

DEBRECENI EGYETEM
Agrár-és Műszaki Tudományok Centruma
Mezőgazdaságtudományi Kar
Földhasznosítási, Műszaki és Területfejlesztési Intézet

INTERDISZCIPLINÁRIS AGRÁR- ÉS TERMÉSZETTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Doktori Iskola vezető:
Prof. dr. Nagy János
MTA doktora

Témavezetők:
Prof. dr. Barnabás Beáta
MTA levelező tagja
Prof. dr. Nagy János
MTA doktora

***IN VIVO, IN VITRO* KÖRNYEZETI TÉNYEZŐK HATÁSÁNAK
VIZSGÁLATA FŐBB TERMESZTETT NÖVÉNYEINK IVAROS
NEMZEDÉKÉNEK FEJLŐDÉSÉRE**

Készítette:
Timár Iлона
doktorjelölt

Debrecen
2007

**IN VIVO, IN VITRO KÖRNYEZETI TÉNYEZŐK HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA
FŐBB TERMESZTETT NÖVÉNYEINK IVAROS NEMZEDÉKÉNEK
FEJLŐDÉSÉRE**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az **Agrártudományok** tudományterületén
Növénytermesztés és Kertészet tudományágban

Írta: Timár Ilona doktorjelölt

A Doktori Iskola neve: Interdiszciplináris Agrár- és Természettudományok Doktori Iskola

A Doktori Iskola vezetője: Prof. dr. Nagy János az MTA doktora

Témavezetők: Prof. dr. Barnabás Beáta az MTA levelező tagja

Prof. dr. Nagy János az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

| | Név | Tud. fokozat |
|--------|-------|--------------|
| Elnök: | | |
| Tagok: | | |
| | | |

A doktori szigorlat időpontja: 200.....

A bíráló bizottság:

| | Név | Tud. fokozat | Aláírás |
|----------|-------|--------------|---------|
| Elnöke: | | | |
| Tagjai: | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| Titkár: | | | |
| Bírálói: | | | |
| | | | |

Az értekezés védésének időpontja: 200.....

**„Ha egy szép élet vágyát őröd, / a múlttal nem szabad törődnöd, /
s mindig úgy tégy, ha veszteség ér, /minthogyha újjászülden élnél; /
Mit akar? - kérdd meg minden nap, / és minden nap felel majd
akkor: /**

**Tetteidnek tudjál örülni, / más tetteit tudd megbecsülni; Főként
ne gyűlölj egy embert se, / s a többit hagyd az Úristenre.”**

Goethe

TARTALOMJEGYZÉK

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. BEVEZETÉS | 6 |
| 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS | 9 |
| 2.1. Gabonafélék hím és női gametofitonjának szerveződése természetes és mesterséges környezetben | 9 |
| 2.1.1. A hím ivaros nemzedék kialakulása, a mikrospórák sporofitikus és gametofitikus fejlődése <i>in vitro</i> | 10 |
| 2.1.2. A női gametofiton kialakulása a növényben, fejlődése <i>in vitro</i> környezetben | 12 |
| 2.1.3. A pollen és az embriózsák kialakulása a növényben optimális és stressz környezetben | 13 |
| 2.2. A búza embriózsákjának és a petesejt érésének, szerkezetének citológiai és ultrastrukturális vizsgálata | 16 |
| 2.3. A kukorica mikrospórák embriogenezise | 19 |
| 2.4. <i>In vitro</i> környezet hatása a gametofitonok normális fejlődésére és funkcióképességére | 21 |
| 2.5. A szőlő virágának fejlődésdinamikája | 22 |
| 2.5.1. Szőlőtermesztés és nemesítés főbb állomásai | 22 |
| 2.5.2. A szőlőnemesítés új technikái | 23 |
| 3. A VIZSGÁLATOK ANYAGA ÉS MÓDSZERE | 26 |
| 3.1. Az eltérő környezetben fejlődött hím és női gametofiton jellemzése és a fejlődés során végbement változások morfológiai, ultrastrukturális vizsgálata | 26 |
| 3.2. A vizsgálatokban felhasznált növények | 26 |
| 3.3. Módszerek | 27 |
| 3.3.1. A kísérleti növények nevelése | 27 |
| 3.3.2. A mikrospórák fejlettségi állapotának meghatározása, megfestésük | 28 |
| 3.3.3. A növények kasztrálása | 29 |
| 3.3.4. Megporzás | 29 |
| 3.3.5. Búzakalászkok és kukoricacímerek sterilizálása | 29 |
| 3.3.6. <i>In vitro</i> kultúrák | 29 |
| 3.3.7. Mintavételek, vizsgálatok | 30 |
| 3.3.8. Szövetteni vizsgálatok | 36 |
| 3.3.9. Elemzés, dokumentálás | 39 |
| 4. EREDMÉNYEK | 40 |
| 4.1. Három <i>Triticum</i> faj pollenjének és embriózsákjának kialakulása optimális és stressz környezetben | 40 |
| 4.1.1. <i>Triticum</i> fajok pollenfejlődésének összehasonlítása | 40 |
| 4.1.2. <i>Triticum</i> fajok embriózsákjának összehasonlítása, alak- és méretváltozása a fejlődés, érés során | 43 |
| 4.2. A búza gametofitonjainak fejlődési szinkronja | 45 |
| 4.2.1. A ploidszint és a genotípus hatása a hím és a női gametofiton fejlődésének szinkronítására | 45 |
| 4.2.2. A <i>Triticum</i> faj fiatal embriói | 54 |
| 4.3. A hexaploid búza petesejt és pollen érésének vizsgálata | 58 |
| 4.3.1. A hexaploid búza petesejt érésének citológiai értékelése és ultrastrukturája | 58 |
| 4.3.1.1. A petesejtek, a sejtmagok méretváltozása az életkoruk függvényében | 58 |
| 4.3.1.2. A petesejtek strukturális vizsgálata a hexaploid Chinese Spring búzafajtánál | 61 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.3.1.3. A petesejtek ultrastruktúrája | 64 |
| 4.3.2. A Chinese Spring hexaploid búzafajta érett pollenjének vizsgálata | 67 |
| 4.4. Kukorica mikrospóra embriogenezis | 69 |
| 4.4.1. Ultrastrukturális megfigyelések | 72 |
| 4.4.2. Az ubiquitin immunolokalizációja fénymikroszkópos úton | 74 |
| 4.5. A szőlő gametofiton fejlődésdinamikája | 80 |
| 4.5.1. Szőlő pollen és termő vizsgálat | 80 |
| | |
| 5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK | 91 |
| | |
| 6. ÖSSZEFOGLALÁS (SUMMARY) | 93 |
| | |
| 7. IRODALOMJEGYZÉK | 102 |
| | |
| 8. FÜGGELÉK | 119 |

1. BEVEZETÉS

Hazánkban a mezőgazdasági növények termésbiztonságát nagymértékben befolyásolják a különböző biotikus és abiotikus környezeti tényezők. A termésbiztonság az egyik fő alappillére a termesztés gazdaságosságának, amely a mezőgazdaságilag fontos növényfajoknál a vetőmagtermesztésben is jelentős célkitűzés. A vetőmagtermesztés közvetlen kapcsolatban áll a virágzásbiológiával, mint alaptudománnyal. A zárvatermő növények ivaros szaporodása, egyedfejlődése az ivarsejtek fúzióján alapul, az új sporofiton nemzedék életciklusa a kettős megtermékenyítéssel kezdődik. Ezért a szaporodásbiológiával kapcsolatos kérdések közvetlenül érintik a vetőmagtermesztés alapjait, kiemelt kutatási területnek számítanak. Fontos gazdasági növényeink genetikai diverzitásának növelése a növénynemesítési kutatások egyik alapvető célja, melynek megvalósítására a hagyományos genetikai, embriológiai módszerek és az *in vitro* manipulációs technikák együttes alkalmazása nagy esélyt ad.

A változó környezeti hatásoknak, pl. extrém időjárási változásoknak kitett növények egyedfejlődésük generatív szakaszában igen érzékenyen reagálnak elsősorban terméscsökkenéssel a különböző abiotikus stresszhatásokra. Ezért célszerű megvizsgálni és részletesen megismerni azokat a kritikus fázisokat a hím és női gametofiton fejlődésében, melyek a legsérülékenyebbek és ezáltal nem kívánt terméskiesés következhet be. A növények generatív fejlődésére hatással van a környezet, mint bonyolult komplexum, ennek közvetlenül és közvetve érvényesülő tényezőivel. Kutatási eredmények igazolják, hogy a termesztési tényezők hatásai nem függetlenek egymástól, a pozitív kölcsönhatások együttes változtatása bizonyos arányban termésnövelő.

A környezeti hatások laboratóriumi körülmények között célirányosan is tervezhetők (pl. mesterséges növénynevelési technikák igénybevételével). Az un. *in vitro* környezet lehetőséget teremt az egyedfejlődési, differenciálódási folyamatok jobb nyomonkövetésére és a különböző környezeti tényezők hatásának direkt vizsgálatára.

A növényi szervezetbe vagy az abból származó, *in vitro* tenyésztett sejtekbe történő beavatkozások akkor lehetnek eredményesek, ha azokat célirányosan, az egyedfejlődés, ill. a növényi sejtciklus megfelelő fázisaiban hajtjuk végre. Az utóbbi években a mikroszkópos technikák, valamint a sejt- és szövettenyésztési módszerek fejlődése nagymértékben hozzájárultak a növényi ivaros folyamatokról alkotott és morfológiai

megfigyelésen alapuló ismereteink bővítéséhez, megteremtve az *in vitro* beavatkozások lehetőségét.

A növényi ivaros folyamatokról rendelkezésünkre álló ismeretek alapvető információként szolgálnak napjainkban a kísérletes szaporodásbiológia egyik fontos területét képező *in vitro* fertilizációs kutatásokhoz is. Izolált hímivarsejtek és petesejtek összeolvasztásával életképes utód hozható létre és ez elvileg lehetővé teszi hibridek előállítását is a búza és rokon fajai között, a protoplasztfúzióhoz hasonló gametoplasztfúzióval.

A beavatkozás szempontjából nem elhanyagolható annak vizsgálata, hogy milyen fiziológiai állapotú sejtek alkalmasak az *in vitro* fúzióra. A fajok közötti *in vitro* ivarsejtfúzió megvalósításához részletes információra van szükség az egyes *Triticum* fajok pollen- és embriózsák fejlődési folyamatairól természetes körülmények között *in situ*, valamint *in vitro*. A két ivar fejlődés-szinkronitásának ismerete lehetővé teszi a gaméták megfelelő időpontban és a fúzióra alkalmas kondícióban történő izolálását, mely a fúzió hatékonyságának egyik legfőbb kritériuma.

Napjainkban a nemesítési gyakorlat részéről nagy igény van életerős dihaploid, antéra, illetve mikrospóra kultúrából származó dihaploid vonalak előállítására a nemesítés genetikai bázisának kiszélesítése és a vonalelőállítás idejének lerövidítése érdekében. A Martonvásáron létrehozott génbankban a magas androgenetikus kapacitású exotikus kukoricák genotípusai használhatók genetikai forrásként. A magas indukciós képességet mutató genotípusok antérakultúrájában számos mikrospóra eredetű struktúra formálódik, amelyeknek csupán egy része képes fertilis növényre fejlődni. A zigotikus, illetve androgenetikus embriogenezis, valamint a kallogenezis tanulmányozását célzó összehasonlító morfológiai vizsgálatokkal kívánjuk feltárni az *in vitro* környezetben lejátszódó folyamatok jellemző sajátosságait, hogy ismeretükben javítani tudjuk a haploidindukció hatékonyságát és lehetővé tegyük a módszer gyakorlati alkalmazását.

A hazai minőségi bortermelésünk világpiacon elfoglalt rangos helye indokolja a szőlővel végzett kutatások jelentőségét. A kutatások vizsgálati eredményei olyan - a szőlőben új - biotechnológiai módszerek kidolgozásához nyújtanak alapokat, melyek segítségével a szőlőnemesítés, elsősorban a rezisztenciára történő nemesítés rövidebbé és hatékonyabbá tehető. A célok között szereplő új technikai megoldások kifejlesztésével és a haploid technikákkal olyan növények állíthatók elő, melyek a korszerű molekuláris genetikai módszerekkel lehetővé teszik fontos tulajdonságok - különböző kórokozóval szembeni rezisztencia, a fajták biotikus, abiotikus

stressztolerancia – genetikai alapjainak vizsgálatát. A két borszőlő genotípuson végzett vizsgálataink kiterjedtek a szőlő hím és női gametofitonjának tanulmányozására.

Fontos gazdasági növényeinkkel végzett kísérletes szaporodásbiológiai kutatásaink; az ivaros folyamatok egyes szakaszainak részletes feltárása és mesterséges (*in vitro*) környezetbe helyezése nagymértékben hozzájárulhat a vetőmagtermesztés alapjairól alkotott ismereteink kiszélesítéséhez és az ivaros nemzedékek, növényi gaméták biotechnológiai célú felhasználásához.

Kutatási céljainkat a következőkben foglaltuk össze:

1. Különböző genomösszetételű és eltérő ploidszintű *Triticum* fajok hím és női gametofitonja differenciálódásának nyomonkövetése *in vivo* és *in vitro* környezeti körülmények között.
2. A búza hím és női gametofiton fejlődési szinkronviszonyának feltárása. Ennek ismeretében egy közvetett vizsgálati módszer segítségével a búza női gametofiton fejlődési fázisának meghatározása.
3. A búza petesejt *in planta* fejlődésének tanulmányozása az embriózsák érése során.
4. Az izolált búza petesejt morfológiai és funkcionális jellemzése a fiatal állapottól az öregedésig fény és elektronmikroszkópos vizsgálattal.
5. A *Triticum* fajok *in planta* fejlődött fiatal embrióinak jellemzése térfogatuk alakulása, valamint morfológiai sajátásaik alapján. Az eredmények segítséget nyújtanak az *in vitro* fertilizáció során mesterségesen létrehozott interspecifikus, intergenerikus embriók tanulmányozásához.
6. A hidegkezelést kapott kukorica mikrospóra embriogenezisének tanulmányozása fény és elektronmikroszkóp segítségével.
7. A szőlővirág fejlődésdinamikájának megismerése, a hím és a női gametofiton fejlődési állapotának meghatározása, jellemzése.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Gabonafélék hím és női gametofitonjának szerveződése természetes és mesterséges környezetben

A gabonák közül a búza és a rozs virágzásának és megtermékenyülésének tanulmányozásáról, a virágzást és termékenyülést befolyásoló tényezők hatásairól már a múlt század elején beszámolt Obermayer (1918) megemlítve, hogy az akkor rendelkezésre álló külföldi adatok mennyiben igazolódtak be a mi viszonyaink között, mennyiben hiányosak vagy ellenkeznek tapasztalatainkkal.

A fent idézett munka megállapítja, hogy:

- a virágszervek, főleg a hím részek minőségének nagy befolyása van a termékenyítésre,
- a termékenyülésre a női ivarszervek minősége is befolyással van,
- az időjárási viszonyok behatása az egyes virágra éppúgy megnyilvánul, mint a virágzás általában való folyására. Kedvezőtlen az alacsony hőmérséklet, azonkívül a némely évben a már beálló nagy hőség,
- a magfejlődés elakadásának kérdése nem a termékenyülés sikertelenségén múlik, hanem bizonyos korlátok közt ez inkább táplálékkérdés,
- a jó vagy rossz termékenyülés elsősorban öröklődő fajtulajdonság.

Ugyancsak természetes körülmények között végzett részletes vizsgálatról számolt be (Lelley et al. 1955). A búza pollen kialakulását és fejlődését, a petesejt és az embriószák differenciálódását, az embrió fejlődését leírva hangsúlyozza, hogy a természetes fejlődés gondos tanulmányozásából meríthetők az ismeretek, melyek lehetővé teszik olyan modern módszerek kidolgozását, amelyekkel leghatásosabban avatkozhatunk be a szaporodási folyamatokba növénynemesítési célból.

A növénynemesítés célja és fontos feladata a fajták hozamának és a termés minőségének folyamatos javítása. Ezt a növények ivaros folyamatainak alapuló klasszikus módszerek és a modern biotechnológiai eljárások (szövettenyésztés, géntranszformáció, *in vitro* fertilizáció) integrációjával valósíthatjuk meg, és ehhez alapvetően szükséges a növények különböző egyedfejlődési ciklusainak részletes ismerete (Barnabás et al. 1988b).

2.1.1. A hím ivaros nemzedék kialakulása, a mikrospórák sporofitikus és gametofitikus fejlődése *in vitro*

A hím ivaros nemzedékkel, a pollennel kapcsolatos komplex (genetikai, fiziológiai és biotechnológiai) kutatások közel egy évtizedes stagnálást követően az 1980-as években újra a tudományos érdeklődés középpontjába kerültek és számos, a gyakorlat számára is érdekes kérdést hoztak felszínre (Barnabás et al. 1988a).

A zárvatermőkhöz tartozó gabonafélék hím gametofitonja kialakulása *in vivo* környezetben, egyetemi tankönyvekből ismert folyamat: a loculamentum belsejét kitöltő sporogén szövetből kialakuló mikrospóra-anyasejt redukciós osztódásával létrejön a tetrad, amely négy haploid egymagvú mikrospórából áll. A mikrospórák további fejlődése, a mikrogametogenezis, melynek folyamán két egymást követő mitotikus osztódással három-sejtes, a kettős megtermékenyítésre alkalmas pollenszemek alakulnak ki (Nawaschin 1898). A mikrosporogenezis és a mikrogametogenezis pontos és részletes ismerete azért is fontos, mert a folyamat kezdetén a fejlődés sporofitikus irányba terelhető, amely lehetővé teszi az *in vitro* androgenezist és a pollenhaploidok előállítását (Dudits – Heszky 2000).

Fejlődésük korai szakaszában *in vitro* környezetbe helyezett mikrospórák, a normális gametofitikus fejlődésüktől eltérően, ismételt osztódások révén különböző soksejtes struktúrákat (kalluszokat és proembriókat) hoztak létre, melyekből életképes haploid növényeket sikerült nagy számban regenerálni. A mesterséges körülmények közötti portoktenyésztéssel kapcsolatos kutatások az 1930-as években kezdődtek el. A kutatások célja először a mikrosporogenezis és mikrogametogenezis vizsgálata volt *in vitro*. La Rue (1952) ismertette néhány nyitvatermő faj pollenjéből eredő szövetszerveződéséről szóló vizsgálatait. Közel tíz év elteltével Guha et al. (1964) számolt be elsőként arról, hogy portokkultúrában pollenből nagyszámú haploid embrioidot, növényt tudtak felnevelni. Ezt követően napjainkra már 300 növényfaj fiatal pollenjéből sikerült haploid kalluszt, embriót, és azokból növényeket előállítani *in vitro* androgenezis indukció útján (Ouyang et al. 1973, Raghavan 1986). Az androgenezist kiváltó indukció valamilyen abiotikus stressz lehet (Touraev et al. 1997), mely a mikrospórák esetében jelenthet többhetes hidegkezelést, több napos éheztetést, magas hőmérsékleti stresszt, melynek hatására az eredetileg gametofitikus genetikai

program átkapcsol az *in vitro* környezetben túlélést biztosító sporofitikus fejlődési programra.

Az egysejtmagvú búza mikrospóra táptalajra oltva androgenetikus fejlődése során *in vitro* környezetben a sorozatos osztódással soksejtes pollenszemmé alakul. A soksejtes pollenből közvetlenül embriogenezissel vagy közvetve, kalluszfázison át szomatikus embriogenezissel vagy organogenezissel regenerálhatók a haploid növények. Heszky et al. (1986) kísérletében rizs portokkultúrában a regenerálódó növények 90%-a haploid volt. Ezt követően Heszky et al. (1991) rizs fajtajelölteket állítottak elő az un. pollenhaploid szomaklón eljárással, melyek közül egyet „Dama” néven 1992-ben fajtaként ismertek el (Heszky és Simon-Kiss, 1992). Androgenetikus haploidokat sikeresen állítottak elő búzánál és kukoricánál (Barnabás et al. 1987a, He et al. 1993). Barnabás et al. (1987b) ultrastrukturálisan is tanulmányozta a pollen embriogenezist kukoricánál, Szakács et al. (1988) pedig búzánál fluorescens mikroszkópos vizsgálatokat végzett. A Gabonatermesztési Kutatóintézetben Szegeden Pauk et al. (1988, 1997), Kertész et al. (1991) *in vitro* androgenetikus úton sikeresen állítottak elő dihaploid búza vonalakat.

