mannitol 0,2M glükóz +Ca	47/47	91%/89%	89%/85%	mikrokallusz
0,2 M mannitol 0,2M maltóz +Ca	43/38	67%/71%	47%/47%	mikrokallusz
0,3 M szacharóz +Ca	49/45	63%/58%	33%/24%	mikrokallusz
0,3 M maltóz +Ca	43/30	67%/63%	30%/20%	mikrokallusz
0,25 M maltóz +MMS3	52/47	23%/17%	17%/13%	**növény, 6%**

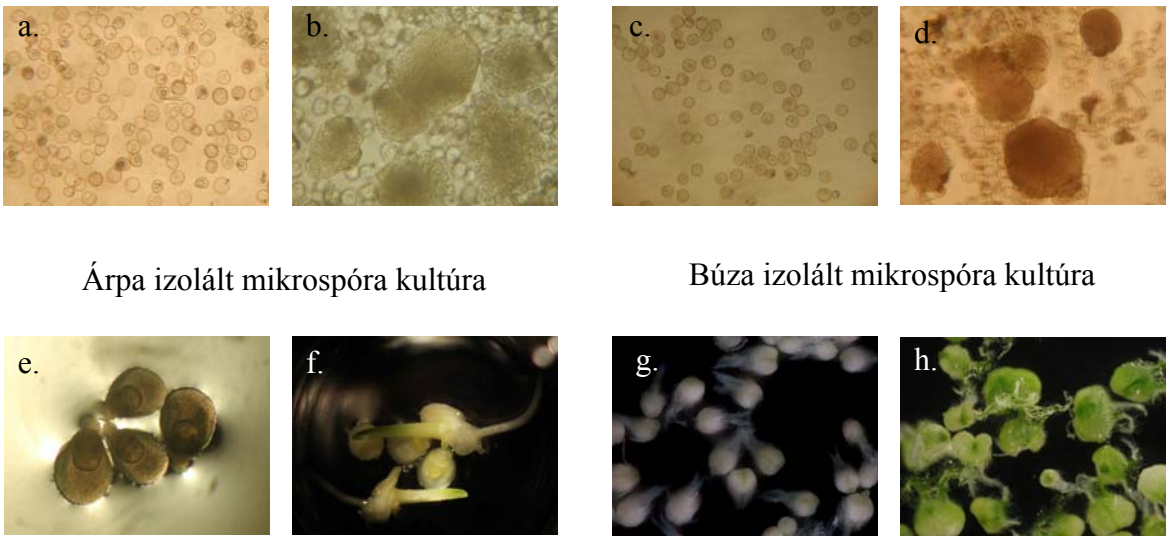
Kísérleteink során a búza zigótákat és a petesejteket csak a 0,6 M töménységű, mannitolt vagy mannitolt és glükózt tartalmazó oldatokban lehetett hatékonyan izolálni (1. táblázat, kékkel szedett sorok). Az azonos töménységű diszacharid-oldatokban az izolált sejtek a folyadék felszínére felúsztak, és ott szétdurrantak. Az alacsonyabb ozmolaritású, de közel azonos sűrűségű oldatokban a sejtek a folyadék alján maradtak, de a kedvezőtlen ozmotikus viszonyok miatt erősen megduzzadtak vagy bimbóztak, és közülük sok elpusztult. Izolálóoldatként a mikrospóra dajkasejtek tenyésztésére jól használható MMS3 tápoldatot is felhasználtuk, melyek a cukrokon és $CaCl_2$-on felül a makro- és mikroelemek sóit, valamint vitaminokat is tartalmaz. Ebben a tápoldatban azonban a petesejtek és zigóták igen intenzíven letapadtak az edény aljára vagy az izoláláshoz használt tűkre, így kezelésük rendkívül nehéz volt, és az ezzel okozott mechanikai sérülések miatt többségük elpusztult. A zigótákat a Kumlehn és mtsai (1998) által alkalmazott 7-10 napos árpa mikrospórákkal együtt tenyésztettük az izolálásra használt oldatban, és azt tapasztaltuk, hogy bár mindegyik esetben voltak osztódásnak indult zigóták, egyedül a 0,25 M maltózt tartalmazó MMS3 tápoldatban (0,316 mOsmol) sikerült növényt felnevelnünk, de ott is igen alacsony hatékonysággal (1. táblázat).

A vizsgált oldatok közül tehát csak a 0,25 M maltóztartalmú MMS3 bizonyult olyannak, mely lehetővé tette a zigóták embriogén fejlődését és a mikrospórák számára is optimális volt.

Ezt követően a zigóták (és petesejtek) hatékony izolálását lehetővé tevő 0,4 M mannitol + 0,2 M glükóz + 2 mM $CaCl_2$ oldatban végeztük a zigóták izolálását, majd a 0,25 M maltózt tartalmazó MMS3 tápoldatban tenyészettük őket. Ezt az oldatkombinációt használva a zigótákat különféle dajkasejtekkel együtt tenyésztettük, és az egyes dajkák esetén összehasonlítottuk a zigóták *in vitro* felnevelésének hatékonyságát (2. táblázat, feketével szedett oszlopok). A dajkák kiválasztásánál abból a feltételezésből indultunk ki, hogy az olyan sejtek termelik a legtöbb növekedésserkentő anyagot, amelyek maguk is intenzíven osztódnak és növekednek. Amennyiben e sejtek fejlődése embriogén, feltehetően olyan típusú növekedési faktorokat termelnek, melyek *in vitro* körülmények között elősegítik a zigóták normális embriófejlődését is. Fontos volt, hogy olyan dajkákat találjunk, melyek optimális hatásúak, de emellett könnyen is tenyészthetők. Ezért olyan explantátumokat választottunk, melyek tartósan intenzív növekedésre képesek az *in vitro* környezetben, ill. lehetőleg embriogén úton fejlődnek és tenyésztésük egyszerűen kivitelezhető. Így az árpa izolált mikrospóra tenyészeteken (5a-b. ábrák) kívül a búza mikrospóra tenyészetek (5c-d. ábrák), a búzaszemekből kipreparált már önálló fejlődésre képes, 6-12 napos embriók (5e-f. ábrák) és az önállóan alkalmazott megtermékenyítetlen, fiatal búza termők (5g-h. ábrák) dajkahatását is teszteltük. Az általunk kiválasztott dajkák mindegyike intenzíven növekedett a tenyésztés során (5b, d, f. és h. ábrák). Amennyiben a dajkák minősége nem volt megfelelő, azaz a mikrospórák, ill. az embriók nem fejlődtek elegendő gyakorisággal embriószerű struktúrákká, ill. a termők elöregedtek, a zigóták *in vitro* fejlődése is erősen gátlódott és felnevelésük lehetetlenné vált (nem mutatott eredmények).

Az árpa mikrospórák *in vitro* fejlődése gyakorlatilag azonos volt a 3. 8. „A mikrospórák *in vivo* és *in vitro* fejlődési mintázata” c. fejezetben ismertetett, már részletesen feltárt úttal, ezért nem mutatunk be minden fejlődési állapotot képeken. A tenyészet indításakor túlnyomórészt a kései egymagvas mikrospórákból (5a. ábra) 2-7 nap alatt soksejtes struktúrák fejlődtek, majd ezek exinéje felhasadt, így a 2. hétre már globuláris és átmeneti állapotú embriószerű struktúrák jellemezték a tenyészetet (5b. ábra). A későbbiekben ezek az embriószerű struktúrák látványosan növekedtek, és mire a zigóták tenyésztése véget ért, egy részük elérte a 2-3 mm-es méretet. Amennyiben regenerációs táptalajra helyeztük ezeket az embriószerű struktúrákat, számos növényt lehetett belőlük regenerálni (pl. Pulido és mtsai, 2006a). A zigótákat a 7-10 napon tehát igen intenzíven fejlődő és növekedő

dajkatenyészetekbe helyeztük. Ennek ellenére a dajkatenyészetekben a zigóták több mint 60 %-a elpusztult az első néhány órában. Az életben maradt zigóták (39 %; 2. táblázat) viszont kivétel nélkül osztódtak. Az osztódott zigóták többsége (az összes tenyésztett zigóta 29 %-a) a növényben is megfigyelhető proembriókra emlékeztető struktúrává fejlődött 4 nap alatt. A zigóták közül néhány viszont mikrokalluszokká alakult (9 %), melyek a későbbiekben nem fejlődtek tovább. A proembriószerű struktúrák többsége (a zigóták 29 %-a) viszont átmeneti állapotú, bunkó alakú embrióvá fejlődött a 8-10. napra. Az ilyen embriók mindegyike beérett, majd néhány kivételtől eltekintve kicsírázott és fertilis növényt eredményezett (20 %).



5. ábra. A tenyésztéshez használt dajkasejtek: (a-b) árpa izolált mikrospóra tenyészetek, (c-d) búza izolált mikrospóra tenyészetek, (e-f) búzaszemekből kipreparált 10 napos embriók, (g-h) búza megtermékenyítetlen fiatal termői; (a, c, e és g) a dajkasejtek kiindulási állapotát mutatja a tenyésztés kezdetekor, (b, d, f és h) pedig a dajkatenyészetek *in vitro* fejlődését 1 hetes (d) vagy 2 hetes (b, f és h) tenyésztés után.

Az árpán felül fajazonos dajkasejtek, így a búza izolált mikrospóra tenyészetek hatását is teszteltük. A sikeres, haploid ill. DH növényeket is eredményező Mv Pálma izolált mikrospóra kultúrák létrehozása már önmagában is jelentős eredmény, ugyanis ez egy kereskedelmi forgalomban lévő fajta, nem modell-genotípus (Bakos és mtsai, 2003a). Az árpához hasonlóan, a búza mikrospórák *in vitro* fejlődése is jól követte a 3. 8. „A mikrospórák *in vivo* és *in vitro* fejlődési mintázata” c. fejezetben ismertetett utat. A fejlődés üteme, gyakorlatilag megegyezett az árpa esetén tapasztalttal (5a-d. ábrák). Így a 7-10. napon a

zigótákat szintén igen intenzíven növekedő tenyészetekbe helyeztük. A zigótákból az egyes fejlődési állapotokat elért struktúrák aránya sem tért el lényegesen az árpa dajkatenyészetben megfigyelttől (2. táblázat).

2. táblázat. Különböző, dajkákként alkalmazott növényi részek segítségével elért tenyésztési hatékonyságok összehasonlítása és az ismertetett tenyésztési elrendezések használata a további kísérletekben. *A különböző korú embriók összesített adatai.

Dajkasejtek	6-12 napos embriók*	Búza mikrospóra kultúra	Árpa mikrospóra kultúra	Búza fiatal termői	Búza fiatal termői
Tápoldat	MMS3	MMS3	MMS3	MMS3	N6Z
Fő szénforrás	maltóz	maltóz	maltóz	maltóz	glükóz
Tenyésztett zigóták száma	100%=76	100%= 76	100%= 69	100%= 89	100%= 148
A zigóták differenciálódása					
Első osztódás 24. óra	42%	28%	39%	30%	85%
Mikrokallusz 4. nap	13%	8%	9%	8%	0%
Proembriószerű struktúra 4. nap	3%	18%	29%	22%	63%
Bunkó alakú embrió 10. nap	0%	18%	23%	22%	62%
Csíranövény 28. nap	0%	18%	20%	22%	59%
Fertilis növény	0%	18%	20%	20%	59%
További kísérletek a megjelölt tenyésztési rendszerrel				búza × kukorica megporzás	hisztológia, búza × rizs megporzás

Zigóták felnevelésének az eddigiekhez képest egyszerűbb módja lehetne, ha fejlődésüket zigotikus embriók segítségével támogathatnánk. Ezért a búza 6, 8, 10 és 12 napos embrióiból is készítettünk dajkatenyészeteket. A dajkának szánt embriók *in vitro* fejlődése nagymértékben függött koruktól (3. táblázat). Míg a tenyészetekben a 6 és 12 napos embriók csekély hányada, a 8-10 napos embriók többsége növekedésnek indult, majd növénnyé fejlődött. A 3-4. napos embriótenyészetekbe helyezett zigóták 42 %-a élte túl az első napot és fejezte be az első osztódást (2. táblázat). Ezt követően azonban csekély hányaduk fejlődött tovább, és azok is főleg mikrokalluszokká váltak (6k. ábra). Mindössze két zigóta (3 %) fejlődött proembrióra emlékeztető struktúrává. A későbbiekben azonban ezek sem voltak képesek további fejlődésre.

3. táblázat. A 6-12 napos korban izolált zigotikus embriók *in vitro* fejlődése és a velük együtt tenyésztett zigóták maximális fejlődési állapota.

Embriók kora	Tenyésztett embriók száma	Sikeres *in vitro* növény-regenerálás	Növények kifejlődéséhez szükséges idő	Zigóták *in vitro* felnevelésének sikeressége
6 nap	129	9%	12 nap	Mikrokallusz
8 nap	115	62%	8-10 nap	Proembrió
10 nap	120	75%	6-10 nap	Mikrokallusz
12nap	123	12%	14 nap	Mikrokallusz

Végül, mivel a búza fiatal termői tartalmazzák az embriózsákot körülvevő anyai szöveteket, ill. a búza izolált mikrospórák számára is dajkákként szolgálnak, önálló alkalmazásuk kézenfekvő volt. Tenyésztésük nagyon egyszerű, ezért használatuk hozzájárulhat a zigóták *in vitro* felnevelésének egyszerűbbé tételéhez. A tápoldatba helyezett éretlen termők (5g. ábra) néhány nap alatt bezöldültek, és fokozatosan növekedtek (5h. ábra). Növekedésük azonban 2-3 hetes korukban leállt és barnulni kezdtek. Ezért a zigótákkal való együtt tenyésztésüket hamarabb, 3-4 napos korukban megkezdtük, majd a 14. napon a búza zigótákkal azonos korú, tehát 10-11 napos szemtermésekre cseréltük le a termőket. A zigótákból az egyes fejlődési állapotokat elért struktúrák aránya teljesen hasonlóan alakult az árpa és a búza izolált mikrospóra tenyészetekben tapasztaltakhoz (2. táblázat).

6. 2. Az izolált zigóták *in vitro* fejlődése

6. 2. 1. A zigóták fejlődése az MMS3 tápoldatot tartalmazó tenyészetekben

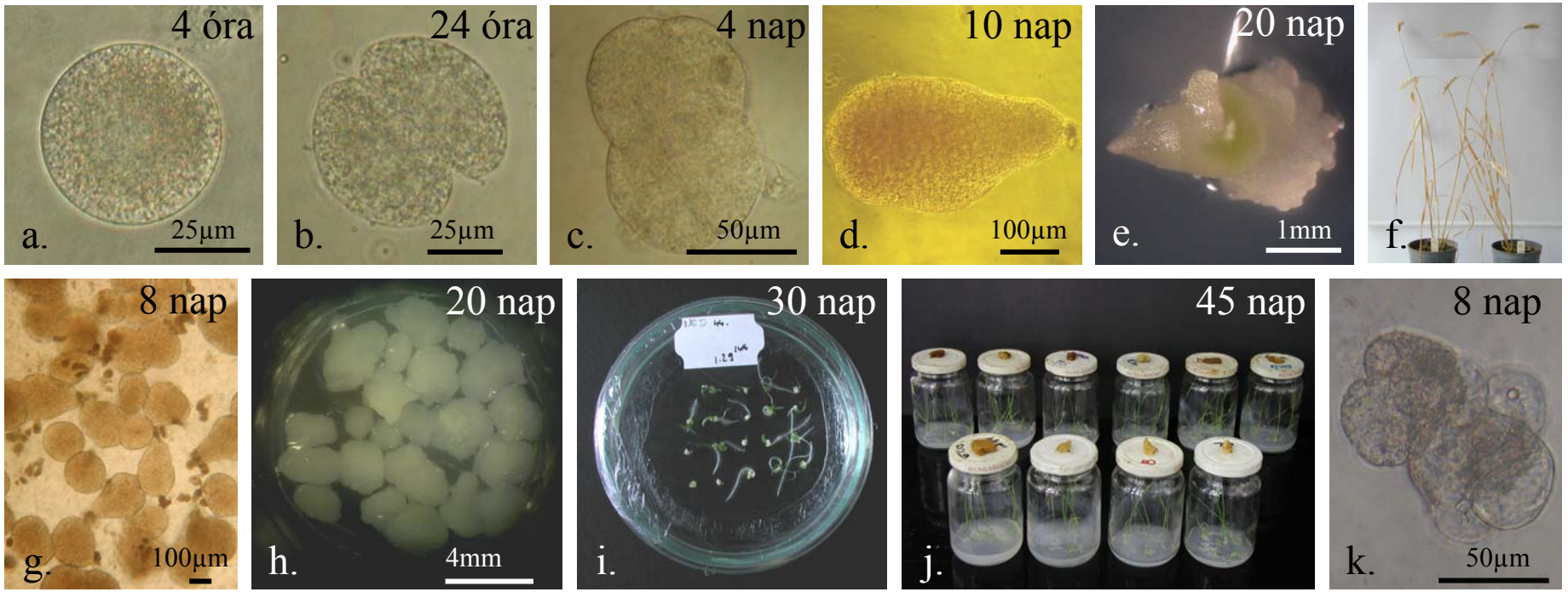
Amint az előző fejezetekben láttuk, a zigóták *in vitro* fejlődése nagyon hasonlóan alakult az árpa és búza mikrospóra ill. a búza termő dajkatenyészetekben. A zigóták *in vitro* fejlődését a búza termő dajkatenyészeteken mutatjuk be, mert – ellentétben a mikrospórákkal – ebben az esetben a dajkasejtek nem kerülnek a zigótákat elválasztó membrán alá, így nem zavarják a zigóták mikroszkópos megfigyelését (6. ábra). Bármelyik típusú dajkatenyészetet is alkalmaztuk, az első napot túlélő zigóták osztódásnak indultak. Az első sejtosztódás minden esetben két, azonos morfológiájú leánysejtet eredményezett (6b. ábra). Ezt követően a zigóták jelentős részében felgyorsultak a sejtosztódások, így a 4. napra már sok, kb. 50-100 sejtet tartalmazó proembriószerű struktúrák fejlődtek, melyek elérték a 100 μm körüli méretet. E proembriószerű struktúráknak még mindig több szimmetriatengelyük volt (6c. ábra), viszont az *in planta* embriókhoz hasonlóan kisméretű, optikailag sűrű, tehát organellumokban gazdag

citoplazmájú sejtekből épültek fel. A zigóták *in vitro* fejlődése néhány esetben azonban nem volt ilyen szabályos, így mikrokallusszá fejlődtek, melyek nem voltak képesek további növekedésre és a későbbiekben elpusztultak. Ez azonban csak azokban a tenyészetekben volt a jellemző fejlődési út, melyekben kipreparált embriókat alkalmaztunk dajkaként. A többi dajkatenyészet esetén a 10. napra a tenyésztett zigóták mintegy 20 %-ából már 300 μm nagyságú átmeneti állapotú embriók fejlődtek, melyek nagyon hasonlítottak a 6-7 napos *in vivo* átmeneti állapotú embriókra (6d. ábra). Az ilyen fejlettségi stádiumot elérő embriók közül szinte mind továbbfejlődött és hát-hasi irányban differenciálódott. A 20. napon már érett embriókat találtunk a tenyészetekben, melyek lényegében azonosak voltak a növényben megfigyelhető embriókkal (6e. ábra). Ezeket az érett embriókat szilárd táptalajra helyezve mindegyikük kicsírázott és morfológiailag normális, teljesen termékeny növénnyé fejlődött (6f. ábra).

6. 2. 2. Az egy-sejt tenyésztési rendszer továbbfejlesztése: az *in vivo* megtermékenyített zigóták hatékony felnevelése

Mivel a maltóz, mint szénforrás, a mikrospórák sporofitikus indukciója és embriogén fejlődése szempontjából fontos, valószínűsíthető, hogy a búza ováriumok *in vitro* tenyésztéséhez nem elengedhetetlen. Ezért kipróbáltuk, hogy a Kumlehn és mtsai (1998) által bevezetett és a zigóták *in vitro* felnevelésében nagyon hatékonynak bizonyult N6Z tápoldat, mely szénforrásként glükózt tartalmaz, megfelelő-e a fiatal búza termők és az izolált zigóták együtt tenyésztéséhez.

A búza ováriumok *in vitro* fejlődése semmiben sem különbözött az MMS3 tápoldatban megfigyelttől (5h. ábra), amennyiben az N6Z tápoldatban tenyésztettük. A zigóták számára ugyanakkor az új tápoldat sokkal kedvezőbbnek bizonyult, mivel a zigóták 85 %-a túlélte az izolálást majd az izolálóoldatból a tenyészetbe történő áthelyezést. Ezt követően a zigóták többsége osztódásnak indult és embriószerű struktúrává fejlődött. Feltehetően a tápoldatban jelen lévő 2,4-D hatására azonban az *in vitro* fejlődő embriók többsége kisebb-nagyobb mértékben torzult az *in vivo* embriókhoz képest (6g-j. ábrák). A tenyésztés hatékonyságát mutatja, hogy a 10. napra a zigóták 62 %-a fejlődött átmeneti állapotú, bunkó alakú embriókhoz hasonló alakú struktúrává, majd 59 %-uk vált az érett embriókhoz hasonlóvá a 3. hétre. E struktúrák mindegyike kicsírázott és egészséges növénnyé fejlődött (2. táblázat, pirossal szedett oszlop).



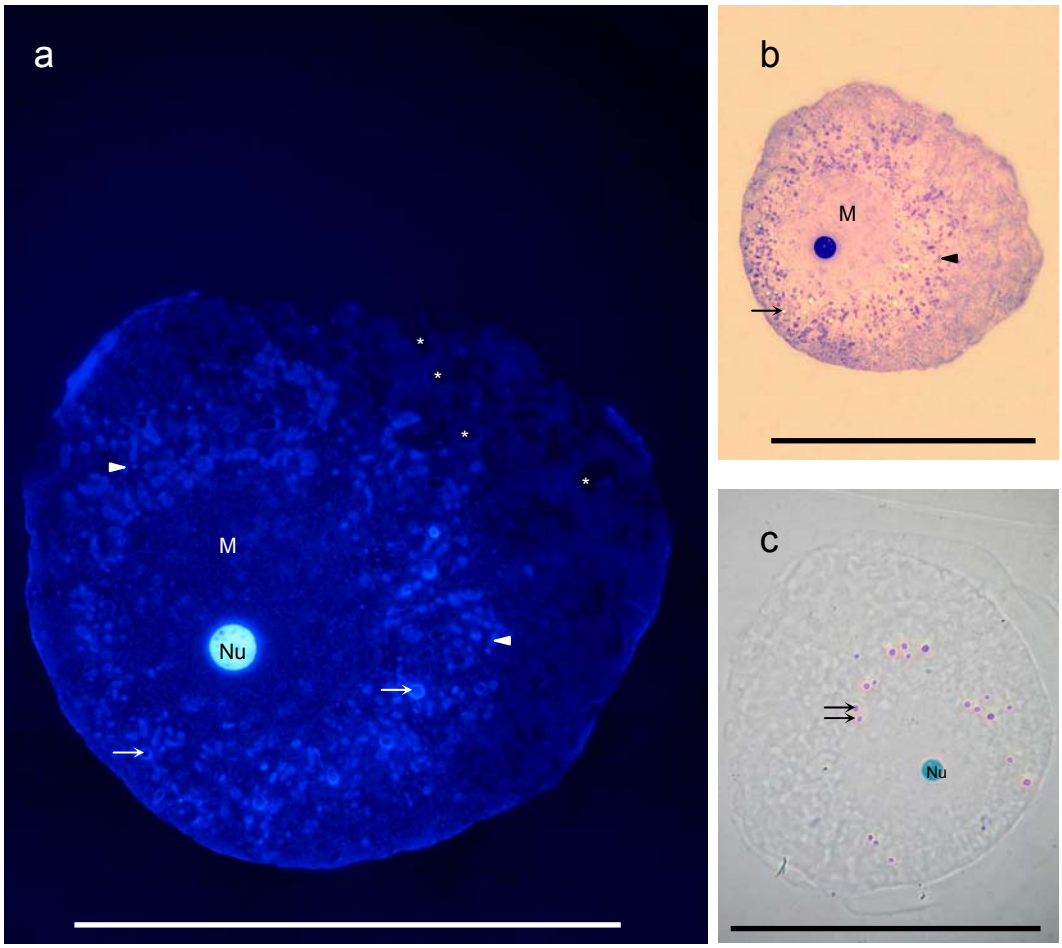
6. ábra. A zigóták *in vitro* fejlődése. (a-f) Fejlődési mintázat az eredeti tenyésztési rendszerben; tápoldat: MMS3, dajkák: fiatal búza termők. (a) Frissen izolált zigóta, (b) az első sejtosztódás 24 órával a tenyészetbe helyezést követően, (c) 4 napos proembriószerű struktúra, (d) bunkó alakú, átmeneti fejlődési állapotú embrió a tenyésztés 10. napján, (e) csírázásra kész, hát-hasi irányban differenciálódott érett embrió a tenyésztés 20. napján, (f) izolált zigóták *in vitro* tenyésztésével felnevelt, érett növények. (g-j) Nagy számú embrió és növény fejlődése a tovább optimalizált, hatékony tenyésztési rendszerben; tápoldat: N6Z, dajkák: fiatal búza termők (g) fiatal, bunkó alakú, átmeneti fejlődési állapotú embriók, (h) érett embriók, (i) a szilárd N6D táptalajra helyezett embriók csírázása, (j) fiatal növények. (k) Amennyiben a búza 8-10 napos korban kipreparált termőit használjuk dajkaként, a tenyésztett zigóták jellemzően mikrokallusszá fejlődnek.

Mivel a búza éretlen termőinek használata hatékonynak bizonyult, ill. az árpa esetében a mikrospórák tenyésztése nem volt lehetséges a glükóztartalmú N6Z tápoldatban, az egy-sejt tenyésztési rendszernek ebben a változatában nem tartottuk szükségesnek a további dajkák tesztelését. Az így optimalizált tenyésztési rendszer már alkalmas volt arra, hogy a zigóták *in vitro* fejlődésének citológiai tanulmányozására, valamint egy különleges, eddig még végre nem hajtott, a búza és a rizs közötti keresztezés megvalósítására használjuk (ld. a „A zigotikus embriók *in vitro* és *in vivo* fejlődésének citológiai és hisztológiai összehasonlítása" és a „Búza × rizs megporzással nyert növények felnevelése a korai állapotban izolált zigóták *in vitro* felnevelésével" c. fejezeteket).

6. 2. 3. A zigotikus embriók *in vitro* és *in vivo* fejlődésének citológiai és hisztológiai összehasonlítása

Ahhoz, hogy az egyedi sejtek műgyantába ágyazását kidolgozzuk és a sejtizolálásnak a sejtstruktúrát esetlegesen károsító hatását megismerjük, a zigótákhoz képest nagyobb számban rendelkezésre álló petesejteket fixáltunk izolálásuk után egy órával és előkészítettük azokat a mikroszkópos hisztokémiai vizsgálatokra. Az izolált petesejtek a sejtek perifériáját érintő kismértékű sérülést leszámítva jól megőrizték struktúrájukat (7. ábra). A toluidinkék és a DAPI + CFW (Calcofluor white) festés után nagyon jól megfigyelhető a sejtmag, benne a vakuólumokat tartalmazó nukleólusz (sejtmagvacska), a sejtmag körül elhelyezkedő sejtorganellumok (mitokondriumok, plasztiszok és vezikulumok), valamint a sejt perifériáján polárisan elhelyezkedő vakuólumok (7a. és b. ábrák; az egyes sejtalkotóknak a 7-13 ábrákon alkalmazott jelölésének jegyzékét ld. a következő oldalon). A PAS festéssel megbízhatóan kimutathatók a keményítőtartalmú plasztiszok (keményítőszemcsék), melyek a sejtmag körül fordulnak elő (7c. ábra).

Az *in vitro* ill. *in vivo* körülmények között a zigótákból fejlődő struktúrák közötti főbb különbségek és hasonlóságokat a 4. táblázatban foglaltuk össze.



7. ábra. Az izolálást követő órában fixált búza petesejt szerkezete. (a) DAPI + CFW festés; (b) toluidinkék; (c) PAS + Coomassie brilliant blue (CBB) festés + Light green kontrasztfestés. Részletes magyarázat a szövegben.

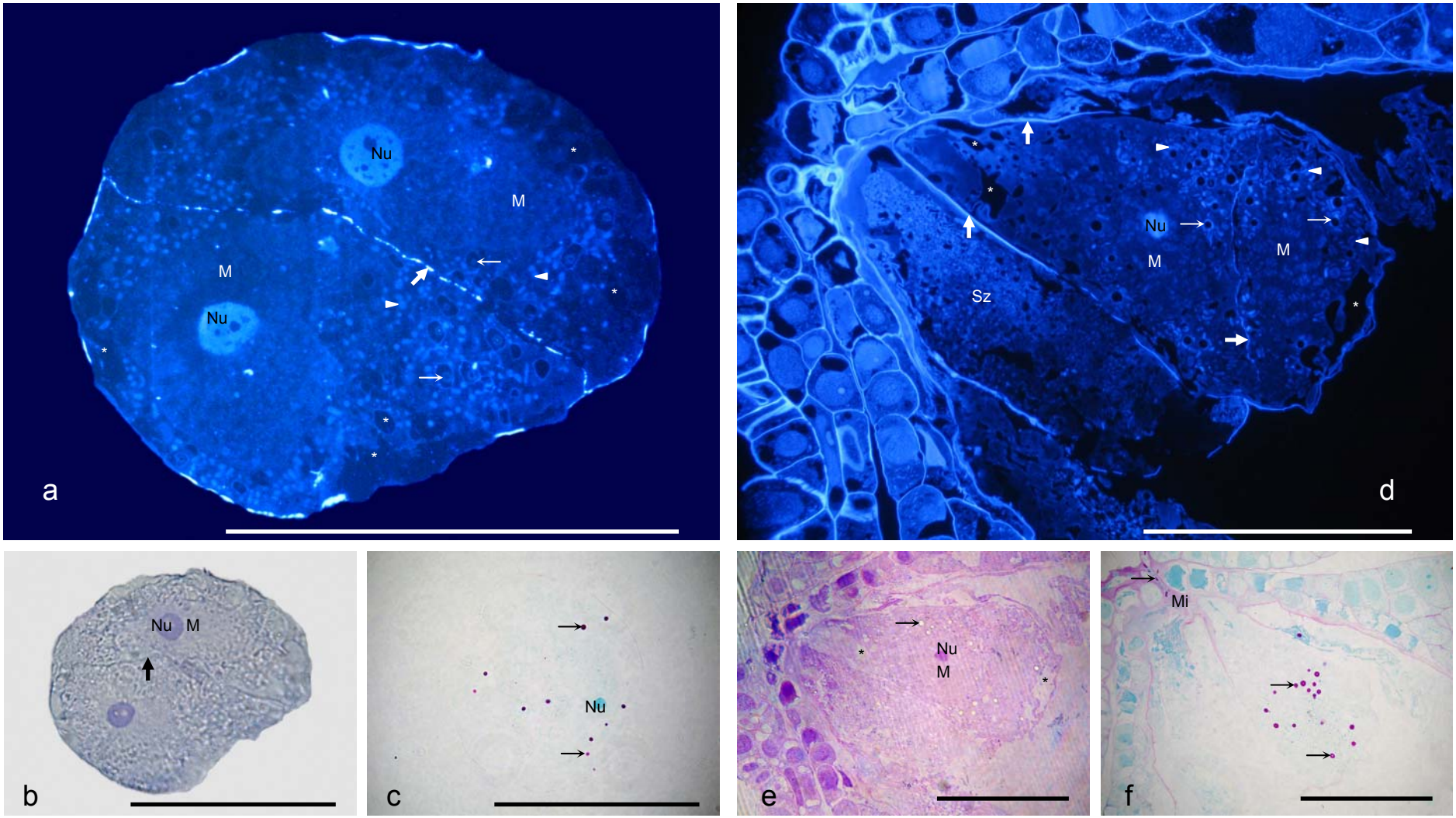
A 7-13. ábrákon általánosan használt jelölések magyarázata:
Bárok: mindenütt 50 μm
M: sejtmag;
Nu: nukleólusz;
Pluszjel (+): osztódó sejt kromoszómái
Kereszt (†): 1-nél több nukleóluszú sejtmaggal rendelkező, osztódási ciklusban lévő sejt
Nyílhegy (háttértől függően fekete vagy fehér): DAPI + CFW-tal, ill. toluidinkékkel erősen festődő sejtorganellumok (valószínűleg mitokondriumok és plasztiszok);
Vékony nyíl (háttértől függően fekete vagy fehér): keményítőtartalmú plasztisz (keményítőszemcse);
Kettős vékony nyíl: a keményítőszemcsék jelölési módja az olyan sejtekben, ahol azok a sejtmag körül helyezkednek el;
Vastag, fekete keretes, fehér kitöltésű nyíl: proteintest
Vastag nyíl (háttértől függően fekete vagy fehér): sejtfal
Csillag: vakuólum.

Az *in vivo* és *in vitro* embriófejlődés tanulmányozása során legelsőként a zigóták első osztódását vizsgáltuk meg (8. ábra). A 26 órás osztódott zigóták között csak annyi különbség volt látható, hogy a leánysejtek alakja *in vitro* körülmények között nagyon hasonló volt – amint azt az egy-sejt tenyészetekben is megfigyeltük, míg az *in vivo* osztódás egy „kúpszerű" alapi és egy „sapkaszerű" csúcsi sejtet eredményezett. A két leánysejt citológiailag azonban mind *in vivo*, mind *in vitro* nagyon hasonló volt. Mindkét esetben a sejtmag ill. a leánysejteket elválasztó fal körüli citoplazma nagy területen organellumokban gazdag volt és csak a sejtek perifériáján figyeltünk meg vakuólumokat (8a-b. és d-e. ábrák). A keményítőszemcsék az organellumokban gazdag citoplazmában fordultak elő, méretük és mennyiségük az izolált petesejtekhez képest némileg nagyobb volt (7c. ill. 8c. és f. ábrák).

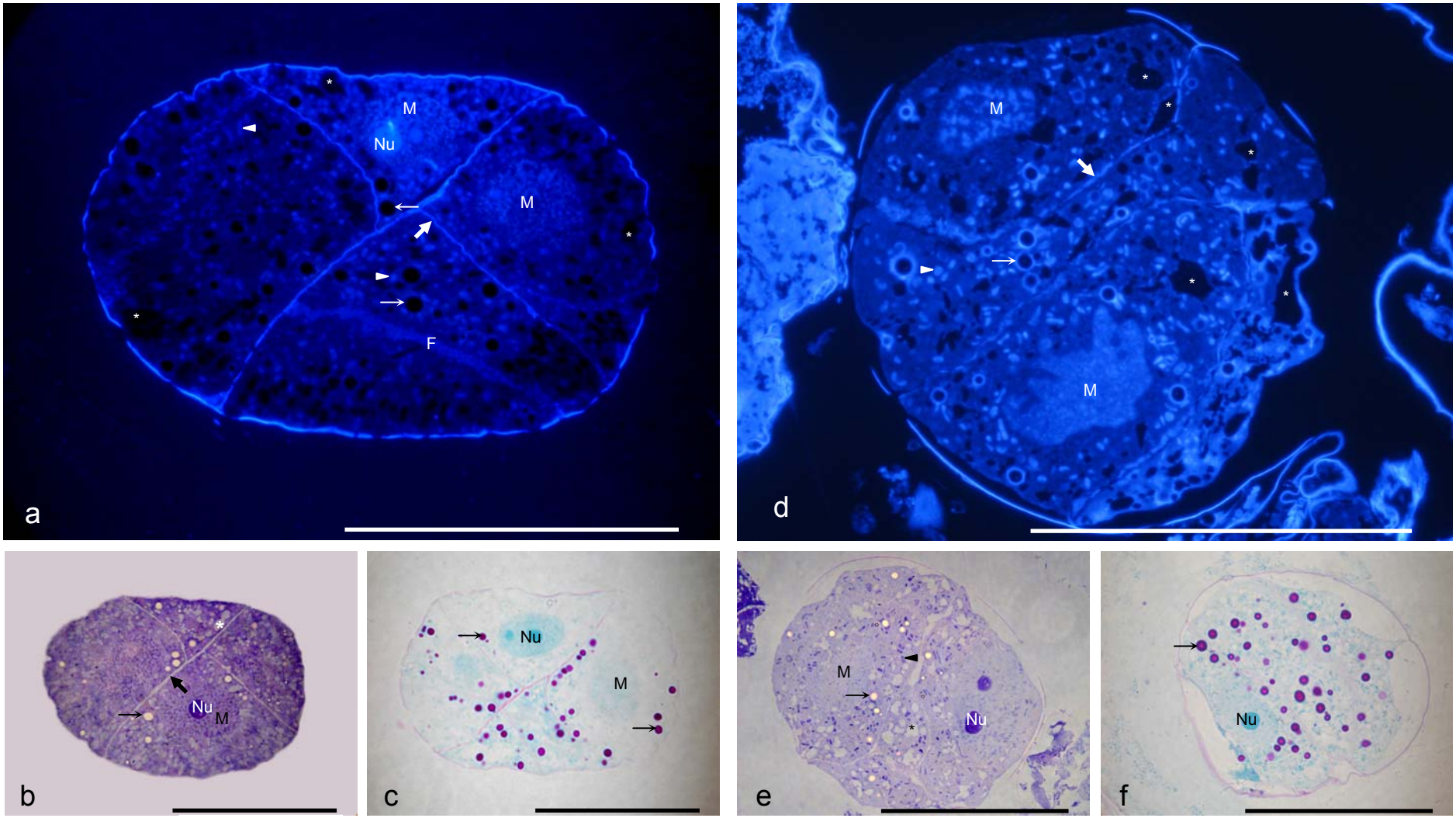
A megtermékenyítést követő 50. órában már mind *in vivo*, mind *in vitro* környezetben néhánysejtes proembriók fejlődtek. Az általunk készített haránt irányú metszeteken mindkét esetben hasonló, gazdag citoplazmájú sejtek láthatóak (9. ábra). Az *in vivo* proembriókhoz képest különbséget jelent, hogy az *in vitro* környezetben fejlődő proembriók sejtjei szabályosabb alakúak. A sejtek organellumgazdagsága mellett mindkét esetben figyelemre méltók a többnukleóluszú (9c. és e. ábrák) ill. többlebenyes (9d. ábra) sejtmagvak, valamint az egyik sejtben látható sík, ami feltehetőleg a következő osztódás síkját kijelölő fragmoplaszt (9a. ábra), ami a sejtek intenzív anyagcseréjét és osztódási ciklusát mutatja. A sejtekben nagy számú és a korábbiakhoz képest nagyobb méretű keményítőszemcsék találhatók (9c. és f. ábrák).

4. táblázat. A búza zigóták *in vivo* és *in vitro* fejlődésének összehasonlítása.

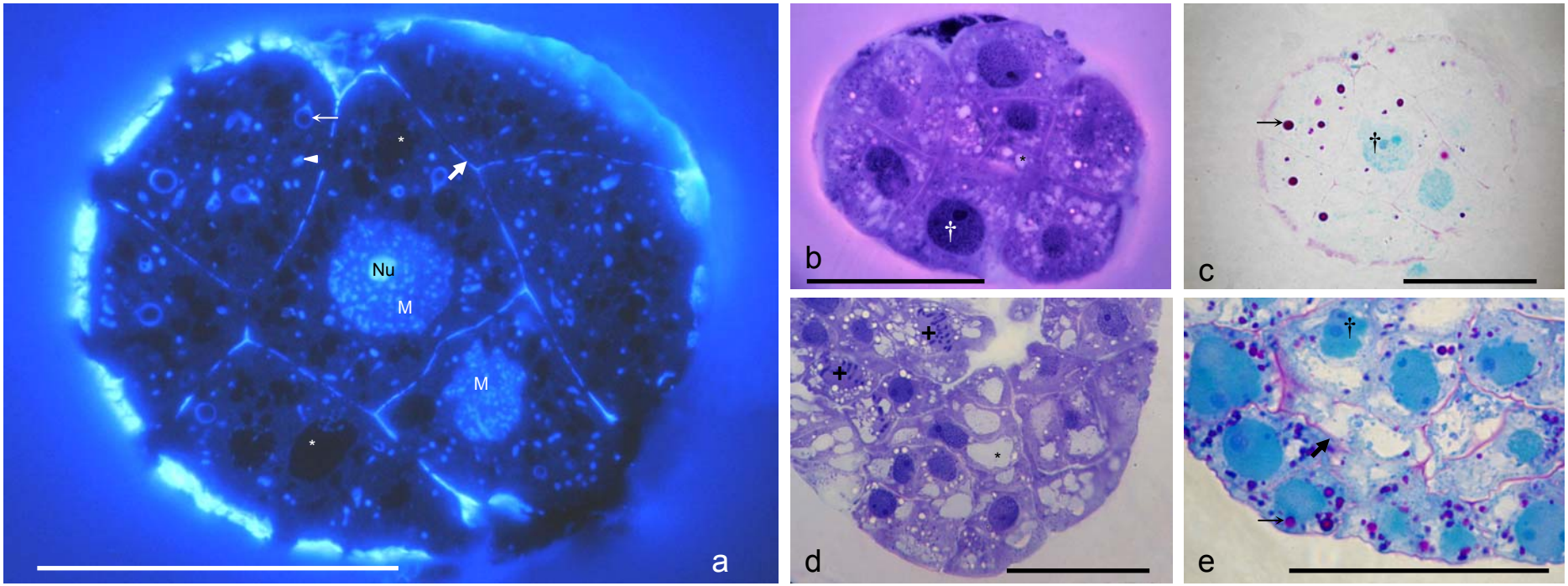
Fejlődési stádium	*In vivo* fejlődés	*In vitro* fejlődés	
1. osztódás	21-24 óra, Aszimmetrikus osztódás; eltérő alakú, de citológiailag azonos, organellumokban gazdag leánysejtek	21-28 óra Szimmetrikus osztódás; mind alakilag, mind citológiailag azonos, organellumokban gazdag leánysejtek	
Proembriók	2-3 nap Körtéhez hasonló alakú, kétoldali szimmetriájú struktúra, szabálytalanabb alakú, organellumban gazdag, merisztéma jellegű sejtekkel	2-3 nap Gömbszerű vagy lebenyes, de több szimmetriatengellyel rendelkező struktúra, szabályosabb alakú, organellumban gazdag, merisztéma jellegű sejtek	
Globuláris és átmeneti fejlődési állapotú embriók	3-5 nap Dinnyemag alakú embrió, véletlenszerű síkban osztódott merisztéma jellegű sejtek; a struktúrát protodermisz sejtréteg fedi	4-10 nap Gömb vagy ellipszoid alakú struktúra, véletlenszerű síkban osztódott merisztéma jellegű sejtek; a 7. napon megjelennek nagyobb vakuólumokat tartalmazó sejtek is.	Fejlődési zsákutca: a nem megfelelő tenyészetekben, kedvezőtlen körülmények között a zigóta eredetű struktúrák elkalluszosodnak, képtelenné válnak további differenciálódásra és elpusztulnak
Embriók differenciálódó szövetekkel	6-14 nap Megjelenik a koleoptil, elkülönül a főként merisztéma jellegű sejtekből felépülő embrionális tengely (hajtás- és gyökércsúcs, epi- és hypokotil) és a vakuolizáltabb, transzfer és raktározó szerepű sejtekből álló sziklevél és koleoriza	12-20 nap Feltehetően a környező szövetek hiányából adódóan jellegzetes tagoltságú struktúrák fejlődnek: a merisztéma jellegű központot kallusz jellegű, feltehetőleg transzfer szerepű sejtrétegek veszik körül; a struktúrák felszínét epidermisz jellegű sejtréteg fedi. A struktúrák bizonyos részein a külső sejtrétegek az *in vivo* endospermium raktározó sejtjeihez hasonlóan nagy mennyiségű keményítő-szemcsét és fehérjetestet tartalmaznak	
Nyugalmi fázis	3-5 hét Az embrió az endospermiummal együtt dehidratálódik	- Nincs nyugalmi fázis és az azt kísérő dehidratáció	
Csírázás	Magnyugalom után, hajtás és gyökér egyszerre fejlődik ki, szinte kizárólag 1 hajtás és 3 szeminális gyökér	3-5 hét a hajtás és gyökér többnyire egyszerre fejlődik ki, általában 1 hajtás és 1 gyökér, de számuk változhat	



8. ábra. A búza zigóták első osztódása *in vitro* (a-c) és *in vivo* (d-f). A megporzás után 26 órával fennálló állapot. (a, d) DAPI + CFW; (b,e) toluidinkék; (c, f) PAS + CBB + Light green kontrasztfestés. További jelölések: Sz: szinergida, Mi: mikropile a pollentömlő maradványával. Részletes magyarázat a szövegben.

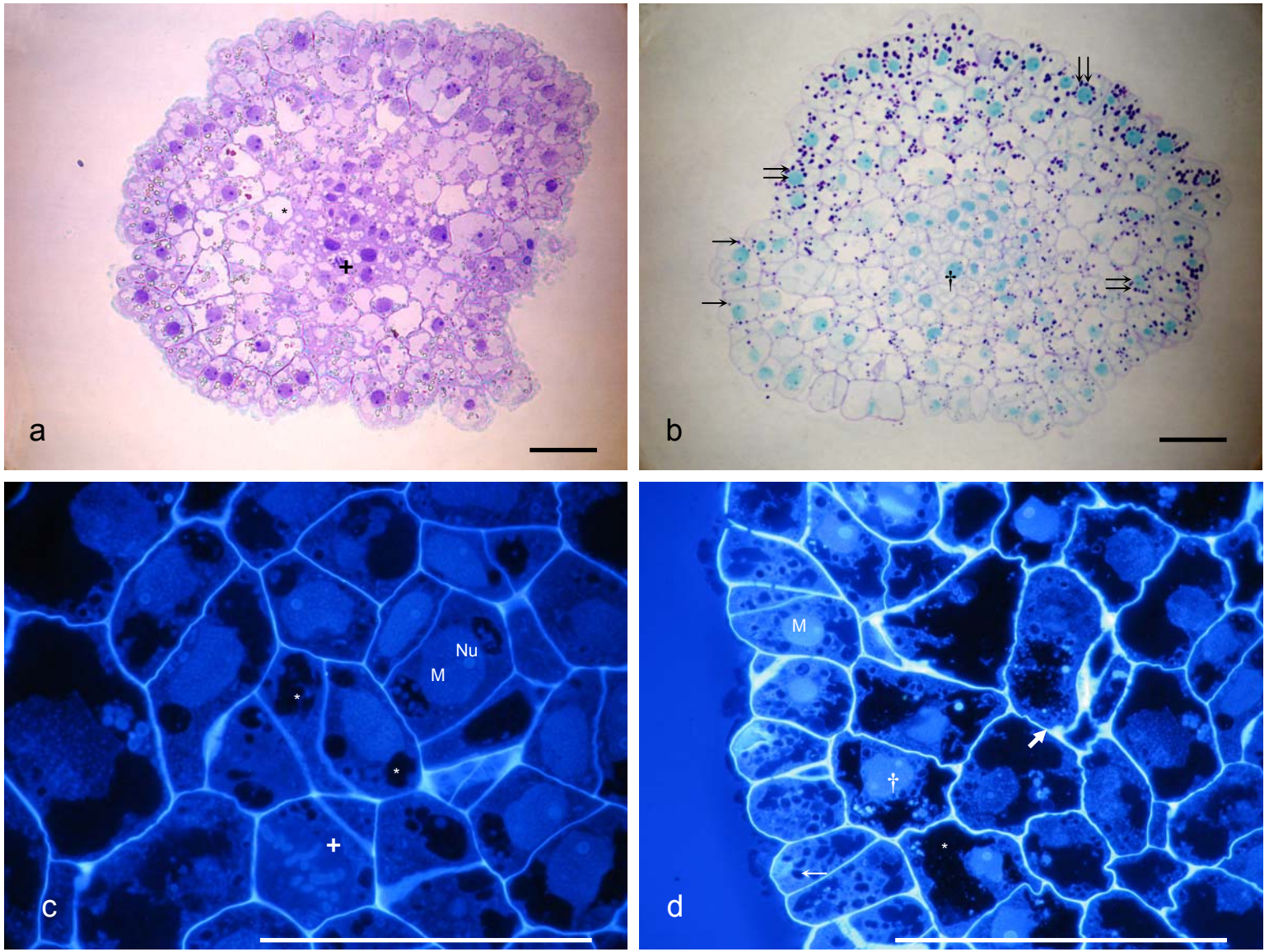


9. ábra. A búza zigótákból *in vitro* (a-c) és *in vivo* (d-f) fejlődő néhánysejtes proembrió. A megporzás után 50 órával fennálló állapot. (a, d) DAPI + CFW; (b, e) toluidinkék; (c, f) PAS + CBB festés + Licht green kontrasztfestés. F: Valószínűleg fragmoplaszt. Részletes magyarázat a szövegben.

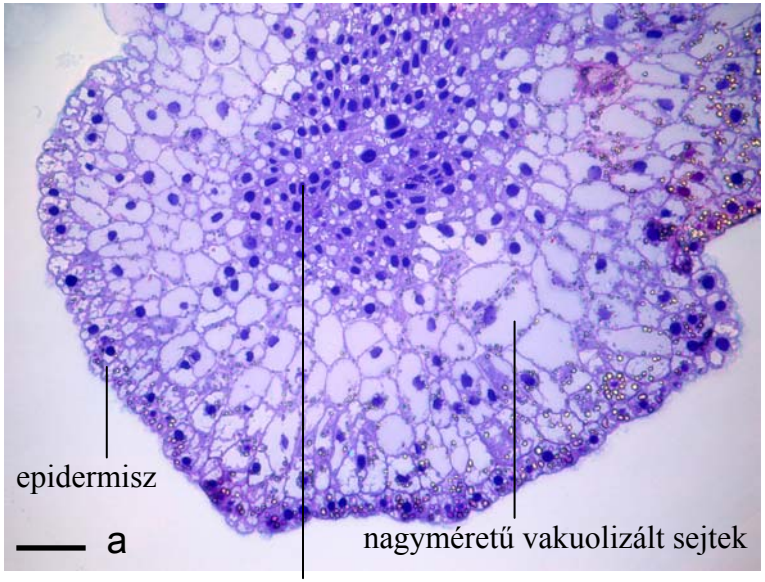


10. ábra. Búza zigóták *in vitro* fejlődése: 4 (a, b, c) és 7 (d, e) napos struktúrák. (a) DAPI + CFW; (b, d) toluidinkék; (c, e) PAS + CBB festés + Licht green kontrasztfestés. Részletes magyarázat a szövegben.

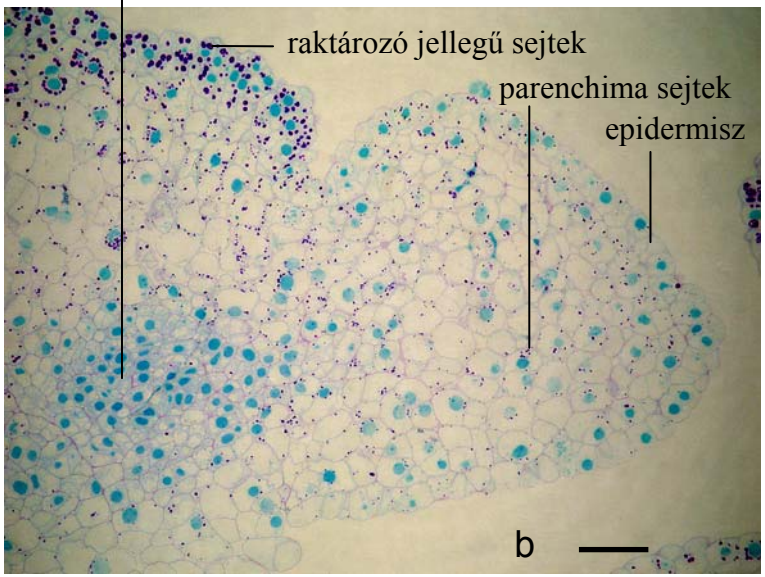
11. ábra. Búza zigóták *in vitro* tenyészeteiben fejlődött 12 napos struktúrák. (a, b) A struktúrákról készült teljes metszetek, (c) centrálisan elhelyezkedő merisztéma jellegű sejtek, (d) epidermisz (protodermisz) az alatta lévő parenchimatikus sejtekkel. (a) toluidinkék festés; (b) PAS + CBB festés + Licht green kontrasztfestés, (c, d) DAPI + CFW festés. Részletes magyarázat a szövegben. ⟶

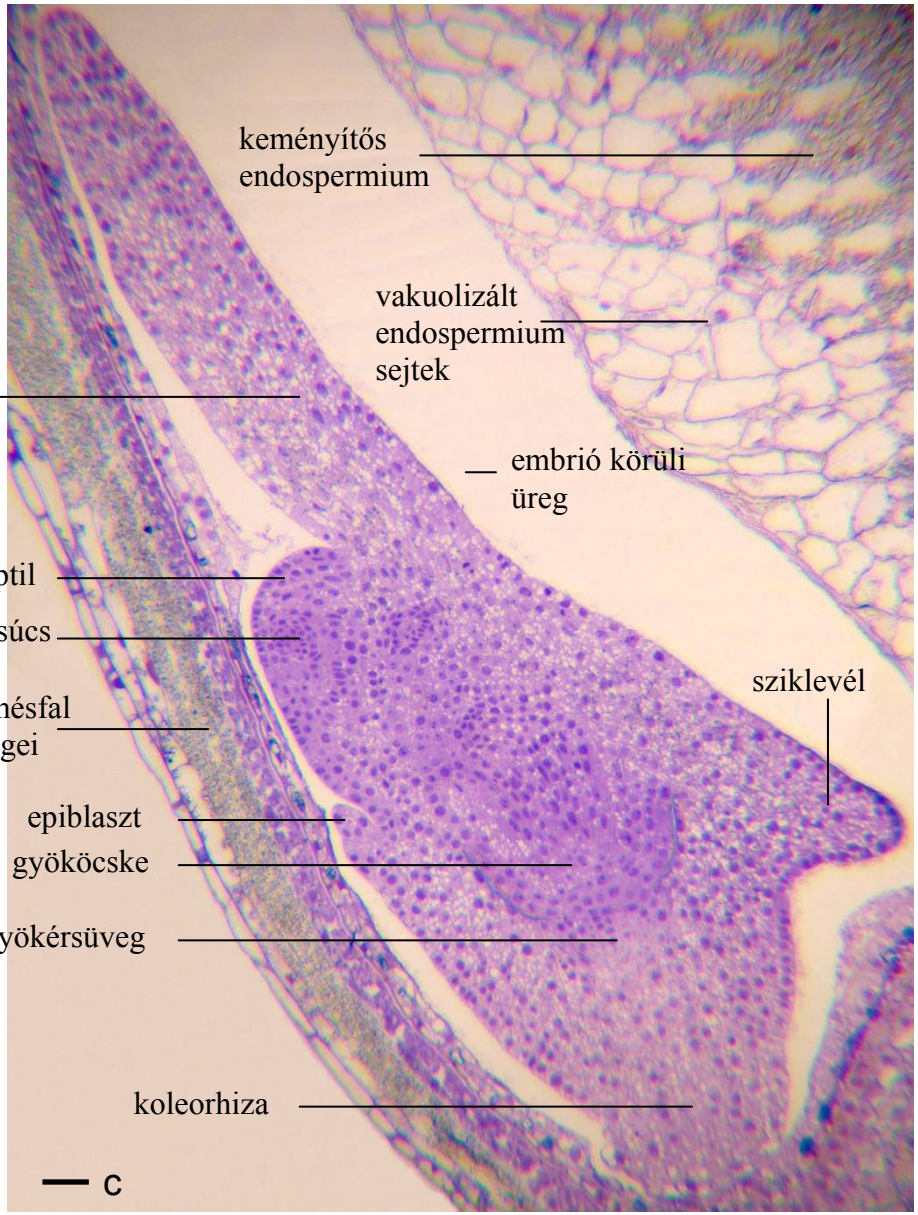


11. ábra.



Centrálisan elhelyezkedő merisztéma jellegű sejtek





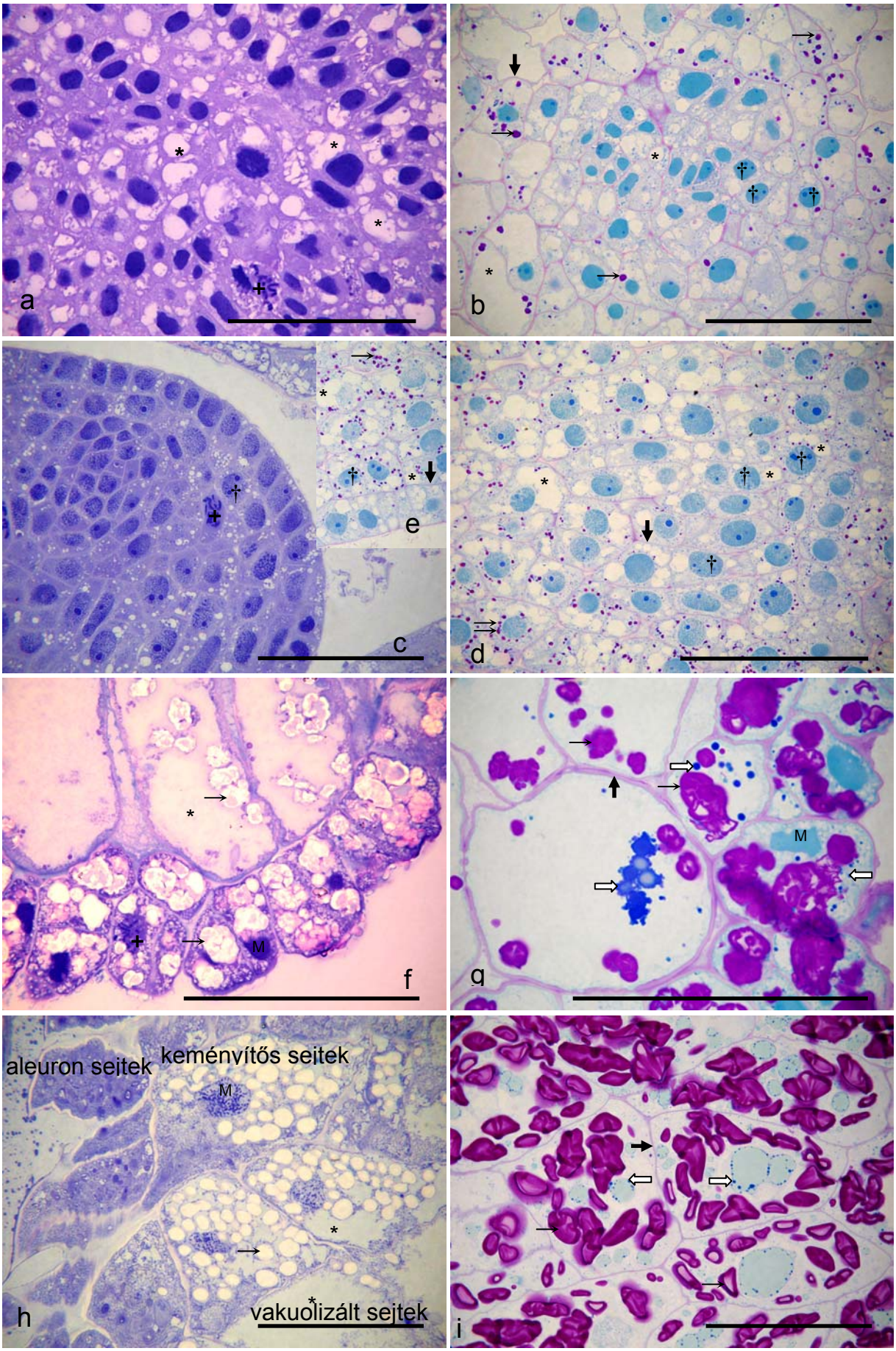
12. ábra.