Barnabás és munkatársai kolchicin kezelési módszert dolgoztak ki *in vitro* az egymagvas mikrospóra haploid kromoszómaszerelvényének megduplázására. A módszer alkalmazásával búza és kukorica dihaploid növények gyakoriságát lehetett növelni (Barnabás et al. 1991, Szakács et al. 1995, Barnabás et al. 1999).

Nagy előrelépést jelentett a pollen-biotechnológiai kutatások területén, a mesterséges környezetben életképes, termékenyítőképes pollen előállításának megvalósítása gabonaféléknél. Először kukoricával folytak pollenérlelési kísérletek címerkezdemény tenyészetekben (Heslop-Harrison 1972). A megfelelő táptalaj-összetétel meghatározását követően a korai címerkezdeményből, a meiózist követően a mikrospórákat táptalajra oltották, ettől számított 20. nap után három magvas pollenszemek kis gyakorisággal voltak megfigyelhetők (Polowick et al. 1981, Polowick-Greyson 1982). Később a gyakoriságot növelni tudták, de eddig még csak két genotípusnál kaptak biztató eredményt (Pareddy-Greyson 1985). Az *in vitro* tenyésztés során az *in vivo* körülményeknek megfelelően a mikrosporogenezis és a gametogenezis lassabban játszódik le, de a pollen kifejlődik (Pareddy-Greyson 1985). Az *in vitro* differenciálódott pollenszemek *in vivo* cső megporzása esetén megtermékenyítőképesek (Pareddy et al. 1987). Ez volt az első közlemény, mely *in vitro* érlelt pollenszemekből származó utódokról adott számot. Kiemelkedő jelentőségű lehet, ha az *in vitro* érett

pollen mélyhűtött állapotban tartósítva, mint pollenbankban tárolt pollen áll rendelkezésre. A kívánt időpontban megporzási célra, kísérleti anyagként különböző genetikai, biokémiai, biotechnológiai vizsgálatokra felhasználhatjuk (Barnabás 1988a, b).

Búza kalászká- és virágkultúrában sikerült középső- és kései- egymagvas állapotú mikrospórából normál hárommagvas polleneket beérlelni két tavaszi búzafajta virágkultúráiban (Barnabás et al. 1989, 1990, 1992, Kovács et al. 1992).

Lehetőség nyílt az *in vitro* pollenszelekcióra (Barnabás et al. 1986) és a pollen genetikai manipulációjára. Sikeresnek bizonyult kukorica pollenből izolálni életképes hímvarsejtet (Dupuis et al. 1987), valamint búzából életképes hím gamétákat, melyek rövid ideig voltak életképesek (Szakács et al. 1989). Ez a továbbiak során a növényeknél is megteremtette a mesterséges megtermékenyítések feltételeit, ezáltal a kontrollált utódelőállítást. Az izolált gaméták tenyésztése és mesterséges fuzionáltatásuk jelentős fejlődést jelentett a biotechnológia e területén.

2.1.2. A női gametofiton kialakulása a növényben, fejlődése *in vitro* környezetben

A gabonafélék női gametofiton fejlődése *in vivo* a következő módon megy végbe: a virágban a magház egy magkezdeményt (ovulumot) tartalmaz, így abban egy szemtermés fejlődik a kettős megtermékenyítést követően. A magkezdemény belsejében levő Polygonum típusú embriózsák kifejlődött állapotban 7 sejtes (8 sejtmagvas), a mikropile felől tartalmazza a haploid női petekészüléket, a petesejtet és a két szinergidát (Maheswari 1950). A kettős megtermékenyítéssel kialakul a zigóta, és az endospermium fejlődése is megkezdődik. A néhány sejtes proembrió állapotot követően az embriófejlődés a jellemző morfológiai stádiumokon keresztül halad. Ezt szövetdifferenciálódás kíséri és a folyamat vége a csírázóképes embrió. Az embrió a sziklevélen vagy scutellumon fekszik a koleoptil által fedett rügyecskével, és a koleorrhiza fedte gyököcskével (Percival 1921, Lelley et al. 1955, Dudits et al. 2000).

A makrogaméták vagyis a női ivarsejtek *in vitro* fejlődésének vizsgálata, érlelése, tenyésztése, izolálása, termékenyítése, a belőlük fejlődő embriók tenyésztése szintén fontos biotechnológiai szempontból. A vizsgálatok során le kell küzdeni azt a nehézséget, hogy a gametofitikus sejtek a növény termőjében rendszerint szövetek által jól körbevéve, beágyazódva helyezkednek el.

A virágtenyésztés a virágkezdemények vagy virágok izolálását, fejlődésük fenntartását, illetve befolyásolását jelenti táptalajon, steril, klimatizált feltételek között, e területen Galun et al. (1962) által vezetett kutatások, valamint az 1970-es évek közepétől Heslop-Harrison et al. (1972), Evans et al. (1983) munkái elismerést érdemelnek. A fejletlen virágrügyeket kipreparálták és táptalajra helyezték. A táptalajok kidolgozásában Nitsch (1951) és White (1954) értek el eredményeket. Napjainkban az alkalmazás során mesterségesen befolyásolni képesek például zöldségnövényeknél a hím és nővirágok arányát így növekedik a terméshozam üzemi szinten.

Az ovarium és ovulum tenyésztés területén elért eredmények (Maheshwari 1958) hozzájárulhatnak ahhoz, hogy faj- és nemzetségkeresztezéssel olyan hibrideket hozzanak létre, melyek például az inkompatibilitás okán *in vivo* nem állíthatók elő. Rédei (1955) sikerrel alkalmazta *Triticum* fajkeresztezései során ezt a tenyésztési módszert és gabona embriókat nevelt fel *in vitro*.

Az elmúlt néhány évben több laboratóriumban kidolgozásra került a hímivarsejtekhez hasonlóan a női ivarsejtek *in vitro* izolálási technikája. Míg néhány faj esetében lehetőség nyílt életképes spermasejtek izolálására (Russel 1991, Theunis et al. 1991, Chabould et al. 1992), addig sokkal korlátozottabb volt azon fajok száma, ahol sikerült petesejtet élve izolálni (Kranz 1991, Kovács et al. 1994, Dumas et al. 1995, Kristóf et al. 1996). A magasabbrendű növények gamétáinak izolálása és az ivarsejtek *in vitro* folyékony közegben történő fuzionáltatása, és ezt követően növényé történő felnevelése csupán néhány éve sikerült Lörz és kutatócsoportjának, Kranz et al. (1991a, b). További eredményekről számoltak be Kranz et al. (1993, 1994, 1995, 1996) is. Az ELTE Növény szerzettani Tanszékén (Kristóf et al. 1996, Imre et al. 1999) kutatásokat folytattak búza, napraforgó és Torénia női ivarszervéből az embriózsákok, illetve azt alkotó sejtcsoportok izolálásával, a sikeres ivarsejtfúzió feltételeinek megteremtésére.

2.1.3. A pollen és az embriózsák kialakulása a növényben optimális és stressz környezetben

A *Triticum* nemzetségbe tartozó búzafajok és fajták nagy gazdasági jelentőségük mellett agronómiai szempontból fontos gének forrásának tekinthetők (pl. a *T. araraticum* Jakubz. számos betegséggel szemben ellenálló). A vad fajoknak a nemesítésben is fontos szerepük van, mivel a ma termesztett fajtáinknál toleránsabbak számos

stressztényezővel szemben. A *Triticum* nemzetség három különböző ploidszintű fajának a *Triticum aestivum* L., *Triticum araraticum* Jakubz., és a *Triticum monococcum* L. gametofiton fejlődését vizsgálta különböző növénynevelési körülményekben Barnabás et al. (1997).

A mezőgazdasági szempontból jelentős gabonafajok virágzásbiológiájáról, a hím és női gametofitonok szerveződéséről több szerző közölt már adatokat. Főként a virágzás dinamikáját, a pollen életképességét, a termő receptivitását és az ivaros nemzedékek struktúráját illetően (Obermayer 1918, Percival 1921, Randolph 1936, Gorin 1953, Rajki 1961, Jensen 1974, You et al. 1985, Hause et al. 1987, Cass et al. 1985, Tian et al. 1992).

A pollen mérete és a ploidszint közötti összefüggést vizsgálták árpanál (Johansen et al. 1994). Megállapították, hogy a pollen mérete emelkedik a ploidszint növekedésével. Búzánál 5 fajt vizsgált Maksimov (1972). A *T. aestivum*, *T. durum*, *T. spelta*, *T. dicoccum*, *T. monococcum* esetében kijelentette, hogy a genomszám növekedésével a pollenszemek mérete növekszik és a mennyiség pedig csökken. A ploidszint hatása mellett célszerű volt megvizsgálni a szilárd fázisú *in vitro* gamétaérlelési módszerben (Barnabás et al. 1990, 1992) a genotípus szerepét (Kovács et al. 1993). Eredményeik szerint jelentős genotípus hatások tapasztalhatók. Az *in vitro* érlelt pollenpopuláció citológiai vizsgálatai alapján kimutatható csökkenés volt az életképességben és a minőségi jellemzőkben, miszerint a virágpor populációk homogenitása eltűnt. A vizsgált genotípusok elegendő számú virágport termeltek a sikeres megtermékenyítéshez, mégis a szemkötés alacsony volt. Az *in vitro* tenyésztés stresszkörülményei valószínűleg negatívan befolyásolták a női gametofitonok fejlődését, és feltehetően komoly szelekciós nyomás nehezedett a női ivarra is. Mindez részben a női ivarszerv működési zavaraira utalt. Az így fejlődött szemek normális felépítést mutattak, többségükben kicsíráztak táptalajon annak ellenére, hogy a szemek összezsugorodtak a száradás után, mivel az endospermium nem telítődött teljesen.

Wardlaw et al. (1989a, b) búzán végeztek vizsgálatokat széleskörű földrajzi és genetikai háttérrel, mely során 66 fajtán a hőstressz indukálta szemkötésben és szentelítődésben megnyilvánuló változásokat figyeltek meg. A hőstresszt (30/25°C) a fejlődés három időpontjában alkalmazták: a zászlóslevél kifejllettségekor, az antézis idején (pollenkiszóródás, megtermékenyülés), szemnövekedés során (hat nappal az antézis után). A széles genetikai variációt mutató fajtaszortimentben 30-35%-os szemsúlycsökkenést tapasztaltak a magas hőmérséklet hatásaként a 18/13°C-os kontroll

növényekhez viszonyítva. Berzy et al. (1998) kukoricával végzett fitotroni modellkísérletükben azt állapították meg, hogy a kukorica virágzásakor alkalmazott hő- és szárazságstresszre a vizsgált genotípusok válaszreakciója eltérő, a rövidebb tenyészidejűeknél a hímvirágzás időszaka tíz nappal, a nővirágzás hat nappal, míg a hosszabb tenyészidejűeknél 13, ill. 10 nappal rövidült le. A gametofitonok fejlődési állapotára, időbeli lefolyására és az egyes állapotok időtartamára az abiotikus környezeti tényezők (főként a hőmérséklet) mellett a genotípusnak is hatása van Pope (1943), Bennett et al. (1972).

A környezeti kölcsönhatások együttes értékeléséről ad számot kukorica termesztési kísérletében Nagy (1995). Kutatási eredményei igazolták, hogy a termesztési tényezők (talajművelés, műtrágyázás, öntözés, növényszám) hatásai nem függetlenek egymástól. Bizonyították, hogy az öntözés x műtrágya és a növényszám x műtrágya kölcsönhatás pozitív, ezért a termesztési színvonal megválasztásakor vagy megváltoztatásakor mindhárom tényezőt egyszerre kell változtatni. A pozitív kölcsönhatású tényezők együttes változtatása termésmnövekedést eredményezett. Kimutatták, hogy az egyes növénytermesztési tényezők a termésmnövekedéshez a következő arányban járultak hozzá: műtrágyázás 48%, öntözés 28%, talajművelés 18%, és a növényszám 6%. A hőmérsékletnek különösen a búza fertilizációját befolyásoló hatását állapította meg Hoshikawa (1960) eltérő nitrogénszintek alkalmazása mellett.

Az *in vitro* fertilizációs kutatásokkal (Kranz et al. 1991, 1992, Kovács et al. 1995) kapcsolatosan is felmerült az igény a hím és női gametofiton fejlődési szinkronviszonyainak tanulmányozására különböző *Triticum* fajoknál, eltérő környezetben, tekintettel arra, hogyan lehet időben biztosítani az érett termékenyítésre és megtermékenyülésre képes fuziogén ivarsejteket. Bennett (1973) részletesen vizsgálta a sejtek fejlődését az antérán és az embriózsákon belül *T. aestivum* L. var. Chinese Spring tavaszi búzafajtában.

A hím és nővirágzás szinkronizációjának gyakorlati fontossága nyilvánul meg a szántóföldi vetőmagtermesztésben (Berzy et al. 1994a, b, 1998), amikor is az apasorok hímvirágzásidejének, valamint az anyasorok nővirágzásidejének megegyezése esetén érnek el kiváló biológiai értékű és megfelelő mennyiségű hibridkukorica-vetőmagot.

A megtermékenyítés után a zigóta és néhány sejtes proembrió izolálását végezték el sikeresen árpanál és búzánál (Töpfer et al. 1985, Comeau et al. 1992). Kukorica megtermékenyített embriózsákjából (Mol et al. 1993) változatos méretű és formájú embriókat izoláltak két hét után, melyeket hormonmentes táptalajra helyeztek.

Továbbiakban nagyszámú embriónál organogenezist figyeltek meg, de a legtöbb embriónak csak gyökere képződött és csupán kis számú embrióból regenerálódott növény. Az eredményes tenyésztési módszer nem csak az un. 'embryo rescue' munkákra és a fejlődés tanulmányozására kitűnő, de genetikai manipulációk végzésére is (Neuhaus et al. 1991). A búza és az árpa intergenerikus hibridjeinek előállításakor (Molnár-Láng et al. 1994) megállapítja, hogy az embrió mérete a hőmérséklet mellett szintén nagymértékben befolyásolja a sikeres csírázást. Az 1,5 mm hosszúságú, árpa x búza és az 1,0 mm hosszúságú, búza x árpa keresztezésből létrejött embriók bizonyultak sikeresnek. A legkisebb embrió mérete 0,57 mm, árpa x búza valamint 0,51 mm, búza x árpa volt, melyből növényt neveltek fel.

2.2. A búza embriószákjának és a petesejt érésének, szerkezetének citológiai és ultrastrukturális vizsgálata

A magasabb rendű növényekre jellemző megtermékenyítési forma a kettős megtermékenyítés, ahol a pollentömlőn keresztül az embriószákba jutó spermasejtek a petesejttel, illetve a központi sejttel történő fúziójaként létrejön az embrió és az endospermium. Ezt a megtermékenyítési módot Nawaschin (1989) elsőként írta le, Russel (1992) kihasználva a mikroszkópi technikák fejlődését további vizsgálatokat folytatott. Szintén mérföldkőnek tekinthető a transzmissziós elektronmikroszkóp alkalmazása a virágos növények embriogenezisének tanulmányozásában az 1960-as évek kezdetén Jensen et al. (1968, 1970, 1973, 1974) vizsgálatai során bizonyossá vált az, hogy nem generatív sejtmagokról, hanem sejtekről van szó és a spermasejtek is valódi sejtek. Megfigyelték azt is, hogy a generatív sejtek osztódását követően a hímivarsejtek kialakulásuk után együtt maradnak. Jensen et al. (1973, 1974) kimutatta, hogy a petesejtet *in vivo* körülfogó két szinergida funkcionális sejt, melyeknek a megtermékenyítés során van lényeges szerepük, ez az az egység, amelyet „petekészülék”-nek neveznek. A transzmissziós elektronmikroszkópos technikára épülő, valamint a modern komputer technika és programok segítségével előállított térbeli rekonstrukciók vezettek a „megtermékenyítő egység” (male germ unit) koncepciójának megalkotásához, amely a spermasejteket és a vegetatív magot, az ivarsejt transzportot, a sejtfelismerést és fúziót lehetővé tevő egységnek tekinti (Dumas et al. 1984, Mogensen 1992, Russel 1992).

Azáltal, hogy a spermasejtek bizonyos fajokban dimorfizmust mutatnak, nyilvánvalóvá vált a további kutatások során, hogy a kettős megtermékenyítés nem véletlenszerűen megy végbe (Hoshikawa 1959, Jensen et al. 1967, Mogensen 1982), vagyis minden hímivarsejt a petesejttel és a központi sejttel történő fúziója előzetesen determinált (Russel 1985). A kettős megtermékenyítés ugyan megfelelő lehetőségeket teremt az ivarsejt kölcsönhatások és kontrollmechanizmusok tanulmányozására, speciális, az állatvilágban, illetve a nem virágos növényekben nem tapasztalható problémákat vet fel, mivel a női ivarsejt hozzáférhetetlensége jelentős akadály a fiziológiai, molekuláris és experimentális kutatásoknak. Az elmúlt néhány évben több laboratórium is kidolgozott módszereket a női és hímivarsejtek megfelelő mennyiségben történő izolálására. A hímivarsejtekhez képest korlátozottabb volt azoknak a fajoknak a száma, ahol sikerült petesejteket élve izolálni. Elsőként sikerült az embriózsák izolálás enzimesejtfalbontás módszerével dohánynál, napraforgónál (Hu et al. 1985, Zhou et al. 1985). Hasonló technikát fejlesztettek ki petesejt és szinergidák izolálására *Torenia* esetén Mol (1986), liliomnál az embriózsák sejtjeire Wagner et al. (1989.a), *Plumbago* estében Huang et al. (1989), kukoricánál Wagner (1989.b). Ezt a módszert (enzimes sejtfalbontást) kombinálva a mikromanipulációs technikával, kukoricánál Kranz et al. (1991), rozsnál Van der Maas et al. (1993), búzánál Kovács et al. (1994), árpánál Holm et al. (1994) alkalmazott. A *Torenia* morfológiai adottságai révén kiváló donornak bizonyult és sikeresen izolálható belőle a petesejt és az embriózsákban lévő többi sejt (Kristóf et al. 1996).

A búza érett embriózsákja Polygonum típusú (Maheshwari 1950), mely a petesejtből (petesejt és a két szinergida) a mikropile felőli póluson, a központi sejtből és a kalazális póluson elhelyezkedő 20-30 ellenlábassal áll (Bennett et al. 1973). Mivel a petesejt, illetve az embriózsák többi sejtjeinek ultrastrukturális felépítése befolyással lehet a zigóta, illetve a proembrió fejlődés specifikus lefolyására, ezért fontos ismernünk a női gametofiton sejtjeinek ultrastrukturáját: sejtmagok és a vakuólumok helyét, számát, valamint a sejtszervecskék eloszlását, struktúráját, továbbá a sejteket körülvevő sejtfal kiterjedését, annak mértékét (Russel 1979, Xi et al. 1983, Cass et al. 1985, You et al. 1985, Haig 1990, Huang et al. 1992, Naumova et al. 1998). A kettős megtermékenyítés alapján az embriózsákba behatoló pollentömlő 'felnyílása' okozza a szinergidák további degenerációját (Bennett et al. 1973), amelyek a megporzás előtt már jelentős változásokon mentek keresztül. Abban a szinergidában, amelybe a pollentömlő behatolt, a pollentömlő felnyílása után is változások zajlanak, míg a másik szinergidában a

'felnyílást' követően nem megy végbe nagymértékű morfológiai változás (Batygina 1974). Mintegy 30 perccel a megporzást követően (20-25 °C-on) megfigyelhető változás a spermasejtmag a pete-, valamint a központi sejt citoplazmájában (You et al. 1985). A megporzás után 60 perccel megtörténik a hím- és a női ivarsejt magjainak kontaktusa, miközben a másik spermasejt a központi sejt egyik sejtmagjával fuzionál. A 60-as évektől kezdődően nagyszámú publikáció foglalkozik a mikro- és a megagametogenezis ultrastruktúrájával, hisztokémiájával és fejlődésével, valamint a gametogenezis és a kettős megtermékenyítés következtében létrejövő embrió és az endospermium fejlődésével (Cass 1970, Zhu 1980). Ugyanakkor a megagametofiton és a megtermékenyítés ultrastruktúrájának részletes vizsgálatát csak a 80-as évek derekán megjelenő fejlett mikroszkópai és mikrotechnikai eszközök tették lehetővé.