← 12. ábra. Hasonló fejlettségű *in vitro* (20 napos; a, b) és *in vivo* (14 napos; c) nevelt zigotikus eredetű struktúrák összehasonlítása: (a, b) az *in vitro* embriószerű struktúrák jellemző szerveződése; (c) a teljes *in vivo* embrió eredeti környezetében. (a, c) Toluidinkék, (b) PAS + CBB festés + Light green kontrasztfestés.

A további fejlődés során még mindig organellumokban gazdag, merisztéma jellegű sejtek jellemezték az *in vitro* fejlődő, 4 ill. 7 napos struktúrákat (10. ábra). Számos többnukleóluszú sejtmagot (10c-e. ábrák) és metafázisos kromoszómákat tartalmazó osztódó sejtet (10d. ábra) találtunk. A 7 napos struktúrákban viszont már megfigyelhető volt a sejtek vakuolizáltságának bizonyos fokú növekedése (10d-e. ábrák).

A zigótákból 12 napos tenyésztés után már közel fél mm-es kompakt embriószerű struktúrák fejlődtek. E struktúráknak már csak a perifériáján, valamint a központjában lévő sejtek voltak citoplazmában gazdagok; e két régió közötti teret vakuolizált, parenchimatikus sejtek töltötték ki (11a. ábra). A keményítő mint tartaléktápanyag felhalmozása határozott polaritást mutatott a struktúrákon belül (11b. ábra). A központban elhelyezkedő merisztéma jellegű sejtek nem vagy csak alig tartalmaztak keményítőt, míg a merisztéma jellegű sejteket körülvevő parenchimatikus ill. a struktúrát fedő epidermisz (protodermisz) sejtek mindegyikében jelen volt több-kevesebb keményítő attól függően, hogy a sejtek az embriószerű struktúra mely pólusához voltak közelebb. A keményítőszemcsék gyakran a sejtmag körül koncentrikusan helyezkedtek el. A struktúra merisztematikus központjának kisméretű sejtjei csak mérsékelt vakuolizációt mutattak, sejtmagjaik viszonylag nagyméretűek voltak (11c. ábra). A 11d. ábrán jól látható, hogy a gazdag citoplazmájú epidermisz sejtek élesen elkülönülnek az alattuk lévő parenchimatikus sejtektől. E struktúrák intenzív növekedését jelzi, hogy bennük jónéhány többnukleóluszos, ill. osztódó sejtet figyeltünk meg (11a-d. ábrák).

13. ábra. Hasonló fejlettségű *in vitro* (20 napos; a, b, f, g) és *in vivo* (14 napos; c, d, e, h, i) nevelt zigotikus embriók összehasonlítása: (a, b) *in vitro* embrió merisztéma jellegű területe; (c) *in vivo* embrió hajtásmerisztémája és koleoptilja, (d) gyökércsúcsa, (e) sziklevelének részlete; (f, g) *in vitro* struktúra kallusz jellegű szövete és az azt fedő epidermisz; (h, i) *in vivo* endospermiumszövet. (a, c, f, h) Toluidinkék, (b, d, e, g, i) PAS + CBB festés + Light green kontrasztfestés. Részletes magyarázat a szövegben. →


a
b
c
d
e
f
g
h
i
M
aleuron sejtek
keményítős sejtek
vakuolizált sejtek

13. ábra.

A 20 napos zigóta eredetű embriószerű struktúrák felépítése hasonló volt a 12 napos struktúrákéhoz, de merisztematikus és parenchimatikus régiójuk tagoltabb és nagyobb volt (12a-b. ábrák). E struktúrákat összehasonlítottuk a kb. hasonló fejlettségi állapotú 2 hetes *in planta* embriókkal is (12. és 13. ábrák). Megállapítható, hogy az *in vitro* tenyésztett zigóta eredetű struktúrákban előforduló sejttípusok a búzaszemben is megtalálhatók, azonban az általunk megmetszett *in vitro* struktúrákban az *in vivo* embrió szerveinek következetes szerveződése nem volt megfigyelhető (12a-c. ábrák). Az *in vitro* (13a-b. ábrák) és *in vivo* (13c-d. ábrák) embriók merisztéma jellegű szöveteit összehasonlítva közös vonások voltak a kis sejtméret, a sejtmagvak sejtekhez képest viszonyított nagy mérete, a többnukleóluszú sejtmagvak és osztódó sejtek előfordulása, valamint a keményítőszemcsék hiánya. Különbséget jelentett azonban, hogy az *in vitro* struktúrák merisztémái viszonylag rendezetlenebbek voltak az *in planta* embriókéhoz képest: a sejtek mérete és vakuolizáltsága viszonylag változatosan alakult az *in vitro* struktúrákban. Bizonyos (kis) területeken a sejtek nagyobb méretűek voltak és több, ill. nagyobb vakuólumot tartalmaztak, máshol viszont az *in planta* merisztémákhoz hasonlóan kis méretű és minimális vakuolizáltságú sejtek láthatók. Figyelemreméltó, hogy az *in vitro* struktúrák merisztémáinak szomszédságában gyakran találtunk olyan sejteket, amelyek az *in planta* embriók sziklevelében előforduló sejtekhez nagyon hasonló szerveződésűek voltak (13b. és e. ábrák). Még izgalmasabb az a megfigyelés, hogy az *in vitro* fejlődő zigóta eredetű struktúrák egyes perifériális területein, különösen az epidermiszben lévő sejtek nagy mennyiségű keményítőt és proteintesteket tartalmaztak (13f-g. ábrák). E sejtek nagyon hasonlítottak az *in planta* endospermium raktározó sejtjeire, melyek szintén sok keményítőt és proteint tartalmaztak (13h-i. ábrák). A proteintestek morfológiája mindkét esetben ugyanolyan volt. Némi különbséget csak az jelentett, hogy az *in vitro* környezetben e sejtek keményítőszemcséi szabálytalanabb alakúak voltak, és proteintestjeik intenzívebben festődtek, mint az endospermiumban.

6. 3. Növények *in vitro* felnevelése távoli rokonfajokkal történő megprorzások eredményeként

6. 3. 1. Búza × kukorica megporzással nyert haploid növények felnevelése embriómentéssel és a korai állapotban izolált „zigóták” *in vitro* felnevelésével

6. 3. 1. 1. A kukoricával megtermékenyített petesejtek *in vitro* fejlődése

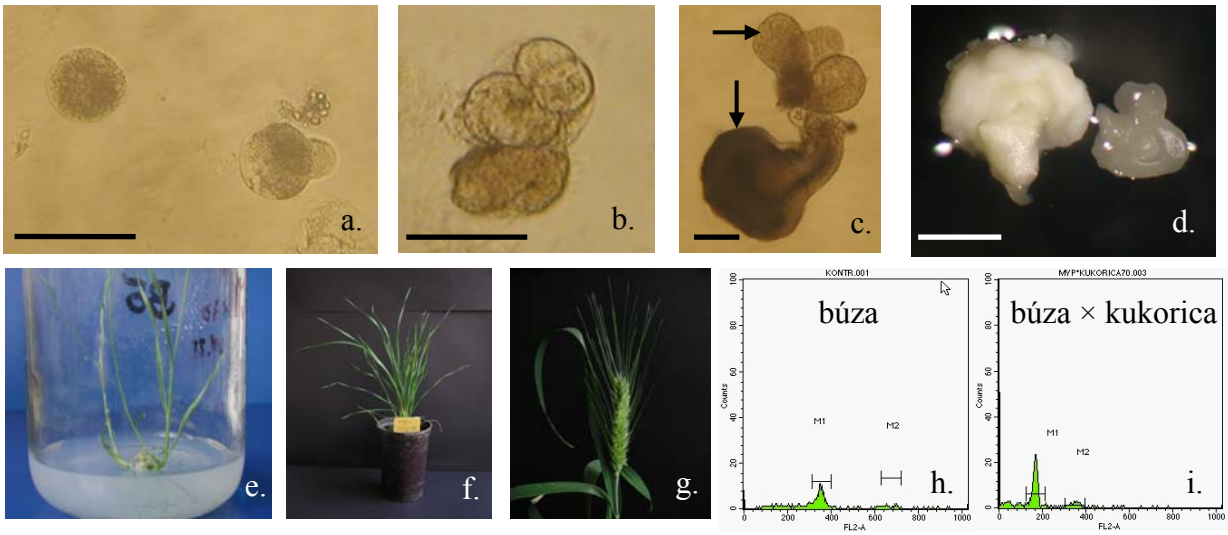
A búza kukoricával történő megporzása után 2 nappal izolált „zigóták” még egysejtes állapotban, osztódás előtt voltak (14a. ábra). Az MMS3 tápoldatban a búza fiatal termőivel együtt tenyésztve a zigóták kb. 20 %-a osztódásnak indult (5. táblázat) és a megporzás utáni 5. napra (3 napos tenyésztés után) lebenyes felépítésű, soksejtes struktúrák fejlődtek mindkét keresztezés esetén. E struktúrákat nagy optikai sűrűségű, citoplazmában gazdag sejtek építették fel (14b. ábra). A későbbiek folyamán e struktúrák egy része (az Mv Ködmön esetén 2 %, az Mv Pálma esetén 4 %, 5. táblázat) továbbfejlődött, és hasonlóvá vált az *in vivo* fejlődő embriókhoz. A tenyésztett „zigóták” 14 naposan az átmeneti állapotú embriókra (14c. ábra), majd 28 naposan az érett embriókra hasonlítottak (14d. ábra). Érdekes, hogy sok fejlődésnek induló „zigótából” ikerembriók fejlődtek (14c. ábra, nyilak). Végül az *in vitro* fejlődés eredményeképpen zöld növényekhez jutottunk (14e. ábra), melyek steril kalászokat hoztak (14f-g. ábrák), és a flow citometriás analízis szerint mindegyikük haploid volt (14h-i. ábrák).

A búza × kukorica „zigóták” *in vitro* fejlődési mintázata tehát hasonló volt a diploid búza zigótákéhoz (6 és 14. ábrák), bár az egyes fejlettségi állapotok eléréséhez néhány nappal hosszabb időre volt szükségük (7. táblázat)

6. 3. 1. 2. Az embrió- és „zigótamentéses” technikák hatékonysága

Az idegenporzás után a két hetes embriók kimentését követő tenyésztéssel is mindkét genotípusból előállítottunk haploid növényeket, de az ilyen embriók jóval kisebb része csírázott ki az *in vitro* fejlődött embriókhoz viszonyítva (5. táblázat). A növényeken fejlődött, majd 14 napos korban izolált embriók mérete igen változatos volt, és Zhang és mtsai (1996) megfigyeléséhez hasonlóan csak az 1 mm-t meghaladó embriók közül voltak olyanok, amelyek növényekké fejlődtek. A „zigótamentés” eredményeként 100 termőnként az Mv Pálma esetében 3,6, az Mv Ködmön esetében 1,6 növényt (kalászonként 1,0 és 0,4) sikerült felnevelnünk, az embriómentés megfelelő adatai pedig 0,7 és 7,5 növény/100 termő (kalászonként 0,2 és 2,6; 5. táblázat). Elmondható tehát, hogy az egy-sejt tenyésztés első

adaptált változatával végrehajtott „zigótamentés” hatékonysága azonos nagyságrendbe esik, tehát nem rosszabb az embriómentéses technikáéhoz képest.



14. ábra. A kukoricával történt megporzás után 2 nappal kimentett búza zigóták *in vitro* fejlődése: (a) frissen kimentett (izolált) zigóta, (b) soksejtes struktúra 5 nappal a megporzást követően, (c) 14 napos korú átmeneti állapotú többszörös ikerembrió, az egymással összenőtt, de jól elkülöníthető embriókat nyilak mutatják, (d) 28 napos, hát-hasi irányban differenciálódott, érett embriók, (e) fiatal Mv Pálma növény, (f-g) kifejlett haploid Mv Ködmön növény, steril kalászokkal, (h) egy diploid (kontroll) és (i) egy haploid Mv Pálma × Norma SC növény flow citometriás diagramja. Bárok: (a-c): 100 µm, (d): 1 mm.

5. táblázat. A búza × kukorica megporzást követő *in vivo* és *in vitro* embriófejlődés gyakorisága, és a növényregeneráció hatékonysága az embrió- és „zigótamentés” eredményeként. Az adatok az adott fejlettségi állapotot elérő zigóták százalékos arányát és a szórást (SD, n=3) mutatják a megporzott termők számához viszonyítva. *A különböző adatokat követő azonos betűk esetén azok nem térnek el egymástól szignifikánsan a p=0,05 szinten a független T-próbák szerint.

Embriómentés (14 naposan)	(db)	(%)		(%)	(%)
Búza × kukorica keresztezések	Megporzott termő	Termő-megnyúlás		*In vivo* embriók	Regenerált növények*
Mv Ködmön × Norma SC	924	62.3±2.8		27.6±1.4	7.5±1.3[a]
Mv Pálma × Norma SC	891	27.9±1.4		9.2±1.1	0.7±0.3[b]
„Zigótamentés” (2 naposan)	(db)	(%)	(%)	(%)	(%)
Búza × kukorica keresztezések	Megporzott termő	Termő-megnyúlás	*In vitro* osztódás	*In vitro* embriók	Regenerált növények*
Mv Ködmön × Norma SC	426	57.5±4.2	20.9±6.6	1.9±0.7	1.6±0.9[b]
Mv Pálma × Norma SC	417	26.1±4.9	16.5±2.9	4.1±1.6	3.6±2.0[ab]

6. 3. 2. Búza × rizs megporzással nyert növények felnevelése a korai állapotban izolált aktivált petesejtek *in vitro* felnevelésével

6. 3. 2. 1. A rizzsel megtermékenyített petesejtek *in vivo* és *in vitro* fejlődése

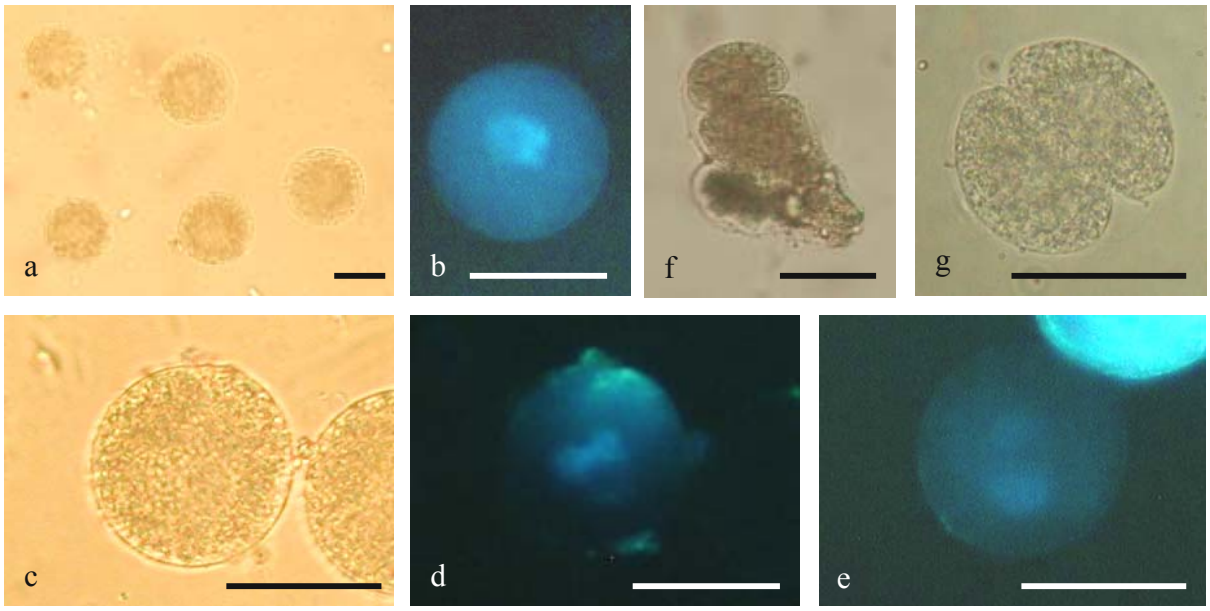
A búza × rizs keresztezések után 2 héttel az alkalmazott fajták esetén nem vagy csak igen ritkán találtunk embriókat a növényeken (6. táblázat). Az ilyen embriók mérete változó volt, de még a legfejlettebbek sem voltak nagyobbak 1 mm-nél. Ezekből az embriókból egyik esetben sem sikerült növényt nevelnünk. Elképzelhető, hogy a petesejtek ugyan aktiválódnak a rizzsel történő megporzás hatására, de az így képződő „zigóták" egyáltalán nem vagy alig képesek a növényen fejlődni, s a 14. napra szinte mindegyikük elpusztul.

6. táblázat. A rizzsel megporzott búza termők és a későbbiekben bennük, a növényen fejlődött embriók száma a 14. napon.

Keresztezés	Porzott virág	Megnyúlt termő	Embriószerű struktúra	Kifejlődött növény
Chinese Spring × Rigola	688	532	3 (0,4%)	0
Chinese Spring × Bioryza	452	92	4 (0,9%)	0
Mv9Kr1 × Rigola	544	284	0 (0%)	0
Mv9Kr1 × Bioryza	434	205	2 (0,5%)	0

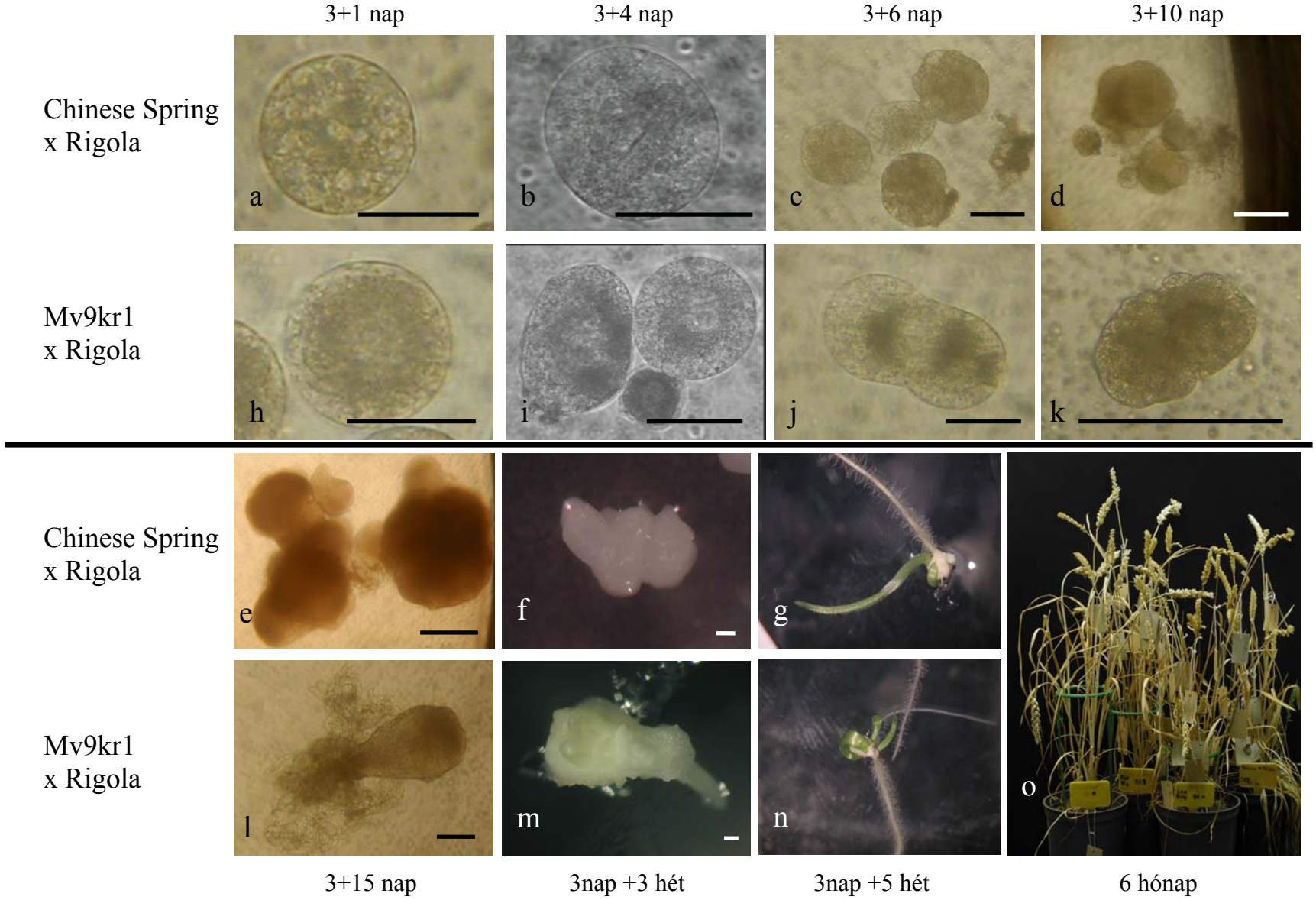
Mire ezeket a kísérleteket végeztük, a búza fiatal termőinek N6Z tápoldatban tenyésztésével már megoldottuk az izolált búza zigóták hatékony felnevelését. Ezért, hogy bebizonyítsuk a búza petesejtek rizzsel történő sikeres megtermékenyítésének vagy aktiválásának a lehetőségét, megpróbáltuk ezeket a sejteket a megporzást követő 1-4 napokon izolálni, majd az egy-sejt tenyésztési rendszerben felnevelni.

A búza rizzsel történő megporzása után 1-4 nappal izolált „zigóták" szinte mindig egysejtes állapotban voltak (15a-b. ábrák). Egy esetben, az Mv9kr1 × Bioryza keresztezést követő 2. napon láttunk a sejtmag osztódására utaló jeleket a DAPI-val megfestett sejtek közül kettőn (15c-e. ábrák). Ezek a sejtek sem fejezték be azonban az osztódást, és morfológiailag inkább a megtermékenyítetlen petesejtekre hasonlítottak, mintsem az *in vivo* (15f. ábra) vagy az *in vitro* (15g. ábra) osztódó, búza × búza zigótákhoz. Előfordulhat azonban, hogy az embriófejlődés hamarabb is megindul, ui. egy esetben a búza × rizs megporzás után 5 nappal már előrehaladottabb fejlődési állapotú proembriót találtak az embriózsákban (Barnabás és Tímár, nem publikált adatok).



15. ábra. A termőkből kimentett aktivált petesejtek fejlettségi állapota 2 nappal a rizzsel történő megporzás után; (a-b) Chinese Spring × Rigola, (c-e) Mv9kr1 × Bioryza „zigóták”; (b, d és e) DAPI festés. (a) A búza × rizs keresztezésből származó „zigóták” egy reprezentatív csoportja. (b) a „zigóták” még egysejtmagvas állapotban vannak. Két kimentett sejt azonban eltérő szerkezetet mutatott: (c) egy 2 napos „zigóta”, mely látszólag még nem kezdte meg az osztódást, (d) a DAPI felvételek azonban mutatják, hogy e sejt magja nem egységes szerkezetű; (e) egy másik hasonló sejtben már jól elkülöníthető a 2 sejtmag. Összehasonlításképpen a tisztán búza zigóta első osztódása *in vivo* (f) és *in vitro* környezetben (g) a megtermékenyítést követő napon. Bárok: 50 μm.

→ 16. ábra. A búza × rizs megporzásokat követő 3. napon kimentett aktivált petesejtek *in vitro* fejlődése. (a-g) Chinese Spring × Rigola, (h-n) Mv9kr1 × Rigola, (o) az összes felnevelt és beérett növény. A képek felett és alatt lévő adatok a bemutatott struktúrák korát jelölik (megporzástól az aktivált petesejtek kimenekítéséig + az onnan számított idő). Bárok: (a-c és h-j): 50 μm, (d-f és k-m): 200 μm. Részletes magyarázat a szövegben.


3+1 nap
3+4 nap
3+6 nap
3+10 nap
Chinese Spring x Rigola
Mv9kr1 x Rigola
a
b
c
d
h
i
j
k
Chinese Spring x Rigola
Mv9kr1 x Rigola
e
f
g
l
m
n
o
3+15 nap
3nap +3 hét
3nap +5 hét
6 hónap

16. ábra

7. táblázat. A búza fajazonos vagy idegenfajú megporzással aktivált petesejtjeinek fejlődési üteme az *in vitro* tenyésztés folyamán. A jelzett időpontok a megporzáshoz képest eltelt időt jelentik.

Keresztezés	**24 óra**	**3-4 nap**	**5-9 nap**	**9-15 nap**	**18-20 nap**	**24-28 nap**	**5-6 hét**
Búza × búza	első osztódás	soksejtes, globuláris proembriószerű struktúra	átmeneti fejlődési állapotú, bunkó alakú embrió	hajtáscsúcs, gyökércsúcs differenciációja	morfológiailag kifejlett, érett embrió	csíranövény	fiatal növény
Búza × kukorica	egy sejtes állapot	kezdeti osztódások	globuláris embriószerű struktúra	átmeneti fejlődési állapotú, bunkó alakú embrió	hajtáscsúcs, gyökércsúcs, sziklevél növekedése	morfológiailag kifejlett, érett embrió	csíranövény
Búza × rizs	egy sejtes állapot	sejtpolarizáció megváltozása, egy sejtes állapot	első osztódás (7-9. nap)	globuláris embriószerű struktúra	átmeneti fejlődési állapotú, bunkó alakú embrió	morfológiailag kifejlett, érett embrió	csíranövény

8. táblázat. A jelzett fejlődési stádiumokat elérő aktivált petesejtek száma az *in vitro* tenyésztés során. A „zigóták” kimenekítése a búza × rizs megporzásokat követően 1-4 nappal történt, az egyes cellák a különböző napokon kimentett „zigóták” és belőlük fejlődő struktúrák összesített adatait mutatják.

A zigótamentés ideje az egyes keresztezések végrehajtása után (napok)	Porzott virág	Termő meg-nyúlás	Izolált sejt	Legalább 1 sikeres *in vitro* osztódás	*In vitro* fejlődött ELS	csak gyökér-fejlődés	*In vitro* fejlődött növény	Beérett növény
Chinese Spring × Rigola	125	a 2. naptól	53	5	7	1	4	3
Chinese Spring × Bioryza	335	a 2. naptól	99	3	2	1	0	0
Mv9Kr1 × Rigola	514	a 2. naptól	103	1	1	0	1	1
Mv9Kr1 × Bioryza	499	a 2. naptól	104	5	0	0	0	0

A kimenekített aktivált petesejtek kezdetben még a tenyészetekben sem osztódtak (16a. és h. ábrák). Az első, *in vitro* körülmények között osztódott aktivált petesejtet a tenyésztés 4. napján találtuk, mely az Mv9kr1 × Rigola keresztezés után 3 nappal kimentett zigóták közül származott (16b. ábra). Ez a „zigóta" tehát a megporzáshoz képest már 7 napos korú volt, mire befejezte az első osztódási ciklust! A Chinese Spring × Rigola keresztezés esetében ekkor még csak egyes sejtek különös megnyúlását és polarizációját észleltük (16i. ábra). Az első sejtosztódást még később, a 9. napon észleltük, azonban ennek sikeres befejeződése még ekkor sem volt bizonyítható (16j. ábra). Ugyanekkor a Mv9kr1 × Rigola „zigótákból" már feltehetően jónéhány sejtes proembriószerű struktúrák fejlődtek (16c. ábra). Az első osztódásig tartó kritikus fázis után mindkét esetben a sejtosztódások és a növekedés felgyorsulását tapasztaltuk, így a tenyésztés 6-10. napja között a proembriószerű struktúrák intenzíven növekedtek (16d. és k. ábrák). Ezt követően, a tenyésztés 15. napjára egyes *in vitro* fejlődő struktúrák morfológiailag megközelítették az *in vivo* zigotikus embriókat (16e. és l. ábrák). Eközben a fejlődés üteme is helyreállt, ugyanis a tenyésztés 20-25. napján már szilárd táptalajra áthelyezhető, érett embriók és embriószerű struktúrák fejlődtek (16f. és m. ábrák). Ez az időtartam az idegenfajú megtermékenyítéshez képest 23-28, az első sejtosztódáshoz képest pedig 16-21 napot jelent, mely utóbbi érték hasonló a normál búza zigóták megfelelő értékéhez. Az embriók kicsírázásához, ill. az embriószerű struktúrák regenerációjához viszont meglehetősen hosszú időre, 10-15 napra volt szükség (16g. és n. ábrák). A 7. táblázat jól mutatja a búza × rizs „zigóták" *in vitro* fejlődési ütemének fent ismertetett sajátosságait és eltéréseit a búza zigótákhoz képest. Végül, az embriószerű struktúrákból összesen kifejlődő 5 növényből 4-et tudtunk teljes érettségig felnevelni (16o. ábra és 8. táblázat).