- A petesejt szerkezete

A petesejt hosszanti metszetét tekintve *in situ* körte alakú. A kalazális részének szélessége nagyobb, mint a mikropile felé eső. Az érett búzapetesejt „*in planta*” mintegy 70 µm hosszú és 50 µm széles a kalazális végénél. A petesejt magja a sejt közepén lokalizált, benne egy sejtmagvacska található (You et al. 1985). Osztódáskor a nukleolusz eltűnik, elektronmikroszkóposan két jól elkülöníthető régiója van. A granuláris régió a magvacska perifériális részén helyezkedik el, ezek lehetnek a riboszómák prekursorai. A fibrilláris régió a ribonukleoproteineket tartalmazza, és ezekből alakul ki a granuláris régió. A sejtmag körül van a citoplazma döntő hányada. Nagyszámú mitokondrium és plasztisz található a perinukleáris és mikropiláris citoplazmában, míg eltérő méretű vakuólumok a sejt perifériáján találhatók nagy számban. A mitokondriumok belső felépítése viszonylag egyszerű, benne kevés számú tilakoidmembrán található. A plasztiszok száma kisebb a mitokondriumokéhoz viszonyítva, azok vagy szétszórtan, vagy csoportokban találhatók a citoplazmában és általában amiloplasztiszok, egy keményítőszemcsét tartalmaznak. A plasztiszokról elmondható, hogy kettős membránnal körülvett organelumok, csak a növényi valódi magvas sejtekben fordulnak elő. Az endoplazmatikus retikulum kevésbé szembetűnő, csakúgy, mint a diktioszómák. A petesejtben fellelhető diktioszómák általában a szinergidákhoz közel eső citoplazma régiókban voltak megfigyelhetők. A nagyszámú riboszómák vagy az endoplazmatikus retikulumhoz kötötten, vagy a citoplazmában szabadon fordulnak elő viszonylag egyenletes eloszlásban. A mikropile felőli régióban a petesejt, a segítősejtek, a központi sejt közötti közös felületen sejtfal található, míg a

kalazális póluson sejtfa! nincs, a sejtek plazmamembránon keresztül vannak kapcsolatban (You és Jensen 1985, Van Lammeren 1986, Wagner et al. 1988, Faure et al. 1992, Mogensen et al. 1979, Cao és Russel 1997).

- A petesejt izolálása, szelekciója, polaritása

A női ivarsejtek kinyeréséhez elengedhetetlenül szükséges az embriózsák ovulumon belüli elhelyezkedésének ismerete. Míg az intakt embriózsák, illetve spermasejt kinyerési módszerek sok növényfaj esetében rutinszerűen alkalmazott eljárásokká váltak, megfelelő mennyiségű életképes petesejt kinyerése csak néhány faj esetében megoldott pl. *Triticum aestivum* L. Kovács et al. (1994), *Hordeum vulgare* L. Holm et al. (1994), Mauritzen et al. (1995), *Plumbago zeylanica* Huang és Russel (1989), *Lolium perenne* L. Van der Maas et al. (1993), *Zea mays* L. Kranz et al. (1991). A női ivarsejt kinyerésének két alternatívája van, az egyik mechanikai megközelítésű, és mikrotűk segítségével történik, a másik alacsony koncentrációjú sejtfa!bontó enzimek és az említett mechanikai eljárás kombinálásával történik.

A petesejt és az *in vitro* zigóták polaritásának kérdése a vizsgálatok során felvetődött. A petesejt-citoplazma egyenlőtlen eloszlásából adódóan, feltehetően mintegy következmény a zigótánál a tulajdonképpeni embrió és a szuszpenzor elkülönüléséhez vezető polaritás (Sheridan et al. 1987, 1993). Ez a polarizáltság a megtermékenyítést követően is megfigyelhető. A kísérletek tanúsága szerint a kukorica petesejtek és a fúziós produktumok körül kiépülő sejtfa! kialakulása is egy kitüntetett pólusról veszi kezdetét. Ez ismét hasonlatos az *in vivo* szituációra, ahol a sejtfa! a petesejtet csak részlegesen fedi (You et al. 1985). Feltételezéseink alapján az izolált petesejt megőrzi polarizációját tenyésztésbe vonását követően, ez irányban további vizsgálatok folynak.

2.3. A kukorica mikrospórák embriogenezise

A zárvatermők szaporodásbiológiájában ismert, hogy a mikrospórák képesek gaméták létrehozására, amelyek aszimmetrikus osztódás következtében jönnek létre a differenciáció során. Ugyanakkor mikrospórából bizonyos stresszválasz következményeképpen sporofitikus fejlődési útvonal is kiváltható, amit alternatív sporofitikus fejlődési útvonálnak tekinthetünk. Ennek eredményeként egy haploid növény jöhet létre embriogenetikus úton mikrospórából (Heberle-Bors 1985, 1989, Raghavan 1986, Vicente et al. 1991, Reynolds 1997).

A dihaploid növények létrehozása portokkultúrából már számos növénynevelési program rutin feladata közé tartozik (Raghavan, 1986). Az antérakultúrákat egyre szélesebb körben az izolált mikrospórákból, ill. pollenkultúrákból származó növényregenerációs rendszer váltja fel, mintegy alternatív megközelítési módként (Benito-Moreno et al. 1988, Pechan et al. 1988, Emons et al. 1991, Hoekstra et al. 1993, Touraev et al. 1996a, b). Mind az antéra,- mind pedig a mikrospórákultúrák esetében nagyszámú eltérő kezeléseknek teszik ki a mikrospórákat, ill. az antérákat olyan körülményeket biztosítva, amelyek a különböző stresszen keresztül biztosítják az androgenetikus fejlődés indukcióját (Raghavan 1986, Touraev et al. 1996c). Számos molekuláris biológiai megközelítés áll rendelkezésre, és ezek mindegyike a DNS szintézist, az úgynevezett hősokkfehérjék lokalizációját és szintézisének vizsgálatát célozza meg, amelyek a pollen embriogenezis során indukálódnak a stresszre adott válaszreakcióként (Binarova et al. 1993, Cordewener et al. 1995, Binarova et al. 1997). Az ubiquitinben, ill. ubiquitin-fehérje konjugátumokban előforduló változások, valamint ezen fehérjék megfelelő mRNS molekuláiban bekövetkező változások nyomonkövetése sok project célja között szerepelt az elmúlt években. Ezen kutatások legfontosabb központi témája az ubiquitin növényi sejtciklusban, a sejtciklus szabályozásában (Kampen et al. 1996), valamint a növényi öregedésben és a stresszre adott növényi válaszban betöltött szerepe volt (Belknap et al. 1996). A kukorica pollen érése során fejlődésanilag szabályozottan fellépő szabad ubiquitin és az ubiquitinhez kötött fehérjék mennyiségének csökkenését, ill. elvesztését vizsgálta Callis et al. (1994). Legjobb tudomásunk szerint azonban mind a mai napig nem áll rendelkezésre olyan közlemény, amelynek céljai között szerepelne az ubiquitin lokalizációja és az ubiquitinhez kötött fehérjék kimutatása az androgenézis során. A mikrospórából, ill. a pollenből kiinduló embriogenezis egy jelentős stresszindukálta válaszként fogható fel, ami a sejtciklusba való újra belépést jelenti egy sejtbe, ahol már elindult egyfajta differenciálódás. Következésképpen ezek a folyamatok szükségszerűen maguk után vonják a sejtciklus kontrolljának megváltozását, beleértve az ubiquitin közvetett szerepét a fehérje degradációs folyamatban is.

Célok között szerepelt, hogy mikrospóra embriogenitást mutató kukorica genotípusban vizsgáljuk azokat a változásokat, amelyek érintik az ubiquitin ill. az ubiquitinhez kötött fehérjék mennyiségét az indukció során. Ehhez immunocitokémiai vizsgálatot alkalmaztunk. A különböző androgenetikus út előfordulása esetén, valamint amikor nagy a variabilitás egy antéra kultúrában, akkor a biokémiai és molekuláris

megközelítések kevésbé eredményesek. Végezetül egy modellt állítottunk föl az ubiquitin közvetítette degradációs útvonal, ill. az ubiquitin pollen sejtciklusban, valamint az ubiquitin androgenezis indukciójában betöltött szerepére.

2.4. *In vitro* környezet hatása a gametofitonok normális fejlődésére és funkcióképességére

A klasszikus növénynemesítésben a magasabbrendű növények virágainak bibéjére kiválasztott növényegyedek pollenjét juttatjuk, hogy gazdasági jelentőséggel bíró új genetikai kombinációkat hozzunk létre. Ezek előállítása hagyományos módszerekkel sok időt vesz igénybe, különösen a hosszú életsiklusú növényfajok esetében. Az eljárás komoly akadálya, hogy bizonyos esetekben számolni kell az inkompatibilitás fellépésével, úgy, mint a fajok közötti inkompatibilitással, illetve bizonyos családjainál előforduló jelenséggel, amikor az önbeporzáskor lép fel összeférhetlenség Lewis (1949), Bateman (1952), Brewbaker (1957), Heslop-Harrison (1975). Búzával (*T. monococcum*) és árpával végzett önbeporzásokat Larsen et al. (1973) és vizsgálta a kompatibilitás, inkompatibilitás kérdését. Keresztezési inkompatibilitást vizsgált Zhang et al. (1982) *Aegilops* és *T. aestivum* esetében. Kenyérbúza és diploid-, tetraploid rozskeresztezésnél fellépő összeférhetlenséget talált Gordey et al. (1983). Kenyérbúza és tritikálé keresztezési nehézségeiről ad számot Neumann et al. (1983). Három termesztett árpafajta keresztezésen Pickering (1984) tanulmányozta az inkompatibilitást. Mindez szükségessé tette alternatív megközelítési módok bevezetését. Ezek többnyire más növényfajokból izolált egy gén bevitelére épülő rendszerek, más esetekben eredményes eljárás lehet eltérő genomösszetételű sporofitikus protoplasztok fúziója. Növényné történő regenerálása ezen sejteknek meglehetősen nehézkes, főként a gabonafélék esetében. Ezért ígéretes eljárásként tartjuk számon gametofitikus eredetű sejtek és különösképpen ivarsejtek felhasználását, alapozva azok természetes fúzióképességére és arra a tényre, hogy a belőlük keletkező zigóta növényné regenerálható. Ezek a technikák: izolált embriózsákok, ill. petesejtek *in vitro* fertilizációja és az *in vitro* létrehozott zigóták növényné regenerálása. Az *in vitro* fúzió viszonylag könnyen megvalósítható elektrofúzióval. Mivel az elektrofúzió egyszerű elektrofizikai törvényszerűségeken alapul, technikailag ugyan kivitelezhető különböző eredetű ivarsejtek fúziója, de a mesterséges fúziós termékből történő növényregenerálási kísérletek sok esetben nehézségekbe ütköznek. Így a technika gyakorlati téren való

alkalmazhatósága a mesterséges zigóták fertilis, fenotípusosan szabályos növényé regenerálása tűnik a szűk keresztmetszetnek és kíván további kidolgozást.

Izolált embriózsákok tenyésztése normális embriógenézishez vezetett (Campenot et al. 1992, Mol et al. 1993, 1995) ellentétben azzal az esettel, amikor az embriózsákból kiemelt zigóták növényé nevelése volt a cél.

Az *in vitro* fúziós technika alkalmazásának segítségével az inkompatibilitási faktor (sporofitikus inkompatibilitás) kiküszöbölhető, új lehetőségeket nyit a gyakorlati növénynevelésben, és a transzformációs kísérletekben. Amennyiben nem csak a sporofitikus inkompatibilitás miatt nem történik meg az ivarsejtek fúziója, hanem ivarsejt szintű inkompatibilitással is számolnunk kell, akkor a mikroinjekciós technikák lehetnek segítségünkre. A sikeres ivarsejt fúziós kísérletek kritikus lépése fertilis hibridek felnevelése *in vitro* tenyészetekben (Dumas et al. 1995).

2.5. A szőlő virágának fejlődésdinamikája

2.5.1. Szőlőtermesztés és nevelés főbb állomásai

A magyar szőlőtermesztés kialakulása régi időkre vezethető vissza. A honfoglaló és letelepedő magyarság a szőlőtermesztés mesterségét az itt élő régi földművelő népektől, majd a nyugati hittérítő papoktól megtanulta és a világ egyik híres és jelentős szőlőtermesztő és bortermelő országát teremtette meg (Kozma 1966). A XII.-XIII. századbeli oklevelek szerint a magyar bor fontos árucikk volt. Híresek voltak a szerémi, szekszárdi és Balaton melléki borok, de az oklevelek az ország minden részéről említik a szőlőművelést (Herczegh 1895). A tokaji bor világhíre csak a XVI. században kezdődik. A török hódoltság idején a bortermelésben erős hanyatlás, majd ismét fellendülés következik, bár az osztrák vámpolitika súlyosan érinti. A XIX. században a filoxéria vész lép fel. A pusztítása 1885-től válik erősen érezhetővé, és ehhez járult 1891-től a peronoszpóra károsítása, minek következtében a szőlőterület 1885-höz képest 1894-re 60%-a lett, a termés mennyiség csökkenése pedig 75%-os volt. 1888-ban újratelepítés indult meg. A második világháború utáni hanyatlást a 1956-ban elért mélypont jelentette. Azt követően megindult az újratelepítés, rekonstrukció, és fokozatos áttérés a nagyüzemi szőlőművelésre (Hegedüs et al. 1966).

A hazai szőlőnevelés küzdelmes, de ugyanakkor eredményes múltra tekinthet vissza és ígéretes jövő elé néz. A céltudatos szőlőnevelés a XIX. század 80-as éveire tehető

és Mathiász József, Mathiász János munkásságával kezdődött. Századunk elejére Horváth Antal és Krasznai Miklós, az első világháború utáni időszakra a Kossuth-díjas Kocsis Pál tevékenysége esik. Említésre méltó Szűcs J. szentendrei, Ábrahám B. kecskeméti nemesítő eredménye. A Szőlészeti Kutató Intézet és a Kertészeti és Szőlészeti Főiskola Szőlészeti és Nemesítési Tanszékének több munkatársa: Bíró K., Darnay E., Erős J., Szegedi S., Király F., Kozma P., Németh M. nevéhez fűződik siker. Az alanyfajták nemesítésében elismerésre méltó és a világszerte ismert fajtákat előállító Teleki Zsigmond, Szilágyi J., Csizmazia J., Kozma P. az új hibridek megalkotói. A rezisztencia-nemesítés kapcsán foglalkoznak hidegtűrő, peronoszpóra- és lisztharmat ellenálló hibridek előállításával: Tamássy I., Koleda I., Csizmazia J. (Hegedüs et al. 1966). Bakonyi Károlyt napjaink nemesítői közül említve.

2.5.2. A szőlőnemesítés új technikái

Guha és Maheswari (1964) felfedezése óta, miszerint *in vitro* androgenezissel mikrospórából (antéra vagy izolált mikrospóra kultúrában) haploid növények állíthatók elő, egyre több növényfaj esetében sikerült haploid, illetve homozigóta dihaploid növények előállítása (Veilleux 1994). Több gazdaságilag fontos faj esetében termesztett fajtákat állítottak elő, és a haploid technikák alkalmazása nagyszámú egyszikű és kétszikű fajnemesítési módszertanának integráns része lett. Heszky et al. (1986, 1991, 1992) nevéhez fűződik a rizs antérakultúrából előállított vonalak és az államilag elismert „Dáma” fajta. Kovács et al. (1993) klasszikus extenzív magyar búzafajták androgenezisét vizsgálta antérakultúrában. Hexaploid őszi búza és tritikálé *in vitro* androgenezis kutatásban, haploid előállításba értek el eredményeket a martonvásári kutatók Karsai et al. (1993, 1994, 1998), Bedő et al. (1992, 1993, 1996) továbbá Szegeden Kertész et al. (1991), Pauk et al. (1988, 1997). A haploid technikák nemesítési felhasználásának jelentősége főként egynyári, lágyszárú fajok, különösen a heterózisnemesítés esetében, ahol a dihaploidok (DH) előállítása jelentősen csökkenti a homozigóta genotípusok előállításához szükséges időtartamot. A homozigóta állapot nagymértékben megkönnyíti a recesszív gének azonosítását, jellemzését és nemesítési felhasználását. A kapott DH vonalak kombinálódó képessége gyorsan tesztelhető, és megfelelő vonal (genotípus) szelekció után a keresztezési kombinációkban jelentős heterózis hatás realizálható. Azon fajok esetében, melyeket a termesztés számára vegetatív úton szaporítunk (amilyen a szőlő is), a haploid technikák alkalmazása szintén

előnyt jelent, hiszen a keresztezés után kapott heterózis a klónokban folyamatosan fenntartható. Bár a fásszárú növények többsége rekalitráns *in vitro* tenyészetekben, az utóbbi években jelentős fejlődés tapasztalható a fontosabb gyümölcsfajok haploidindukciója területén. Több laboratórium számol be sikeres antérekultúráról alma (Hofer et al. 1990, 1994), cseresznye (Hofer et al. 1990), szilva (Ruzic et al. 1997), őszibarack (Todorovic et al. 1992) esetében, és e fajokra a megfelelő módszerek elérhetők.

Más fajokkal összevetve viszonylag nehezebbnek tűnik e technikák alkalmazása a szőlőnél, de a szakirodalmi adatok alapján ennek is megvan a lehetősége. A módszer szőlőre történő adaptálását a következők indokolják:

1. a módszerrel előállított homozigóta egyedek keresztezésekben való felhasználása esetén erős heterózishatással számolhatunk,
2. a rezisztenciára történő nemesítés számára stabil rezisztencia donor vonalak előállítása válik lehetővé,
3. a transzformációval előállított egyedekből az új tulajdonságot stabilan magában hordozó és azt biztonságosan továbbörökítő vonal nyerhető,
4. homozigóta alapanyag biztosítása a legfrissebb genetikai módszerek (RAPD, mikroszatellit módszer, QTL) számára, melyek segítségével a hagyományos nemesítés hatékonyabbá tehető.

Szőlőben mindössze egy publikáció számol be ez idáig haploid növények előállításáról antérekultúra segítségével (Zou et al. 1981). Haploid kalluszvonalat ugyan több kutatóhelyen sikerült előállítani (Gresshoff et al. 1974, Kim et al. 1981, Cersosimo 1986), de sem embriót, sem teljes növényt nem tudtak regenerálni. Az első növényt Rajasekaran et al.(1979) állította elő antérekultúra segítségével. Azóta számtalan kutatócsoportnak sikerült teljes növény felnevelése, de a genetikai, morfológiai, izoenzim vizsgálatok alapján mind szomatikus eredetűnek bizonyult (Holló et al. 1997 Zhang et al. 1997, Salunkhe et al. 1999).

A női ivarszervekben található makrogametofiton haploid sejtjeit jóval kevesebben próbálták dihaploid növények előállítására felhasználni. Ebben nyilvánvalóan szerepet játszik az egy virágon belül található magkezdemények alacsony száma, a fejlettségi állapot nehéz meghatározhatósága és bonyolult izolálásuk is. Ennek ellenére érdemes megpróbálni olyan fajoknál, mint a szőlő, ahol az antéra vagy mikrospóra kultúra nem működőképes.

A szőlővirág morfológiai vizsgálatát már a múlt század végén kezdték el hazánkban (Ráthay 1889). Az első részletes anatómiai feltárást Berlese (1892) végezte el. Azóta sok kutatóhelyen vizsgálták a virágrészek, így a magkezdemény kialakulását is. Vizsgálataik alapján az alábbiakat tudjuk a szőlő magkezdeményéről.

Normális hímnős virág esetében a nucellust a 4-5 rétegű külső és a 3 sejtrétegű belső integumentum takarja. A magkezdemények a magház belseje felé fordult oldalán a funiculus összenőtt a külső integumentummal és raphét alkot. A nucellus mikropiláris végén könnyen felismerhető a legyező alakú, szabályos, jól festődő sejt sorokból felépülő nucelláris sapka, amely az embriósákot határolja. Az embriósák kialakulásánál a makrospóra–anyasejt 3-4 sejtre osztódik, amelyből a kalaza felé eső sejt marad meg. A megmaradt, élő sejt tovább osztódik, és létrehozza a 8 magvas embriósákot. A 8 magból 3 kialakítja az embriósák mikropiláris végén a petekészüléket (1 petesejt és 2 szinergida), 2 mag összeolvadásával kialakul a központi mag, míg a kalaza felé eső részén a 3 magból lesz a 3 antipodasejt, amelyek virágzáskor már nem találhatók meg (Hegedüs et al. 1966).

Szövettenyésztési célokra a megtermékenyítetlen petesejtet tartalmazó ováriumot és ovulumot használták szomatikus embriogenezis indukálására (Mullins et al. 1976), illetve a magvatlan szőlőfajták nemesítése során a magvatlan x magvatlan keresztezések lebonyolítására az un. *in ovulo* embrió kultúra vagy „embrió-rescue” módszernél a megtermékenyített petesejtből kialakuló embriót a magkezdemény egyéb szöveteibe ágyazva (Bouquet et al. 1989).

Újabb vizsgálatok szerint a haploid állapot természetes körülmények között is megfigyelhető. Eder (1992) poliembriogenikus magoncokat vizsgált, és kísérletei során 2 haploid növényt is talált. Ez az eredmény is azt mutatja, hogy a női gametofiton is lehet kiindulópontja partenogenetikus haploid produkciónak.

Haploid/dihaploid növényeknek a makrogametofiton sejtjeiből történő indukációjához sok egyéb tényező mellett elengedhetetlen az embriósák fejlettségi állapotának meghatározása és az optimális fejlettségi állapot elérése. Ezért fontos egy közvetett értékelési módszer a megfelelő fejlettségi állapot meghatározására.

3. A VIZSGÁLATOK ANYAGA ÉS MÓDSZERE

3.1. AZ ELTÉRŐ KÖRNYEZETBEN FEJLŐDÖTT HÍM ÉS NŐI GAMETOFITON JELLEMZÉSE ÉS A FEJLŐDÉS SORÁN VÉGBEMENT VÁLTOZÁSOK MORFOLÓGIAI, ULTRASTRUKTURÁLIS VIZSGÁLATA

A kísérleteket, vizsgálatokat a Magyar Tudományos Akadémia Mezőgazdasági Kutatóintézetben Martonvásáron végeztük.

Az együttműködésben végzett munkák:

Mezőgazdasági Biotechnológiai Központ, Gödöllő, búza elektronmikroszkópia; Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, Estación Experimental de Zaidín, CSIC. Granada, Spain, kukorica mikroszpóra embriogenezis fény- és elektronmikroszkópia;

FVM Szőlészeti és Borászati Kutatóintézete, Eger, szőlővirág mintavétel, pollen fénymikroszkópia.

3.2. A vizsgálatokban felhasznált növények

- Az eltérő genomösszetételű és ploidszintű búza hím és női gametofiton *in planta* és *in vitro* fejlődésének összehasonlító vizsgálatához az alábbi *Triticum* fajokat használtuk:

Triticum aestivum L. cv. Mv 15 (AABBDD) ($2n=6x=42$)

Triticum araraticum Jakubz. (AAGG) ($2n=4x=28$)

Triticum monococcum L. (AA) ($2n=2x=14$).

- A búza petesejt finom szerkezetét, méretváltozásait és morfológiai sajátosságait a Siete Cerros és a Chinese Spring tavaszi búzafajtákon tanulmányoztuk.

- Az érett pollenszemek méreteinek analizéséhez a Chinese Spring tavaszi búzafajtát használtuk.

- Az eltérő ploidszintű búzafajok embriófejlődésének összehasonlítását a *Triticum aestivum* L. cv. Mv 15 (AABBDD) ($2n=6x=42$), *Triticum araraticum* Jakubz. (AAGG) ($2n=4x=28$), *Triticum monococcum* L. (AA) ($2n=2x=14$), növényeken végeztük.

- A kukorica *in vitro* androgenézis folyamatát a nagy haploidindukciós gyakoriságot mutató DH 109 x ZK191/a hibrid antérainak felhasználásával vizsgáltuk.

- A szőlővirág fejlődésdinamikájának jellemzéséhez, strukturális, morfológiai vizsgálataihoz az alábbi genotípusokat használtuk:

Muscadinia rotundifolia Planch. x *Vitis vinifera* L. BC₃,

Leányka.

3.3. Módszerek

3.3.1 A kísérleti növények nevelése

- Szabadföldön:

a kísérleti növények közül a búza és a szőlő növényeket neveltük fel.

A búza hím és női gametofiton *in vivo* és *in vitro* fejlődésének összehasonlító vizsgálatához a növényeket szántóföldi kisparcellás körülmények között neveltük fel. A növények egy részéből a főkalászokat - amikor a hím gametofiton Mu (középső egymagvas) fejlődési állapotú volt - *in vitro* kalászkakultúrában neveltük tovább, virágzásig.

A két szőlő genotípus virágait az FVM Szőlészeti és Borászati Kutatóintézete, Eger kőlyuktetői szabadföldi fajtagyűjteményében nevelt növényekből szedtük.

- Fitotronban:

a búza petesejtek excizálásához, az érett pollen méretének- a fiatal embriók- és a kukorica androgenézis vizsgálatához a növényeket fitotronban, kontrollált környezeti körülmények között az alábbiak szerint neveltük fel.

Csíráztatás

A búza kísérlet növényeinek szemtermését Petri-csészében csíráztattuk. Szűrőpapírra helyeztünk 20 szemet, majd a közeget megnedvesítve 2 napig csíráztattuk szobahőmérsékleten. Ezt követően a csíranövényeket tápkockákba helyeztük és újabb két napig teljes megvilágításban tartottuk őket. Megerősödött állapotban áthelyeztük a növényeket a vernalizációs kamrába.

A kukoricaszemeket, a búzához hasonló módon csíráztattuk, majd az erőteljes csíranövénykéket a klímakamrában elhelyezett tenyészedényekbe ültettük.

Vernalizáció és felnevelés

A vernalizáció 4°C-on 5 hétig tartott, majd tenyészedénybe ültettük a növényeket. Innen CONVIRON PGR 15 típusú kamrába kerültek további felnevelésre. A megvilágítás a

vernalizáció után napi 8 óra, a kalászosítás kezdetekor napi 12 óra, a fényerősség $305 \mu\text{M m}^2/\text{s}$ volt. A klímaprogramok napi menetét a 3/1 táblázat tartalmazza.

3/1. táblázat

A kamrák klímaprogramjának napi menete

Bokrosodás, szárbaindulás idején

| idő (óra) | hőmérséklet (°C) | relatív páratartalom (%) |
|----------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| 0-4 | 15 | 75 |
| 4-6 | 17 | 70 |
| 16-24 | 15 | 75 |

Kalászosítás kezdetekor

| idő (óra) | hőmérséklet (°C) | relatív páratartalom (%) |
|----------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| 4-16 | 20 | 70 |
| 16-4 | 18 | 75 |

A kukorica növényeket Ny2 nyári klímaprogramon fitotronban neveltük fel (Tischner et al. 1997) kukorica pollenre kidolgozott programja alapján.

3.3.2. A mikrspórák fejlettségi állapotának meghatározása, megfestésük

A frissen begyűjtött kalászok alsó, középső és felső harmadából tárgylemezre kivettünk 1-1 portokot és 1 csepp 1%-os kármínecetsavban kisebb részekre vágtuk. A feldarabolt portokokból a mikrspórákat a fedőlemez enyhe megnyomásával kiszabadítottuk és szélesztettük. A jól megfestődött pollenszemeket OPTON 67275 típusú mikroszkóp segítségével vizsgáltuk és megállapítottuk a mikrspórák fejlettségét Ouyang et al. (1973) nomenklatúrája szerint.

A kukorica mikrspórák fejlettségi állapotának meghatározásához a címerek fő és mellékágaiból vett portokokat használtuk fel.

A kárminecetsavas festés a szőlő esetében nem hatékony, ezért a mikrospórák megfestésére az Alexander-féle eljárást alkalmaztuk (Alexander 1969).

3.3.3. A növények kasztrálása

A pollen fejlettség meghatározásával a kasztrálást egy bizonyos pollenállapotban (Binukleátus = Bn, kétmagvas mikrospóra) végeztük el. A kasztrálás, azaz a portokok eltávolítása során a három portok a bibe megkímélésével, egyetlen mozdulattal kivehető. A kalászról az alsó és a csúcsi részen lévő fejletlen kalászkákat és a középső virágokat szintén eltávolítottuk.

3.3.4. Megporzás

A PGV típusú növénynevelő kamrában T2 tavaszi klímaprogramon (Tischner et al. 1997) nevelt három *Triticum* faj (*T. aestivum*, *T. araraticum*, *T. monococcum*) növények izolált kalászaiból 3-3 kalászt kasztráltunk. A kalászokat mesterségesen megporozva, pörgetéssel módszerrel megtermékenyítettük.

A megporzás pörgetéssel módszerének lényege, hogy az éppen virágzásnak induló kalászokat levágtuk a növényekről, melegvízbe helyeztük, ezzel megindult a gyors portok kitolódás és a pollen szóródni kezdett. Ekkor a kasztrált kalász izolátor zacskóját felvágtuk, a port adó kalászt többször, alaposan megpörgettük a megtermékenyítésre előkészített kalász körül. A port adó kalász eltávolítása után az izolátor belsejét egy kevés vízzel párásítottuk, védve a pollenszemeket a kiszáradástól, végül gondosan lezártuk a celofán zacskót.

3.3.5. Búzakalászok és kukoricacímerek sterilizálása

A búzakalászokat 8, a kukoricacímereket pedig 10 percig 20%-os Na-hipoklorit oldatban állni hagytuk, majd steril vízzel háromszor leöblítettük.

3.3.6. *In vitro* kultúrák

• *In vitro* búza kalászkakultúra

Az Mu fejlődési állapotú főkalászok középső harmadából kalászkákat excizáltunk, és fajonként 100-100 db kalászkát Barnabás et al.(1992) módszere szerint *in vitro* körülmények között tenyésztettük. Az eljárás szerint a megfelelő fejlettségi állapotú

kalászkák felszínét sterilizáltuk, majd a kalászkákat a kalászkakultúra igényeinek megfelelően módosított (Kovács et al. 1992) MS szilárd táptalajra (Murashige et al. 1962) oltottuk. A kalászkatenyészeteket csíráztató kamrában (20°C, 25 μ mol/m²/s fényintenzitás, 8/16 órás nappali és éjszakai fotoperiódusú megvilágítás) inkubáltuk. A tenyésztés során a leoltástól kezdődően minden nap mintát vettünk az antézisig.

• *In vitro* kukorica portokkultúra

A kukorica növényekből az antérákat adó címereket a zászlós levélből való kiemelkedés előtt izoláltuk és 7°C-on 10 napig hidegkezeltük, alufóliába csomagolva sötétben tartottuk (Dieu et al. 1986). A hidegkezelést követően a címer felszínét sterilizáltuk. Az antérákat a mikrospórák (LU) késői 1 magvas állapotában izoláltuk steril körülmények között. Petri-csészében módosított YP táptalajon (0,1 mg/l 2,3,5-trijodobenzoic sav, 5mg/l aktív szén, 500 mg/l kazein hidrolizátum, 120g/l szaharóz, és 2,5g/l gerlit (SIGMA P-8169), (pH 5,4) 29°C-on sötétben tenyésztettük az androgenézis indukciójának céljából.

3.3.7. Mintavételek, vizsgálatok

• Búza pollen és embriózsák *in vivo* és *in vitro* fejlődésének vizsgálata

Három eltérő ploidszintű és genomösszetételű búzafaj fejlődését kívántuk összehasonlítani vizsgálataink során, melyeket eltérő környezetben neveltünk fel. A búza hím és női ivaros nemzedék *in vivo* és *in vitro* fejlődésének nyomonkövetésére fajonként 20-20 azonos fejlettségi állapotú főkalászt használtunk. A főkalászkákat celofán zacskóval izoláltuk. A kalászkák közepső harmadából származó antérából meghatároztuk a mikrospóra fejlettségi állapotát.

A mikrospóra-fejlődés közepső 1-sejtmagvas (Mid uninucleate = Mu) állapotától kezdődően, naponként 5-5 antérát és 10-10 termőt vettünk ki, a 3-sejtes pollen kialakulását jelentő antézis bekövetkeztéig. Az antérákat a mikrospóra-fejlettségi állapot detektálására fixáló oldatban (abszolút alkohol és jégcet 3:1 arányú keverékében), a termőket 0,1M foszfátpufferrel készített, 2,5%-os glutáraldehid-oldatban fixáltuk mikrotechnikai vizsgálatok céljából.

Az antéra mintavétel és a mikrospóra fejlettségi állapot meghatározása párhuzamosan történt a női gametofitonéval. Az antérákat, ill. a mikrospórákat a fixálás után a

vizsgálat jellegéből adódóan a preparátum festési eljárásával, beágyazás nélkül is vizsgálni tudtuk. A mikroszkóp látómezejében lévő 100 db jól megfestődött pollenszem fejlettségi állapotát meghatároztuk és megmértük az átmérőjét. A három búzafaj pollenjének méretbeli alakulását jellemző adatokat statisztikai módszerrel, varianciaanalízissel elemeztük, értékeltük.

Az embriózsák kialakulását a Spurr-gyantába beágyazott termőkből (fajonként és mintavételenként 10-10 termő) ultramikrotechnikai eljárásokkal készített és 0,5% toluidinkékkel megfestett (O'Brien et al. 1981) félvékony (1,5 μ m-es) hosszmetseteken tanulmányoztuk Zeiss Ultraphot-III típusú fénymikroszkóppal. A különböző fejlettségű termők hosszirányú sorozatmetsetein kikerestük az ovulumok belsejében elhelyezkedő embriózsákok legnagyobb kiterjedésű metsetét, és okulár mikrométer segítségével meghatároztuk az embriózsákok hosszúsági és szélességi adatait. Fajonként és mintavételenként 10-10 embriózsák adataiból (COREL DRAW számítógépprogram segítségével) az embriózsák alak- és térfogatváltozását tükröző sematikus ábrákat szerkesztettünk.

• **Az embriózsák lézer scanning mikroszkópos vizsgálata**

A fixált, víztelenített búzatermőket (Mv 15) Polietilén glikolba ágyaztuk (PEG 1500). A dermedést követően a mintákból Reichert (acélkéses) mikrotómmal 10-40 μ m vastagságú metseteket készítettünk. A metseteket akridinnarancs (SIGMA, c.i. 46005) mikroszinezéssel (1 μ l/ml) megfestettük

• **A hím és a női gametofiton egymáshoz viszonyított fejlődésének vizsgálata**

Vizsgálataink kiterjedtek a különböző ploidszintű búzafajok hím és női gametofiton egymáshoz viszonyított fejlődésének megfigyelésére. Összesen nyolc mintavételi alkalmat és hat, illetve öt fejlődési fázist vettünk alapul.

A hím gametofiton megfigyelt fejlődési stádiumai:

- Mu (mid-uninucleate), középső 1 magvas állapot
- Lu (late uninucleate), késői 1 magvas állapot
- Pm (premitotic) osztódás előtti állapot
- eBn (early binucleate) korai kétmagvas állapot
- Bc (bicellular) kétsejtes állapot

Tc (tricellular) érett háromsejtes állapot

A női gametofiton megfigyelt fejlődési stádiumai:

tetrád állapot

makrospóra állapot

kétmagvas állapot

négymagvas állapot

hétsejtes (8 magvas) állapot

Ezek a megfigyelések fontos információt adnak arra vonatkozóan, hogyan szervezzük a növénynevelést és hangoljuk össze az ivarsejt izolálási tevékenységet a sikeres ivarsejt fúzióhoz.

A szőlővirág fejlődésdinamikájának strukturális, növényanatómiai, morfológiai, szövettani vizsgálatát a növényekről szedett 5-5 virágmintán végeztük.

A szőlőpollen fejlődési állapotok

A portokokat feltárva preparátumot készítettünk, megfestettük a benne lévő mikrospórákat. A mikrospórák megfestésére az Alexander féle eljárást alkalmaztuk (Alexander 1969). Mindkét genotípusban az alábbi fejlődési állapotokban történt a mintavétel:

1. PMC (pollenanyasejt),
2. Tetrád,
3. Korai egymagvas: szabálytalan forma, vékony, halványzöldes festődésű pollenfal, sejtmag nem látható,
4. Középső egymagvas: rögbilabda formájú mikrospóra, vastag, sötétzölden festődő pollenfal, a sejtmag halvány, a mikrospóra középpontjában található,
5. Késői egymagvas: kerekded forma, egyre sötétebben festődő citoplazma, a sejtmag az erősen festődő nukleólusszal a mikrospóra egyik pólusa felé vándorol, míg az ellenkezőn egy vakuólum alakul ki,
6. Korai kétmagvas: a citoplazma olyan sötét, hogy a sejtmagok csak nehezen fedezhetők fel, az egyik sejtmag egy lencseszerű lefűződésben található,
7. Érett pollen: a citoplazma egyenletes sötétlila festődésű, sejtmagok egyáltalán nem láthatók, sötétzöld pollenfal.

A szőlőtermő vizsgálata

A pollen fejlődési állapotának meghatározása után kiválasztottuk azt az 5-5 virágot, amelyben tetrád, középső egymagvas és késői egymagvas/kétmagvas átmeneti állapotú mikospórák találhatóak. Ezen virágok termőit (genotípusonként 15 minta) ágyasztuk be műgyantába félvékony metszetek készítésére.

• Búza embrió vizsgálatok

A hét sejtes (8 magvas) embriózsákot a kéthetes embrióval és az érett embrióval vetettük össze.

A fitotronban, Conviron PGV típusú növénynevelő kamrában T2 tavaszi klímaprogramon (Tischner et al. 1997) nevelt három *Triticum* faj (*T. aestivum*, *T. araraticum*, *T. monococcum*) növények izolált kalászaiból 3-3 kalászt kasztráltunk. A kalászokat mesterségesen megporozva, pörgetéses módszerrel megtermékenyítettük.

A megporzás, megtermékenyítés után a 14. napon a kéthetes magkezdeményeket 2,5%-os glutáraldehid oldatban fixáltuk. Az embriókat sztereómikroszkóp alatt (Zeiss Stemi 2000-C típus) kiemeltük. A kinyert embriókat tárgylemezre tett, 1:1 arányú LMP (SIGMA, op=30 °C, fp=65° C, No. A- 9414) agaróz-glükóz cseppbe helyeztük, a félig megszilárdult anyagot egy zárócseppel szendvicsszerűen lefedtük. A teljesen megszilárdult agarózból zsilett pengével blokkot metszettünk ki, melynek a közepében beágyazva helyezkedett el az embrió. A további vizsgálatig gutáraldehid 2,5%-os oldatában tároltuk.

Az általunk agaróz szendvicsblokknak elnevezett módon beágyazott, tárolt, sérüléstől és kiszáradástól megvédett embriók hosszúsági és szélességi kiterjedését a mikroszkóp okulár mikrométere segítségével meghatároztuk. A kéthetes embriókról morfológiai összehasonlítás céljából fotókat készítettünk Zeiss EM910 elektronmikroszkóp segítségével SEM üzemmódban.

A három *Triticum* faj érett szemterméseit 48 órán át, desztillált vízben, szobahőmérsékleten duzzasztottuk. A megduzzadt szemek terméshéját felhasítva hozzáférhetővé vált az érett embrió. Sztereómikroszkóp alatt bonctű és lándzsa segítségével, az embrió sérülését elkerülve kiemeltük az embriót. Az így kinyert

embriókat megmértük, az adatokat táblázatba foglaltuk és összevetettük az embriózsák és a 14 napos embrió adataival.

• Petesejt vizsgálatok

In planta petesejtek

A három *Triticum* fajnál a petesejt méretbeli fejlődését vizsgáltuk. A termőkből készült metszetek közül azokat válogattuk ki, amelyeken meghatározhattuk az embriózsák mikropile felőli végén elhelyezkedő petesejt legnagyobb átmérőjét. Az *in planta* petesejtek adatait táblázatba foglaltuk, az egyes fejlődési állapotokat lefotóztuk. Így információt kaptunk, hogy miként érheti el a petesejt a funkcionális érettség állapotát.

Excizált petesejtek

A hexaploid Siete Cerros és Chinese Spring tavaszi búzafajtákból steril, kontrollált körülmények mellett történt a petesejtek excizálása.

Mivel a hím gametofiton fejlődési dinamikájához viszonyítva vizsgáljuk a petesejt fejlettségi állapotát, ezért szükség van arra, hogy a kasztrálást egy bizonyos pollenállapotban (Binukleátus = Bn, két magvas állapot) végezzük. Az állapot meghatározási vizsgálat kárminecetsavas (1%) festési eljárással történt, OPTON 67275 típusú mikroszkóp segítségével.

A kasztrált virágokból az ováriumokat ill. a petesejteket meghatározott időpontban 3 naponként (a kasztrálás után 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 napos állapotban) mechanikai izolálással, (Kovács et al. 1994) ZEISS STEMI 2000C típusú binokuláris mikroszkóp használatával végeztük. A petesejteket a következő módszer szerint izoláltuk: a kalászközből kinyert ováriumokat sztereómikroszkóp alatt félbevágtuk úgy, hogy az ovulumok mikropile felőli darabjai, amelyek tartalmazzák az embriózsákot, kinyerhetők legyenek az őket körülvevő ovárium-szövetekből. Az embriózsákot tartalmazó feltárult ovulum-felekből mikrotűkkel kiszabadítottuk a petesejteket. A petesejtek így az izozmotikus (0,6 mólos mannitol) izolációs oldatba kiúsztak, mely 2 mmol $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -t tartalmazott.