Fontos sajátsága a rizzsel megporzott, majd kimentett aktivált petesejtek tenyésztésének, hogy csak igen kis részük, 359-ből összesen 14 volt képes az első osztódási ciklus sikeres végrehajtására, de ez minden megvizsgált keresztezési variációnál megtörtént néhány esetben (8. táblázat). Az első osztódáson túljutott „zigótáknak" viszont nagyobb része, összesen 8 tovább tudott fejlődni, melynek eredményeképpen 10 embriót kaptunk. A Chinese Spring × Rigola keresztezés esetében ugyanis előfordult, hogy egy aktivált petesejtből több embrió is kifejlődött, hasonlóan az *in vitro* tenyésztett kontroll búza vagy a búza × kukorica „zigótákhoz". E keresztezésen kívül a Chinese Spring × Bioryza és az Mv9kr1 × Rigola „zigótamentése" is eredményezett embriókat és embriószerű struktúrákat, viszont növényeket csak a Chinese Spring × Rigola és Mv9kr1 × Rigola „zigótáiból" tudtunk nevelni, melyeket a megporzás után 3 nappal mentettünk ki. A beérett növények száma rendre 3 és 1 volt. A

növények morfológiája gyakorlatilag megegyezett a búzáéval (16o. ábra), de a kalászok esetenként sajátosan torzultak (17. ábra). A továbbfejlődő sejteknek a 8. táblázatban feltüntetett csekély számából még nem lehet a búza × rizs keresztezések genotípusfüggésére következtetni. Megjegyezendő viszont, hogy sikeres osztódást csak a megporzáshoz képest 1-3 nappal később kimenekített aktivált petesejteknél figyeltünk meg, továbbá, hogy mindegyik felnevelt növény három napos korban kimentett sejtből származott.

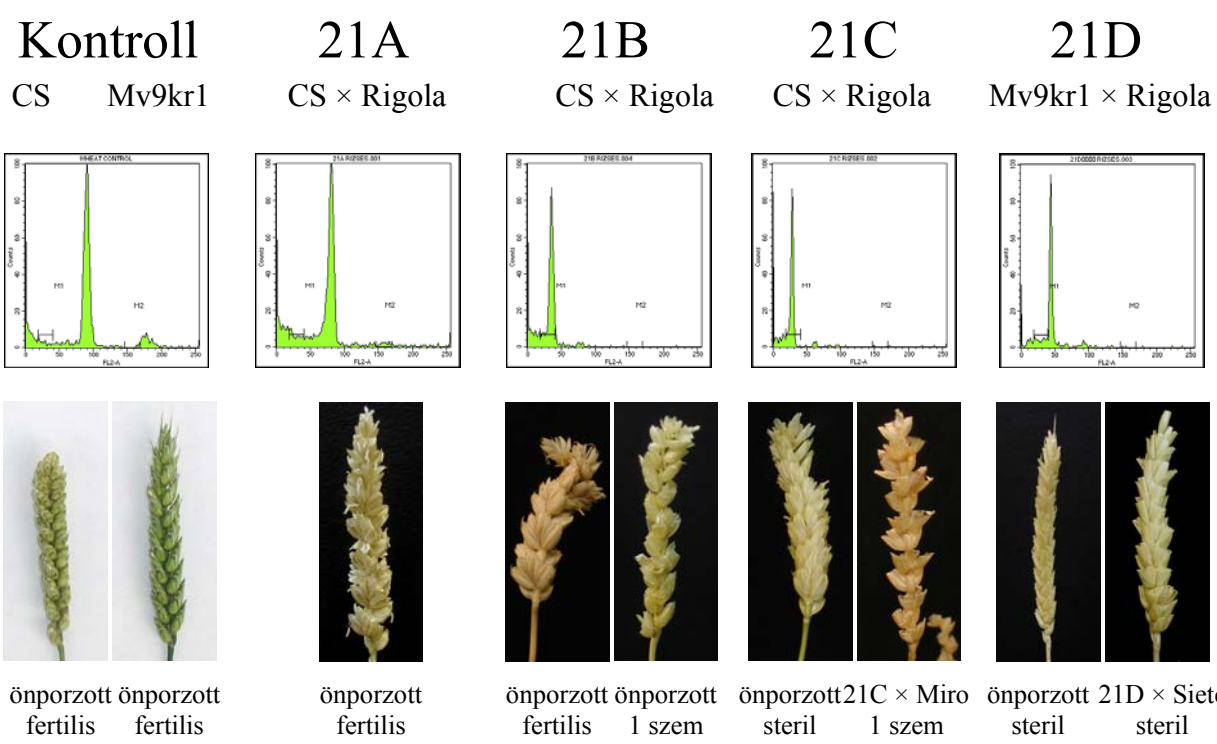
Összesen 35 Chinese Spring és 33 Mv9kr1 zigótát is tenyésztettünk ugyanebben az elrendezésben, hogy az egy-sejt tenyésztési módszer használhatóságát a búza × rizs keresztezések során használt búzafajtáknál is ellenőrizzük Ezekből rendre 19 és 20 növényt sikerült felnevelnünk (54 és 61 %-os hatékonyság), melyek *in vitro* fejlődése teljesen hasonló volt a korábbiakban ismertetett Siete Cerros búzafajtáéhoz. E kísérletek tehát pozitív kontrollként szolgálhattak a rizzsel megporzott búzákból izolált aktivált petesejtek *in vitro* tenyésztéséhez.

6. 3. 2. 2. A rizzsel keresztezett búzanövények genommérete és termékenysége

Az érésig felnevelt búza × rizs növények kalászmorfológiáját és genommméretét a 17. ábra, a fertilitási adatokat pedig a 9. táblázat tartalmazza. A Chinese Spring × Rigola növények 1-1 hajtását vizsgálva egy növény a diploid búzához közeli genommérettel rendelkezett (21A jelű növény), kettő pedig a haploid búzához hasonlóval (21B és C növények). Az Mv9kr1 × Rigola utód genommérete is a haploid búzáéhoz volt közeli (21D növény). Az általunk végzett flow citometriás analízis érzékenysége nem elegendő a rizs genom vagy annak részeinek kimutatására. Ennek oka, hogy a búza genommérete sokszorosa a rizsének (Arumuganathan és Earle, 1991). E nagyságrendnyi különbség miatt a búza és a rizs flow citogramjának csúcsait nem lehetett egy diagramon megjeleníteni, így a rizs genom sorsáról egyelőre semmit nem tudunk.

A növények fertilitása a következőképpen alakult: a 21A jelű növény teljesen termékeny volt. Nagyon érdekes azonban, hogy a 21B jelű növényen két kalász szintén termékenynek bizonyult, de a többi kalász önporzása összesen csupán 2 szemet eredményezett. A 21C és 21D jelű növények önporzott kalászai teljesen sterilek voltak, szemkötést csak idegen genotípussal (Siete Cerros vagy Mironovszkaja 808) történt megporzással lehetett elérni, így kalászonként 0-3 szem fejlődött ki (9. táblázat).

A búza × rizs növényeken termett szemek és e növények *in vitro* tenyésztett hajtáscsúcsaiból regenerált utódnövények citogenetikai vizsgálata folyamatban van.



17. ábra. A búza × rizs utódnövényeinek flow citometriás diagramjai és kalászaik jellemző morfológiája. Rövidítések: CS: Chinese Spring, Miro: Mironovszkaja 808, Siete: Siete Cerros.

9. táblázat. A búza × rizs utódnövények kalászainak termékenységi adatai. A fejlécben az utódnövények jelölése, az első oszlopban pedig a kalászok megporzásához használt partnerek szerepelnek. Normál betűvel a megporzott kalászok száma, **vastaggal pedig az ezekben a kalászokban termett szemek száma**. A 21B növény önporzott kalászai fertilitásuk alapján két jól elkülönülő csoportot alkotott, ezért e két csoport összesített adatai külön szerepelnek.

	CS × Rigola 21A	**CS × Rigola 21B**	**CS × Rigola 21C**	**Mv9kr1 × Rigola 21D**
önporzott	8, **224**	2+7, **61+2**	9, **0**	7, **0**
× Miranovszkaja	-	3, **3**	9, **13**	1, **0**
× Siete Cerros	-	-	-	2, **2**
× 21A	-	1, **1**	-	-

7. Az eredmények megvitatása

7. 1. A búza zigóták izolálása és *in vitro* tenyésztése során fellépő problémák megoldása

Az izolált zigóták *in vitro* felnevelése nagyon precíz munkát igényel, mely során alapvetően két problémát kell megoldani: 1. a sejtek izolálásánál és a tenyészetbe helyezésénél elkerülni a zigóták mechanikai sérülését és a jelentősebb mértékű ozmotikus stresszt, 2. a zigóták *in vitro* embriófejlődéséhez szükséges tápanyagokat és növekedésszabályozókat biztosítani a tenyésztés teljes időtartama alatt. Laboratóriumunkban e két probléma megoldására a korábbi munkák tapasztalatainak figyelembevételével terveztünk kísérleteket. Holm és mtsai (1994) bebizonyították, hogy lehetséges a búza izolált zigótáinak *in vitro* felnevelése. A zigótákat már a felnevelésükre alkalmas tápoldatban izolálták, majd ebben is tenyésztették, de e lépéseket még csak alacsony hatékonysággal tudták sikeresen végrehajtani. Szénforrásként maltózt alkalmaztak, ami a dajkasejtekként használt mikrospórák embriogén fejlődéséhez is optimális (Olsen, 1991). Kovács és mtsai (1994) a búza petesejteket, és zigótákat már hatékonyan izolálták a 600 mOsmol körüli ozmotikus koncentrációjú mannitololdatban. A későbbiekben pedig Kumlehn és mtsai (1998) a mannitololdatban izolált zigóták döntő többségét fel tudták nevelni, amennyiben az *in vitro* tenyésztéshez glükóztartalmú tápoldatot használtak. Dajkasejtekként kizárólag az árpa izolált mikrospóra tenyészeteket használták minden eddigi sikeres munkában (áttekintő cikk: Kranz és Kumlehn, 1999).

7. 1. 1. A zigóták izolálásához és tenyésztéséhez szükséges közegek

A sejtek izolálása során szerzett tapasztalataink (1. táblázat) csaknem mindenben megerősítették a korábbi kutatók megfigyeléseit: 1. a zigóták izolálhatók és fel is nevelhetők egyazon teljes tápoldatban, mely szénforrásként maltózt tartalmaz, de nagyon alacsony hatékonysággal; 2. a petesejteket és zigótákat nagyon nehéz izolálni és kezelni a teljes tápoldatokban, melyek nagyobb mennyiségben tartalmaznak sókat, ill. többértékű fémionokat; 3. a petesejtek és zigóták hatékonyan izolálhatók a 0,6 M mannitololdatban, vagy az ahhoz közeli ozmolaritású és sűrűségű, mannitolt is tartalmazó oldatokban; 4. diszacharid-tartalmú izolálóoldatok esetén, amennyiben az ozmotikus koncentráció megfelelő, az oldat sűrűsége túl nagy. Ekkor a zigóták túlélését ill. a tenyésztés hatékonyságát jelentősen csökkenti, hogy a sejtek felúsznak az oldat tetejére, és ott kidurrannak. Amennyiben viszont a diszacharid-tartalmú izolálóoldat fizikai sűrűsége megfelelő és az ozmotikus koncentráció túl kicsi, akkor a legtöbb zigóta megduzzad vagy bimbózik (nem mutatott adatok), és emiatt jelentős részük,

mintegy 60-80 %-uk elpusztul, de az életben maradt zigóták jelentős része növénnyé nevelhető (1-2. táblázatok, 6. ábra). Egyetlen, az eddigiektől (Kumlehn és mtsai, 1998) valamelyest eltérő tapasztalat, hogy a Ca^{2+} alkalmazása az izolálóoldatban nem okozta a sejtek fokozott kitapadását a mi esetünkben alkalmazott koncentráció esetén (2 mM). Mindezekből az a következtetés vonható le, hogy a zigóták (és petesejtek) izolálása során egyaránt fontos az izolálóoldat ozmotikus nyomása és sűrűsége is. Emellett, nem lehet túl nagy a szervetlen sók koncentrációja sem, de kis mennyiségű Ca^{2+} alkalmazása előnyös lehet, mert stabilizálja a protoplaszt jellegű izolált petesejteket és zigótákat.

A zigóták *in vitro* felnevelésének másik megoldandó kérdése a tenyésztéshez használható tápoldat és dajkatenyészet kiválasztása. Különböző típusú sejtek együtt-tenyésztésénél általában jelentős probléma, hogy nehéz olyan tápközeget találni, mely mindkét sejttípus, a dajka és a dajka által kiválasztott növekedésserkentő anyagokat igénylő felnevelendő sejtek számára megfelelő körülményeket biztosít. Gondot okozhat a zigóták áthelyezése is az izolálóoldatból a tápoldatba, ugyanis ennek során komoly mértékű ozmotikus stressz léphet fel, ami e sejtek jelentős részét elpusztíthatja (2. táblázat).

Láthattuk, hogy a zigóták tenyésztésére bár a maltóz is megfelelő szénforrás lehet (Holm és mtsai, 1994), a legsikeresebben a glükózt alkalmazták (Kumlehn és mtsai, 1998, 1999, 2001). Ugyanakkor, laboratóriumunkban az árpa izolált mikrospórákat nem tudtuk a szénforrásként glükózt tartalmazó tápoldatban megfelelően tenyészteni és dajkákként felhasználni (1. táblázat). Ezért az együtt-tenyésztéshez a továbbiakban a mikrospórák sporofitikus indukciójához és embriogén fejlődéséhez használt és jól bevált maltózt (Olsen, 1991; Mordhorst és Lörz, 1993; Holm és mtsai, 1994; Hu és Kasha, 1997) alkalmaztuk szénforrásként. A mikrospórák számára optimális tápoldat maltózkoncentrációja, és így ozmolaritása azonban jelentősen eltér az izolálóoldatétól, ezért a zigóták tenyészetbe helyezésekor fellépő ozmotikus stressz nagyon jelentős. Ezt elkerülni nem lehetett, de úgy csökkenthettük, hogy a zigótákat az izolálóoldattal együtt a 2b. ábrán látható tenyésztési elrendezésben olyan sejttartókba helyeztük, melyeknek az alján lévő membrán megakadályozza a két oldat közvetlen keveredését, így az oldott anyagok koncentrációja csak diffúziós folyamat eredményeként, lassan egyenlítődhetnek ki.

7. 1. 2. A különböző dajkák jellemzői és alkalmazásuk eredményessége

A zigóták felnevelésének előfeltétele a megfelelő tápoldaton kívül a dajkasejtek jelenléte is. Kutatásaink során kiderült, hogy hasonlóan a búza izolált mikrospóráihoz, (Puolimatka és Pauk, 1999), az izolált zigóták számára is többféle sejttípus alkalmazható dajkaként. Míg eddig csak az árpa izolált mikrospórák segítségével neveltek fel izolált búza zigótákat (Kumlehn és mtsai, 1998; Kranz és Kumlehn, 1999), kísérleteink eredményeképpen ez elsőként valósult meg fajazonos dajkák, így a búza fiatal termőit is tartalmazó búza izolált mikrospóra tenyészetek, ill. az önállóan alkalmazott fiatal termők segítségével.

Nem minden tenyésztett explantátum rendelkezik azonban megfelelő dajkahatással, és ez valószínűleg az általuk szekretált anyagok minőségével és mennyiségével áll összefüggésben. A búza mikrospórák számára hatékony dajkáknak bizonyultak a búza és az árpa fiatal termői, a pelyvalevelek, és részben az egész virágok is, míg a portokokkal nem lehetett jó eredményt elérni (Puolimatka és Pauk, 1999). A vizsgált dajkáknak a búza zigóták *in vitro* fejlődésére gyakorolt kedvező hatásában is voltak különbségek. Így pl. a 6-12 napos korban kipreparált embriók nem tették lehetővé az izolált zigótákból történő növényfejlődést; pedig ezek – ellentétben a proembriókkal – abban az értelemben autotrófnak tekinthetők, hogy képesek megszintetizálni minden olyan növekedési faktort, mely fejlődésükhöz szükséges. A búza fiatal termőit is tartalmazó búza izolált mikrospóra tenyészetek, és a búza önállóan tenyésztett termői viszont megfelelő dajkáknak bizonyulnak. Az a tapasztalat, hogy a zigótákat a mikrospórák nélkül tenyésztett termők segítségével is ugyanolyan hatékonysággal fel lehetett nevelni, azt mutatja, hogy a dajkahatásért nem (csak) a mikrospórák, hanem feltehetően elsősorban a termők felelősek. Ez jelentős, de nem meglepő különbség az árpa mikrospórákhoz képest, hiszen ellentétben az árpával, a búza mikrospórák maguk is dajkákra szorulnak ahhoz, hogy embriókká majd növényekké fejlődhessenek (Puolimatka és mtsai, 1996; Touraev és mtsai, 1996; Puolimatka és Pauk, 1999).

A dajkák által termelt növekedési faktorok funkciója feltehetően az embriogén fejlődés hosszú távú fenntartása. E feltételezést támasztja alá, hogy a búza mikrospóra tenyészetekben legalább 10 napig (Puolimatka és Pauk, 1999), a zigóták esetében pedig a teljes tenyésztés ideje alatt jelen kell, hogy legyenek a dajkasejtek (Kumlehn és mtsai, 1998). A tenyésztés során mindvégig nagyon fontos a dajkasejtek megfelelő fiziológiai állapota is. Ezt bizonyítja, hogy a 8-10 napos búza embriók a tenyészetekben 6-10 nap után kicsíráztak, tehát csak nagyon rövid ideig fejlődtek embrióként (5e-f. ábra), így legfeljebb az együtt-tenyésztési idő kezdetén támogathatták az izolált zigóták fejlődését. Az is előfordulhat, hogy a tenyésztett zigótákhoz képest ezek a jóval idősebb embriók már nem a megfelelő növekedési

faktorokat termelték. A fiatalabb, 6 napos embriók számára a tenyésztési körülmények nem voltak kedvezőek, az idősebb, 12 naposak pedig már megkezdhették a nyugalmi állapotot, így egyikük sem rendelkezett megfelelő dajkahatással. A búza termőinek fiziológiai ill. fejlődési állapota hosszabb ideig megfelelő lehetett, de a zigóták *in vitro* felnevelésének sikeréhez elengedhetetlen volt, hogy a 14 napig tenyésztett termőket elöregedésük előtt újabbakra cseréljük le. A felsorolt megfigyelésekből és szakirodalmi adatokból látható, hogy a dajkáknak a tenyésztés teljes ideje alatt intenzív növekedési fázisban kell lenniük, hogy folyamatosan termelhessék az embriók növekedését serkentő anyagokat, és nem öregedhetnek el, mivel ekkor toxikus anyagok kerülhetnek a tenyészetbe. Elképzelhető, hogy a tenyésztési rendszer hatékonyságának nagyfokú ingadozása a kukorica izolált zigótái esetében is (Leduc és mtsai, 1996) a dajkatenyészet változó minőségére vezethető vissza. Az általunk alkalmazott dajkatenyészetekkel elért eredmények és korábbi tapasztalatok (Holm és mtsai, 1994; Leduc és mtsai, 1996; Kumlehn és mtsai, 1998, 1999; Puolimatka és Pauk, 1999; Kranz és Kumlehn, 1999) alapján tehát úgy tűnik, hogy az együtt-tenyésztés sikeressége elsősorban a dajkák fejlődési ill. fiziológiai állapotától függ, és nem az a lényeges, hogy az alkalmazott dajka és a felnevelendő sejt azonos növényfajból származzon.

A legfontosabb dajka, a búza termői által kibocsátott növekedési faktorok egyelőre ismeretlenek, de a mikrospóra tenyészetek vizsgálatának eredményeként ma már számos vegyületről tudjuk, hogy az embriófejlődésre pozitív hatással van. E növekedésserkentő anyagok megismerését szolgálja az *in vivo* fejlődő embriók mikrokörnyezetének kutatása is. E két területen elért legfontosabb eredményeket a 3. 3. „Petesejt/zigóta eredetű embriók tenyésztése” című fejezet ismerteti, itt csak annyit fontos megjegyezni, hogy a zigóták *in vitro* felnevelését lehetővé tevő szintetikus tápoldat megtervezéséhez még további vizsgálatok szükségesek: a búza termők által a tápoldatba kibocsátott anyagok és/vagy az *in vivo* embriók környezetének még pontosabb felderítése az idő függvényében.

A búza zigóták *in vitro* tenyésztésének hazai adaptálásában a búza fiatal termői játszották a kulcsszerepet, ugyanis segítségükkel vált lehetővé laboratóriumunkban a Kumlehn és mtsai (1998) által kifejlesztett és az izolált zigóták nagyon hatékony felnevelését lehetővé tévő N6Z tápoldat használata. Ellentétben a mikrospórákon megfigyelt tapasztalatainkkal, a fiatal termők ugyanis a szénforrásként glükózt tartalmazó N6Z tápoldatban is intenzíven és tartósan növekedtek. Az N6Z tápoldat alkalmazása lehetővé tette, hogy a zigótákat a tenyészetbe helyezéskor érő ozmotikus stresszt minimálisra csökkentsük, ugyanis megoldhatóvá vált az, hogy az izolálóoldat és a tenyésztéshez használt tápoldat ozmotikus koncentrációja és sűrűsége is gyakorlatilag azonos legyen. A búza termők mint

dajkák és az N6Z tápoldat alkalmazása az *in vitro* egy-sejt tenyésztési rendszert reprodukálhatóan kiemelkedő hatékonyságúvá és könnyebben kivitelezhetővé tette (2. táblázat, pirossal szedett oszlop).

Bár csak néhány búzafajtából neveltünk fel zigótákat, és az általunk tenyésztett sejtek száma erősen korlátozott volt, saját és más kutatók (Kumlehn és mtsai, 1998, 2001; Kumlehn, személyes közlés) eredményeiből arra lehet következtetni, hogy e technika nem mutat genotípusfüggést, így széles körben alkalmazható.

7. 2. A búza zigóták *in vitro* fejlődése

7. 2. 1. Az *in vitro* fejlődő embriók differenciálódása

7. 2. 1. 1.A zigóták első osztódása *in vivo* és *in vitro*

A búza petesejtjében és zigótájában az organellumok perinukleárisan, a sejtmag körül helyezkednek el (You és Jensen, 1985; Naumova és Matzk, 1998). Ez az izolált petesejtre is jellemző (Barnabás és mtsai, 2001a; 7. ábra), csupán a sejt alakja változik meg (Kovács és mtsai, 1994). A sejtorganellumok zigótán belüli eloszlása kulcsfontosságú a leánysejtek sejttartalmának különbözősége/hasonlósága szempontjából (Jane, 1999). A pázsitfűfélék közül például a kukorica (van Lammeren, 1981), az árpa (Engell, 1988), és az *Arundo formosana* Hack (Jane, 1999) esetében a petesejt polaritása megváltozik a megtermékenyítéskor, míg a gyöngyköles (Taylor és Vasil, 1995) és a búza (Naumova és Matzk, 1998) petesejtjében és zigótájában a sejtorganellumok elrendeződése nagyon hasonló. A zigótában meglévő polaritás következtében az első sejtosztódás a zárvatermőknél két eltérő sejtet, az organellumokban gazdag csúcsi ill. a vakuolizált alapi sejtet eredményez (pl. kukorica: Randolph, 1936; Schel és Kieft, 1986; árpa: Norstog, 1972; rizs: Jones és Rost, 1989; gyöngyköles: Taylor and Vasil, 1995; *Arundo formosana*: Jane, 1999). Ezalól a búza annyiban jelent kivételt, hogy a zigótában meglévő polaritást mutató sejtorganellum-elrendeződés ellenére az osztódás eredményeként létrejövő alapi és csúcsi sejt igen hasonló sejttartalmú és méretű, látszólag csak alakjában különböző (You és Jensen, 1985; Naumova és Matzk, 1998; 8d-f. ábrák).

A sejtizolálás során a petesejt, ill. a néhány órája megtermékenyült zigóta protoplasztként szabadul ki a sejtfalból, következésképpen gömb alakúvá válik és polarizációja ezzel zavart szenved (Kovács és mtsai, 1994; Kumlehn és mtsai, 1999; 7. ábra). Valószínűleg ennek az alakváltozásnak a következménye, hogy az *in vitro* közegben a zigóta

osztódásának eredményeként két azonos alakú leánysejt jön létre (Kumlehn és mtsai, 1999; 6b. és 8a-c. ábrák). A *Fucus* tengeri alga, mint modellszervezet zigótáinak tanulmányozásának köszönhetően ismert ugyanis, hogy a sejtfal épsége, pontosabban molekuláris aszimmetriája szükséges a megfelelő polaritástengely kialakításához és a leánysejtek normális differenciálódásához (Belanger és Quatrano, 2000; Corellou és mtsai, 2001). He és mtsai (2007) a dohány, tehát egy magasabb rendű növény sejtfallal rendelkező és protoplaszt állapotú zigótáinak *in vitro* fejlődését vizsgálva ugyanerre a következtetésre jutottak: csak az *in vivo* szintetizált, összetételbeli grádienst mutató sejtfallal körülvett zigóták voltak képesek *in vitro* környezetben reprodukálni a proembriók *in planta* osztódási mintázatát; a zigóta-protoplasztok a sejtfal *in vitro* regenerálódását követően szimmetrikusan osztódtak és csak a későbbiekben váltak az *in vivo* embriókhoz hasonlókká. Ráadásul az ilyen zigótákból fejlődő embriók szuszpenzor nélküliek voltak.

7. 2. 1. 2. Hogyan alakulhatnak ki a szimmetrikusan osztódó zigótákból a növényben is megfigyelhető morfológiájú embriók?

Kumlehn és mtsainak (1998) hipotézise szerint a zigóta szimmetrikus osztódása ellenére a sejtek belső polaritása megmarad, így a kezdeti lépéseket követően azok *in vitro* környezetben is a zigotikus embriógenezis jól definiált útját követik. E hipotézist tapasztalataink annyiban erősítették meg, hogy a tenyészetekben a zigóta első osztódásakor keletkező leánysejtek citoplazmája, organellumainak elrendeződése azonos volt az *in planta* proembriók sejtjeivel. Mivel azonban a búzában eddig egyelőre nem elérhetők az ilyen irányú részletes biokémiai és molekuláris biológiai vizsgálatok eredményei, e hipotézis csak közvetetten tekinthető bizonyítottnak. Mindeddig a búza zigóták és a kétsejtes proembriók génexpressziós mintázatát csak egymással hasonlították össze (Sprunck és mtsai, 2005). A proembrió sejtjei között meglévő különbségeket még csak a kukoricában vizsgálták, ahol – ellentétben a búzával – szembetűnő morfológiai különbség is van a csúcsi és az alapi sejt között (Okamoto és mtsai, 2005). A polaritás molekuláris szintű fennmaradásának (vagy újraalakulásának?) további közvetett bizonyítéka, hogy hasonlóan a búzához (Kumlehn és mtsai, 1998, 1999; 6. ábra), bizonyos késedelem után a dohány szimmetrikusan osztódott zigótái is képesek – a szuszpenzort leszámítva – morfológiailag tökéletes embriókká fejlődni az *in vitro* környezetben (He és mtsai, 2004, 2007).

Sok pázsitfűféle esetében a proembriók sejtosztódási síkjai legalábbis részben véletlenszerűek a globuláris proembrió fejlődési stádium eléréséig, ami azt jelenti, hogy bármely irányú sejtosztódás bekövetkezhet, és így a proembriónak gömbszerű alakja lesz (pl.

Arundo formosana: Jane, 1999; rizs: Suzuki és mtsai, 1992). E proembriók alakja általában annyiban tér el a szabályos gömbtől, hogy az alapi részük keskenyebb. Sőt, a rizsben azt is megfigyelték, hogy a globuláris stádiumú *in planta* proembrió alakja variábilis a környezeti tényezők függvényében (Nagato, 1978; Suzuki és mtsai, 1993). A búza esetében tehát ehhez hasonló jelenség lehet, hogy a zigóták és proembriók osztódási mintázata eltérő az *in vitro* és *in vivo* környezetben. A búza zigótákból *in vitro* fejlődő embriók esetében a kezdeti osztódások szimmetrikusak, szinkronizáltak, és az előző osztódáshoz képest merőleges síkúak voltak, majd a további osztódások aszinkronizáltan alakultak, ami az embrió szimmetriájának fokozatos torzulásához vezetett (6c., 8a-c. és 9a-c. ábrák; Kugelmann és mtsai, 2007: készülő TDK dolgozat). A kezdeti osztódások szimmetriája tehát az *in vivo* állapothoz képest különbözött, azonban a későbbiekben az aszinkronizált és random osztódási mintázat tulajdonképpen analógiát mutat az *in vivo* állapottal. Az *in vitro* fejlődő struktúrák annyiban is hasonlók voltak az *in planta* embriókhoz, hogy sejtjeik szintén organellumokban gazdag és merisztéma jellegűek voltak (8-10. ábrák).