Ezt követően az egyes izolált petesejteket (Pónya et al. 1999), WPI A203XVZ típusú nanoliter-injektor segítségével vittük át 5 mikroliteres mikrocseppekbe. Az evaporáció elkerülése végett a mikrocseppeket parafinolajjal fedtük le. Az így tárolt ivarsejteket alacsony olvadáspontú agaróz gélbe (SIGMA, op= 30°C, fp= 65°C, No. A-9414)

ágyasztuk úgy, hogy 1,2 M koncentrációjú mannitol oldatot és 2%-os koncentrációjú alacsony olvadáspontú agarózt kevertünk össze 1:1 arányban. A sejteket nanoliter-injektor segítségével gyűjtöttük össze a mikrocseppekből, majd behelyeztük őket a fenti módon elkészített agaróz cseppekbe. A szilárdulás gyorsítására az agarózcseppeket hűtőszekrénybe 4°C-ra tettük. A petesejteket tartalmazó megszilárdult agarózcseppeket 2,5% glutáraldehidet tartalmazó 0,2 M-os Na-kakodilát ((CH₃)₂As(O)ONa x 4H₂O) pufferben (pH 6,9) fixáltuk. A fixálás időtartama 12 óra volt. Az alakjukat megőrző, morfológiailag ép sejtek és sejtmagok átmérőjét megmértük okulármikrométer segítségével. A két genotípusból összesen 60-60 női ivarsejtet nyertünk ki, a 21. nap mintasorozata már nem volt értékelhető a petesejtek nagyfokú degradációja miatt. A petesejteket műgyantába ágyasztuk fénymikroszkópos- és TEM vizsgálatokhoz.

• A búza érett pollenjének vizsgálata

A Chinese Spring három-sejtes érett pollenjének vizsgálatakor az érett pollent tartalmazó portokokat feltártuk. Öt portokból, portokonként 10-10 pollent választottunk ki a mikroszkópi látómezőben. A preparátum készítésekor a tárgylemezen lévő megfestett (karmin ecetsav 1%), lefedett pollenszemeket láng felett melegítve derítettük a felhalmozódott keményítőtartalom miatt. ZEISS Ultraphot-III típusú fénymikroszkóp okulár mikrométerével megmértük az érett pollenben levő (két) generatív és vegetatív sejtet. Adatokat gyűjtöttünk a méreteikről és az adatokat táblázatban megjelenítettük, elemeztük.

•Portoktenyésztetek

Minimum 15 db kukorica portokot gyűjtöttünk össze véletlenszerűen a Petri-csészéből 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 13, 17 nappal a sejttenyésztésbe vonás kezdetét követően és ezeket később a fény, ill. a TEM-os előkészítési eljárásnak vetettük alá. Az antérákat 4°C-on, egy éjszaka fixáltuk 4%-os paraformaldehid, 0,1%-os glutáraldehid, 0,1 mol/l Na-kakodilát puffert (pH 7,2) tartalmazó oldatban. A fixált mintákat beágyasztuk Unicryl gyantába, majd metszeteket készítettünk.

•Ubiquitin immunolokalizáció

A kukorica portok félvékony metszeteit, 3-aminopropil-triethoxi-szilán bevonatú tárgylemezekre tettük. Ezeket a tárgylemezeket rendre TBS-be (10mM/l Tris, 115mM/l Na Cl, pH 7,4) helyeztük (10 perc szobahőmérséklet), majd 1 órára (szobahőmérséklet)

az un. blokkoló oldatba 2% BSA TBS, ezt követően nyúl polyclonális anti-ubiquitin antiszérumot adtunk hozzá (Sigma, St. Luis, MI, USA) ezt 1:10 arányban kevertük a blokkoló oldattal (4°C egy éjszakán át) valamint TBS-be helyeztük (3x20 perc szobahőmérsékleten), valamint az anti-nyúl IgG (Fe) – bázikus foszfatáz konjugátummal inkubáltuk (Promega Coop., Madison, WI, USA) ezt 1:200 arányban hígítottuk, 4°C-on 4 órán keresztül TBS (3x20 perc szobahőmérsékleten), a detekciós puffer: Tris-HCL 100mmol/l pH 9.5, NaCl 100mmol/l, Mg Cl₂ 5mmol/l, levasimole 1mmol/l (20 perc szobahőmérsékleten) és végül NBT/BCIP szubsztrátumot adtunk hozzá (Armesco Inc., Solon, OH. USA) (5 óra szobahőmérsékleten sötétben). A kontroll lemezek pedig az antiubiquitin antitest hozzáadása nélkül készültek.

3.3.8. Szöveti vizsgálatok

• Beágyazások

Spurr-gyantába (AGAR SIENTIFIC LTD, U.K. R1032) Spurr (1969) *ágyazás menete:*

1. Öblítés 0,1M-os Na₂HPO₄:KH₂PO₄ = 4:1 pufferben, 3x30 perc
2. Utófixálás 1%-os OsO₄ oldatban szobahőmérsékleten 2 óra sötétben
3. Öblítés pufferben, 2x15 perc és desztillált vízben, 30 perc
4. Víztelenítés etanolsorozatban:
 - 25% 15 perc
 - 50% 15 perc
 - 70% 15 perc
 - 95% 15 perc
 - 100% 4x 30 perc
5. Mosás abszolút etanolban
6. Átitatás Spurr műgyantával:
 - absz. etanol és Spurr 3:1 arányú keveréke, egy éjszaka 4°C-on
 - absz. etanol és Spurr 1:1 arányú keveréke, 24 órán belül
 - absz. etanol és Spurr 1:3 arányú keveréke, egy éjszaka 4°C-on
 - tiszta Spurr, 48 óra 4°C-on
7. Öntés, polimerizálás. A teljesen átitatódott termőket öntőformába tettük, domborúra feltöltöttük légbuboréktól mentesen és 70°C-ra helyeztük egy

éjszakára. Másnap reggel kivettük a termosztátból és állni hagytuk, amíg teljesen kihűlt.

A mintákat a kísérleti program további részében metszetek készítésére használtuk fel.

Polietilén glikolba (PEG 1500) történő beágyazás menete:

négy lépésben impregnáltuk a fixált, víztelenített termőket

PEG: etilalkohol 1:3 arányú keverékében 30 percen át

PEG: etilalkohol 1:1 arányú keverékében 30 percen át

PEG: etilalkohol 3:1 arányú keverékében 30 percen át

Tiszta PEG 20 órán át.

Az öntőformában levő mintákat egy éjszakára 50°C-ra termosztátba helyeztük. A dermedést követően metszeteket készítettünk LSM vizsgálatokhoz.

Unicryl gyantás beágyazás

A puffer oldatban kimosott mintákat, víztelenítettük etanol sorozatban. A dehidratációt követően a hőmérsékletet fokozatosan csökkentettük -25°C-ig, ami megfelel az Unicryl gyanta (BB International, Cardiff, UK) beágyazási eljárások előírásainak. A polimerizációt -25°C-on három napon keresztül UV megvilágításnál végeztük.

Agarózos beágyazás

A búza kéthetes magkezdeményeit 2,5%-os glutáraldehid oldatban fixáltuk. Az embriókat sztereómikroszkóp alatt (Zeiss Stemi 2000-C típus) kiemeltük a magkezdeményekből. A kinyert embriókat tárgylemezre tett, 1:1 arányú LMP (SIGMA, op=30 °C, fp=65 °C, No. A-9414) agaróz-glükóz cseppbe helyeztük, a félig megszilárdult anyagot egy zárócseppel szendvicsszerűen lefedtük. A teljesen megszilárdult agarózból zsilippengével blokkot metszettünk ki, melynek a közepében beágyazva helyezkedett el az embrió. A további vizsgálatig (SEM) gutáraldehid 2,5%-os oldatában tároltuk.

• **Metszés**

A búzatermőket és az izolált petesejteket tartalmazó mügyanta blokkokat Reichert-Jung ULTRACUT E 701704 típusú mikrotóm segítségével, üveggéssel és gyémántkéssel metszettük meg. A félvékony (1-2 μm) metszetek 0,5% toluidinkékkel megfestettük. A vizsgálatot, fotódokumentációt OPTON ULTRAPHOT III típusú mikroszkóppal végeztük. A polimerizálódott petesejteket fáziskontraszt mikroszkóp alatt azonosítottuk és az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz (TEM) gyémántkéssel ultramikrotómmal ultravékony (70 nm) metszeteket készítettünk.

A PEG-be ágyazott búzatermőkből a Reichert (acélkéses) mikrotómmal 10-40 μm vastagságú metszeteket készítettünk. A metszeteket akridinnarancs (SIGMA c.i.46005) mikroszinezéssel (1 $\mu\text{l/ml}$) megfestettük, LSM vizsgálathoz.

Az Unicrylbe ágyazott kukorica portokokból félvékony, 1 μm vastag metszeteket készítettünk Reichert-Jung ultramikrotómmal, majd ezeket 0,5%-os metilénkékkel, valamint 0,5%-os toluidin kékkel festettük meg, a megfestett metszeteket 1%-os bórsavban tartottuk 10 percen keresztül. Ezt követően Zeiss Axioplan fotómikroszkóppal vizsgáltuk. Az ultravékony metszeteket (70 nm vastagság) ugyanezzel a mikrotómmal készítettük, melyeket 300-mesh nikkelt gridekre tettük, valamint uranilacetáttal, ólom-citráttal festettük. Megfigyeléseinket Zeiss EM 10C/CR transzmissziós elektronmikroszkóppal végeztük 60 KV-on.

• **Fénymikroszkópos vizsgálat**

A megfestett mikrospórákat és a félvékony, 1-2 μm vastagságú metszeteket vizsgáltuk OPTON ULTRAPHOT III típusú, valamint Zeiss Axioplan fénymikroszkóppal.

• **TEM vizsgálat**

Az ultravékony metszeteket fém gridekre helyeztük és uranilacetáttal, ólom-citráttal kontrasztosítottuk (Venable et al. 1965), Zeiss EM10C/CR valamint Zeiss EM910 típusú elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

• **SEM vizsgálat**

A fiatal búza embriók hosszúsági és szélességi kiterjedését a mikroszkóp okulár mikrométere segítségével meghatároztuk. A formvar bevonatú egylyukú gridekre

helyezett embriókat szénbevonattal láttuk el, uranilacetattal megfestettük, és Zeiss EM910 típusú elektronmikroszkóppal 60 kV-on vizsgáltuk.

A kéthetes embriókról morfológiai összehasonlítás céljából fotókat készítettünk elektronmikroszkóp segítségével SEM üzemmódban.

• LSM vizsgálat

Az embriózsák behatóbb morfológiai vizsgálatára, elemzésére Zeiss LSM 410 lézer scanning mikroszkópot használtunk. A konfokális lézer scanning mikroszkópia nagy előnye a hagyományos mikroszkóppal szemben az optikai szeletelőképessége, amelynek eredményeként jelentős térbeli kiterjedéssel rendelkező objektumok háromdimenziós feldolgozása, analizálása lehetővé válik, amire a félvékony metszetek fénymikroszkópos vizsgálata nem alkalmas.

A konfokális lézer scanning mikroszkóp az előzőekben említett tulajdonságai alapján alkalmas olyan jellegű vizsgálatokra, amelyek célja a sejtek, sejtiszervecskék térbeli helyzetének meghatározása.

Az embriózsákban az ellenlábás sejtek csoportjának, a kettősmagvú központi sejt, valamint a petekészülék térbeli elhelyezkedését a konfokális lézer scanning mikroszkóppal tudtuk feltárni azáltal, hogy a félvékony metszeteknél vastagabb szeleteket sikerült áttekinteni.

3.3.9. Elemzés, dokumentálás

• Alkalmazott matematikai módszerek

A szignifikancia szinteket egytényezős véletlen blokk varianciaanalízissel és többtényezős ANOVA varianciaanalízissel számítottuk ki.

A búza embriózsák adataiból a COREL DRAW számítógépes grafikai program segítségével az embriózsák alak- és térfogatváltozását tükröző sematikus ábrákat szerkesztettünk.

• Fotózás

Megfigyeléseinket fotók készítésével dokumentáltuk. A fénymikroszkópos fotófelvételeket OPTON ULTRAPHOT III típusú, valamint Zeiss Axioplan fotómikroszkóppal, Porst, Fuji, Kodak színes diafilmekre és Forte fekete-fehér negatív filmekre készítettük. Zeiss EM10C/CR valamint Zeiss EM910 típusú

elektronmikroszkóppal Kodak Electron Microscope Film 4489-re (SIGMA, F8395) készítettük a felvételeket.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Három *Triticum* faj pollenjének és embriózsákjának kialakulása optimális és stressz környezetben

4.1.1. *Triticum* fajok pollenfejlődésének összehasonlítása

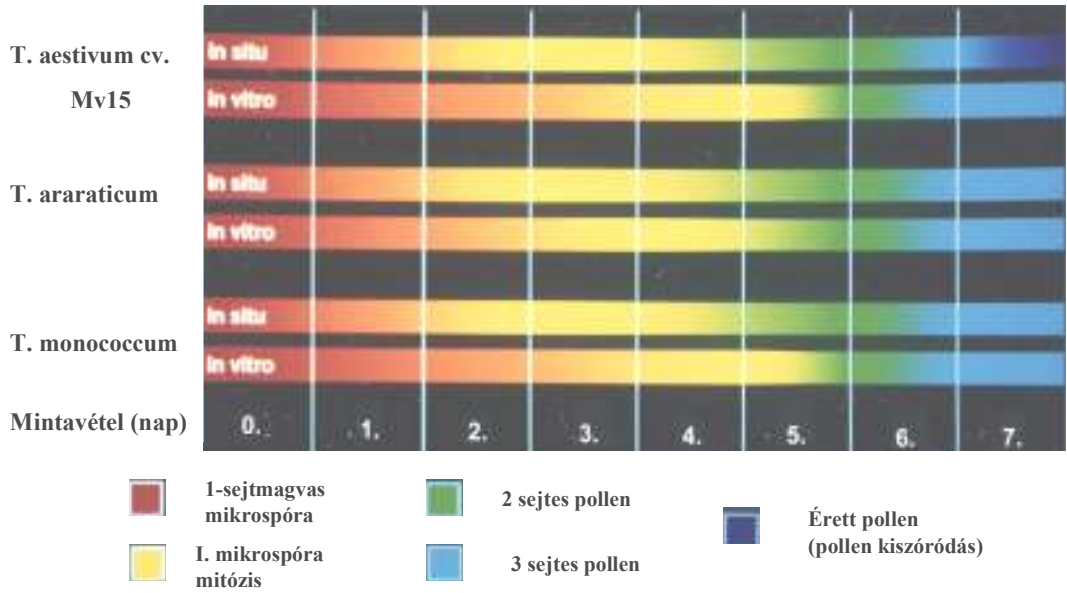
Vizsgálatunk során először a hím ivaros nemzedék fejlődését hasonlítottuk össze *in situ* és *in vitro* környezeti körülmények között. Az első mintavételkor mind a három faj a fejlődés azonos (Mu) középső egymagvas állapotban volt. A 4/1. ábrán szemléltetjük a fejlődés dinamikáját. A fejlődést tekintve az egymagvas állapotból kiindulva az első mikrospóra mitózison és a kétsejtes pollenen át a háromsejtes pollen állapot a mintavétel hetedik napján figyelhető meg mindhárom faj és a két környezet esetében. Az *in vivo* és *in vitro* körülmények fejlődésre gyakorolt hatása aránytalan különbséget nem eredményezett. Eltérés a *Triticum aestivum* cv. Mv 15 esetében figyelhető meg, ennél a fajtánál a pollen kiszóródás a hetedik napon bekövetkezett, míg a másik kettőnél még ez nem következett be.

A hím gametofiton fejlődését három, Mu, Bn, Tn fejlődési stádiumban a pollenszemek átmérője alapján vizsgáltuk. Az adatokat varianciaanalízissel elemeztük (4/1. táblázat). Tapasztalataink szerint a három fejlődési állapotban vizsgált pollenszemek méretük szerint nagy eltérést mutattak. Az eltérő ploidszintű *Triticum* fajok vonatkozásában az eltérések $p=0,1\%$ szinten megbízhatóan különböztek. A pollen méret és a ploidszint közötti összefüggést Johansen – Bothmer (1994) megállapította árpa kísérletei során, miszerint a ploidszint emelkedésével a pollenméret emelkedett. Egyedül a Tc fejlődési állapotban a tetraploid és a diploid érett pollen méretében nem volt szignifikáns különbség. A legkisebb mikrospóra mérete a diploid *T. monoccocum* volt az Mu állapotban (29,35 μ m). Az érett pollen tekintetében a *T. araraticum* és a *T. monoccocum* bizonyult a legkisebbnek (44,75 μ m, 45,80 μ m), míg a legnagyobb a *T. aestivum* cv. Mv15 (55,48 μ m) volt *in vivo* körülmények között. Megállapítható, hogy a különböző ploidszintű búzafajok pollen fejlődésének dinamikája eltérő.

A hexaploid és a tetraploid lassúbb, egyenletesebb, a diploid gyorsabb fejlődési intenzitással jut el az érett Tc állapotra. Az *in vivo* és *in vitro* környezetben hasonlítva össze a fajokat két esetben nincs szignifikáns különbség mégpedig az Mv 15 fajtánál a Bn fejlődési állapotban, a *T. araraticum*-nál a Tc állapotban. Az *in vitro* környezetben ugyancsak két esetben nem megbízható a különbség, az Mv15-nél Bn és Tc állapotban, valamint a *T. araraticum* és a *T. monococcum* Bn állapota között. Szignifikáns a különbség $p=5\%$ -on a *T. monococcum* Bn és Tc állapotú pollenek között.

Az *in vitro* érlelt pollen mindegyik faj esetében kisebb az összes fejlődési állapotban, mint a növényben fejlődött. Felvetődik a kérdés, hogy a pollenméret mennyire determinált genetikailag és mennyiben függ, pl. a tápanyagellátástól. A további vizsgálatok során bizonyára válasz kapható arra, hogy a kisebb pollen kevésbé életképes-e, vagy a tömlőhajtás során mutat-e eltérést, rövidebb tömlőt hajt-e?

4/1. ábra

A *Triticum* fajok hím gametofitonjának fejlődése *in situ* és *in vitro*

4/1. táblázat

A pollen méretének varianciaanalízise

A pollen mérete (μm)

| GENOTÍPUS | <i>In vivo</i> | | | <i>In vitro</i> | | |
|--------------------------|----------------|-------|-------|-----------------|-------|-------|
| | Mu | Bn | Tc | Mu | Bn | Tc |
| <i>T. aestivum</i> Mv 15 | 41,05 | 47,12 | 55,48 | 41,05 | 46,64 | 47,70 |
| <i>T. araraticum</i> | 31,68 | 38,85 | 44,75 | 31,58 | 35,02 | 43,65 |
| <i>T. monococcum</i> | 29,35 | 40,92 | 45,80 | 29,35 | 34,36 | 35,64 |

SzD (p=5%) = 1,2

SzD (p=1%) = 1,5 } Bármely két kombináció között.

SzD (p=0.1%) = 2,0

Mu: közepső 1-sejtmagvas mikrospóra; Bn: 2-sejtmagvas mikrospóra; Tc: érett 3-sejtes pollen

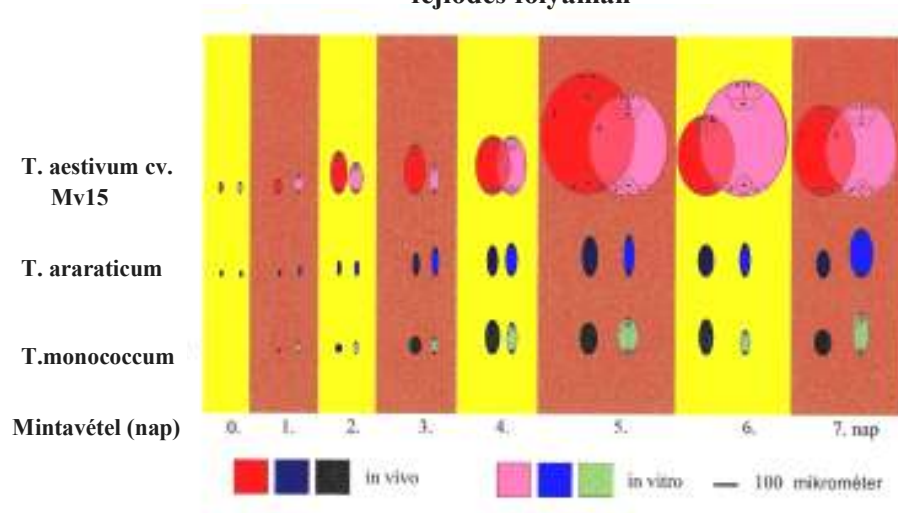
4.1.2. *Triticum* fajok embriózsákjának összehasonlítása, alak- és méretváltozása a fejlődés, érés során

In vitro a női gametofiton szerveződése során végbemenő mitotikus osztódások szinkronban történtek az *in vivo* kontrollal, mégis a fejlődő embriózsák intenzív hosszúságú növekedése mindhárom fajnál egy napos eltolódással következett be (4/2. ábra).

In vitro az embriózsák maximális méreteit is később érte el, mint természetes körülmények között. Érdekes jelenség volt, hogy az alacsonyabb ploidszintű fajoknál az *in vitro* fejlődött embriózsák maximális méretei meghaladták a természetes körülmények között kialakult embriózsák volumenét. Ez valószínűleg a táptalaj által biztosított környezet természetestől eltérő ozmotikus viszonyainak volt a következménye. Továbbá megállapítható, hogy az embriózsák kialakulásához vezető mitotikus osztódások időbeni lefolyását az *in vitro* viszonyok nem befolyásolták.

4/2. ábra

Különböző *Triticum* fajok embriósákjainak alak- és méretváltozása a fejlődés folyamán



Az általunk vizsgált mindhárom *Triticum* fajnál a 2-4 sejtmagvas átmenetben, a 2. mitózis idején következett be az embriózsák hosszmeretében a legnagyobb növekedés. Ekkor az embriózsák radiális hosszmerete a hexaploid fajnál közel háromszorosára (60 μ m-ről 176,8 μ m-re), a tetraploid fajnál kb. 1,5-szeresére (63 μ m-ről 98 μ m-re), a diploid *T. monococcum* esetében pedig kétszeresére (74 μ m-ről 142,5 μ m-re) nőtt (4/2. ábra).

4.2. A búza gametofitonjainak fejlődési szinkronja

4.2.1. A ploidszint és genotípus hatása a hím és női gametofiton fejlődésének szinkronitására

A *Triticum* fajokra jellemző 7-sejtes (8-sejtmagvas) Polygonum típusú embriózsák a makrogametogenezis során a makrospóra három, egymást követő mitotikus osztódásával jön létre.

Vizsgálataink kezdetén az első mintavételkor a hím ivaros nemzedék mindhárom fajnál a középső 1-sejtmag (Mu) mikrospóra állapotban volt. Ezzel szemben a női ivaros nemzedék szerveződése csak a hexaploid fajnál volt ennek megfelelő makrospóra állapotban. Az alacsonyabb ploidszintű fajok ugyanekkor a meiosis tetrád fázisáig fejlődtek, és a funkcionális makrospóra elkülönülése csak a következő napon volt megfigyelhető (4/2. táblázat).

A hexaploid faj 7-sejtes női gametofitonja a makrospóra három gyors mitotikus osztódásával három nap alatt kialakult, az alacsonyabb ploidszintű (tetra- és diploid) búzáknál ehhez egy nappal hosszabb időre volt szükség.

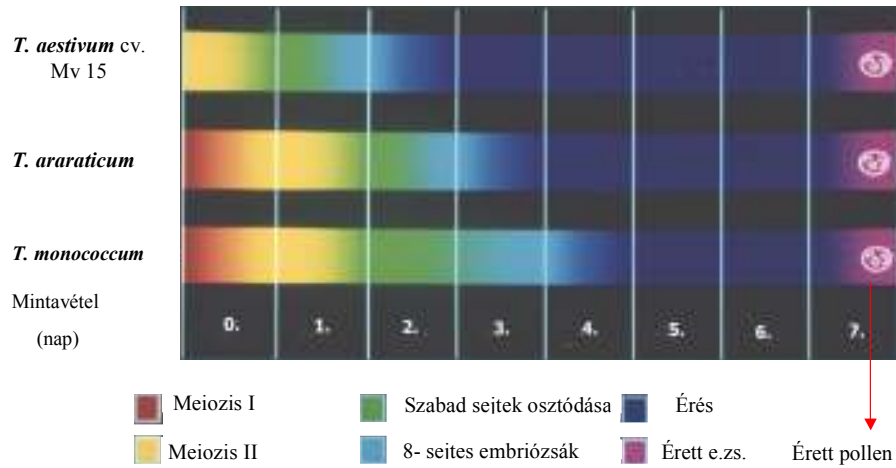
Összehasonlítva az embriózsák érését megállapítható a genotípusra utaló különbség. A *Triticum aestivum* cv. Mv 15 búzafajta gyorsabb érésű, egy nappal korábban éri el a 7-sejtes fejlettségi állapotot, mint a *T. araraticum* és a *T. monococcum*. (4/3. ábra).

4/2. táblázat
Különböző ploidszintű búzafajok embriózsákjának kialakulása és fejlődése

| Mintavétel (nap) | Fajok | | |
|---------------------|------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| | hexaploid <i>T. aestivum</i> cv. Mv15 | tetraploid <i>T. araraticum</i> | diploid <i>T. monococcum</i> |
| 0 | Makrospóra | Tetrád | Tetrád |
| 1 | 2-sejtmagvas | Makrospóra | Makrospóra |
| 2 | 4-sejtmagvas | 2-sejtmagvas | 2-sejtmagvas |
| 3 | 7-sejtes | 4-sejtmagvas | 4-sejtmagvas |
| 4 | ↓ | 7-sejtes | 7-sejtes |
| 5 | | ↓ | ↓ |
| 6 | | | |
| 7 | ↓ | ↓ | ↓ |

4/3. ábra

Az embriózsák kialakulása és a fejlődés dinamikája eltérő genotípusoknál



A megfigyelések arra utalnak, hogy a vizsgált növényfajoknál természetes körülmények között a növényben a hím és női gametofitikus folyamatok egyes lépései nincsenek összhangban, mivel a 7-sejtes embriózsák három, ill. négy nap alatt kifejlődött a funkcióképes makrospórából, míg az antézis, a 3-sejtes pollen kiszóródása a portokból csak a 7. napon, ill. később következett be. A hím- és a női ivaros folyamatok aszinkronjáról a búzanövényeken belül már Rajháthy (1955) is említést tett, azzal a megjegyzéssel, hogy nincsenek egyértelmű adatok arra vonatkozóan, hogy proterandria vagy protogynia jellemzi-e a búza autogam virágait (4/3.táblázat). Vizsgálataink egyértelműen igazolták, hogy a búza protogyn növény.

Eredményeinkből arra lehet következtetni, hogy a női gametofiton kialakulása hamarabb megtörténik, mint a pollen kiszóródása. A makrospóra-mitózisok során létrejövő 7-sejtes női gametofiton még egy további érési folyamaton megy keresztül, és felkészül a pollentömlő fogadására. Arról azonban, hogy a partenogenezis, az indukált gynogenezis, ill. az *in vitro* fertilizáció szempontjából az embriózsák sejtjeinek milyen fejlődési állapota lehet optimális, nem rendelkezünk adatokkal, ahhoz további vizsgálatok szükségesek.

A hexaploid *Triticum aestivum* cv. Mv 15 embriózsák fejlődése szemlélteti a többi vizsgált faj fejlődési stádiumait, morfológiai jellemzőkkel (4/4. ábra)

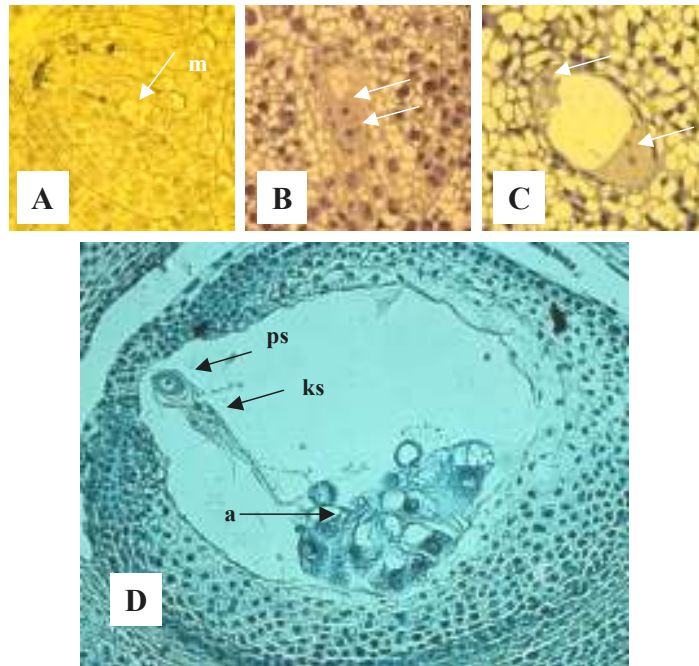
4/3. táblázat
A hím és a női gametofiton összehasonlítása természetes körülmények között
a három *Triticum* faj esetében

| Mintavétel (nap) | Pollenfejltségi állapot | Női gametofiton fejlettségi állapot | | |
|---------------------|----------------------------|-------------------------------------|---------------|---------------|
| | | T. aestivum cv. Mv15 | T. araraticum | T. monococcum |
| 0 | Mu | Makrospóra | Tetrád | Tetrád |
| 1 | Lu | 2-sejtmagvas | Makrospóra | Makrospóra |
| 2 | Pm | 4-sejtmagvas | 2-sejtmagvas | 2-sejtmagvas |
| 3 | eBn | 7-sejtes | 4-sejtmagvas | 4-sejtmagvas |
| 4 | eBn | 7-sejtes | 7-sejtes | 7-sejtes |
| 5 | eBn | 7-sejtes | 7-sejtes | 7-sejtes |
| 6 | Bc | 7-sejtes | 7-sejtes | 7-sejtes |
| 7 | Tc | 7-sejtes | 7-sejtes | 7-sejtes |

Mu: korai 1-sejtmagvas mikrospóra; Lu: késői 1-sejtmagvas mikrospóra; Pm: mitózis előtti mikrospóra;
eBn: korai 2-sejtmagvas mikrospóra; Bc: 2-sejtes mikrospóra; Tc: érett 3-sejtes pollen

4/4. ábra

A hexaploid *Triticum aestivum* cv. Mv 15 búza
makrogametogenezise



A: a nyíl a funkcionális makrospórát mutatja.

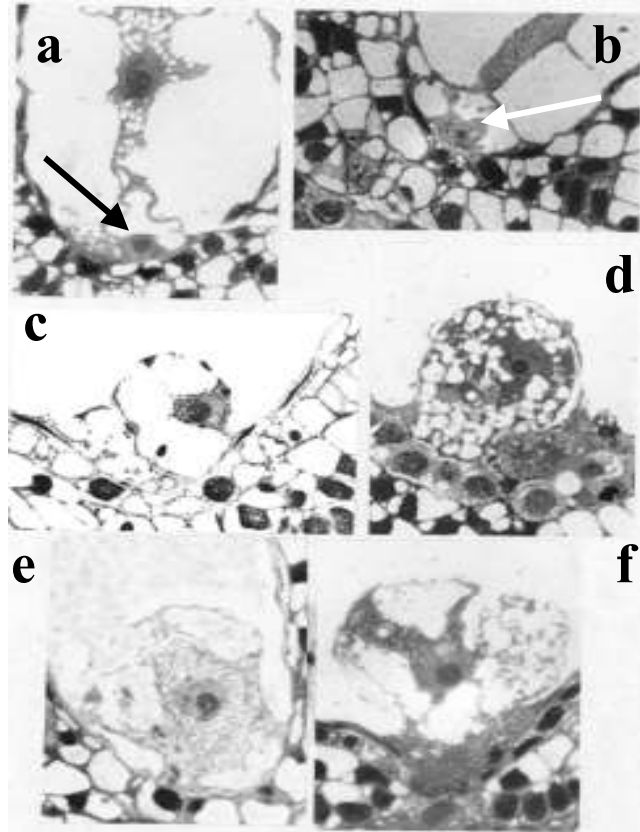
B: az első makrospóra mitózis, a nyíl a két sejtmagot jelzi.

C: az embriózsák első hosszirányú megnyúlása benne a négy sejtmaggal (nyilak).

D: az embriózsák hosszszelvénye a maximális kiterjedésénél, a nyilak a differenciálódott sejteket mutatják az embriózsákban. (ps) petesejt, (ks) központi sejt, (a) antipod sejtek.

4/5. ábra

A petesejt fejlődése a 7-sejtes állapottól az antézis-kori
 érett petesejt állapotig *T. aestivum* cv. Mv15



a: a petesejt a 7-sejtes állapot létrejöttékor. **b:** a citoplazma növekedésével kezd nőni a petesejt. **c:** a megnagyobbodott petesejt körte alakúvá formálódik. **d:** az embriózsákban jellemző körte alakú petesejt és benne differenciálódnak a sejtorganellumok. **e:** a körte formájú petesejtben jól látható a sötétén festődő sejtmag. **f:** érett, receptív petesejt.

Az *in planta* fejlődött petesejtek a vizsgált intervallumban, időbeli érését figyelve megállapítható (4/4. táblázat), hogy méreteinek alakulásában lényeges a tapasztalható különbség. A hím gametofiton Bn, Bc, fejlettségi állapotakor a detektált petesejt mérete 14-17 μm , az érett antéziskori hím gametofiton esetében a petesejtek méretének tartománya 40-58 μm közötti volt. A kialakuláskori petesejtet viszonyítva az érett, megtermékenyítésre felkészült petesejthez közel a három- ill. a négyszeresére növekedett. A ploidszint tekintetében a hexaploid búza érett petesejtje a legnagyobb 58 μm , a tetraploid és diploid érett petesejt 42,5 μm és 40,5 μm átmérőjű. A két alacsonyabb ploidszintű érett petesejt méretében nem közelítette meg a hexaploidét, ugyanakkor a tetraploid és a diploid érett petesejtek méreteikben nem különböztek lényegesen egymástól. Az érés során a petesejt (4/5. a-f ábra) méret és alakváltozáson megy át, (4/4. a és b ábra kezdeti állapot), megfigyelhettük az un. körte formát, ami nagyon jól látható a 4/5. d és e ábrán. Lényeges morfológiai különbséget az azonos fejlettségi állapotú petesejteknel félvékony metszeteken vizsgálva nem figyeltünk meg. Összevetve az embriózsák fejlődésénél tapasztaltakkal a fennálló méretbeli eltéréseket követték a petesejtek is. Az SzD érték számítása a metszetkészítési munka jellegéből eredően, kevés ismétlés számú minta okán nem volt lehetséges.

4/4. táblázat**Különböző ploidszintű búzafajok petesejtjének
átmérői**

| Mintavétel (napok) | Petesejtátmérő (µm) | | |
|-------------------------------|-----------------------------|----------------------|----------------------|
| | <i>T. aestivum</i> cv. Mv15 | <i>T. araraticum</i> | <i>T. monococcum</i> |
| 1. | | | |
| 2. | 14,5 | | |
| 3. | 46,4 | 14,5 | |
| 4. | 49,3 | 20,3 | 17,4 |
| 5. | 50,7 | 34,8 | 34,8 |
| 6. | 43,5 | 29,0 | 29,0 |
| 7. | 58,0 | 42,5 | 41,1 |

4.2.2. A *Triticum* faj fiatal embriói

A kéthetes korban kipreparált embriókat viszonyítottuk a desztillált vízben duzzasztott érett szemekből kiemelt embriókhoz (csírákhoz), valamint a pollen kiszóródáskori embriózsák térfogatához a 4/5. táblázatban.

Figyelemre méltó az embrió gyors növekedése, amit a diploid búzánál láthatunk az adatok tükrében. A kéthetes embrió mérete jóval meghaladja a hexaploid embrió méretét. Az érett embrió mérete viszont már kisebb és a hexaploidé a vezető szerep. A tetraploid búza kéthetes embriója a legkisebb és ez megmarad az érett állapot bekövetkeztékor is. A magokat, ill. magkezdeményeket szintén megmértük és összevetettük az adatokat, melynek eredménye ugyancsak jellemzi a fejlődés folyamatát.

Kitűnt, hogy a hexaploid búzánál a kéthetes magkezdemény a végleges szem méret 48%-át, a tetraploid csupán a 22,8%-át, a diploidnál viszont az 58%-át érte el. Az *in vitro* fertilizáció során létrejövő embriók viszonyításához fontos tájékozódó információként használhatjuk ezeket az eredményeket.

Az antéziskori embriózsákot és a kéthetes embriót összehasonlítva nagy eltérések tapasztalhatók. Legnagyobb embriózsákja a hexaploid búzának van, így az embrió ehhez viszonyítva 54-szeres növekedéssel éri el a kéthetes embrió térfogatot. Ezt a növekedést jóval felülmúlja a tetraploid (1230-szoros), de méginkább a diploid búza (2923-szoros) térfogat növekedéssel.

Az embriók alakbeli különbsége nagy változatosságot mutat (4/6. ábra, a, b, c). A szemtermések alakjában is jellegzetes elkülönítésre alkalmas jegyek jutnak kifejezésre, akár a szemtermés színe, egy külső bélyeget említve.

Azoknak a *Gramineae* fajoknak igen limitált a száma, melyeknél rendelkezünk részletes információkkal arról, hogy a makrosporogenezistől a virágzásig tartó időszak alatt milyen konkrét strukturális és fiziológiai/biokémiai változások mennek végbe az embriózsák egyes sejtjeiben (Bennett 1973, Russel 1979, You és Jensen 1984, Cass és Peteya 1986, Dow és Mascarenhas 1991). Az eddigi megfigyelések elsősorban a sejtfaalak kialakulását helyezték fókuszba.

Pontos ismereteink azonban mindaddig nincsenek arról, hogy a 7-sejtes állapot kezdetén is megtermékenyíthető-e az embriózsák (pl. mesterséges inszeminációval), ill. arról, hogy a manipulációs kísérletek számára a gametofitikus sejtek melyik fejlődési fázisa a

legmegfelelőbb. A legújabb publikációk már beszámolnak különböző fajok gametoplasztjainak eredményes fúziójáról is (Kranz et al. 1995, Kranz és Dresselhaus 1996). Eddig elért eredményeink indokoltá teszik a sejtbiológiai vizsgálataink folytatását a gametoszomatikus keresztezésre szánt fajok hím és női gametofitonjai fejlődési stádiumainak még pontosabb identifikálása irányába.

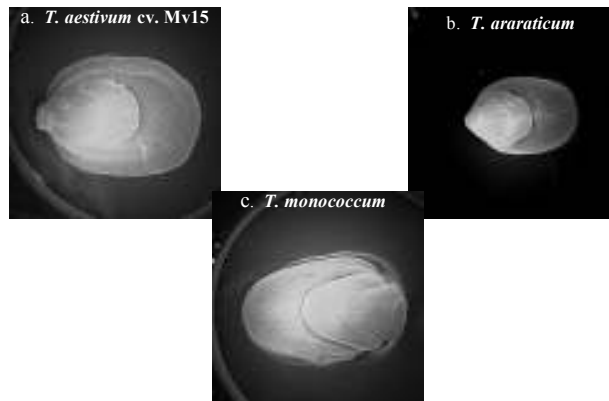
Vizsgálataink eredményei a búza *in vitro* fertilizációs program (Kovács et al. 1994, Kovács et al. 1995) sikeres továbbfolytatásához ad információt. Az embriózsákra vonatkozó morfológiai megfigyeléseink megkönnyítik a petesejtek mechanikus élve izolálását és a fúzió szempontjából optimális fejlettségű és fiziológiai állapotú gaméták izolálását. Ezáltal javítani lehet a sikeres ivarsejtfúziók gyakoriságát és a fúziós produktumok növényregenerációs képességét.

4/5.táblázat
Eltérő ploidszintű búzák embriózsákjának és
embrióinak térfogata

| Ploidszint | Embriózsák (μm^3) | 2 hetes embrió (μm^3) | csíra v. embrió (érett szem) (μm^3) |
|-------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| Hexaploid | 1,26E+7 | 68,7E+7 | 611,0E+7 |
| Tetraploid | 0,002E+7 | 24,6E+7 | 416,0E+7 |
| Diploid | 0,003E+7 | 87,7E+7 | 597,0E+7 |
| SZD 5% | 0,23E+7 | 7,8E+7 | 112,0E+7 |
| SZD1% | 0,52E+7 | 10,8E+7 | 154,0E+7 |

4/6. ábra

A hexaploid, a tetraploid és a diploid búza kéthetes embriói



- a: az embrió téglalap alakú, a szkutellum a téglalap csúcsainál lekerekített.
- b: az embrió a gyököcske irányába csúcsosodó.
- c: az embrió a gyököcske felől félkör alakú, a szkutellum irányában keskenyedő.