A random osztódások eredményeként kialakuló, még differenciálatlan globuláris proembrióban már bizonyos grádiensek jelen vannak, melyek meghatározó szerepet játszanak az egyes szervek kialakulásánál (kutikula képződés, rügyhüvely differenciáció, koleoriza, majd gyökér- és hajtáscsúcs, sziklevél kialakulása: Suzuki és mtsai, 1996, és Natesh és Rau, 1984; Willemsen és Scheres, 2004; Weijers és Jürgens, 2005). Gyakran az *in vitro* környezetben fejlődő búza embriókban is megfelelő módon kialakulhattak ezek a későbbi differenciációt meghatározó biokémiai grádiensek, így a sejtizolálás közben megzavart polaritású, a szokásostól eltérően osztódni kezdő búza zigóták a későbbi fejlődés során képesek voltak visszatérni az embriógenezisnek a növényben is megfigyelhető útjára (6d-e. és g. ábrák). E fejlődésbeli sajátosság analóg (esetleg homológ) azzal, ahogy a globuláris stádiumban véletlenszerű síkokkal osztódó rizs embrióból is jól definiáltan szervezett embrió válik a későbbiekben (Suzuki és mtsai, 1992, 1993, 1996). A magas hatékonyságot biztosító, de 2,4-D-t tartalmazó N6Z tápoldatú tenyészetekben azonban a legtöbb esetben valószínűleg kisebb-nagyobb mértékben torzult módon épültek fel a differenciációt meghatározó grádiensek (Taylor és Vasil, 1996a E3), így az embriók is torzult alakúak lettek (6g-h. ábrák). Kísérleteink során az *in vitro* embriófejlődés üteme általában lassabb volt, mint a növényben megfigyelhető, ez azonban megegyezik a korábbi tapasztalatokkal (Kumlehn és mtsai, 1998). Mindezek a jelenségek mögött álló mechanizmusok feltárásához további részletes molekuláris biológiai vizsgálatok szükségesek.

7. 2. 1. 3. Kalluszoknak vagy embrióknak tekintsük-e az *in vitro* fejlődő zigótákat?

Hisztológiai vizsgálataink rámutattak, hogy a zigótákból *in vitro* környezetben legtöbbször kompakt kalluszok fejlődtek, melyekben a központilag elhelyezkedő merisztéma jellegű sejteket vakuolizált parenchimatikus kalluszsejtek, és az azt fedő epidermisz vette körül (11-13. ábrák). Fransz és Schel kukoricán végzett szövet- és sejttani tanulmányaikat összegezve (1994) megállapították, hogy a kompakt kalluszok gyakorlatilag torzult embrióknak, ill. inkomplett embriók csoportjának tekinthetők. Hasonló struktúrájú kompakt kalluszokat, ill. embriószerű struktúrákat a búzában is megfigyeltek és jellemeztek (Ozias-Akins és Vasil, 1982). Sőt, maguk a búza zigóták egy részéből is ilyen struktúrák, ún. ikerembriók fejlődtek *in vitro* környezetben (Kumlehn és mtsai, 1998; 6g. ábra).

Felvetődik azonban annak a lehetősége is, hogy az *in vitro* környezetben fejlődő zigóták embriógenezis programja megszakad és embriók vagy embriószerű struktúrák helyett kalluszok fejlődnek, majd ezt követően gyakorlatilag organogenezis útján történik a növényregeneráció. Ez utóbbinak azonban némileg ellentmond, hogy az általunk vizsgált *in vitro* fejlődött struktúrák minden időpontban és esetben tartalmaztak merisztéma jellegű sejttömörülést, így valószínűsíthető, hogy ezek a sejttömegek mintegy ősmerisztémaként a zigótából eredően folyamatosan fennálltak. A tenyészetek megfigyelése alapján az is megállapítható, hogy az embriók döntő többsége a torzult alakja vagy ikerszerű morfológiája ellenére is képes egészséges és fertilis növénnyé kifejlődni (6. ábra és 2. táblázat). Így feltehetően az áll a legközelebb az igazsághoz, hogy a zigóta eredetű *in vitro* fejlődő struktúrák többsége többé-kevésbé rendellenes differenciáció eredményeként torzult, gyakran abnormális tengelyű embrió, melyekből a növények kifejlődése gyakran úgy történik, hogy először csak a hajtás fejlődik ki, melyet a gyökeresedés csak napokkal később követ, de ez nem nevezhető organogenezisnek, mivel a hajtás nem kalluszsejtekből *de novo* kialakuló merisztémából differenciálódik.

Szomatikus embriókban megfigyelték, hogy a növényregenerációra való képességnek feltétele, hogy a merisztéma megőrizze eredeti sajátságát, azaz organellumgazdagságát és kismértékű vakuolizáltságát (Taylor és Vasil, 1996a,b; Nickle és Yeung, 1993). Az *in vitro* tenyésztett zigóták döntő többsége képes volt növénnyé fejlődni, ugyanakkor e struktúrákban megtalálható merisztéma szöveti szerveződése némileg rendezetlenebb volt az *in vivo* embriókban megfigyelhetőnél (11c. és 13a-d. ábrák). Az esetünkben tapasztalt jó növényregenerációs arány valószínűleg azzal magyarázható, hogy a zigóta eredetű struktúrák merisztéma jellegű szöveteiben legalább a sejtek egy része az *in planta* állapothoz hasonlóan organellumgazdag és viszonylag alacsony vakuolizáltságú maradt.

A zigótákból a tenyészetekben kifejlődő struktúrákban megtalálható kalluszsejteknek feltehetően az embriót, ill. a merisztematikus sejtcsoportot tápláló szerepük lehet, amint arra Taylor és Vasil (1996a) és Emons és Kieft (1991) szomatikus embriókon végzett tanulmányai is rámutattak. Ezekre feltehetően az anyai, teljesen ideális környezet hiánya miatt van szükség. A növényben ugyanis megvannak a megfelelő szervek (szuszpenzor, endospermium, nucellusz) az embrió táplálására. E szervek hiányát pótló, tápláló funkciójú sejteket mikrospórákból fejlődő struktúrák esetén is kimutattak immunológiai és molekuláris biológiai vizsgálatokkal (pl: *ZmAE1* endospermium-specifikus gén expressziója, arabinogalaktán proteinek szekretálása: Magnard és mtsai, 2000; Borderies és mtsai, 2004; Massonneau és mtsai, 2005). Az *in vitro* környezetben az endospermium pótlásának jelensége esetünkben is megfigyelhető volt, ugyanis a zigóta eredetű struktúrák bizonyos, perifériálisan elhelyezkedő területein az endospermiumhoz igen hasonló, keményítőt és proteint felhalmozó sejteket találtunk (13f-i. ábrák).

A zigóták *in vitro* fejlődése esetenként egyáltalán nem hasonlított az embriógenezis útjára. Így mikrokalluszok fejlődését is megfigyeltük a zigótákból, de a Kumlehn és mtsai (1998) által közölt adatokhoz hasonlóan, csak kis gyakorisággal (2. táblázat). A mikrokalluszok kizárólag akkor voltak túlsúlyban, amikor a zigótákat makro- és mikroelemektől gyakorlatilag mentes, csak szénhidrátot tartalmazó izolálóoldatokban tenyésztettük, vagy amikor nem alkalmaztunk dajkasejteket, ill. azok inadekvátak voltak (idősebb embriók, gyengén fejlődő mikrospóra tenyészetek vagy be nem zöldülő termők). A mikrokalluszok kialakulása tehát feltehetően az igen kedvezőtlen, így komoly stresszt jelentő körülmények: a tápanyagok ill. a megfelelő növekedésszabályozó anyagok hiányának eredménye. Általánosan elmondható, hogy kallusz akkor képződik, amikor egy explantátumot eredeti környezetéhez képest merőben eltérő környezetbe helyezünk. Ez egy stresszt jelent, amire az explantátum elsődlegesen egy sokkszerű választ ad, melyet egy dedifferenciációs folyamat követ, és amennyiben a környezet lehetővé teszi, csak ezután történik további sejtproliferáció, ill. növényeket eredményező szomatikus embriógenezis vagy organogenezis (Fransz és Schel, 1994; Kikuchi és mtsai, 2006).

7. 2. 2. A tartaléktápanyagok felhalmozódása az *in vitro* fejlődő búza embriókban

7. 2. 2. 1. Keményítő

A búza petesejtben *in planta* viszonylag sok keményítőszemcse található (You és Jensen, 1985). A keményítőszemcsék száma a megtermékenyítéskor lecsökken, amit a folyamat energiaigényessége, ill. a zigóta aktív anyagcseréje megmagyaráz (Naumova és Matzk, 1998; Okamoto és mtsai, 2005; Sprunck és mtsai, 2005). Esetünkben azonban az izolálás után 1 órával fixált petesejtek nem tartalmaztak kimutathatóan több keményítőszemcsét, mint a már osztódott zigóták. A keményítőszemcsék viszonylag kicsik voltak a petében és mind az *in vivo*, mind az *in vitro* kifejlődött kétsejtes proembriókban. Elképzelhető, hogy a petesejtizolálás során fellépő stressz miatti többlet energiafelhasználás is oka lehetett ennek. A zigóták az első osztódást követően azonban mind *in vivo* mind *in vitro* közegben képesek voltak növelni a keményítőszemcsék számát és méretét, így feltehető, hogy a fejlődő zigóták szénhidrát-táplálása *in vitro* környezetben is megfelelő volt. Más pázsitfű fajokban is megfigyelték a keményítőszemcsék számának növekedését a zigóták első osztódását követően (gyöngyköles: Taylor és Vasil, 1996a; *Arundo formosana*: Jane, 1999).

A pázsitfűfélék *in planta* embrióiban a kezdeti sejtosztódásokat követően is mindvégig jelen vannak a keményítőt tartalmazó amiloplasztiszok. Az embriófejlődés folyamán a raktározott keményítő mennyisége növekszik, főleg a sziklevélben és a koleorizában, azonban meg sem közelíti az endospermium sejtjeinek keményítőtartalmát (búza: Smart és O'Brien, 1983; 12c., 13d-e. és h-i. ábrák; rizs: Suzuki és mtsai, 1991; gyöngyköles: Taylor és Vasil, 1995; *Arundo formosana*: Jane, 1999). Az *in vitro* embriószerű struktúrákban is mindvégig jelen volt a raktározott keményítő, melynek mennyisége nőtt az időben. További fontos hasonlóságok, hogy a keményítőszemcsék gyakran a sejtmag körül körkörösen helyezkedtek el (11b., 12b. és 13d. ábrák), és hogy a merisztémákban nem vagy alig fordultak elő keményítőszemcsék (11b., 12b., 13b. és d. ábrák). Mindezen hasonlóságok mellett azonban lényeges különbség, hogy az *in vitro* fejlődő struktúrák bizonyos – elsősorban perifériális – területein rengeteg, az endospermium raktározó sejtjeivel összemérhető mennyiségű keményítőszemcsét mutattunk ki. Mindez az *in vitro* közegben hiányzó endospermium funkcionális pótlásaként fogható fel (ld. a „Kalluszoknak vagy embrióknak tekintsük-e az *in vitro* fejlődő zigótákat?" c. fejezetet). Szövettenyészetekben nevelt struktúrák perifériális részén előforduló keményítő-felhalmozást kukorica portok (fehér áttetsző kalluszok, Jäger és mtsai, 2005) és árpa izolált mikrospóra tenyészetekben is megfigyeltek (nem publikált adatok).

7. 2. 2. 2. Proteinek

A keményítő mellett tartalékfehérjék felhalmozása szintén jellemző a pázsitfűfélék embrióiban és endospermiumaikban (rizs: Krishnan és White, 1997; *Arundo formosana*: Jane, 1999). A búza esetében leginkább az endospermium keményítőraktározó és aleuron sejtjeiben vannak proteintestek, de azok megtalálhatók az embrióban is: a sziklevélben, a koleoptilban és a koleorizában (Bechtel és mtsai, 1982; Smart és O'Brien, 1983). Kísérleteink során a Coomassie brilliant blue festéssel csak a nagyobb méretű proteintesteket tudtuk megbízhatóan kimutatni a 14 napos búzaszemek endospermiumában és a 20 napos *in vitro* embriószerű struktúrák raktározó típusú sejtjeiben (13g. és i ábrák). Mivel az *in vitro* nevelt zigóta eredetű struktúrákban a kimutatott proteintestek morfológiailag hasonlítottak az endospermium sejtjeinek proteintesteihez, e megfigyelés tovább erősítette az endospermium *in vitro* funkcionális pótlására vonatkozó feltevésünket.

7. 2. 2. 3. Lipidek

Lipidcseppeket, esetenként nagy számban kimutattak egyes gabonafélék embrióiban (gyöngyköles: Taylor és Vasil, 1995, 1996b; rizs: E10: Suzuki és mtsai, 1991; *Arundo formosana*: Jane, 1999). Sőt, elektronmikroszkóppal kimutatható, hogy kisméretű lipidtestek a búza petesejtjében és zigótáiban is jelen vannak (You és Jensen, 1985; Naumova és Matzk, 1998). A búza későbbi embriófejlődésére vonatkozóan viszont nem találtunk adatot, és nagy mennyiségű lipid jelenlétét Sudan Black B festéssel (Bronner, 1975) nem tudtunk kimutatni sem az embrióban, sem az endospermiumban. Mivel az általunk használt festési módszer megbízhatóságát bizonyítja, hogy a maghéjban felhalmozódó lipidek (Bradbury, 1956) erősen festődő rétegként láthatóvá váltak a metszeteinken (nem mutatott adatok), valószínűsíthető, hogy az embriófejlődés folyamán a lipidek nem szerepelnek energetikailag jelentős tartaléktápanyagként a búzában. A búza embriófejlődés későbbi stádiumaiban a lipidek jelenlétének ill. esetleges felhalmozódásának igazolására azonban további, elektronmikroszkópos vizsgálatok szükségesek.

A búza izolált zigóták tenyésztéséhez kapcsolódó legfontosabb tudományos eredményeink tehát, hogy e sejtek in vitro felnevelését teljesen új dajkákkal is megvalósítottuk: a búza izolált mikrospóra tenyészetekkel és a búza fiatal termőinek önálló alkalmazásával. A búza termő dajkák segítségével az izolált zigóták in vitro felnevelését lényegesen egyszerűbbé tettük. Kísérleteink során a világon másodikként valósítottuk meg az izolált búza zigóták sikeres in vitro felnevelését, és elsőként vizsgáltuk meg in vitro fejlődésüket cito- ill. hisztokémiai módszerekkel.

7. 3. Az egy-sejt tenyésztési rendszer szerepe távoli rokonfajokkal történő keresztezések megvalósításában

7. 3. 1. A búza × kukorica „zigóták” *in vitro* felnevelése

A búza × kukorica megporzást követően az aktivált petesejtek még izolálásukkor, 48 órával a megporzás után sem osztódtak (14a. ábra, 7. táblázat), tehát fejlődésük már a legkorábbi stádiumban elmaradt a búza × búza zigóták fejlődéséhez képest. A búza zigóták ugyanis a 24. órára már befejezik az első sejtosztódást (Batygina és Vasilyeva, 1969, 2001), akár *in vitro* körülmények között is (Kumlehn és mtsai, 1999; 6b. ábra). A búza × kukorica megporzásokat követő pollentömlőhajtás, majd a megtermékenyítés és az azt követő embriófejlődés azonban nagymértékben függ a növény genotípusától és környezetétől, különösen a fényintenzitástól és a hőmérséklettől (Campbell és mtsai, 1998, 2001). Bizonyos esetekben tehát az aktivált petesejtek 24-32 órával a kukoricával történő megporzás után osztódásnak indulnak (Laurie és Bennett, 1989), máskor azonban 24 óra még arra sem elegendő, hogy minden pollentömlő eljusson a csírakapuhoz (Wedzony és van Lammeren, 1996; Campbell és mtsai 2001). Így valószínű, hogy a búza × búza és a búza × kukorica „zigóták” *in vivo* fejlődésének kezdeti eltérése a növényfajták és környezet különbözőségével magyarázható.

Az *in vitro* tenyésztés eredményeként az izolált búza × kukorica „zigóták” egy része fejlődésnek indult, de az *in vitro* tenyésztés kezdetén nagyon sok sejt elpusztult. Ez feltehetően ugyanarra a tényezőre vezethető vissza, mint az MMS3 tápoldatban tenyésztett kontroll búza zigóták esetében: az izolálóoldatból az MMS3 tápoldatba helyezéskor fellépő ozmotikus stresszre. A fejlődésnek indult aktivált petesejtek első osztódásai a kontroll búza zigótákhoz képest szabálytalanabb proembriószerű struktúrákat eredményeztek. Ezek a struktúrák azonban a későbbiekben visszatértek a búza × búza embriók *in vivo* és *in vitro* fejlődésére emlékeztető útra, mire elérték a bunkó alakú embriók átmeneti fejlődési állapotát (14c-d. ábrák). Az aktivált petesejtek tenyésztése során az ilyen embriók szinte mindegyike az *in planta* embriókkal gyakorlatilag azonos módon fejlődött tovább, és egészséges, haploid növényeket eredményezett.

A tenyészetekben gyakran figyeltünk meg ikerembriókat, melyeknek az első osztódások eredményeként kifejlődő szabálytalanabb struktúrák lehettek a kiinduló pontjai. Jelenlegi tudásunk azonban nem elegendő annak megítélésére, hogy a megfigyelt szabálytalanabb struktúrákat megzavart polaritású zigotikus embrióknak vagy esetleg

szomatikus embriók kiindulási struktúráinak tekintsük-e. Figyelemre méltó, hogy Zhang és mtsai (1996) is gyakran tapasztalták ikerembriók fejlődését a búza × kukorica megporzást követően indított kalászkatenyészetekben. Kumlehn és mtsai (1998) is nagy számú ikerembriót kaptak a normál búza zigóták *in vitro* tenyésztése során. Ezek gyakorisága tovább nőtt a tápoldat 2,4-D koncentrációjának függvényében. A kontroll zigóták *in vitro* felnevelése során mi is megfigyeltünk ikerembriókat, de jóval kisebb gyakorisággal, ami esetleg az *in vitro* tenyésztéshez használt búzafajták különbségével magyarázható. Az ikerembriók annak a folyamatnak lehetnek az eredményei, hogy a „zigóta" kezdeti egy vagy néhány osztódása során még teljesen differenciálatlan, egyenrangú sejtek keletkeznek, melyek akár több új embrió kiindulását jelentik (Zhang és mtsai, 1996). Az ilyen struktúrák feltehetően a zigóták vagy aktivált petesejtek *in vitro* környezetben megfigyelhető szimmetrikus osztódásának eredményeként, ill. az embriófejlődés kezdetén jelenlévő 2,4-D hatására alakulnak ki. A búza × kukorica keresztezéseknél azért lehet gyakori az ikerembriók fejlődése, mert az embriófejlődés kezdetén 2,4-D-vel kezelik a termőket.

Kísérleteink során tehát nyomon követtük a búza × kukorica „zigóták" *in vitro* fejlődését, és megállapítottuk, hogy az nagymértékben hasonlít a búza × búza zigóták *in vitro* embriogén fejlődésére. Eredményeink rámutatnak, hogy (1) az endospermium *in vivo* funkciójának kiesése (Laurie és Bennett, 1988) dajkasejtek segítségével pótolható, és (2) a kromoszóma elimináció folyamatát nem befolyásolja az aktivált petesejtek *in vitro* tenyésztése.

A kukoricával megporzott búzanövényen a funkcióképes endospermium hiánya már nagyon korai stádiumban hátráltatja az embriók fejlődését, melyek a későbbiekben el is pusztulnak (Zenkteler, 1980; Schel és Kieft, 1986; Laurie és Bennett, 1988; Wedzony és van Lammeren, 1996). Mindezt jól szemlélteti, hogy Wedzony és van Lammeren (1996) 2 nappal a megporzás után még a termők 69 %-ában találtak proembriót vagy osztódó „zigótát", míg 14 napos korukban már csak a termők 14 %-a tartalmazott életképes embriót. A kétnapos korú aktivált petesejtek kimentése tehát nagyon előnyös lehet, amennyiben egy hatékony, megfelelően kidolgozott tenyésztési módszer rendelkezésre áll. Kísérleteink során a tenyésztés kezdetén az MMS3 tápoldatba helyezéskor nagyon sok aktivált petesejtet elvesztettünk az ozmotikus sokk következtében, de ennek ellenére az általunk végzett „zigótamentés" és az azt követő egy-sejt tenyésztés hatékonysága elérte a klasszikus embriómentési technikáét (5. táblázat; Zhang és mtsai, 1996; Sharma és mtsai, 2002). Az N6Z

tápoldat segítségével tovább tökéletesített egy-sejt tenyésztési rendszerben (2. táblázat, pirossal szedett oszlop) a „zigótamentés” hatékonysága várhatóan tovább növelhető.

7. 3. 2. Egy teljesen új, a búza × rizs fajok közötti keresztezés megvalósítása az egy-sejt tenyésztési rendszer segítségével

A *Pooideae* alcsaládba tartozó búza anya- és az *Oryzoideae* alcsaládba tartozó rizs apaszülők közötti keresztezés sikeres végrehajtása egyedülálló eredmény. Bár a fordított irányú, rizs × búza keresztezés megtörtént (Chen és Zhang, 1980), tudomásunk szerint rizzsel még eredményesen nem poroztak be búzát, vagy a búzának közeli rokonfaját. Ismeretes a rizs és a búzához hasonlóan a *Pooideae* alcsaládba tartozó árpa protoplaszt fúzióval (Powers és mtsai, 1976) előállított szomatikus hibridje is (Kisaka és mtsai, 1998). A búza és a rizs szomatikus hibridjeiről azonban nem lelhető fel szakirodalmi adat.

A rizs közelebbi rokona a búzának, mint a kukorica (Kellogg, 2001), mégis, tapasztalataink és a szakirodalomban található közlemények száma szerint a közöttük lévő inkompatibilitás nagyobb. Bár általában az inkompatibilitás növekszik a fajok rokonsági távolságának növekedésével, ennek ellentéte sem rendkívüli (Sharma, 1995). Erre egyik legjobb példa, hogy a búza Kr génjei meggátolják az egészen közeli rokon nemzetségek fajaival történő keresztezést (Snape és mtsai, 1979), de nem befolyásolják a kukoricával történő keresztezés sikerességét (Laurie és mtsai, 1990).

A rizs pollenjei képesek a búza bibepapilláin kicsírázni, tehát e két faj között a sporofitikus inkompatibilitás nem teljes. Erősségét jelzi azonban, hogy a kicsírázó pollenek aránya alacsonyabb, mint a búza × kukorica esetében, és hogy e pollentömlők növekedése nagyon lassú és gyakran abnormális (3a-d. ábrák). Végeredményben a búza és a rizs közötti inkompatibilitás olyan erős, hogy a megporzásokat követő 14. napon már csak a termők elenyésző hányadában fordultak elő embriók, melyek igen fejletlenek voltak, és az embriómentési módszerrel nem lehetett őket felnevelni (6. táblázat). Bár a sporofitikus, ill. megtermékenyítés előtti inkompatibilitásról nincs további információnk és a megtermékenyítés sem bizonyított, a gametofitikus inkompatibilitásról elmondható, hogy az feltehetően nem merül ki az endospermium rendellenes fejlődésében, mint a búza × kukorica keresztezések esetén. Ezt alátámasztó megfigyelések, hogy (1) az egysejtes állapotban kimentett aktivált petesejtek egy része megnyúlt az osztódást megelőzően és az organellumok elrendeződése nagyon különösen alakult, (2) az általunk kimentett „zigóták” esetében az első sejtosztódás befejezéséhez aránytalanul hosszú időre, 7-9 napra volt szükség, (3) igen kicsi

volt a ténylegesen osztódni képes aktivált petesejtek gyakorisága, és (4) az érett embrió méretét elérő struktúrák csak nagyon lassan hajtottak ki (16. ábra, 6. és 7. táblázatok). Ezek a tényezők mind erősen különböztek a kontroll búza vagy a búza × kukorica „zigóták" *in vitro* fejlődésétől. Mindemellett a búza × kukorica keresztezésekhez hasonlóan az endospermium funkciójának hiánya is fontos imkompatibilitási tényező lehet. Erre utal, hogy, ellentétben az anyai környezettel, ahol csak igen kis számú embrió igen lassú fejlődésre volt képes, a tenyészetekben sikeresen osztódott aktivált petesejtek növekedési intenzitása már hasonló volt a kontroll zigóták *in vivo* vagy *in vitro*, ill. a búza × kukorica „zigóták" *in vitro* fejlődési üteméhez. Az inkompatibilitás természetének mélyebb megismeréséhez azonban mindkét távoli keresztezés esetén kiterjedt citológiai, biokémiai és molekuláris biológiai vizsgálatokra van szükség. Ilyen vizsgálatok egyelőre csak a búza × kukorica keresztezések esetén, citológiai szinten történtek (Laurie és Bennett, 1989, 1990; Wedzony és van Lammeren, 1996; Zhang és mtsai, 1996; Campbell és mtsai, 2001; Mochida és mtsai, 2004). Molekuláris biológiai szinten pedig még csak a normál búza vagy kukorica embriózsák-sejteket, valamint a belőlük fejlődő embriókat és endospermiumokat (Drea és mtsai, 2005; Le és mtsai, 2005; Okamoto és mtsai, 2004, 2005; Sprunck és mtsai, 2005; Yang és mtsai, 2006), ill. a Salmon búza parthenogén petesejtjeit (Kumlehn és mtsai, 2001) vizsgálták.

Az embriómentéssel ellentétben, a „zigótamentésen" alapuló technika eredményességét mutatja, hogy a sikeresen osztódott aktivált petesejteknek már jelentős része továbbfejlődött az *in vitro* közegben, így az utóbbi módszerrel már lehetséges volt néhány búza × rizs növény felnevelése, többféle genotípus kombináció esetén is. Az egy-sejt tenyésztési rendszer segítségével azt is biztosítani lehetett, hogy az első osztódás befejezésére képes búza × rizs aktivált petesejtek jelentős része a búza zigóták *in vitro* embriógenezisével gyakorlatilag azonos módon fejlődjenek. Ezekből a tapasztalatokból kiindulva feltételezhetjük, hogy a zigóták kimentése és az általunk adaptált egy-sejt tenyésztési módszer továbbfejlesztett változatának alkalmazása már a kukoricánál is előnyösebb lesz, mint a klasszikus embriómentés. Campbell és mtsai (2001) megfigyelése, mely szerint a kukorica pollentömlő-hajtása sikeresebb a búzán, ha a búzát erős fényre helyezik, segítségünkre lehet a búza × rizs keresztezések eredményességének növelésében is. Az erős fényen (az általunk és általában alkalmazható 230-400 μmol m^{-2} s^{-1}-mal szemben 700 μmol m^{-2} s^{-1}) jelentősen nőtt a növény fotoszintézis rátája, és úgy tűnt, hogy ez segítette a pollentömlők növekedését, és ezáltal a megtermékenyítés gyakoriságát.

7. 3. 2. 1. A búza × rizs növények tulajdonságai

Felvetődhet esetleg annak a lehetősége, hogy az ismertetett csekély számú növény nem a búza × rizs megporzások, hanem kasztrálási hiba miatt fellépő önbeporzás eredményeként fejlődött ki. Ez azonban az említett megfigyelések közül az alábbiak alapján teljes mértékben kizárható: 1. A búza × rizs megporzásokat követően nem volt olyan kimentett sejt, ami a kontroll búza zigótákhoz hasonlóan viselkedett; az első sejtosztódás befejezéséig rendkívül hosszú idő, 7-9 nap telt el, míg az *in vitro* fejlődő kontroll zigóták még a legrosszabb esetben is befejezik az első osztódást 48 órán belül (6. és 15. ábrák, 7. táblázat). 2. A négy növényből három a haploid búzához közeli DNS-tartalmú hajtással is rendelkezett, melyek önporzással terméketlenek voltak.

Az általunk végzett kísérletekben tehát biztosra vehető, hogy a búza petesejtjei a rizs hatására aktiválódtak és fejlődtek növénnyé. Egyelőre azonban még csak flow citometriás vizsgálatot végeztünk, mellyel a búza mellett nem lehet kimutatni a nagyjából egy búza kromoszómának megfelelő nagyságú teljes rizsgenomot sem (Arumuganathan és Earle, 1991). E vizsgálat figyelemre méltó eredménye, hogy a búza fenotípusát mutató utódnövények DNS-tartalma növényenként eltérő volt: a haploid vagy a diploid búza DNS-tartalmához állt közel. A növények termékenysége összefüggést mutatott a DNS-tartalommal abban az értelemben, hogy a diploidhoz közeli DNS-tartalmú 21A jelű növény teljesen termékeny volt, míg haploidhoz közeli DNS-tartalmú 21C és 21D növények csak idegenporzással érleltek csekély számú szemet. A 21B növény kalászfüggő fertilitása arra utal, hogy bár egyetlen hajtását mérve a növény haploidhoz közeli DNS-tartalmúnak tűnt, de valójában kiméra lehetett. Valószínű, hogy a 21A növény búza kromoszómái spontán reduplikálódtak, és feltételezhetően ugyanez történt a 21B növény egy vagy több sejtvonalában is.