4.3. A hexaploid búza petesejt és pollen érésének vizsgálata

4.3.1. A hexaploid búza petesejt érésének citológiai értékelése és ultrastruktúrája

4.3.1.1. A petesejtek, a sejtmagok méretváltozása az életkoruk függvényében

A horizontális és vertikális átmérők vizsgálatához a kasztrálás időpontjától számítva 3, 6, 9, 12, 15, 18 napos petesejteket használtunk. A kasztrálástól számított 21 napos sejteket még sikerült excizálnunk, de azok degradáltak voltak, nem volt felismerhető sértetlen sejtmembránjuk.

A petesejtek gömb alakjukat az izoláció után veszik fel, hiszen addig a szinergidák között helyezkednek el és körte alakúak. A mérési adatokból leolvasható, hogy a horizontális és vertikális irányba való eltérés nem számottevő, így a petesejteket gömb alakúaknak tekinthetjük.

A 3 napos petesejtek átlagos átmérője Chinese Spring esetében 60,91 μm , a Siete Cerros

fajtánál 59,82 μm . A Chinese Spring fajta petesejt átmérője folyamatosan növekszik a 18. napig, ekkor értéke 85,86 μm , a Siete Cerros legnagyobb méretét 12 napos korban éri el (79,70 μm), majd sejt átmérője lecsökken 73,41 μm -re (4/6., 4/7. táblázatok, 4/7-4/12., 8/33. ábrák)

A megtermékenyítés szempontjából meghatározó 6 és 9 napos sejtek átmérője 63,49 és 73,91 μm között változott. A petesejtmagokat vizsgálva megállapíthatjuk, hogy a Chinese Spring 15 napos (14,17 μm), a Siete Cerros 12 napos korban (12,89 μm) éri el a legnagyobb átmérőjét. A maximális nagyság elérése után mindkét fajtánál csökken az átmérő. A sejt és a sejtmag egymáshoz viszonyított aránya Chinese Spring esetén folyamatosan nő, míg a másik fajtánál a legnagyobb eltérés 12 napos korban van, utána csökken a különbség.

4/6. táblázat
Chinese Spring búzafajta átlagos petesejt és
petesejtmag átmérője

| Napok | Sejtátmérő (μm) | Magátmérő (μm) | Különbségük |
|---------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------|
| 3 | 60,92 | 9,77 | 51,15 |
| 6 | 66,01 | 11,09 | 54,92 |
| 9 | 73,92 | 10,69 | 63,23 |
| 12 | 74,40 | 11,82 | 62,59 |
| 15 | 83,35 | 14,18 | 69,17 |
| 18 | 85,87 | 13,52 | 72,35 |
| SZD 5% | 4,95 | 1,02 | |
| SZD1% | 6,55 | 1,36 | |

4/7. táblázat
Siete Cerros búzafajta átlagos petesejt és
petesejtmag átmérője

| Napok | Sejtátmérő (μm) | Magátmérő (μm) | Különbségük |
|---------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------|
| 3 | 59,83 | 9,56 | 50,27 |
| 6 | 63,49 | 10,91 | 52,58 |
| 9 | 73,32 | 12,83 | 60,49 |
| 12 | 79,70 | 12,90 | 66,81 |
| 15 | 73,98 | 12,77 | 61,22 |
| 18 | 73,41 | 11,12 | 62,29 |
| SZD 5% | 3,65 | 1,25 | |
| SZD1% | 4,82 | 1,66 | |

4.3.1.2. A petesejtek strukturális vizsgálata a hexaploid Chinese Spring búzafajtánál

- Kasztrálástól számítva 3 napos petesejt

A sejt mérete kicsiny, a citoplazmában kis méretű vezikulumok figyelhetők meg egyenletes eloszlásban. Az organellumok (mitokondriumok, plasztiszok) félkörben veszik körül a sejtmagot. A sejtmag jól kifejezett, egy magvacskát tartalmaz. A sejt membránja igen sérülékeny az izolálás során történő beavatkozáskor (4/7. ábra).

- Kasztrálástól számítva 6 napos petesejt

A sejt méretében nincs nagy változás, de a sejtmagéban van. A magvacska kifejezettebben látszik. Az organellumok körkörös, szinte sugarasan oszlanak el a mag körül. A citoplazma vezikulumai egybeolvadnak, méretük így lényegesen nagyobb. A sejtmag heterokromatikus, készül a megtermékenyülésre. A nukleoluszban nukleoláris vezikulumok találhatóak, mely rRNS szintézisre utal, tehát jelzi, hogy aktív a mag (4/8. ábra).

- Kasztrálástól számítva 9 napos petesejt

A plazma sűrűbb. Az organellumok a mag körül, de a sejt egyik pólusán helyezkedik el. Ismét kis vezikulumokat találhatunk a citoplazmában. A nukleolusz mérete nőtt, van benne nukleoláris vezikulum. Lényeges különbség a 6 napos állapothoz képest, hogy itt az organellumok polarizáltan helyezkednek el, és a plazma perifériális részén is megtalálhatóak. A sugaras eloszlásuk randomszerűvé válik, de csak az egyik póluson (4/9. ábra)

- Kasztrálástól számítva 12 napos petesejt

A mag térfogata növekszik és a vezikulumok fuzionálnak. Az organellumok nem veszik körbe egyenletesen a sejtmagot, csak az egyik oldalán fordulnak elő. A nukleolusz granulált és sok vezikulumot tartalmaz.(4/10. ábra)

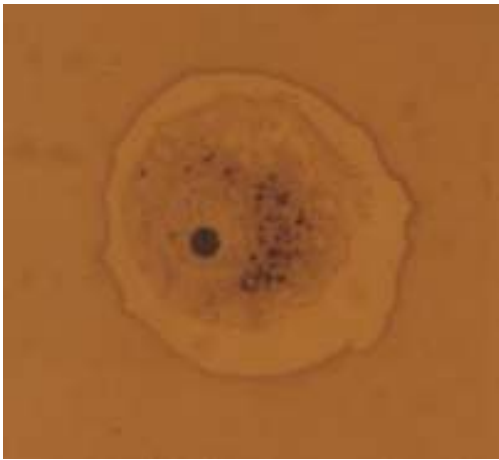
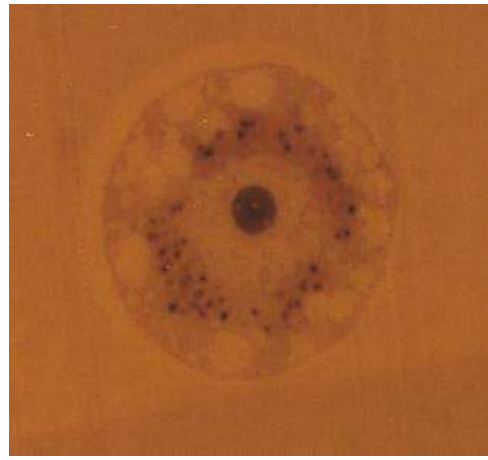
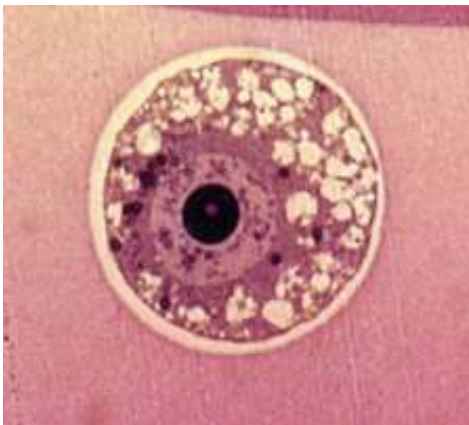
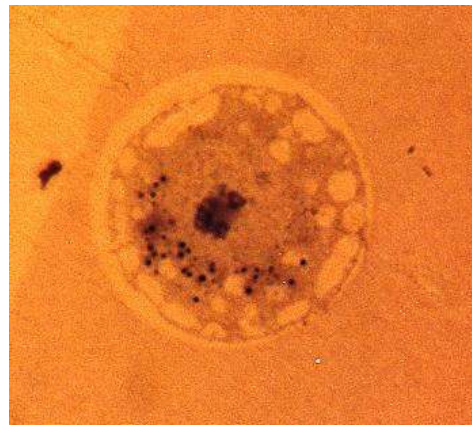
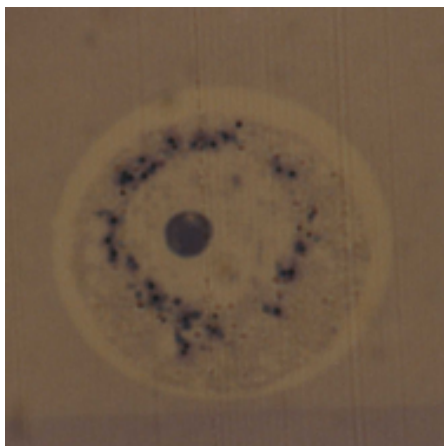
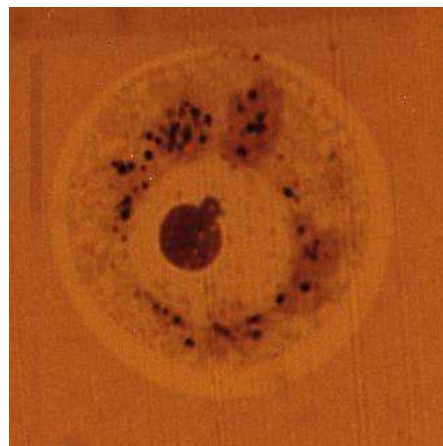
- Kasztrálástól számítva 15 napos petesejt

A magvacska vezikulumai kezdenek leválni (nukleolusz fragmentáció), vagyis rRNS jut ki a nukleoluszból. Az organellumok körkörösén helyezkednek el a mag körül. A vezikulumok kisebbek, a vakuolumok térfogata csökken. A maghártya kevésbé kifejezett (4/11. ábra)

- Kasztrálástól számítva 18 napos petesejt

Nagy a magvacska, a vezikulumok lefűződése itt is megfigyelhető. A plazma a nukleusz körül zsákszerű formában jelenik meg. Ezekben a zsákokban helyezkednek el az organellumok, melyek körbe veszik a sejtmagot. A sejtmag méret egy kissé, míg a sejtmérete kevésbé csökken (4/12. ábra)

A megfigyeléseket alátámasztják Rajki (1961) virágzásbiológiai kutatásai. Megállapította, hogy a nagyon fiatal fejlettségi állapotú bibe (a bibekaréjok differenciálódásakor) fogékonysága igen csekély, az ilyen virágokat megporozva csak nagyon kevés szemtermés kötődött. A kasztrálás után 4-6 nappal a bibék fejlettsége már megfelelő volt a magas szemkötés eléréséhez. A kasztrálás után 12-14 nappal a bibék öregedése miatt már nem kapott szemkötést. Rajki a női gametofiton (embriózsák és petesejt) állapotát nem vizsgálta. Molnár-Láng és Rajki (1983) a termő korának hatását vizsgálták a fejlődő búzaszemek stuktúrájának alakulására.

A Chinese Spring fajta izolált petesejtjeinek struktúrája**4/7. ábra 3 napos petesejt****4/8. ábra 6 napos petesejt****4/9. ábra 9 napos petesejt****4/10. ábra 12 napos petesejt****4/11. ábra 15 napos petesejt****4/12. ábra 18 napos petesejt**

4.3.1.3. A petesejtek ultrastruktúrája

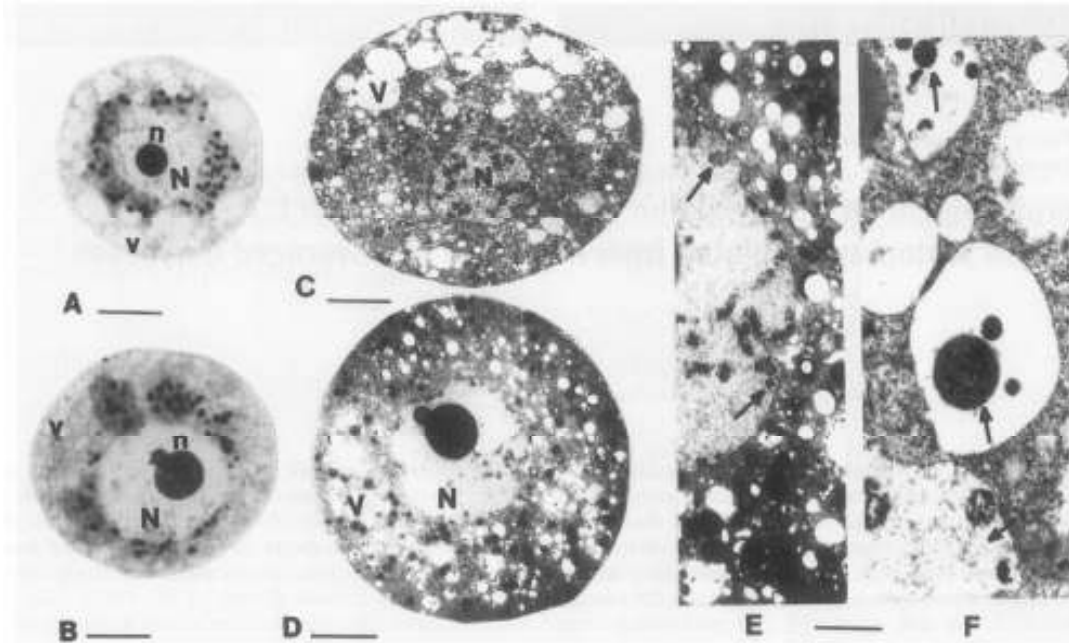
Az izolált petesejtek rendre gömb alakú protoplasztok mind a fiatal, mind az un. öreg állapotban egyaránt (4/13. ábra A, B). Az *in situ* körülmények között körte formát mutató búza petesejt (You és Jensen, 1985) az izolálást követően válik gömbölyűvé a megváltozott ozmotikus nyomás, a természetes szöveti környezet, és a szomszédos sejtek térbeli közelsége okozta nyomóerő hatására.

A félvékony metszeteken (0,5-1 μm) a fiatal petesejtek megjelenésére jellemző (4/13. ábra, A) a periférikusan elhelyezkedő vakuolumok, a nagyméretű sejtmag a sejtmagvacskával, mindezt körülvevő sűrű citoplazma. A petesejt térfogata növekvő tendenciát mutat az érés felé haladva. A fiatal fejlettségi állapotú petesejt átlagos térfogata 96917 μm^3 , ami 135900 μm^3 -re emelkedett 12 nappal az antézist követően. Az adatokból kitűnt, hogy a búza petesejt nagyobb térfogatú, mint az izolált kukorica petesejt, ami 62418 μm^3 volt az antéziskor (Faure et al. 1992).

A fénymikroszkópos megfigyeléseinket megerősítették azok a vizsgálatok, amelyeket TEM segítségével végeztünk. A 4/13.C, és D ábrák megmutatják a 3 nappal az antézis előtti fiatal állapotú izolált petesejtet, ami megegyezik *in planta* állapotúéval (You és Jensen 1985). A citoplazmában lipid testek, mitokondriumok, amiloplasztok, valamint keményítő szemcsék találhatóak a perifériális vezikulumok között. A receptív korú petesejt (antézis-kori) ultrastrukturális karakterére jellemző a sűrű citoplazma, nagyszámú mitokondrium jelenléte, a nukleuszban az endoplazmás retikulum, az erőteljes polarizáltság, és a határozott festődés. Az endoplazmatikus retikulum a sejt életében fontos szerepet játszik, az érés folyamán a funkcionális eltérést jelzi a struktúra. Az öreg állapotú petesejt (4/13.B ábra) struktúrája számos jellegzetességet mutat. A sejtmag kromatin állományában degradáció figyelhető meg. A kromatin maradványok hozzátapadtak a sejtmag membránhoz, és un. membrán blebbingek alakultak ki (4/13.E ábra). Nagyon nagyszámú lipid, keményítő, protein halmozódott fel a citoplazmában. A mitokondriumok normális struktúrájúak, de a vezikulumokban lízis figyelhető meg, és megjelennek az autofág vakuolumok (4/13.F ábra). Ezek a jelenségek megtalálhatók az állati sejteknél (Cohen 1993) és növényi szuszpenzor sejteknél (Jones és Dangl, 1996, Gray és Johal, 1999), és a programozott sejthalál jellegzetes szimptomái megfigyelhetők az öreg fejlettségi állapotú petesejteknél.

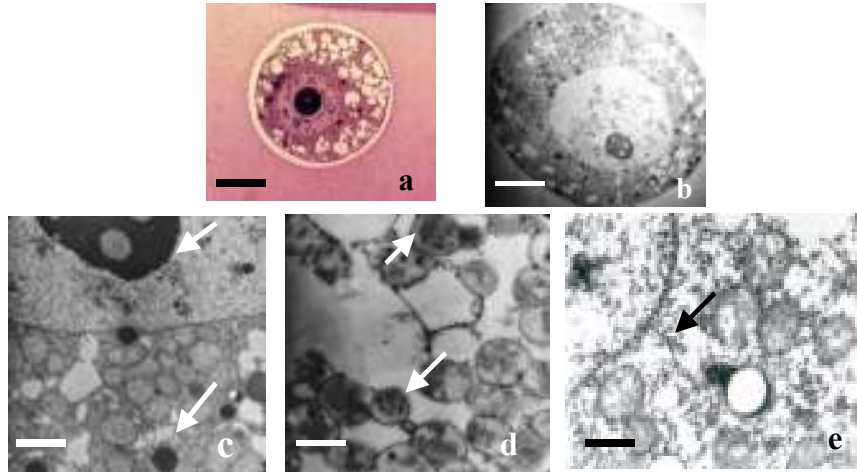
4/13. ábra

Izolált fiatal és öreg búza protoplaszt



A: félvékony metszet fiatal petesejtről (3 napos). Bar: 18 μ m. **B:** félvékony metszet idős petesejtről (12 nappal az antézis után). Bar: 17 μ m (N= nukleusz, n= nukleolusz, V= vakuolum). **C:** Transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) kép a fiatal protoplasztról. Jellemző az organellemek központi elhelyezkedése és a periférikus nagyszámú vakuolum (N nukleusz, V vakuolum). **D:** TEM kép az idős protoplasztról. Figyelemre méltó a tápanyagfelhalmozódás (lipid, keményítő) és a degeneratív nukleusz. Bar: 12,8 μ m. **E** és **F:** részlet a petesejt citoplazmájáról és sejtmagjáról a programozott sejthalál jegyeivel, autofág vakuolumok és a sejtmag membránján elhelyezkedő blebbingek (nyilak). Bar: 5,3 μ m.

4/14. ábra
Izolált receptív búza protoplaszt



a: megtermékenyítésre kész petesejt félvékony metszete, az antézis után 3 nappal. Bár: 17,4 μm . **b:** TEM kép a receptív protoplasztról, egyenletes maghártya, a vakuolumok egyenletes eloszlásúak. **c:** részlet a sejtmagról a kromatidokkal, lipid cseppekkel (nyilak). Bár: 12,5 μm . **d:** részlet a mitokondriumokról (nyilak). **e:** a maghártyához kapcsolódó ER (endoplazmatikus retikulum), (nyíl). Bár: 0,97 μm .

A petesejt strukturális vizsgálatai megerősítették azokat a korábbi hasznos megfigyeléseket, melyek szerint a női gametofiton nem túl hosszú idő után (megközelítően 2 héttel az antézist követően) elveszíti a receptivitását. Az idős petesejt kevésbé megtermékenyülő, mint a fiatal állapotú petesejt. A különböző fejlettségi állapotú búza petesejt fuziogenitására vonatkozóan még nem rendelkezünk adatokkal. Az elvégzett vizsgálataink a kezdetét jelentik azoknak a munkáknak, amelyek során a női gametofiton funkcióját és a mikromanipulációs célokra való alkalmasságát tárja fel. Az *in vitro* ivarsejt fúziós rendszer alkalmas a gametoszomatikus sejthibridek előállítására is, ezzel áthidalható a szexuális és a szomatikus hibridizáció közötti távolság. Emellett az eljárás alkalmazható olyan interspecifikus, intergenerikus hibridek előállítására, amelyek a természetben a sporofitikus inkompatibilitás okán nem jön létre. Az *in vitro* fertilizációs és mikroinjekciós technikák lehetnek segítségünkre a sikeres ivarsejtfúziós kísérletekben, hogy az így kapott fertilis hibrideket felneveljük *in vitro* tenyészetekben (Dumas és Faure 1995).

4.3.2. A Chinese Spring hexaploid búzafajta érett pollenjének vizsgálata

A Chinese Spring érett, háromsejtes pollenjének adatait táblázatban foglaltuk össze (4/8. táblázat). A pollen átmérője érett állapotban 55,7 μ m, mely megegyezik a hexaploid Mv 15 búza fajta érett petesejtjével, 58 μ m. Az érett pollenben lévő két hímvarsejt mérete 16 μ m és 15,2 μ m, az egyik kismértékben eltér, de ez következetesen meglévő különbség. A vegetatív sejt 13,9 μ m, és a sejtmagja 6,9 μ m, és alakilag különbözik a gamétáktól. A hímvarsejtek a hosszúságuk alapján arányaiban hozzávetőleg negyede az érett petesejtnek.