Az említett spontán endoreduplikáció más fajkombinációjú keresztezéseknél is előfordul. Így pl. a *Triticum turgidum ssp. durum* × *Aegilops tauschii* keresztezés amfiploid növényt eredményez, ami azonban meglehetősen termékeny, és amfidiploid szemeket érlel. Az amfidiploid kromoszómaszerelvény nemzedékeken keresztül stabil, és gyakorlatilag a búza hexaploid genomjának felel meg (Matsuoka és Nasuda, 2004). Az ismert keresztezések közül azonban azok (búza × hagymás árpa (*Hordeum bulbosum* L.), árpa × hagymás árpa, búza × gyöngyköles (*Pennisetum glaucum*, L.), búza × cirok (*Sorghum bicolor*, L.), búza × alangfű (*Imperata cylindrica* L.), búza × *Tripsacum dactyloides*, L., búza × kukorica), amelyeknél az apai faj genomja teljesen eliminálódik, haploid utódot eredményeznek

(Sharma, 1995; Chaudhary és mtsai, 2005). Ezek közül gyakorlatilag csak a búza × kukorica keresztezések esetén tudunk spontán endoreduplikáció megtörténéséről, de itt is csak elenyésző gyakorisággal (1:500, Kumlehn és mtsai, 2001). A szövettenyésztés, ill. a hosszan tartó kalluszfázis azonban jóval nagyobb gyakorisággal okozhat endoreduplikációt (Doré és mtsai, 1988). Ezzel összhangban van, hogy a Salmon búzának az egy-sejt tenyészetben *in vitro* fejlődő parthenogén petesejtje is megkettőzött génállományú növényt eredményezett (Kumlehn és mtsai, 2001). Így elképzelhető, hogy a szövettenyésztés miatt kaptunk diploid búzáéhoz közeli DNS-tartalmú búza × rizs utódot is.

Az idegenfajú keresztezések esetén a fajkombinációtól függően igen sokféleképpen alakulhat az utódok genomi összetétele (Sharma, 1995; Friebe és mtsai, 1996). Az ilyen keresztezések gyakori sajátossága az apai genom eliminációja (Laurie és Bennett, 1989, 1990; Gernand és mtsai, 2005), azonban ez még a különböző alcsaládba tartozó, egészen távoli rokonfajok esetén sem mindig azonnali vagy teljes, így nem lehet kizárni az anyaként szereplő faj genomjában esetlegesen megtörténő változásokat (búza × kukorica: Comeau és mtsai, 1988; rizs × búza: Ahokas, 1994; zab (*Avena sativa*, L.) × kukorica: Riera-Lizarazu és mtsai, 1996; búza × gyöngyköles: Gernand és mtsai, 2005). A búza × rizs utódnövényekben egyelőre még nem ismerjük a rizs genomjának sorsát, tehát még nincs válasz arra, hogy a búza × rizs megporzással lehetőség van-e kromoszómarészletek (gének) átvitelére a rizsből a búzába, vagy pedig haploid ill. DH búzanövényeket kapunk. Ennek kiderítésére további citogenetikai vizsgálatokra van szükség.

Amennyiben e keresztezések során megtörténhet génátvitel a rizsből a búzába, lehetőség nyílna a belvíz miatti elárasztást elviselő búza előállítására. A rizs ugyanis a folyamatosan elárasztott területeken él, így gyökérzete jól tűri a hipoxiát, azaz a talaj gyenge oxigénellátottságát, vagy a gyakorlatilag teljesen oxigénmentes környezetet, az anoxiát (Das és Uchimiya, 2002). A legújabb kísérletek számos, az anoxia által indukált gént felderítettek a rizsben (Agarwal és Grover, 2005), melyek közül a megfelelőknek a búzába vitelével elérhető lenne a kívánt eredmény. A cél érdekében a génátvitel valószínűségét az elkalluszosított hajtáscsúcsok *in vitro* tenyésztésével (Larkin és Scowcroft, 1981), esetleg a még feltehetően hibrid proembriók besugárzásával (Sears, 1956) lehet növelni.

Összességében tehát elmondható, hogy az egy-sejt tenyésztési rendszerben nemcsak a fajazonos megtermékenyítéssel nyert búza zigóták, hanem az idegenfajú megporzással aktivált petesejtek is felnevelhetők, és nyomon követhető in vitro fejlődésük. Ellentétben a klasszikus embriómentési technikával, az egy-sejt tenyésztési rendszer lehetőséget adott arra, hogy a

búza × rizs megporzás eredményeként elsőként neveljünk fel növényeket. Mindezek a tapasztalatok alapján további kutatásra érdemes, hogy az aktivált petesejtek kimentését követő in vitro tenyésztéssel további keresztezések is megvalósíthatók-e.

8. Az elért tudományos eredmények összefoglalása

Jelen munkában a búza gametofitikus sejtjeiből embriók *in vitro* fejlődését lehetővé tevő sejttenyésztési technikákat honosítottunk meg. E tenyészeteket a búza zigóták *in vitro* fejlődésének sejttani vizsgálatára és idegenfajú megporzásokkal aktivált petesejtek felnevelésére használtuk fel. Eredményeink az alábbiakban foglalhatók össze:

1) Az *in vivo* megtermékenyített búza zigóták *in vitro* felnevelését a búza izolált mikrospóra tenyészeteivel, és a búza fiatal termőivel is megvalósítottuk. A könnyen tenyészthető búza termők segítségével jelentősen egyszerűsítettük az egy-sejt tenyésztési módszert és az izolált zigóták 59 %-át növénnyé neveltük.

2) A zigóták *in vitro* és *in planta* fejlődésének összehasonlítása során megállapítottuk, hogy a tenyészetekben megvalósul az embriógenezis programja és az *in vitro* fejlődő embriók merisztémája nem kalluszosodik el, hanem folyamatosan jelen van. Lényeges különbség azonban az *in planta* embriófejlődéshez képest, hogy a tenyészetekben az embriók a merisztematikus sejttípusok mellett kallusz ill. endospermium jellegű sejteket is tartalmaznak.

3) A búza × kukorica megporzással aktivált petesejteket az egy-sejt tenyészetek segítségével haploid növényekké neveltük. Az aktivált petesejtek kimentésének hatékonysága hasonló volt a klasszikus embriómentésen alapuló technikáéval.

4) Az egy-sejt tenyésztési rendszer lehetővé tette, hogy elsőként neveljünk fel növényeket a búza × rizs megporzás eredményeképpen.

9. Irodalomjegyzék

Agache, S., Bachelier, B., de Buyser, J., Henry, Y. és Snape, J. (1989) Genetic analysis of anther culture response in wheat using aneuploid, chromosome substitution and translocation lines. Theoretical and Applied Genetics 77: 7-11.

Agarwal, S. és Grover, A. (2005) Isolation and transcription profiling of low O_2 stress-associated cDNA clones from the flooding-stress-tolerant FR13A rice genotype. Annals of Botany 96: 831-844.

Ahokas, H. (1994) Searching for DNA introgressed from wheat and for wheat-like grain proteins in a rice × wheat hybridization derivative. Euphytica 72: 177-182.

Ambrus H, Darkó, É., Barnabás, B. és Király, Z. (2005) Effects of ROS progenitors on the sporophytic development of maize microspores. Acta Biologica Szegediensis 49: 25-28.

Ambrus, H., Darkó, É., Szabó, L., Bakos, F., Király, Z. és Barnabás, B. (2006) *In vitro* microspore selection in maize anther culture with oxidative-stress stimulators. Protoplasma, 228: 87-94.

Amici, G. B. (1824) Observations microscopiques sur diverses espéces de plantes. Ann. des Sci. Nat., Bot. 2: 41-70, 211-248.

Arumuganathan, K. és Earle, E. D. (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. Plant Molecular Biology Reporter 9: 208–218.

Ascough, G., Bakos F., Balázs, E., Barnabás, B. és van Staden, J. (2006) Screening South African wheat germplasm for androgenic competence. South African Journal of Botany 72: 40-45.

Asker, S. E., és Jerling, L. (1992). Apomixis in Plants. Boca Raton: CRC Press, Florida.

Aubert, D., Chevillard, M., Dorne, A. M., Arlaud, G. és Herzog, M. (1998) Expression patterns of *GASA* genes in *Arabidopsis thaliana*: the *GASA4* gene is up-regulated by gibberellins in meristematic regions. Plant Molecular Biology 36: 871-883.

Bajaj, Y., P., S. (ed) (1995) Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed (Biotechnology in Agriculture and Forestry). Springer, Berlin, Heidelberg.

Bakos, F., Darkó, É., Pónya, Z. és Barnabás, B. (2003a) Regeneration of fertile wheat (*Triticum aestivum* L.) plants from isolated zygotes using wheat microspore culture as nurse cells. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 74: 243-247.

Bakos, F., Darkó, É., Pónya, Z. és Barnabás, B. (2003b) Application of wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture and ovaries to raise wheat zygotes *in vitro*. Acta Biologica Cracoviensis Series Botanica 45: 107-110.

Bakos, F., Jäger, K. és Barnabás, B. (2005) Regeneration of haploid plants after distant pollination of wheat via zygote rescue. Acta Biologica Cracoviensis Series Botanica 47: 167-171.

Bao, F., Shen, J., Brady, S. R., Muday, G. K., Asami, T. és Yang, Z. (2004) Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in *Arabidopsis*. Plant Physiology 134: 1624-1631.

Barabás, Z., Pauk, J., Purnhauser, L., Sági, F. és Kertész, Z. (1990) Tissue culture in cereal breeding. Napjaink Biotechnologiája 25: 25-32.

Bárány, I., Testillano, P. S., Mitykó, J. és Risueno, M. C. (2001) The switch of the microspore program in *Capsicum* involves HSP70 expression and leads to the production of haploid plants. International Journal of Developmental Biology 45: 39-40.

Barnabás, B., Kovács, G., Hegedűs, A., Erdei, S. és Horváth, G. (2000) Regeneration of doubled haploid plants from *in vitro* selected microspores to improve aluminium tolerance in wheat. Journal of Plant Physiology 156: 217-222.

Barnabás, B., Obert, B. és Kovács, G. (1999) Colchicine, an efficient genome-doubling agent for maize (*Zea mays* L.) microspores cultured in anthero. Plant Cell Reports 18: 858-862.

Barnabás, B., Pfahler, P. L. és Kovács, G. (1991) Direct effect of colchicine on the microspore embryogenesis to produce dihaploid plants in wheat (*Triticum-aestivum* L.). Theoretical and Applied Genetics 81: 675-678.

Barnabás, B., Pónya, Z., Bakos, F., Tímár, I., Darkó, É., Takács, I. és Szakács, É. (2002) Plant gametes as tools for molecular breeding. Acta Agronomica Hungarica 50: 295-301.

Barnabás, B., Pónya, Z., Szakács, E., Tímár, I., Obert, B. és Pretova, A. (2001a) Title: Biotechnology and micromanipulation of sexual processes in flowering plants. Biologia 56: 7-12.

Barnabás, B., Szakács, É., Karsai, I. és Bedő, Z. (2001b) *In vitro* androgenesis of wheat: from fundamentals to practical application. Euphytica 119: 211-216.

Batygina, T. B. (1969) On the possibility of separation of a new type of embryogenesis in angiosperms. Rev. Cytol. Biol. Végét. 32: 335-341.

Batygina, T. B. és Vasilyeva, V. E. (2001) *In vivo* fertilization. In: Bhojwani, S. S. és Soh, W. Y. (ed.) Current Trends in the Embryology of Angiosperms, pp. 101-142. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Baudino, S., Hansen, H., Brettschneider, R., Hecht, V. F. G., Dresselhaus, T., Lörz, H., Dumas, C. és Rogowsky, P. M. (2001) Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the *SERK* gene family. Planta 213: 1-10.

Bechtel, D. B., Gaines, R. L. és Pomeranz, Y. (1982) Early stages of wheat endosperm formation and protein body initiation. Annals of Botany 50: 507-518.

Bedő, Z., Karsai, I., Balla, L. és Barnabás, B. (1988) Some possibilities of efficient haploid production in wheat. pp. 1043-1046. In: Miller, T. E. és Koebner, R. M. D. (ed) Proceedings of the 7th International Wheat Genetics Symposium, Cambridge, 13-19 July, 1988.

Bedő, Z., Karsai, I., Juhász, A., Szűcs, P., Mészáros, K., Hayes P. M. és Láng, L. (1999) Contribution of biotechnological methods to the cereal breeding. Journal of Plant Biotechnology 1: 39-45.

Belanger, K. D. és Quatrano, R. S. (2000) Polarity: the role of localized secretion. Current Opinions in Plant Biology 3: 67-72.

Bennett, M. D., Rao, M. K., Smith, J. B. és Bayliss, M. W. (1973) Cell development in the anther, the ovule, and the young seed of *Triticum aestivum* L. var. Chinese Spring. Philosophical Transaction of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 226: 39-81.

Bentsink, L. és Koornneef, M. (2002) Seed dormancy and germination. In: Somerville C. R., Meyerowitz E. M. (eds) The Arabidopsis book. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi/10.119996/tab.0050, http: //www.aspb.org/publications/arabidopsis/

Berzonsky, W. A., Kleven, S. L. és Leach, G. D. (2003) The effects of parthenogenesis on wheat embryo formation and haploid production with and without maize pollination. Euphytica 133: 285-290.

Bicknell, R. A. és Koltunow, A. M. (2004) Understanding Apomixis: Recent Advances and Remaining Conundrums. Plant Cell 16: S228-S245.

Bolik, M. és Koop, H. U. (1991) Identification of embryogenic microspores of barley (*Hordeum vulgare* L.) by individual selection and culture and their potential for transformation by microinjection. Protoplasma 162: 61-68.

Bonet, F. J., Azbaid, L. és Olmedilla, A. (1998) Pollen embryogenesis: Atavism or totipotency? Protoplasma 202: 115-121.

Bordeires, G., le Béchec, M., Rossignol, M., Lafitte, C., Le Deunff, E., Beckert, M., Dumas, C. és Matthys-Rochon, E. (2004) Characterization of proteins secreted during maize microspore culture: arabinogalactan proteins (AGPs) stimulate embryo development. European Journal of Cell Biology 83: 205-212.

Bosnes, M., Weidemann, F., és Olsen, O.-A. (1992) Endosperm differentiation in barley wild-type and sex mutants. Plant Journal 2: 661-674.

Bouget, F.-Y., Gerttula, S., Shaw, S. L. és Quatrano, R. S. (1996) Localization of actin mRNA during the establishment of cell polarity and early cell divisions in *Fucus* embryos. Plant Cell 8: 189-201.

Boutilier, K., Offringa, R., Sharma, V. K., Kieft, H., Ouellet, T., Zhang, L., Hattori, J., Liu, C.-M., van Lammeren, A. A. M., Miki, B. L. A., Custers, J. B. M. és van Lookeren Campagne, M. M. (2002) Ectopic expression of *BABY BOOM* triggers a conversion from vegetative to embryogenic growth. The Plant Cell 14: 1737-1749.

Bozhkov, P. V., Filonova, L. H., Suarez, M. F., Helmersson, A., Smertenko, A. P., Zhivotovsky, von Arnold, S. (2004) VEIDase is a principal caspase-like activity involved in plant programmed cell death and essential for embryonic pattern formation. Cell Death and Differentiation 11: 175-182.

Bradbury, D. (1956) Structure of the mature wheat kernel. 2. Microscopic structure of pericarp, seed coat, and other coverings of the endosperm and germ of hard red winter wheat. Cereal Chem. 33: 342-360.

Brar, D. S. és Khush, G. S. (1997) Alien introgression in rice. Plant Molecular Biology 35: 35-47.

Bronner, R. 1975. Simultaneous demonstration of lipids and starch in plant tissues. Stain Technol. 50: 1-4.

Bruins, M. B. M., RakoczyTrojanowska, M. és Snijders, C. H. A. (1996) Isolated microspore culture in wheat (*Triticum aestivum* L): The effect of co-culture of wheat or barley ovaries on embryogenesis. Cereal Research Communications 24: 401-408.

Buhot, N., Douliez, J. P., Jacquemard, A., Marion, D., Tran, V., Maume, B. F., Milat, M. L., Ponchet, M., Mikes, V., Kader, J. C. és Blein, J. P. (2001) A lipid transfer protein binds to a receptor involved in the control of plant defence responses. FEBS Letters 509: 27-30.

Burgess, J. (1985) An introduction to plant cell development. Cambridge University Press. Cambridge, pp. 129-153.

Cai, X., Chen, P. D., Xu, S. S., Oliver, R. E. és Chen, X. (2005) Utilization of alien genes to enhance Fusarium head blight resistance in wheat - A review. Euphytica 142: 309-318.

Camerarius, R. J. (1694). „De sexu plantarum epistola." Tübingen.

Campbell, A. W., Griffin, W. B., Burrit, D. J. és Conner, A. J. (2001) The importance of ligth intensity for pollen tube growth and embryo survival in wheat × maize crosses. Annals of Botany 87: 517-522.

Caredda, S., Devaux, P. Sangwan, R. S., Proult, I. és Clement, C. (2004) Plastid ultrastructure and DNA related to albinism in androgenetic embryos of various barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 76: 35-43.

Caredda, S., Doncoeur, C., Devaux, P., Sangwan, R. S. és Clement, C. (2000) Plastid differentiation during androgenesis in albino and non-albino producing cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). Sexual Plant Reproduction 13: 95-104.

Carman, J. G. (1995) Nutrient absorption and the developmentand genetic stability of cultured meristems. In: Terzi, M., Cella, R. és Falavigna, A. (ed) Current issues in plant molecular and cellular biology, pp. 393-403. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers;

Carman, J. G., Bishop, D. L. és Hess, J. R. (1996) Carbohydrates, minerals and free amino acids in *Triticum aestivum* L. kernels during early embryony. Journal of Plant Physiology 149: 714-720.

Carman, J. G. és Bishop, D. L. (2004) Diurnal O_2 and carbohydrate levels in wheat kernels during embryony Journal of Plant Physiology 161: 1003-1010.

Carmichael, J. S. és Friedmann, W. E. (1995) Double fertilization in *Gnetum gnemon*: the relationship between the cell cycle and sexual reproduction. Plant Cell 7: 1975-1988.

Casacuberta, J. M., Puigdomenech, P. és San Segundo, B. (1991) A gene coding for a basic pathogenesis-related (*PR-like*) protein from *Zea mays*. Molecular cloning and induction by a fungus (*Fusarium moniliforme*) in germinating maize seeds. Plant Molecular Biology 16: 527-536.

Casmitjana-Martinez, E., Hofhuis, H. F., Xu, J., Liu, C.-M., Heidstra, R. és Scheres, B. (2003) Root-specific *CLE19* overexpression and the *sol1/2* suppressors implicate a CLV-like pathway in the control of Arabidopsis root meristem maintenance. Current Biology 13: 1435-1441.

Castillo, A. M., Valles, M. P. és Cistue, L. (2000) Comparison of anther and isolated microspore cultures in barley. Effects of culture density and regeneration medium. Euphytica 113: 1-8.

Caumont, C., Petitprez, M., Woynaroski, S., Barthou, H., Brière, C., Kallerhof, J., Borin, C., Souvré, A. és Alibert, G. (1997) Agarose embedding affects cell wall regeneration and microtubule organization in sunflower hypocotyl protoplasts. Physiologia Plantarum 99: 129-134.

Cawood, A. H., Potter, U. és Dickinson, H. G. (1978) An evaluation of Coomassie blue as a stain for quantitative microdensitometry of protein in section. Journal of Histochemistry and Biochemistry 26: 645-650.

Chaudhary, H. K., Sethi, G. S., Singh, S., Pratap, A. és Sharma, S. (2005) Efficient haploid induction in wheat by using pollen of *Imperata cylindrica*. Plant Breeding 124: 96-98.

Chen, C. C., Howarth, M. J., Peterson, R. N. és Kasha, K. J. (1984) Ultrastructure of androgenic microspores of barley during early stages of anther culture. Canadian Journal of Genetics and Cytology 26: 484-491.

Chen, J. és Zhang, Y. (1980) The breeding and utilization of naked seed rice. Acta Genetica Sinica 7: 185-188.

Cistué, L., Vallés, M. P., Echavarri, B., Sanz, J. M. és Castillo, A. M. (2003) Barley anther culture. In: Maluszynski, M., Kasha, K. J., Forster, B. P. és Szarejko, I. (ed) Doubled Haploid Production in Crop Plants. A Manual, pp. 29-34. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.

Clarc, J. K. (1996) Maize embryogenesis mutans In: Wang, T. L., Cuming, A. (eds) Embryogenesis. The generation of plant. pp 89-112. Bios Oxford

Colombo, L., Franken, J., van der Kroll, A. R., Wittich, P. E., Dons, H. J. M. és Angenent, G. C. (1997) Downregulation of ovule specific *MADS* box genes from Petunia results in maternally controlled defects in seed development. Plant Cell 9: 703-715.

Comeau, A., Plourde, A., St-Pierre, C. A. és Nadeau, P. (1988) Production of doubled haploid wheat lines by wheat × maize hybridization. Genome 30(S1): 482.

Cordts, S., Bantin, J., Wittich, P. E., Kranz, E., Lörz, H. és Dresselhaus, T. (2001) ZmES genes encode peptides with structural homology to defensins and are specifically expressed in the female gametophyte of maize. Plant Journal 25: 103-114.

Corellou, F., Brownlee, C., Kloareg, B. és Bouget, F.-Y. (2001) Cell cycle-dependent control of polarized development by a cyclindependent protein kinase in the *Fucus* zygote. Development 128: 4383-4392.

Darkó, E., Ambrus, H., Stefanovits-Bányai, E., Fodor, J., Bakos, F. és Barnabás, B. (2004) Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerant lines developed by *in vitro* microspore selection. Plant Science 166: 583-591.

Darkó, É., Bakos, F., Szakacs, É., Dulai, S. és Barnabás, B. (2002a) Long-term phytotoxic effects of alumunium on Al-susceptible and Al-tolerant genotypes of wheat selected from microspores. Acta Biologica Szegediensis 46: 87-88.

Darkó, É., Barnabás, B. és Király, Z. (2002b) Kukorica stressztűrő képességének növelése biotechnológiai módszerekkel. In: 50 éves az Acta Agronomica Hungarica. A növénytermesztés szerepe a jövő multifunkcionális mezőgazdaságában. Bedő, Z., Sutka, J. és Veisz, O. (ed). pp. 93-98. Akadémiai Kiadó, Budapest.

Darkó, É., Stafanovits-Bányai, É., Ambrus, H., Bakos, F. és Barnabás, B. (2003) Az aluminium fitotoxikus hatása a búza növekedésére és ásványi anyag összetételére Al-szenzitív és mikrospórákból *in vitro* szelekcióval előállított Al-toleráns vonalakban. In: Galbács, Z. (ed) Proceedings of The 10th Symposium on analitical and environmental problems, pp. 160-164. Szeged, 29 September 2003. ISBN 9632128672

Das, A. és Uchimiya, H. (2002) Oxygen stress and adaptation of a semi-aquatic plant: rice (*Oryza sativa*). Journal of Plant Research 115: 315-320.

Datta, R., Chamusco, K. C. és Chourey, P. S. (2002) Starch biosynthesis during pollen maturation is associated with altered patterns of gene expression in maize. Plant Physiology 130: 1645-1656.

DeBuyser, J., Henry, Y., Lonnet, P., Hertzog, R. és Hespel, A. (1987) Florin - a doubled haploid wheat variety developed by the anther culture method. Plant Breeding 98: 53-56.

Doré, C., Cauderon, Y. és Chueca, M. C. (1988) Inflorescence culture of *Triticum aestivum* × *Secale cereale* hybrids: production, characterization and cytogenetic analysis of regenerated plants. Genome 30: 511-518.

Drea, S., Leader, D. J., Arnold, B. C., Shaw, P., Dolan, L. és Doonan, J. H. (2005) Systematic spatial analysis of gene expression during caryopsis development. Plant Cell 17: 2172-2185.

Dubois, T., Guedira, M., Dubois, J. és Vasseur, J. (1991) Direct somatic embryogenesis in leaves of *Cichorium*. A histological and SEM study of early stages. Protoplasma 162: 120-127.

Dyachock, J. V., Wiweger, M., Kenne, L. és von Arnold, S. (2002) Endogenous Nod-factor-like signal molecules promote early somatic embryo development in Norway spruce. Plant Physiology 128: 523-533.

Emons, A. M. C. és Kieft, H. (1991) Histological comparison of single somatic embryos of maize from suspension cultures with somatic embryos attached to callus cells. Plant Cell Reports 10: 485-488.

Engell, K. (1988) Embryology of barley. II. Synergid, egg cell, zygote and embryo development. In: Cresti, M., Gori, P. és Pacini, E. (ed). Sexual reproduction in higher plants. pp. 383-388. Springer, Berlin.

Engell, K. (1989) Embryology of barley: time course and analysis of controlled fertilization and early embryo formation based on serial sections. Nordic Journal of Botany 9: 265-280.

Faure, J. E., Mogensen, H. L., Dumas, C., Lörz, H. és Kranz, E. (1993) Karyogamy after electrofusion of single egg and sperm cell protoplasts from maize: cytological evidence and time course. Plant Cell 5: 747-755.

Fehér, A., Pasternak, T. P. és Dudits, D. (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 74: 201-228.

Fiers, M., Hause, G., Boutilier, K., Casamitjana-Martinez, E., Weijers, D., Offringa, R., van der Geest, L., van Lookeren Campagne, M. és Liu, C.-M. (2004) Mis-expression of the *CLV/ESR*-like gene *CLE19* in *Arabidopsis* leads to a consumption of root meristem. Gene 327: 37-49.

Fransz, P. F. és Schel, J. H. N. (1991) An ultrastructural study on the early development of *Zea mays* somatic embryos. Canadian Journal of Botany 69: 858-865.

Friebe, B., Jiang, J., Raupp, W. J., McIntosh, R. A. és Gill, B. S. (1996) Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to deseases and pests: current status. Euphytica 91: 59-87.

Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwartz, H., Hamann, T., Offringa, R. és Jürgens, G. (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. Nature 426: 147-153.

Frova, C. (1990) Analysis of gene expression in microspores, pollen, and silks of *Zea mays* L. Sexual Plant Reproduction 3: 200-206.

Fu, X. és Harberd, N. P. (2003) Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. Nature 421: 740-743.

Gaillard, A., Vergne, P. és Beckert, M. (1991) Optimization of maize microspore isolation and culture conditions for reliable plant regeneration. Plant Cell Reports 10: 55-58.

Galbraith, D. W. és Schultz, J. (1983) Rapid flow cytometric analysis of nuclear DNA levels in higher plants. In: Downey, K., Voellmy, R. W. és Ahmad, F. (ed) Advances in Gene Technology: Molecular Genetics of Plants and Animals. p. 552. Academic Press, New York, USA.

Gamborg, O. L., Miller, R. A. és Ojima, K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research 50: 151-158.

Garcia-llamas, C., Martin, A. és Ballesteros, J. (2004) Differences among auxin treatments on haploid production in durum wheat × maize crosses. Plant Cell reports 23: 46-49.

Gernand, D., Rutten, T., Varshney, A., Rubtsova, M., Prodanovic, S., Bruss, C., Kumlehn, J., Matzk, F. és Houben, A. (2005) Uniparental chromosome elimination at mitosis and interphase in wheat and pearl millet crosses involves micronucleus formation, progressive heterochromatinization, and DNA fragmentation. Plant Cell 17: 2431-2438.

Gómez, E., Royo, J., Guo, Y., Thompson, R. és Hueros, G. (2002) Establishment of central endosperm expression domains: identification and properties of a maize transfer-cell-specific transcription factor, *ZMRP-1*. Plant Cell 14: 599-610.

González-Melendi, P., Ramírez, C., Testillano, P. S., Kumlehn, J. és Risueño, M. C. (2005) Three dimensional confocal and electron microscopy imaging define the dynamics and mechanisms of diploidisation at early stages of barley microspore-derived embryogenesis. Planta 222: 47-57.

Gorbunova, V. Y., Kruglova, N. N. és Abramov, S. N. (2001) The induction of androgenesis *in vitro* in spring soft wheat. Balance of exogenous and endogenous phytohormones. Biology Bulletin 28: 25-30.

Griesbach, R. J. (1987) Chromosome-mediated transformation via microinjection. Plant Science 50: 69-77.

Grimanelli, D., Perotti, E., Ramirez, J. és Leblanc, O. (2005) Timing of the maternal-to-zigotic transition during early seed development in maze. Plant Cell 17: 1061-1072.

Guha, S. és Maheshwari, S. C. (1964) *In vitro* production of embryos for anthers of *Datura*. Nature 204: 497.

Guha, S. és Maheshwari, S. C. (1966) Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. Nature 212: 97-98.

Gyurján, I. (2004) Növényi embriogenezis és differenciáció. Egyetemi jegyzet. Trefort Kiadó. Budapest.

Haberlandt, G. (1902) Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber. Mat. Nat. Kl. Kais. Akad. Wiss. Wien 111: 69-92.

Haecker, A., Gross-Hardt, R., Geiges, B., Sarkar, A., Breuninger, H., Herrmann, M. és Laux, T. (2004) Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. Development 131: 657-668.

Haig, D. és Westoby, M. (1991) Genomic imprinting in endosperm – its effect on seed development in crosses between species, and between different ploidies of the same species, and its implications for the evolution of apomixis. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 333: 1-13.

Hamann, T., Benkova, E., Bäurle, I., Kientz, M. és Jürgens, G. (2002) The Arabidopsis *BODENLOS* gene encodes an auxin response protein inhibiting *MONOPTEROS*-mediated embryo patterning. Genes and Development 16: 1610-1615.

Hanai, H., Matsuno, T., Yamamoto, M., Matsubayashi, Y., Kobayashi, T., Kamada, H. és Sakagami, Y. (2000) A secreted petide growth factor, phytosulfokine, acting as a stimulatory factor of carrot somatic embryo formation. Plant and Cell Physiology 41: 27-32.

Hannig, E. (1904) Zur Physiologie pflanzlicher Embryonen. Ueber die Cultur van Cruciferen-Embryonen ausserhalb der Embryosacks. Bot. Ztg. 62: 45-80.

Hanstein, J. (1870) Die Entwickelung des Keimes der Monocotylen und Dicotylen. Bot. Abhandl. Bonn 1: 1-112.

Harada, J. J. (2001) Role of *Arabidopsis LEAFY COTYLEDON* genes in seed development. Journal of Plant Physiology 158: 405-409.

Hause, B. és Hause, G. (1996) Induction of embryogenesis in isolated microspores and pollen of *Brassica napus* L. 9-10, 31-48, 121-129. Thesis, ISBN 90-5485-614-9.

Hause, G. és Hahn, H. (1998) Cytological characterization of multicellular structures in embryogenic microspore culture of *Brassica napus* L. Botanica Acta 111: 204-211.

Hays, D. B., Mandel, R. M. és Pharis, R. P. (2001) Hormones in zygotic and microspore embryos of *Brassica napus*. Plant Growth Regulation 35: 47-58.

He, Y. C., Sun, M. X. és Yang, H. Y. (2004) Regeneration of fertile plants from isolated tobacco zygotes by *in vitro* culture. Chinese Science Bulletin 49: 810-814.

He, Y. C., He, Y. Q., Sun, M. X. és Yang, H. Y. (2007) Tobacco zygotic embryogenesis *in vitro*: the original cell wall of the zygote is essential for maintenance of cell polarity, the apical-basal axis and typical suspensor formation. The Plant Journal 49: 515-527.

Hess, J. R., Carman, J. G. és Banowetz, G. M. (2002) Hormones in wheat kernels during embryony. Journal of Plant Physiology 159: 379-386.

Hess, W. R., Prombona, A., Fieder, B., Subramanian, A. R. és Börner, T. (1993) Chloroplast rps15 and the rpoB/C1/C2 gene cluster are strongly transcribed in ribosome-deficient plastids: evidence for a functioning non-chloroplast-encoded RNA polymerase. EMBO Journal 12: 563-571.

Heszky, L. (1972) Az embriókultúrának, mint módszernek az alkalmazása a növénynemesítési és genetikai kutatásokban. Növénytermelés 21: 185-190.

Heszky, L. (1974) A *Nicotiana tabacum* L. haploid és homozigóta diploid alakjainak előállítása portokkulturában, valamint kalluszszövet-kulturában. Agrobotanika 15: 215-232.

Heszky, L. (2003) Az ivaros szaporodás biotechnológiája. In: Dudits, D. és Heszky L. (ed) Növényi biotechnológia és géntechnológia, pp. 57-96. Agroinform, Budapest.

Heszky, L. és Mesch, J. (1976) Anther culture investigations in cereal gene bank collection. Zeitschrift für Pflanzenzüchtung. 77: 187-197.

Heszky, L. és Pauk, J. (1976) Haploid növények előállítása az *Oryza sativa* L. *in vitro* portok- és ováriumkulturájából. II. Növényindukció portokkultúrában. Agrobotanika 16: 147-153.

Higashiyama, T., Kuroiwa, H. és Kuroiwa, T. (2003) Pollen-tube guidance: beacons from de female gametophyte. Current Opinion in Plant Biology 6: 36-41.

Higashiyama, T., Yabe, S., Sasaki, N., Nishimura, Y., Miyagishima, S. és Kuroiwa, T. (2001) Pollen tube attraction by the synergid cell. Science: 1480-1483.

Hobe, M., Müller, R., Grunewald, M., Brand, U. és Simon, R. (2003) Loss of CLE40, a protein functionally equivalent to the stem cell restricting signal *CLV3*, enhances root waving in *Arabidopsis*. Development Genes and Evolution 213: 371-381.

Hoekstra, S., van Bergen, S., van Brouwershaven, I. R., Schilperoort R. A. és Heidekamp, F. (1996) The interaction of 2,4-D application and mannitol pretreatment in anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. *cv*. Igri. Journal of Plant Physiology 148: 696-700.

Hoekstra, S., van Bergen, S., van Brouwershaven, I. R., Schilperoort, R. A. és Wang, M. (1997) Androgenesis in *Hordeum vulgare* L.: Effect of mannitol, calcium and abscisic acid on anther pretreatment. Plant Science 126: 211-218.

Hoekstra, S., van Zijderveld, M. H., Louwerse, J. D., Heidekamp, F. és van der Mark, F. (1992) Anther and microspore culture of (*Hordeum vulgare* L.) *cv*. Igri. Plant Science 86: 89-96.

Holm, P. B., Knudsen, S., Mouritzen, P. Negri, D., Olsen, F. L. és Roué, C. (1994) Regeneration of fertile barley plants from mechanically isolated protoplasts of the fertilized egg cell. Plant Cell 6: 531-543.

Holm, P. B., Olsen, O., Schnorf, M., Brinch-Pedersen, H., Knudsen, S. (2000) Transformation of barley by microinjection into isolated zygote protoplasts. Transgenic Research 9: 21-32.

Holme, I. B., Olesen, A., Hansen, N. J. P. és Andersen, S. B. (1999) Anther and isolated microspore culture response of wheat lines from northwestern and eastern Europe. Plant Breeding 118: 111-117.

Hoshino, Y., Scholten, S., von Wiegen, P., Lörz, H. és Kranz, E. (2004) Fertilization-induced changes in the microtubular architecture of the maize egg cell and zygote – an immunocytochemical approach adapted to single cells. Sexual Plant Reproduction 17: 89-95.

Huang, B.-Q. és Russel, S. D. (1994) Fertilization in *Nicotiana tabacum*: citoskeletal modifications in the embryo sac during synergid degeneration. Planta 194: 200-214.

Hueros, G., Royo, J., Matiz, M., Salamini, F. és Thompson, R. D. (1999b) Evidence for factors regulating transfer cellspecific expression in maize endosperm. Plant Molecular Biology 41: 403-414.

Hu, T. és Kasha, K. J. (1997) improvement of isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) through ovary co-culture. Plant Cell Reports 16: 520-525.

Hu, T. és Kasha, K. J. (1999) A cytological study of pretreatments used to improve isolated microspore cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chris. Genome 42: 432-441.

Hu, T. C., Ziauddin, A., Simion, E. és Kasha, K. J. (1995) Isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) in a defined medium. I. Effects of pretreatment, isolation methods and hormones. *In vitro* Cellular and Developmental Biology 31: 79-83.

Indrianto, A., Barinova, I., Touraev, A. és Heberle-Bors, E. (2001) Tracking individual wheat microspores *in vitro*: identification of embryogenic microspores and body axis formation in the embryo. Planta 212: 163-174.

Indrianto, A., Heberle-Bors, E. és Touraev, A. (1999) Assessment of various stresses and carbohydrates for their effect on the induction of embryogenesis in isolated wheat microspores. Plant Science 143: 71-79.

Ingram, G. C., Boisnard-Lorig C., Dumas, C. és Rogowsky, P. M. (2000) Expression patterns of genes encoding *HD-ZipIV* homeodomain proteins define specific domains in maize embryos and meristems. Plant Journal 22: 401-414.

Ingram, G. C., Magnard, J.-L., Vergne, P., Dumas, C. és Rogowsky, P. M. (1999) *ZmOCL1*, an *HDGL2* family homeobox gene, in expressed in the outer cell layer throughout maize development. Plant Molecular Biology 40: 343-354.

Islam, A. K. M. R. és Shepherd, K. W. (1990) Incorporation of barley chromosomes into wheat. In: Bajaj, Y. P. S. (ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 13 Wheat, pp. 128-151. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Ito, M., Sentoku, N., Nishimura, A., Hong, S.-K., Sato, Y. és Matsuoka, M. (2002) Position dependent expression of *GL2*-type homeobox gene, *Roc1*: significance for protoderm differentiation and radial pattern formation in early rice embryogenesis. Plant Journal 29: 497-507.

Jane, W. N. (1999). Ultrastructure of embryo development in Arundo formosana Hack. (Poaceae). International Journal of Plant Sciences160: 46-63.

Jäger, K., Kőszegi, D. és Barnabás, B. (2005) Regeneration capacity of microspore-derived structure produced in anther cultures of maize (*Zea mays* L.). Acta Physiologiae Plantarum. 27: 621-629.

Jähne, A., Becker, D., Brettschneider, R. és Lörz, H. (1994) Regeneration of transgenic, microspore-derived, fertile barley. Theoretical and Applied Genetics 89: 525-533.

Jenik, P. D és Barton, M. K. (2005) Surge and destroy: the role of auxin in plant embryogenesis. Development 132: 3577-3585.

Jensen W. A. (1964) Observations on the fusion of nuclei in plants. Journal of Cell Biology 23: 669-672.

Jimenez, V. M. (2005) Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. Plant Growth Regulation 47: 91-110.

Johansen, D. A. (1950) Plant embryology. Chronica Botanica, Waltham, Mass.

Jones, T. J. és Rost, T. L. (1989) Histochemistry and ultrastructure of rice (*Oryza sativa*) zygotic embryogenesis. American Journal of Botany 76: 504-520.

Karsai, I. és Bedő Z. (1997) Effect of carbohydrate content on the embryoid and plant production in triticale anther culture. Cereal Research Communications 25: 109-116.

Karsai, I., Bedő Z. és Hayes, P. M. (1994) Effect of induction medium pH and maltose concentration on in-vitro androgenesis of hexaploid winter triticale and wheat. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 39: 49-53.

Kasha, K. J., Hu, T. C., Oro, R., Simion, E. és Shim, Y. S. (2001) Nuclear fusion leads to chromosome doubling during mannitol pretreatment of barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores. Journal of Experimental Botany 52: 1227-1238.

Kasha, K. J. és Kao, K. N. (1970) High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). Nature 225: 874-876.

Kasha, K., J., Keller, W., A. és Palmer, C., E. (eds) (2006) Haploids in Crop Improvement II. Springer, Berlin, Heidelberg.

Kasha, K. J., Ziauddin, A., Cho, U-H., Simion, E., Petroski, R. és Cistué, L. (1997) Anther and microspore cultures of barley and wheat. Journal of Applied Genetics 38(4): 373-380.

Kellogg, E. A. (2001) Evolutionary History of the Grasses. Plant Physiology 125: 1198-1205.

Kent, N. és Brink, R. A. (1947) Growth *in vitro* of immature *Hordeum* embryos. Science 106: 547-548.

Kikuchi, A., Sanuki, N., Higashi, K., Koshiba, T. és Kamada, H. (2006) Abscisic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells. Planta 223: 637-645.

Kisaka, H., Kisaka, M., Kanno, A. és Kameya, T. (1998) Intergeneric somatic hybridization of rice (*Oryza sativa* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) by protoplast fusion. Plant Cell Reports 17: 362-367.

Koul, A. K. és Karihaloo, J. L. (1977) *In vivo* embryoids from anthers of *Narcissus bioflorus* curt. Euphytica 26: 97-102.

Kovács, M., Barnabás, B. és Kranz, E. (1994) The isolation of viable egg cells of wheat (*Triticum aestivum* L.). Sexual Plant Reproduction 7: 311-312.

Kovács, M., Barnabás, B. és Kranz, E. (1995) Electro-fused isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) gametes develop into multicellular structures. Plant Cell Reports. 15: 178-180.

Kovács, M., Barnabás, B. és Sutka, J. (1997) Selection for frost tolerance in anther culture-derived embryos and regeneration of frost-tolerant fertile DH plants in winter wheat. International symposium on cereal adaptation to low temperature stress in controlled environments, Martonvasar, Hungary, 1997 június 2-4. Acta Agronomica Hungarica. 45: 285-293.

Kölreuter, J. C. (1761-1766) „Vorläufige Nachricht von einigen das Geschlecht der Pflanzen betreffenden Versuchen und Beobachtungen."

Krahulcova, A., Papouskova, S. és Krahulec, F. (2004) Reproduction mode in the allopolyploid facultatively apomictic hawkweed *Hieracium rubrum* (*Asteraceae, H.* subgen. *Pilosella*). Hereditas 141: 19-30.

Kranz, E., Bautor, J. és Lörz, H. (1990) *In vitro* fertilization of single, isolated gametes, transmission of cytoplasmic organelles and cell reconstitution of maize (*Zea Mays* L.). In: Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. Proceedings of the VIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Amsterdam, The Netherlands, 24-29 June, 1990, pp. 252-257. Nijkamp, H. J. J., Van der Plas, L. H. W. és Van Aartrijk, J. (eds) Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.

Kranz, E. és Dresselhaus, T. (1996) *In vitro* fertilisation with isolated higher plant gametes. Trends in Plant Science 1: 82-89.

Kranz, E. és Kumlehn, J. (1999) Angiosperm fertilisation, embryo and endosperm development *in vitro*. Plant Science 142: 183-197.

Kranz, E. és Lörz, H. (1993) *In vitro* fertilisation with isolated, single gametes results in zygotic embryogenesis and fertile maize plants. Plant Cell 5: 739-746.

Kranz, E., von Wiegen, P. és Lörz H. (1995) Early cytological events after induction of cell division in egg cells and zygote development following *in vitro* fertilization with angiosperm gametes. Plant Journal 8: 9-23.

Krishnan, H. B. és White, J. A. (1997) Protein body formation and immunocytochemical localization of globulins and glutelins in developing rice (*Oryza sativa* L) embryos. Crop Science 37: 932-939.

Kumlehn, J., Brettschneider, R., Lörz, H. és Kranz, E. (1997) Zygote implantation to cultured ovules leads to direct embryogenesis and plant regeneration of wheat. Plant Journal 12: 1473-1479.

Kumlehn J., Kirik V., Czihal A., Altschmied L., Matzk F., Lörz H. és Bäumlein, H. (2001) Parthenogenetic egg cells of wheat: cellular and molecular studies. Sexual Plant Reproduction 14: 239-243.

Kumlehn, J. és Lörz, H. (1999) Monitoring sporophytic development of individual microspores of barley (*Hordeum vulgare* L.). In: Clement, X., Pacini, E. és Audran, J. C. (ed) Anther and pollen: from biology to biotechnology, pp. 183-189. Springer, Berlin Heidelberg

Kumlehn, J., Lörz, H. és Kranz, E. (1998) Differentiation of isolated wheat zygotes into embryos and normal plants. Planta 205: 327-333.

Kumlehn, J., Lörz, H. és Kranz, E. (1999) Monitoring individual development of isolated wheat zygotes: a novel approach to study early embryogenesis. Protoplasma 208: 156-162.

Kyo, M. és Harada, H. (1986) Control of the developmental pathway of tobacco pollen *in vitro*. Planta 168: 427-432.

Larkin, P., K. és Scowcroft, W. R. (1981) Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theoretical and Applied Genetics 68: 547-554.

Laurie, D. A. és Bennett, M. D. (1988) The production of haploid wheat plants from wheat × maize crosses. Theoretical and Applied Genetics 76: 393-397.

Laurie, D. A. és Bennett, M. D. (1989) The timing of chromosome elimination in hexaploid wheat × maize crosses. Genome 32: 953-961.

Laurie, D. A. és Bennett, M. D. (1990) Early post-pollination events in hexaploid wheat × maize crosses. Sexual Plant Reproduction 3: 70-76.

Laurie D. A., O'Donoughue, L. S. és Bennett M. D. (1990) Wheat × maize and other wide sexual hybrids, their potential for genetic manipulation in crop improvement. In: Gustafson J. P. (ed) Gene manipulation in crop improvement, pp. 95-126. II. Stadler Genetics Symposium, Columbia, Missouri, USA, Plenum Press, New York, London

Le, Q., Gutierrez-Marcos, J. F., Costa, L. M., Meyer, S., Dickinson, H. G., Lörz, H., Kranz, E. és Scholten, S. (2005) Construction and screening of subtracted cDNA libraries from limited populations of plant cells: a comparative analysis of gene expression between maize egg cells and central cells. Plant Journal 44: 167-178.

Leduc, N., Matthys-Rochon, E., Rougier, M., Mogensen, L., Holm, P. B., Magnard, J.-L. és Dumas, C. (1996) Isolated maize zygotes mimic *in vivo* embryonic development and express microinjected genes when cultured *in vitro*. Developmental Biology 177: 190-203.

Leeuwenhoek, A. v. (1677) „Observations.... de natis e semine genitali animalculis."

Letarte, J., Simion, E., Miner, M. és Kasha, K. J. (2006) Arabinogalactans and arabinogalactan-proteins induce embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture. Plant Cell Reports 24: 691-698. Erratum in: Plant Cell Rep. (2006) 25: 877.

Li, H. és Devaux, P. (2001) Enhancement of microspore culture efficiency of recalcitrant barley genotypes. Plant Cell Reports 20: 475-481.

Lin, B. Y. 1984. Ploidy barrier to endosperm development in maize. Genetics 107: 103-115.

Liu, C. A. és Douches, D. S. (1993) Production of haploids of potato (*Solanum-tuberosum ssp. tuberosum*) and their identification with electrophoretic analysis. Euphytica 70: 113-126.

Liu, J., Xu, X. és Deng, X. (2005) Intergeneric somatic hybridization and its application to crop genetic improvement. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 82: 19-44.

Liu, W., Zheng, M. Y., Polle, E. és Konzak, C. F. (2002) Highly efficient doubled-haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) via induced microspore embryogenesis. Crop Science 42: 686-692.

Lőkös Tóth, K., Mázik Tőkei, K., Kertész, Z., Pauk, J. és Heszky, L. E. (1997) Agronomic performance of doubled haploid wheat varieties. Cereal Research Commmunications 25: 155-161.

Mäes, O., Comeau, P., Nadeau, P., Simard, R. R. és St-Pierre. (1999) Characterisation of the natural chemical and osmotic environment of early wheat embryogenesis. Physiologia Plantarum 107: 220-229.

Magnard, J. L., Le Deunff, E., Domenech, J., Rogowsky, P. M., Testillano, P. S, Rougier, M., Risueno, M. C., Vergne, P. és Dumas, C. (2000) Genes normally expressed in the endosperm are expressed at early stages of microspore embryogenesis in maize. Plant Molecular Biology 44: 559-574.

Maheshwari, N. (1958) *In vitro* culture of excised ovules of *Papaver somniferum*. Science 127: 342.

Maheshwari, P. (1950) An itroduction to the embryology of Angiosperms. McGrw-Hill, New York.

Maluszynski, M., Kasha, K. J., Forster, B. P. és Szarejko, I. (2003) In: Maluszynski, M., Kasha, K. J., Forster, B. P. és Szarejko, I. (Ed) Doubled haploid production in crop plants. A Manual. pp. 21-52. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.

Maraschin, S. F., Caspers, M., Potokina, E., Wülfert, F., Corredor, M., Graner, A., Spaink, H. P. és Wang, M. (2005d) Androgenic switch in barley microspores. II. cDNA array analysis of stress-induced gene expression in barley androgenesis. PhD thesis, Leiden University, The Netherlands.

Maraschin, S. F., de Priester, W., Spaink, H. P. és Wang, M. (2005a) Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. Journal of Experimental Botany 56: 1711-1726.

Maraschin, S. F., Gaussand, G., Pulido, A., Olmedilla, A., Lamers, G. E. M., Korthout, H., Spaink, H. P. és Wang, M. (2005b) Programmed cell death during the transition from multicellular structures to globular embryos in barley androgenesis. Planta 221: 459-470.

Maraschin, S. F., Lamers, G. E. M. és Wang, M. (2003b) Cell death and *14-3-3* proteins during the induction of barley microspore androgenesis. Biologia 58: 59-68.

Maraschin, S. F., Lamers, G. E. M., de Pater, B. S., Spaink, H. P. és Wang, M. (2003a) *14-3-3* isoforms and pattern formation during barley microspore embryogenesis. Journal of Experimental Botany 51: 1033-1043.

Maraschin, S. F., Vennik, M., Lamers, G. E. M., Spaink, H. P. és Wang, M. (2005c) Time-lapse tracking of barley androgenesis reveals position determined cell death within pro-embryos. Planta 220: 531-540.

Márton, M. L., Cordts, S., Broadhvest, J. és Dresselhaus, T. (2005) Micropylar pollen tube guidance by egg apparatus of maize. Science 307: 573-576.

Massonneau, A., Coronado, M. J., Audran, A., Bagniewska, A., Mol, R., Testillano, P. S., Goralski, G., Dumas, C., Risueno, M. C. és Matthys-Rochon E. (2005) Multicellular structures developing during maize microspore culture express endosperm and embryo-specific genes and show different embryogenic potentialities. European Journal of Cell Biology 84: 663-675.

Matsuoka, Y. és Nasuda, S. (2004) Durum wheat as a candidate for the unknown female progenitor of bread wheat: an empirical study with a highly fertile F1 hybrid with *Aegilops tauschii* Cross. Theoretical and Applied Genetics 109: 1710-1717.

Matthys-Rochon, E., Mól, R., Heizmann, P. és Dumas, C. (1994) Isolation and microinjection of active sperm nuclei into egg cells and central cells of isolated maize embryo sacs. Zygote 2: 29-35.

Mayer, K. F. X., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jürgens, G. és Laux, T. (1998) Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. Cell 95: 805-815.

McManus, J. C. F. (1948) Histological and histochemical uses of periodic acid. Stain Technology 23: 99-108.

Mentewab, A. B., Lazarevich, S. V., Souvre, A. és Sarrafi, A. (1997) Androgenic ability of different *Triticum* species. Journal of Genetics and Breeding 51: 109-113.

Mitykó, J., Andrásfalvy, A., Csilléry, G. és Fáry, M. (1995) Anther-culture response in different genotypes and F1 hybrids of pepper (*Capsicum annuum* L.) Plant Breeding 114: 78-80.

Mochida, K., Tsujimoto, H. és Sasakuma, T. (2004) Confocal analysis of chromosome behavior in wheat × maize zygotes. Genome 47: 224-228.

Molnár-Láng, M., Linc, G., Friebe, B. R. és Sutka, J. (2000) Detection of wheat-barley translocations by genomic *in situ* hybridization in derivatives of hybrids multiplied *in vitro*. Euphytica 112: 117-123.

Molnár-Láng, M. és Sutka, J. (1994) The effect of temperature on seed set and embryo development in reciprocal crosses of wheat and barley. Euphytica 78: 53-58.

Monostori, T., Lantos, Cs., Mihály, R. és Pauk, J., 2003. Induction of embryogenesis without exogenous hormone-supplement in barley microspore culture. Cereal Research Communications 31: 297-300.

Monostori, T. és Pauk, J. (1995) Androgenezis indukciója izolált árpa mikrospórák *in vitro* tenyészetében. Tiszántúli Mezőgazdasági Tudományos Napok, Hódmezővásárhely, 1995. április 21-22. p. 365.

Monostori, T., Puolimatka, M. és Pauk, J. (1998) Tritikálé *in vitro* androgenezis izolált mikrospóra-tenyészetben. Növénytermelés 47: 241-251.

Mordhorst, A. P. és Lörz, H. (1993) Embryogenesis and development of isolated barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores are influenced by the amount of and composition of nitrogen sources in culture media. Journal of Plant Physiology 142: 485-492.

Mordhorst, A. P., Toonen, M. A. J. és de Vries, S. C. (1997) Plant embryogenesis. Critical Reviews in Plant Science 16: 535-576.

Mórocz, S. (1991) Plant regeneration from protoplasts of androgenetic maize haploids. Physiologia Plantarum 82: 1.

Morrison, J. W. (1955) Fertilization and postfertilization development in wheat. Canadian Journal of Botany 33: 168-176.

Mouritzen, P. és Holm, P. B. (1994) Chloroplast genome breakdown in microspore cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.) occurs primarily during regeneration. Journal of Plant Physiology 144: 586-593.

Mozsár, J. és Viczián, O. (1996) Genotype effect on somatic embryogenesis and plant regeneration of *Vitis* spp. Vitis 35: 155-157.

Mujib, A. és Samaj, J. (eds) (2006) Somatic Embryogenesis. Springer, Berlin, Heidelberg.

Nagato, Y. (1978) Analyses on the growth of embryo in some Gramineae. Japanese Journal of Breeding 28: 97-105.

Natesh, S. és Rau, M. A. (1984) The embryo. In: Johri BM (ed) Embryology of angiosperms, pp. 377-443. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo.

Naumova, T. N. és Matzk, F. (1998) Differences in the initiation of the zygotic and parthenogenetic pathway in the Salmon lines of wheat: ultrastructural studies. Sexual Plant Reproduction 11: 121-130.

Nawaschin, S. G. (1898) Resultate einer Revision der Befruchtungsvorgänge bei der Ulme. Bul. Acad. Imp. des Sci. St. Petersburg. 8: 345-357.

Nickle, T. C. és Yeung, E. C. (1993) Failure to establish a functional shoot meristem may be a cause of conversion failure in somatic embryos of *Daucus carota* (Apiaceae). American Journal of Botany 80: 1284-1291.

Niizeki, H. és Oono, K. (1968) Induction of haploid rice plant from anther culture. Proceedings of the Japan Academy 44: 554-557.

Ning, J., Peng, X. B., Qu, L. H., Xin, H. P., Yan, T. T. és Sun, M. (2006) Differential gene expression in egg cells and zygotes suggests that the transcriptome is restructed before the first zygotic division in tobacco. FEBS Letters 580: 1747-1752.

Nordström, A., Tarkowski, P., Tarkowska, D., Norbaek, R., Åstot, C., Dolezol, K. és Sandberg, G. (2004) Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: A factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 101: 8039-8044.

Nunez, Z. V. M., Martinez, C. P., Navarez, V. J. és Rova, W. (1985) Using anther cultures to obtain homozygous lines of rice (*Oryza sativa*) with tolerance for aluminium toxicity. Acta Agronomica 35: 7-26.

Obert, B. és Barnabás, B. (2004) Colchicine induced embryogenesis in maize. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 77: 283-285.

O'Donoughue, L. S és Bennett, M. D. (1994) Durum-wheat haploid production using maize wide-crossing. Theoretical and Applied Genetics 89: 559-566.

Okamoto, T., Higuchi, K., Shinkawa, T., Isobe, T., Lörz, H., Koshiba, T. és Kranz, E. (2004) Identification of major proteins in maize egg cells. Plant and Cell Physiology 45: 1406-1412.

Okamoto, T., Scholten, S., Lörz, H. és Kranz, E. (2005) Identification of genes that are up- or down-regulated in the apical or basal cell of maize two-celled embryos and monitoring their expression during zygote development by a cell manipulation- and PCR-based approach. Plant and Cell Physiology 46: 332-338.

Olsen, F. L. (1991) Isolation and cultivation of embryogenic microspores from barley (*Hordeum vulgare* L.). Hereditas 115: 255-266.

Opsahl-Ferstad, H.-G., le Deunff, E., Dumas, C., és Rogowsky, P. M. (1997) *ZmEsr*, a novel endosperm-specific gene expressed in a restricted region around the maize embryo. Plant Journal 12: 235-246.

Osmond, R. I., Hrmova, M., Fontaine, F., Imberty, A. és Fincher, G. B. (2001). Binding interactions between barley thaumatine-like proteins and 1-3-beta-D-glucans. Kinetics, specificity, structural analysis and biological implications. European Journal of Biochemistry 268: 4190-4199.

Ouyang, T. W., Chuang, C. C. és Tseng, C. C. (1973) Induction of pollen plants from anther of *Triticum aestivum* L. cultured *in vitro*. Scientia Sinica 16: 79-95.

Ozias-Akins, P. és Vasil, I. K. (1982) Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* L. (wheat): Evidence for somatic embryogenesis. protoplasma 110: 95-105.

Paire, A., Devaux, P., Lafitte, C., Dumas, C. és Matthys-Rochon, E. (2003) Proteins produced by barley microspores and their derived androgenic structures promote *in vitro* zygotic maize embryo formation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 73: 167-176.

Palanivelu, R., Brass, L., Edlund, A. F., és Preuss, D. (2003) Pollen tube growth and guildance is regulated by *POP2*, an Arabidopsis gene that controls GABA levels. Cell 114: 47-59.

Pauk, J., Kertész, Z. és Barabás, Z. (1988) Production of wheat lines by means of anther culture and their performance in performance tests.; *In vitro* androgenesis of wheat: from fundamentals to practical application. Növénytermelés 37: 197-203.

Pauk, J., Kertész, Z., Beke, B., Bóna, L., Csősz, M. és Matúz, J. (1995) New winter wheat variety: 'GK Délibáb' developed via combining conventional breeding and *in vitro* androgenesis. Cereal Research Communications 23: 251-256.

Pauk, J., Manninen, O., Mattila, I., Salo, Y. és Pulli, S. (1991) Androgenesis in hexaploid spring wheat F2 populations and their parents using a multiple-step regeneration system. Plant Breeding 107: 18-27.

Pauk, J., Puolimatka, M., Tafti, M. N., Mesterházy, Á. és Kertész, Z. (1999) Integration of *in vitro* induced doubled haploids in wheat breeding programs. Proceedings of the COST 824 Workshop on Gametic Embryogenesis in Monocots, pp. 53-57. Jokioinen, Finland.

Pearce, G., Moura, D. S., Stratmann, J. és Ryan, C. A. (2001) RALF, a 5kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. Proceedings of the National Academy of Sciences 98: 12843-12847.

Peng, X. B., Sun, M. X. és Yang, H. Y. (2005) A novel *in vitro* system for gamete fusion in maize. Cell Research 15: 734-738.

Perry, S. E., Lehti, M.D. és Fernandez, D. E. (1999) The MADS-domain protein *AGAMOUS-like 15* accumulates in embryonic tissues with diverse origins. Plant Physiology 120: 121-129.

Pichot, C., El Maâtaoui, M., Raddi, S. és Raddi, P. (2001) Surrogate mother for endangered cupressus: A rare cypress tree increases its chances by using a clever reproductive strategy. Nature 412 (6842): 39.

Pónya, Z. és Barnabás, B. (2001) Microinjected fluorescent phalloidin *in vivo* reveals F-actin dynamics in isolated egg cells of wheat (*Triticum aestivum*, L.) developed *in situ* and fertilised *in vitro*. Journal of Plant Physiology 158: 1527-1539.

Pónya, Z., Finy, P., Fehér, A., Mitykó, J., Dudits, D. és Barnabás, B. (1999a) Optimisation of introducing foreign genes into egg cells and zygotes of wheat (*Triticum aestivum* L.) via microinjection. Protoplasma 208: 163-172.

Pónya, Z., Kristóf, Z., Ciampolini, F., Faleri, C., Cresti, M. és Barnabás, B. (2004) Structural change in the endoplasmic reticulum during the *in situ* development and *in vitro* fertilisation of wheat egg cells. Sexual Plant Reproduction 17: 177-188.

Pónya, Z., Tímár, I., Szabó, L., Kristóf, Z. és Barnabás, B. (1999b) Morphological characterization of wheat (*Triticum aestivum*, L.) egg cell protoplasts isolated from immature and overaged caryopsis. Sexual Plant Reproduction 11: 357-359.

Powers, J. B., Frearson, E. M., Hayward, C., George, D., Evans, P. K., Berry, S. F. és Cocking, E. C. (1976) Somatic hybridization pf *Petunia hybrida* × *P. parodii*. Nature 263: 500-502.

Prado, A. M., Porterfield D. M. és Feijó J. A. (2004) Nitrous oxide is involved in growth regulation and re-organization of pollen tubes. Development 131: 2707-2714.

Pu, R. és Robinson, K. R. (1998) Cytoplasmic calcium gradients and calmodulin in the early development of the fucoid alga *Pelvetia compressa*. Journal of Cell Science 111: 3197-3207.

Pulido, A., Bakos, F., Castillo, A., Vallés, M.P., Barnabás, B. és Olmedilla, A. (2005) Comparison of cytological and ultrastrucutral changes induced in anther and isolated-microspore cultures in barley: presence of Fe deposits in isolated-microspore cultures. Journal of Structural Biology. 149: 170-181.

Pulido, A., Bakos, F., Castillo, A., Vallés, M.P., Barnabás, B. és Olmedilla, A. (2006a) Influence of the Fe concentration in the medium on multicellular pollen grains and haploid plants induced by mannitol pre-treatment in barley (*Hordeum vulgare* L.) Protoplasma 228: 101-106.

Pulido, A., Hernando, A., Bakos, F., Méndez, E., Devic, M., Barnabás, B. és Olmedilla, A. (2006b) Hordeins are expressed in microspore-derived embryos and also during male gametophytic and very early stages of seed development. Journal of Experimental Botany 57: 2837-2846.

Puolimatka, M., Laine, S. és Pauk, J. (1996) Effect of ovary co-cultivation and culture medium on embryogenesis of directly isolated microspores of wheat. Cereal Research Communications 24: 393-400.

Puolimatka, M. és Pauk, J. (1999) Impact of explant type, duration and initiation time on the co-culture effect in isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). Journal of Plant Physiology 154: 367-373.

Pullman, G. S. és Buchanan, M. (2003) Loblolly pine (*Pinus taeda* L.): stage-specific elemental analyses of zygotic embryo and female gametophyte tissue. Plant Science 164: 943-954.

Pullman, G. S., Montello, P., Cairney, J., Xu, N. és Feng, X. (2003) Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) somatic embryogenesis: maturation improvements by metal analyses of zygotic and somatic embryos. Plant Science 164: 955-969.

Raghavan, V. (1976) Role of the generative cell in androgenesis in henbane. Science 191: 388-389.

Raghavan, V. (1997) Molecular embryology of flowering plants. Adventive embryogenesis pp. 465-522. Cambridge University Press, Cambridge.

Raghavan, V. (2006a) Double Fertilization. Embryo and endosperm development in flowering plants. pp. 57-80. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Raghavan, V. (2006b) Double Fertilization. Embryo and endosperm development in flowering plants. pp. 101-129. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Raghavan, V. (2006c) Double Fertilization. Embryo and endosperm development in flowering plants. pp. 131-149. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Raghavan, V. (2006d) Double Fertilization. Embryo and endosperm development in flowering plants. pp. 151-185. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Rahman, M. H., Krishnaraj, S. és Thorpe, T. A. (1995) Selection for salt tolerance *in vitro* using microspore-derived embryos of *Brassica napus* cv. Topas, and the characterization of putative tolerant plants. *In vitro* Cellular and Developmental Biology - Plant 31: 116-121.

Rammana, M. S. (1974) The origin and *in vivo* development of embryoids in the anthers of *Solanum* hybrids. Euphtytica 23: 623-632.

Randolph, L. F. (1936) Developmental morphology of the caryopsis in maize. Journal of Agricultural Research 53: 881-916.

Reynolds, T. L. (2000) Effects of calcium on embryogenic induction and the accumulation of abscisic acid, and an early cysteine-labeled metallothionein gene in androgenic microspores of *Triticum aestivum*. Plant Science 150: 201-207.

Riera-Lizarazu, O., Rines, H. W. és Phillips, R. L. (1996) Cytological and molecular characterization of oat × maize partial hybrids. Theoretical and Applied Genetics 93: 123-135.

Ritala, A., Mannonen, L. és Oksman-Caldentey, K. M. (2001) Factors affecting the regeneration capacity of isolated microspores (*Hordeum vulgare* L.). Plant Cell Reports 20: 403-407.

Rood, S. B., Pearce, D. és Pharis, R. P.(1987) Identification of endogenous gibberellins from oilseed rape. Plant Physiology 85: 605-607.

Sági, L. és Barnabás, B. (1989) Evidence for cytoplasmic control of *in vitro* microspore embryogenesis in the anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). Theoretical and Applied Genetics 78: 867-872.

Saïdi, N., Chlyah, O. és Chlyah H. (1998) Production of green haploid durum wheat plants by pollination of wheat with maize. Canadian Journal of Botany 76: 652-656.

Sárkány, S. és Szalai, I. (1957) Növénytani praktikum I. Növényszervezettani gyakorlatok. pp. 547-548, 580. Tankönyvkiadó, Budapest.

Sauer, M. és Friml, J. (2004) *In vitro* culture of *Arabidopsis* embryos within their ovules. Plant Journal 40: 835-843.

Schauer, S. E., Jacobsen, S. E., Meinke, D.W. és Ray, A. (2002) DICERLIKE1: blind men and elephants in *Arabidopsis* development. Trends in Plant Science 7: 487-491.

Schel, J. H. N. és Kieft, H. (1986) An ultrastructural-study of embryo and endosperm development during *in vitro* culture of maize ovaries (*Zea mays*) Canadian Journal of Botany 64: 2227-2238.

Schmidt, E. D. L., Guzzo, F., Toonen, M. A. J. és de Vries, S. C. (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. Development 124: 2049-2062.

Schmulling, T. (2002) New insights into the functions of cytokinins in plant development. Journal of Plant Growth Regulation 21: 40-49.

Scholten, S. és Kranz, E. (2001) *In vitro* fertilization and expression of transgenes in gametes and zygotes. Sexual Plant Reproduction 14: 35-40.

Scholten, S., Lörz, H. és Kranz, E. (2002) Paternal mRNA and protein synthesis coincides with male chromatin decondensation in maize zygotes. Plant Journal 32: 221-231.

Schöffl, F., Prändl, R. és Reindl, A. (1998) Regulation of the heat shock response. Plant Physiology 117: 1135-1141.

Sears, E. R. (1956) The transfer of leaf rust resistance from *Aegilops unbellulata* to wheat. Brookhaven Symposia in Biology 9: 1-22.

Seary, K. B. és Mulcachy, D. L. (1990) Comparison of the response to aluminium toxicity in gametophyte and sporophyte of four tomato varieties. Theoretical and Applied Genetics 80: 289-295.

Shariatpanahi, M. E., Belogradova, K., Hessamvaziri, L., Heberle-Bors, E. és Touraev, A. (2006) Efficient embryogenesis and regeneration in freshly isolated and cultured wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores without stress pretreatment. Plant Cell Reports 25: 1294-1299.

Shani, E., Yanai, O. és Ori, N. (2006) The role of hormones in shoot apical meristem function. Current Opinion in Plant Biology 9: 484-489.

Sharma, H. C. (1995) How wide can a wide cross be? Euphytica 82: 43-64.

Sharma, H., Yang, Y. és Ohm, H. (2002) An assessment of doubled haploid production in soft red winter wheat by wheat × corn wide crosses. Cereal Research Communications 30: 269-275.

Shen, B., Li, C., Min, Z., Meeley, R. B., Tarczinsky, M. C. és Olsen, O. A. (2003) sal1 determines the number aleurone cell layers in maize endosperm and encodes a class E vacuolar sorting protection. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 100: 6552-6557.

Shimizu, K. K. és Okada, K. (2000) Attractive and repulsive interactions between female and male gametophytes in *Arabidopsis* pollen tube guidance. Development 127: 4511-4518.

Shivanna, K. R. és Johri, B. M. (1985) The angiosperm pollen. pp. 5-52. Wiley Eastern Limited, New Delhi.

Singh, S., Behl, R. K. és Punia, M. S. (2001) Production of double haploids via maize pollination in wheat. Cereal Research Communications 29: 289-296.

Sitch, L. A. és Snape, J. W. (1987) Factors affecting haploid production in wheat using the *Hordeum bulbosum* system. 1) Genotypic and environmental effects on pollen grain germination, pollen tube growth and the frequency of fertilisation. Euphytica 36: 483-496.

Smart, M. G. és O'Brien, T. P. (1983) The development of the wheat embryo in relation to the neighboring tissues. Protoplasma 114: 1-13.

Snape, J. V., Chapman, V., Moss, J., Blanchard, C. E. és Miller, T. E. (1979) The crossabilities of wheat verieties with *Hordeum bulbosum*. Heredity 42: 291-298.

Sprunck, S., Baumann, U., Edwards, K., Langridge, P. és Dresselhaus, T. (2005) The transcript composition of egg cells changes significantly following fertilization in wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Journal 41: 660-672.

Strasburger, E. (1884) „Neue Untersuchungen über den Befruchtungsvorgang bei den Phanerogamen." Jena.

Suarez, M. F., Filonova, L. H., Smertenko, A., Savenkov, E. I., Clapham, D. H., von Arnold, S., Zhivotovsky, B. és Bozhkov, P. V. (2004) Metacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis. Current Biology 14: 339-340.

Sun, H., Basu, S., Brady, S. R., Luciano, R. L. és Muday, G. K. (2004) Interactions between auxin transport and the actin cytoskeleton in developmental polarity of *Fucus distichus* embryos in response to light and gravity. Plant Physiology 135: 266-278.

Sunderland, N. és Evans, L. J. (1980) Multicellular pollen formation in cultured barley anthers. II. The A, B and C pathways. Journal of Experimental Botany 31: 501-540.

Sunderland, N., Roberts, M., Evans, L. J. és Wildon, D. C. (1979) Multicellular pollen formation in cultured barley anthers. I. Independent division of the generative and the vegetative cells. Journal of Experimental Botany 30: 1133-1144.

Suzuki, K., Taniguchi, T. és Maeda, E. (1991) Development of scutellar epithelial-cells during rice embryogenesis, studied by chemical fixation and freeze-substitution methods. Japanese Journal of Crop Science 60: 161-173.

Suzuki, K., Taniguchi, T. és Maeda, E. (1992) Ultrastructure and cleavage pattern of rice proembryos. Japanese Journal of Crop Science 61: 292-303.

Suzuki, K., Miyake, H., Taniguchi, T. és Maeda, E. (1993) Ultrastructural studies on rice globular embryos with emphasis on epidermis initiation. Japanese Journal of Crop Science 62: 116-125.

Suzuki, K., Miyake, H., Taniguchi, T. és Maeda, E. (1994) Determination of shoot apical meristem and plumule organization in rice embryos – light and electron microscopy. Japanese Journal of Crop Science 63: 352-361.

Suzuki, K., Miyake, H., Taniguchi, T. és Maeda, E. (1996) Anatomy and ultrastructure of the developing radicle in rice embryos: An approach to the study of somatic embryogeny. Japanese Journal of Crop Science 65: 119-130.

Szakács, É., és Barnabás, B. (2004) Development of diploid pollen in spikelet cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.) and rye (*Secale cereale* L.). Acta Agronomica Hungarica 52: 1-8.

Szakács, É., Karsai, I., Bedő, Z. és Barnabás, B. (2002) *In vitro* androgenesis of wheat (*Triticum aestivum* L.): theory and practice. Növénytermelés 51: 603-612.

Szarka, B., Dévényi, M. és Mórocz, S. (1999) Production of fertile maize plants from isolated microspores. Növénytermelés 48: 571-582.

Szarka, B., Gonter, I., Molnár-Láng, M., Mórocz, S. és Dudits, D. (2002) Mixing of maize and wheat genomic DNA by somatic hybridization in regenerated sterile maize plants. Theoretical and Applied Genetics 105: 1-7.

Takács, I., Kovács, G. és Barnabás, B. (1998) *In vitro* maturation and seed set of maize pollen. Maydica 43: 251-254.

Taylor, M. G és Vasil, I. K. (1995) The ultrastructure of zygotic embryo development in pearl-millet (*Pennisetum glaucum,* Poaceae). American Journal of Botany, 82: 205-219.

Taylor, M. G. és Vasil, I. K. (1996a) The ultrastructure of somatic embryo development in pearl millet (*Pennisetum glaucum*; Poaceae) American Journal of Botany 83: 28-44.

Taylor, M. G és Vasil, I. K. (1996b) Quantitative analysis of ultrastructural changes during zygotic and somatic embryogenesis in pearl millet (*Pennisetum glaucum* [L] R Br). sexual plant reproduction 9: 286-298.

Taylor, R. L. (1967) The foliar embryos of *Malaxis paludosa*. Canadian Journal of Botany 45: 1553-1556.

Testerink, C., van der Meulen, R. M., Oppedijk, B. J., de Boer, A. H., Heimovaara-Dijkstra, S., Kijne, J. W. és Wang, M. (1999) Differences in spatial expression between *14-3-3* isoforms in germinating barley embryos. Plant Physiology 121: 81-87.

Testillano, P., Georgiev, S., Mogensen, H. L., Coronado, M. J., Dumas, C., Risueno, M. C. és Matthys-Rochon, E. (2004) Spontaneous chromosome doubling results from nuclear fusion during *in vitro* maize induced microspore embryogenesis. Chromosoma 112: 342-349.

Theunis, C. H., Pierson, E. S. és Cresti, M. (1991) Isolation of male and female gametes in higher plants. Sexual Plant Reproduction 4: 145-154.

Tischner, T., Kőszegi, B. és Veisz, O. (1997) Climatic programmes used in the Martonvásár phytotron most frequently in recent years. Acta Agronomica Hungarica 45: 85-104.

Torp, A. M., Hansen, A. L. és Andersen, S. B. (2001) Chromosomal regions associated with green plant regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. Eupytica 119: 377-387.

Touraev, A., Ilham, A., Vicente, O. és Heberle-Bors, E. (1995) Stress-induced microspore embryogenesis in tobacco: an optimized system for molecular studies. Plant Cell Reports 15: 561-565.

Touraev, A., Indrianto, A., Wratschko, I., Vicente, O. és Heberle-Bors, E. (1996) Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. Sexual Plant Reproduction 9: 209-215.

Touraev, A., Pfosser, M. és Heberle-Bors, E. (2001) The microspore: A haploid multipurpose cell. Advances in Botanical Research 35: 53-109.

Touraev, A., Vicente, O. és Heberle-Bors, E. (1997a) Initiation of microspore embryogenesis by stress. Trends in Plant Science 2: 297-302.

Töpfer, R. és Steinbiss, H. H. (1985) Plant regeneration from cultured fertilized barley ovules. Plant Science 41: 49-54.

Touraev, A., Stöger, E., Voronin, V. és Heberle-Bors, E. (1997b) Plant male germ line transformation. Plant Journal 12: 949-956.

Tupy, J., Rihova, L. és Zarsky, V. (1991) production of fertile tobacco pollen from microspores in suspension-culture and its storage for insitu pollination. Sexual Plant Reproduction 4: 284-287.

van Bergen, S., Kottenhagen, M. J., van der Meulen, R. M. és Wang, M. (1999) The role of abscisic acid in induction of androgenesis: A comparative study between *Hordeum vulgare* L. Cvs. Igri and Digger. Journal of Plant Growth Regulation 18: 135-143.

van Engelen, F. A. és de Vries, S. C. (1993) Extracellular proteins in plant embryogenesis. Trends in Genetics 8: 66-70.

van Lammeren, A. A. M. (1981) Early events during embryogenesis in *Zea mays*. Acta Societatis Botanicae Polonicae 50: 289-290.

van Lammeren, A. A. M. (1986) Developmental morphology and cytology of the young maize embryo (*Zea mays* L.). Acta Botanica Neerlandica 35: 169-188.

van Loon, L. C. (1990) The nomenclature of pathogenesis-related proteins. Physiological and Molecular Plant Pathology 37: 229-230.

van Overbeek, J., Conklin, M. E. és Blakeslee, A. F. (1942) Cultivation *in vitro* of small *Datura* embryos. American Journal of Botany 29: 472-477.

Venglat, S. P., Xiang, D., Kushalappa, K., Keller, W., Palmer, D., Selvara, G. és Datla, R. (2005) OBPC Symposium: Maize 2004 & Beyond - Developmental and molecular genetics of embryogenesis in plants. *In vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant 41: 378-387.

Vergne, P., Delvalle, I. és Dumas, C. (1987) Rapid assessment of microspore and pollen developmental stage in wheat and maize using DAPI and membran permeabilization. Stain Technology 62: 299-304.

Verma, V., Bains, N. S., Mangat, G. S., Nanda, G. S., Gosal, S. S és Singh K. (1999) Maize genotypes show striking differences for induction and regeneration of haploid wheat embryos in the wheat × maize system. Crop Science 39: 1722-1727.

Vrinten, P. L., Nakamura, T. és Kasha, K. J. (1999) Characterization of cDNAs expressed in the early stages of microspore embryogenesis in barley (*Hordeum vulgare*) L. Plant Molecular Biology 41: 455-463.

Wagner, V. T., Song,. C., Matthys-Rochon, E. és Dumas, C. (1989) Observations on the isolated embryo sac of *Zea mays* L. Plant Science 59: 127-132.

Wedzony, M., Marcinska, I., Ponitka, A., Slusarkiewicz-Jarzina, A. és Wozna, J. (1998) Production of doubled haploids in Triticale (× *Triticosecale* Wittm) by means of crosses with maize (*Zea mays* L) using picloram and dicamba. Plant Breeding 117: 211-215.

Wedzony, M. és van Lammeren, A. A. M. (1996) Pollen tube growth and early embryogenesis in wheat × maize crosses influenced by 2,4-D. Annals of Botany 77: 639-647.

Weijers, D. és Jürgens, G. (2005) Auxin and embryo axis formation: the ends in sight? Current Opinion in Plant Biology 8: 32-37.

White, C. N., Proebsting, W. M., Hedden, P. és Rivin, C. J. (2000) Gibberellins and seed development in maize. I. Evidence that gibberellin/abscisic acid balance governs germination versus maturation pathways. Plant Physiology 122: 1081-1088.

White, C. N. és Rivin, C. J. (2000) Gibberellins and seed development in maize. II. Gibberellin synthesis inhibition enhances abscisic acid signaling in cultured embryos. Plant Physiology 122: 1089-1097.

Widholm, J. M. (1972) The use of fluoresceine diacetate and phenosaphranine for determining viability of cultured plant cells. Stain Technology 47: 189-194.

Willemsen, V. és Scheres, B. (2004) Mechanisms of pattern formation in plant embryogenesis. Annual Review of Genetics 38: 587-614.

Wolters-Arts, M., Lush, W. M. és Mariani, C. (1998) Lipids are required for directional pollen-tube growth. Nature 392: 818-821.

Xiao, W., Gehring, M., Choi, Y., Margossian, L., Pu, H., Harada, J. J., Goldberg, R. B., Pennell, R. I., és Fischer, R. L. (2003) Imprinting of the *MEA* polycomb gene is controlled by antagonism between *MET1* methyltransferase and *DME* glycosylase. Developmental Cell 5: 891-901.

Yakovlev, M. S. és Yoffe, M. D. (1957) On some peculiar featuresin the embryogeny of *Paeonia* L. Phytomorphology. 7: 74-87.

Yang, H., Kaur, N., Kiriakopolos, S. és McCormick, S. (2006) EST generation and analyses towards identifying female gametophyte-specific genes in *Zea mays* L. Planta 224: 1004-1014.

You, R. és Jensen, W., A. (1985). Ultrastructural observations of the mature megagametophyte and the fertilization in wheat (*Triticum aestivum*). Canadian Journal of Botany 63: 163-170.

Zaki, M. A. M. és Dickinson, H. G. (1991) Microspore derived embryos in *Brassica*: the significance of division symmetry in pollen mitosis I to embryogenic development. Sexual Plant Reproduction 4: 48-55.

Zamani, I., Gouli-Vavdinoudi, E., Kovács, G., Xynias, I., Roupakias, D. és Barnabás, B. (2003) Effect of parental genotypes and colchicine treatment on the androgenic response of wheat F-1 hybrids. Plant Breeding 122: 314-317.

Zenkteler, M. (1980) Intraovarian and *in vitro* pollination. International Reviews of Cytology, Suppl. B. 11: 137-156.

Zhang, J., Dong, W. H., Galli, A. és Potrykus, I. (1999) Regeneration of fertile plants from isolated zygotes of rice (*Oryza sativa*). Plant Cell Reports 19: 128-132.

Zhang, J., Friebe, B., Raupp, W. J., Harrison, S. A. és Gill, B. S. (1996) Wheat embryogenesis and haploid production in wheat × maize hybrids. Euphytica 90: 315-324.

Zhang, Z. és Russel, S. D. (1999) Sperm cell surface characteristics of *Plumbago zeylanica* L. in relation to transport in he embryo sac. Planta 208: 539-544.

Zheng, M. Y. (2003) Microspore culture in wheat (*Triticum aestivum* L.) – doubled haploid production via induced embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 73: 213-230.

Ziauddin, A., Marsolais, A., Simion, E. és Kasha, K. J. (1992) Improved plant regeneration from wheat anther and barley microspore culture using phenylacetic acid (PAA). Plant Cell Reports 11: 489-498.

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Bedő Zoltán[1] akadémikus professzornak, a MTA Mezőgazdasági Kutatóintézet igazgatójának, hogy lehetővé tette munkámat. Nagyon köszönöm Dr. Barnabás Beáta[1] akadémikus professzorasszonynak a kutatómunkához biztosított anyagi hátteret és a szakmai irányítást. Köszönöm Dr. Darkó Éva[1], és Tímár Ilona[1] és Szabó László[1] munkatársaknak a kutatásomat kiegészítő részfeladatokban nyújtott segítségét, valamint Ambrus Helga[1] és Dr. Jäger Katalin[1] munkáját. Külön köszönet illeti Dr. Lángné Dr. Molnár Mártát[1], Dr. Darkó Évát[1], Molnár Istvánt[1] és Dr. Takács Imrét[1] a hasznos szakmai tanácsokért, Fehér E. Mónikát[1], Gondos Erikát[1], Olasz Ildikót[1], Békné Kapral Emesét[1] és Keserű Jánosné Ilonát[1] a nélkülözhetetlen asszisztensi munkájukért, Fodor Szilviát[1], Szalay Évát[1] és a fitotroni csoportot az általuk nyújtott további segítségért. Köszönöm egyetemi oktatóim: Dr. Barnabás Beáta[1] professzorasszony, Dr. Gyurján István[2] professzor, Dr. Kristóf Zoltán[2], Dr. Bóka Károly[2], Dr. László Lajos[2], és az együttműködő partnerek: Dr. Adela Olmedilla[3], Dr. Amada Pulido[3], dr. Mitykó Judit[4] segítségét a kutatáshoz szükséges tananyag és technikák elsajátításában.

Hálás köszönettel tartozom szüleimnek, akik eljuttattak oda, hogy kutatómunkát végezhessek. Legnagyobb köszönetem pedig feleségemet, Bakos-Kiss Enikőt illeti, aki odaadó szeretetével és segítségével mindent megtett, hogy munkámat a lehető legkönnyebben végezhessem.

1. MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete, Martonvásár
2. ELTE-TTK, Növényszervezettani Tanszék, Budapest
3. Deptartment of Plant Biochemistry, Cell and Molecular Biology, Estación Experimental del Zaidín, (CSIC), Granada, Spanyolország
4. Mezőgazdasági Biotechnológiai Központ, Gödöllő

10. Összegzés

A dolgozatban ismertetett munka elsődleges célja az volt, hogy az izolált búza zigótákat dajkasejtek segítségével hatékonyan felneveljük az egy-sejt tenyésztési rendszerben, és az *in vitro* tenyésztett zigóták fejlődését sejt- és szövettani szinten összevessük az *in planta* fejlődési úttal. A tenyésztési rendszer első adaptált változatával a zigóták 20, majd a technika továbbfejlesztését követően 59 %-ából neveltünk fel fertilis növényeket. Dajkasejtekként árpa és búza izolált mikrospóra tenyészeteket, ill. a búza fiatal termőit használtuk eredményesen. Az egyszerűen tenyészthető termők segítségével a zigóták *in vitro* felnevelését egy kevésbé munkaigényes módszerrel is lehetővé tettük. Az *in vitro* embriófejlődés a zigóták szimmetrikus osztódásával kezdődött, ami különbözik a növényben megfigyelhető aszimmetrikus kezdeti osztódástól. A további random síkú sejtosztódások eredményeként globuláris proembriószerű struktúrák fejlődtek. Ezt követően az *in vitro* fejlődő embriók morfológiája esetenként megegyezett az *in planta* embriókéval, legtöbbször azonban e struktúrák olyan kallusz-szerű sejtekből álló szöveteket is tartalmaztak, melyek vélhetően az *in planta* endospermiumhoz hasonlóan tápláló és raktározó funkciójúak. Fontos, hogy az *in vitro* fejlődő struktúrák merisztémája egyik esetben sem kalluszosodott el, hanem a zigóta állapottól kiindulva folytatólagosan jelen volt. Mindez hasonló a növényben megfigyelhető állapothoz.

Az egy-sejt technika segítségével a búza × kukorica megporzást követően a zigótákat kimenekítettük és haploid növényekké neveltük, miközben nyomon követtük *in vitro* fejlődésüket. Megállapítottuk, hogy bár a búza × kukorica zigóták első osztódásai a búza proembriókhoz képest szabálytalanabb struktúrákat eredményeznek, ezt követő fejlődésük a búza embriókkal azonos morfológiát mutat. Kísérleteink során az eredeti módszerrel összevethető gyakorisággal neveltünk fel haploid növényeket, de az egy-sejt tenyésztés továbbfejlesztett változatával valószínűleg növelhető a „zigótamentés” hatékonysága.

A búza × rizs megporzások esetében a klasszikus embriómentési technika nem vezetett eredményre, utódnövényeket kizárólag az általunk továbbfejlesztett egy-sejt tenyésztéssel lehetett felnevelni. A kimentett petesejtek csak igen hosszú idő alatt osztódtak, amennyiben erre egyáltalán képesek voltak. A petesejtek egy része tahát aktiválódott a rizs hatására, de kezdeti fejlődésük zavart szenvedett. Az *in vitro* fejlődés későbbi szakasza már közelebb állt a búza embriókéhoz. A felnevelt utódnövények között előfordultak a hexaploid és a monoploid búza genomméretéhez hasonló DNS-tartalmú, ill. fertilis, részben fertilis és steril egyedek is. E növények genetikai hátterének felderítéséhez azonban további vizsgálatok szükségesek.

11. Summary

The main purpose of this study was to establish an efficient single-cell culture system for growing plants from isolated zygotes and to compare their *in vitro* development with that *in planta*. Isolated microspore cultures of barley and wheat and solely cultured immature wheat pistils proved to be efficient as nurses for the isolated zygotes. Since wheat pistils are easy to culture, the single-cell culture system has been simplified by their use. Using the original method, 20 % of the wheat zygotes grew into plants, but this ratio has now been improved as much as 59%. Contrary to the asymmetrical division of the zygotes *in planta*, the first few cell divisions *in vitro* were symmetrical. The subsequent divisions were randomly directed and globular proembryo-like structures developed. Subsequently, some embryos showed morphology very similar to that of embryos *in planta*, but, others also contained a callus domain, presumably as a compensation for the lack of endosperm. Meristems were continuously present from the zygote stage and did not become callogenic in any structures developing *in vitro*. This situation is similar to that observed *in planta*.

With the use of single-cell cultures, activated egg cells resulting from wheat × maize pollinations were rescued and grown into haploid plants. The *in vitro* development of these cells was monitored. The developing structures were atypical compared to *in vivo* proembryos presumably as a consequence of the disturbance in cell polarisation, but later their development resembled that observed *in vivo*. The first version of the single-cell culture technique allowed us to obtain haploid plants with a frequency comparable to that of the original method of embryo rescue. With the improved version of the single-cell technique, however, the efficiency of this "zygote rescue" technique might be expected to increase.

Wheat was also pollinated with rice, but the classical embryo rescue technique did not lead to any plant progeny. Plants were only obtained if these "activated egg cells" were rescued and grown in single-cell cultures. Some of the rescued cells were activated, but an extremely long time was needed before they completed their first division, if they divided at all. The later developmental phases bore a greater resemblance to the *in planta* situation. The resulting plants included fertile, partially fertile and sterile individuals, the tillers of which had genome sizes corresponding to that of hexaploid and monoploid wheat. The genomic composition of these plants, however, needs to be clarified in order to determine, whether gene transfer is possible from rice into wheat, or whether the elimination of the paternal rice genome is complete.