4/8. táblázat

**Chinese Spring búzafajta hím gametofiton
alkotói (μm)**

| | |
|---------------------------|--------------|
| Pollen átmérő | 55,70 |
| Generatív sejt (1) | 16,00 |
| Generatív sejt (2) | 15,20 |
| Vegetatív sejt | 13,90 |
| Vegetatív sejtmag | 6,90 |
| SzD 5% | 1,33 |
| SzD 1% | 1,76 |

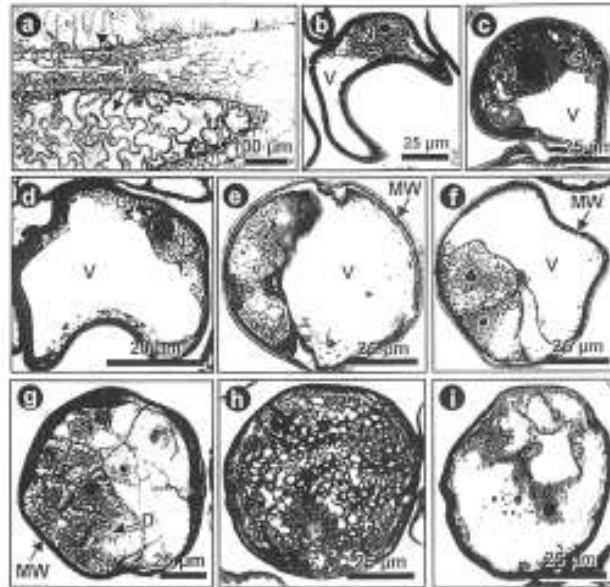
4.4. Kukorica mikrspóra embriogenezis

Közvetlen a tenyésztésbe vonás után az antérákból készített félvékony metszetek tanulmányozása során megfigyeltük, hogy az antérák nagymennyiségű fénymikroszkóppal kimutatható mikrspórát tartalmaztak, melyek egymással szoros kapcsolatban álltak, irreguláris formájúak voltak (4/15.a ábra). A tanulmányozott mikrspórák többsége a késői 1 magvas állapot morfológiai sajátosságait hordozta, nagyméretű vakuolumok és a perifériára szoruló 1 sejtmag jelenléte volt jellemző rájuk (4/15.b ábra). A mikrspórafal jellegzetesen jól struktúráldott volt, és erősen festődött. Az osztódó mikrspórák a tenyésztésbe vonás 2. napján jelentek meg, ugyanakkor a mikrspórák többsége az első, ill. a 2. napot követő időintervallumon belül 1 magvas állapotú maradt (4/15.c és d ábrák). A mikrspórakultúra ezen korai szakaszában az első napok során, valamint azt követően a mikrspórák többsége duzzadni kezdett és gömb alakot vett fel. A sejtek többségében a citoplazma sötét tónusúvá vált. A tenyésztés 5. napjától kezdődően a mikrspóra osztódások jellegzetessé váltak (4/15.e ábra), valamint többsejtes mikrspóra (MCM) struktúrák jelentek meg (4/15.f ábra), előfordulásuk gyakorinak volt mondható. A többsejtmagvas (MNM) mikrspórák jelenlétét is megfigyeltük, ezek száma sokkal alacsonyabbnak bizonyult (kb. 0,5%). A többsejtes mikrspóra aggregátumokban fellépő további sejtosztódásokat észlelhettünk a 7. naptól (4/15.g ábra). Különböző sejtípusok, mint az MCM és MNM típusú sejtaggregátumok léteztek a kultúrában (4/15.g és h, 4/16.a és b ábrák). Sok degenerált, nem indukálódott mikrspórát is találtunk. Ezeknek a különböző morfológiai formáknak az előfordulása különböző androgenetikus utak jelenlétét mutatja.

A tenyésztésbe vonás 13. napján proembriók jelentek meg a kultúrában (4/16.c ábra), ahol az embrió jellegű struktúrák a szöveti differenciálódás korai jegyeit mutatták (4/16.d ábra) és a 16. nap után voltak megfigyelhetők.

4/15. ábra

Kukorica antéra androgenézis indukciójának fénymikroszkópos vizsgálata. I.



a: közvetlen a hidegkezelés után az antérából készült metszet.

b: mikrspóra részlet közvetlen a hidegkezelést követően.

c és d: mikrspórák 1 nappal a tenyésztési kultúrába vétel után.

e: első osztódás a mikrspórában 5 nappal a kultúra indítása után.

f: 4 sejt az az MCM (soksejtes mikrspóra) az 5 napos kultúrában.

g: MCM mitózis látható a 7 napos kultúrában (D).

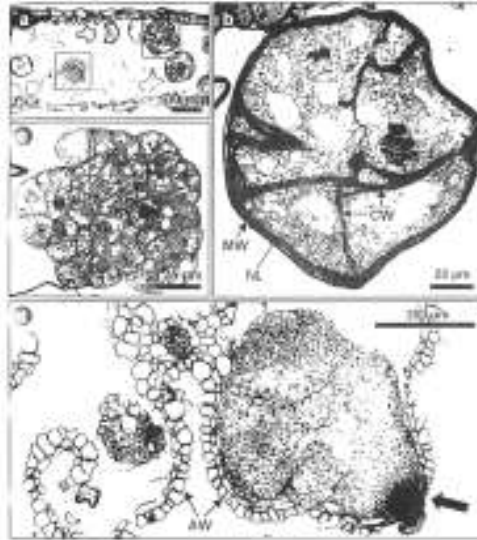
h: sűrűn vakuolizált, keményítőben gazdag MCM a 13 napos kultúrában.

i: MNM (soksejtmagvas mikrspóra) 13 nappal a kultúra indítása után

Cy: citoplazma, D: osztódás, M: mikrspóra, MW: mikrspóra fal,
N: nucleus, V: vakuolum

4/16. ábra

Kukorica antéra androgenézis indukciójának fénymikroszkópos vizsgálata II.



- a:** MCM (soksejtes mikrospóra) és proembrió látható a 13 napos kultúrából készült metszeten.
- b:** MCM amelyen még látható az eredeti sejtfal. Megfigyelhető az új réteg közel az intinéhez és a vastag sejtfal, amint körülveszi az elkükonült sejteket.
- c:** egy proembrió részlet osztódó sejtekkel. Az eredeti sejtfal nincs jelen ebben a struktúrában
- d:** embrió-szerű struktúra amely a szöveti differenciálódás korai jegyeit mutatja 16 napos kultúrában. A struktúra szétszakítja az antéra falát (nyíl).
AW: antéra fal, CW: sejt fal, E-L S: embrió-szerű struktúra, NL: újonnan szintetizálódott réteg, MW mikrospóra fal.

4.4.1. Ultrastrukturális megfigyelések

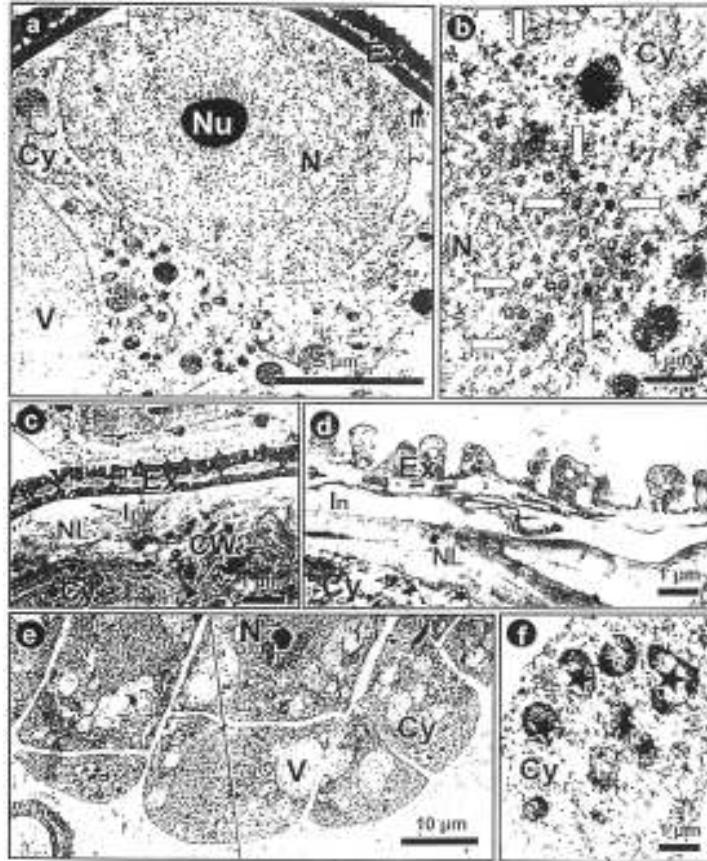
A tenyésztésbe vonást követő kezdeti időszakban a mikrospórák kevés organelummal jellemezhető citoplazmával rendelkeztek és a riboszómák is alacsony denzitást mutattak (4/17.a ábra). A sejtmagvak kromatin állománya dekondenzált állapotban volt és a sejtmagvacskák majdnem kizárólagosan sűrűn fibrilláris komponenseket alkottak. A pollenfal vékony intineből és egy jellegzetes struktúrájú exineből állt. Megfigyeléseink alapján elmondható, hogy a sejtmaghártyán található pórusok kezdetben alacsony száma jelentősen növekszik, akár 2-3-szorosa is lehet az eredetinek. A tenyésztés első stádiumában követhető nyomon ez a folyamat és még a sejtmagosztódás előtt figyelhető meg (4/17.b ábra).

Az ultrastrukturális vizsgálatok során az MCM típusú mikrospóra aggregátumokra fordítottuk a figyelmünket. A sokféle struktúra közül leginkább ez érdekelt minket (4/17.c ábra). A fentebb említett aggregátumok 4-8-ig terjedő sejtszámmal rendelkeztek, amelyeket az eredeti mikrospóra-sejtfal vett körül. Ez a szerkezet, ill. fejlődési stádium a 4/16.a és b. ábrán követhető nyomon. Jól látható az újonnan szintetizálódott vastag sejtfal az eredeti mikrospóra intinéje alatt (4/17.c ábra). Ezeknek a sejteknek a citoplazmája sűrűbb, mint közvetlen az indukció után lévő sejtek citoplazmája, beleértve ebbe a magasabb számú riboszómát, a számos kis méretű mitokondriumot és a plasztiszokat. Igen kis mennyiségű keményítőszemcse található, valamint kisméretű vakuolumok, melyek némelyike elektronenz begyűrdéseket tartalmaz. A sejtmag dekondenzált, a sejtmagvacska pedig sűrű fibrilláris és granuláris, gömbszerű komponensű. A sejtosztódás fejlődési programján keresztül, a mikrokallusz stádium elérése előtt az eredeti mikrospórafal feldarabolódása zajlott (4/17.c és d. ábrák), ami végül is annak teljes eltűnésével zárult le. A proembriók és az embrió jellegű struktúrák ultramikroszkópos felvételein nyomonkövethetőek a tipikusan fiatal merisztematikus sejtekre jellemző ultrastrukturális sajátosságok (4/17.e és f. ábra), magas sejtosztódási ráta, valamint a riboszóma gazdag citoplazma vakuolumokkal, és még nem differenciálódott organelumokkal (4/17.f ábra).

4/17. ábra

Kukorica antéra androgenesis indukciójának

TEM vizsgálata I.



a: mikrspóra metszet 1 nappal a kultúrában való tenyésztés után.
b: magpórusok az 1 napos tenyésztés után. **c** és **d:** az eredeti mikrspóra sejtfa 7 napos és 10 napos (d) kultúrában. Megfigyelhető a vastag réteg alatt a mikrspóra intine (c és d), jelzi az eredeti falszakadásokat.
e és **f:** proembrió 13 napos kultúrában. A részlet a differenciálatlan organelumokat mutatja (csillag). Cy: citoplazma, Ex: exine, NL: újonnan szintetizálódott réteg, In: intine, N: nukleusz, Nu: nukleolusz, V: vakuolum.

4.4.2. Az ubiquitin immunolokalizációja fénymikroszkópos úton

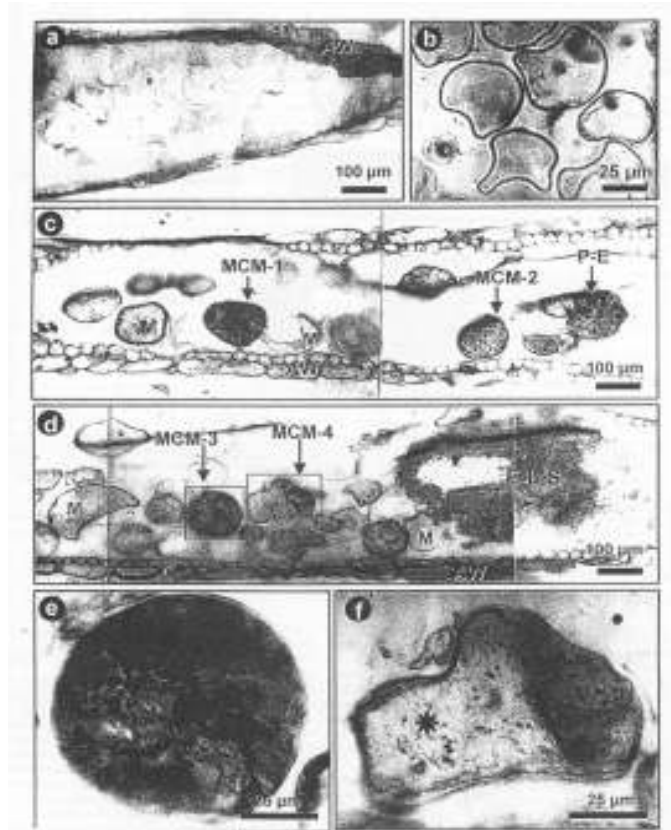
Az immunolokalizációs kísérletek eredményei szerint egy alacsony szintű, de stabil ubiquitinhez kötött protein populáció található az antérákban az indukciót követő rövid időszak során, ami 0-5 napig terjedő intervallumot jelent. Az immunológiai jelölés a mikrospórák citoplazmájában fordult elő kisebb erősséggel, ugyanakkor a mikrospórák között elhelyezkedő lokuláris anyagban is megtaláltuk, és mindez akkor bizonyult szembeötlőnek, amikor ezeket a mintákat a kontrollal összehasonlítottuk (4/18.a és b ábrák).

Ennek a kezdeti jelölésnek az intenzitása az MCM-ben (a soksejtes mikrospórákban) az 5. napot követően emelkedni kezdett (nem közölt eredmények alapján), az MCM aggregátumok közötti különbség a 13-16. nap közötti időszakra tehető, ebben az intervallumban kifejezetté vált. Az MCM aggregátumok egy része (4/18.c és d. ábrák) intenzívebb jelölést mutatott, míg mások és a nem osztódó, valamint a degenerálódó mikrospórák nem jelölődtek, viszont a korai proembriók igen (4/18.c ábra).

A proembriók a 16. napot követően jöttek létre, amelyek a kezdeti differenciációs jegyeket viselték magukon és a jelölés ezeken a perifériákon található, ugyanakkor a belső régiókban a proembriók kevésbé jelölődtek (4/18.d ábra). A citoplazma sűrű MCM aggregátumai erősebben festődtek, míg a magas fokú vakuolizációt mutatók nem festődtek (4/18.e és f. ábrák).

A különböző mikroszkópos megközelítések nagy jelentőségűek a növényi embriogenezis vizsgálata szempontjából, mert a sejttani változások nyomkövetése alkalmazásuk révén lehetővé válik. Ugyanakkor ezeket a problémákat taglaló cikkek száma meglehetősen kevés, és ezek is csupán egy korlátozott számú rendszer leírását adják (Rashid et al. 1982, Barnabás et al. 1987b, Zaki et al. 1990, Pretova et al. 1993, Garrido et al. 1995, Hause et al. 1998). Alché és mts.-inak vizsgálatai a kukorica androgenetikus indukciójáról néhány következtetés levonását teszi lehetővé (Alché et al. 2000). A hideg előkezelésnek kitett mikrospórák citológiai vizsgálata alapján elmondható, hogy azok egy intenzív degradáción mentek keresztül (néhány esetben tönkrementek a stressz következtében), ami megtörténhet bizonyos esetekben, ha az adott sejtpopulációt éhezési stressznek vetik alá (Heberle-Bors, 1989). Ebben az esetben fellépő csökkenő riboszóma populációt figyeltek meg a *Datura* androgenetikus mikrospórájában (Sangwan-Norreel, 1978) és a dohányban (Garrido et al. 1995).

4/18. ábra
Az UBQ és az UBQ-proteinek
immunolokalizációja



a: negatív kontroll az elsődleges antitest nélkül készült. **b:** mikrospórák közvetlen a hidegkezelés után, amelyek még nem jelölődtek. **c** és **d:** választ adó antérák metszetei 13 napos, és 16 napos kultúrában. Néhány MCM (soksejtes) mikrospóra, MCM-1-től MCM-4-ig), proembriók (P-E) és embrió jellegű struktúrák (E-L S) intenzív jelölést mutattak. Azokon a helyeken ahol osztódás nem volt, a mikrospórák (M) degradálódtak és nem jelölődtek. **e** és **f:** nagy nagyítású MCM (e), amely intenzív jelölést mutat. Jelölés nélküli nagy kiterjedésű vakuolum (f) (csillag). AW:antérafal.

A mikrospóratenyésztés kezdetén az első osztódást megelőző időszakban jellegzetes citológiai tünetegyüttesek lépnek fel, nevezetesen a sejt megnagyobbodás, ami sejtduzzadás, valamint a citoplazma elektron sűrűségének megnövekedése, ami valószínűsíthetően a riboszóma mennyiség emelkedésének tudható be, továbbá a sejtmaghártyán található pórusok nagyszámú előtűnése, ezek a metabolizmus reaktivációjának jelei. A sejtmaghártyán található pórusok dinamikus struktúrák, amelyek attól függően változnak, hogy a sejtmag citoplazmájában előforduló transzportmechanizmusok mit igényelnek. Dohányban pl. a fentebb említett sejtmaghártya pórusok számának szignifikáns csökkenését írták le (Garrido et al. 1995), a fiatal pollenszemek vegetatív nukleuszaiban, ami valószínűsíthetően az embriogenikus kompetencia megszerzésének következményeként értékelhető. Minden vizsgált esetben a mikrospórák osztódása szimmetrikus volt, mert két azonos utódsejtet vagy sejtmagot hozott létre. Megjegyzendő azonban, hogy ezt a kijelentést némi fenntartással kell fogadnunk, és további DAPI festéssel meg kell erősíteni ezt a feltételezést. Megemlítendő, hogy ezen eredményünk ellentétben áll Pretova et al. (1993), Barnabás et al. (2001) megfigyeléseivel, mert a szerzők döntő többségben a mikrospórák aszimmetrikus osztódását figyelték meg. Ennek a szimmetria viszonyának a feltérképezése a jövő feladata. A sejtosztódás eredményeképpen a vastag fal és az intine között kialakuló új sejtfal képződése, valamint az új sejteket körbevevő fal az oka a sejt metabolizmusa reaktivációjának minden valószínűség szerint (Rashid et al. 1982). Dohányban és káposztában (Zaki et al. 1990) szintén hasonló ún. fibrilláris fal megjelenését írták le az androgenézis során. A folyamatos sejtosztódással létrejövő nyomás vezet oda, hogy az eredeti mikrospórafal részekre szakadozik, és az előbb említett fal képződése során körbe veszi a proembriót.

Az osztódást követően a mikrospórák 2 fő citológiai jellemzőjét kell nyomatékosan említeni. Az első, az egyazon antérákban is előforduló különböző sejtformák nagyfokú heterogenitása. Másodsorban pedig, ami ezzel az elsővel összefüggésben áll, a magas polaritás egy adott struktúrán belül. Ezt az embriogenikus mikrospórákban előforduló nagyfokú heterogenitást mélyrehatóan tanulmányozta Hause et al. (1998). Cikkükben a *Brassica napus* esetében az egy, ill. többsejtes struktúrák 6 csoportját írták le citológiai jellemzőik alapján. Alché és munkatársai kutatásai során hasonló sejttani struktúrákat, formákat találtak, megegyezően az előbb említett publikációban leírt formákkal, viszont részletesebben az MCM struktúrák közül csak egy típust vizsgáltak. Ez az a mikrospóra fajta, forma, amely a leggyakrabban mutatott progresszív embriogén fejlődési típust.

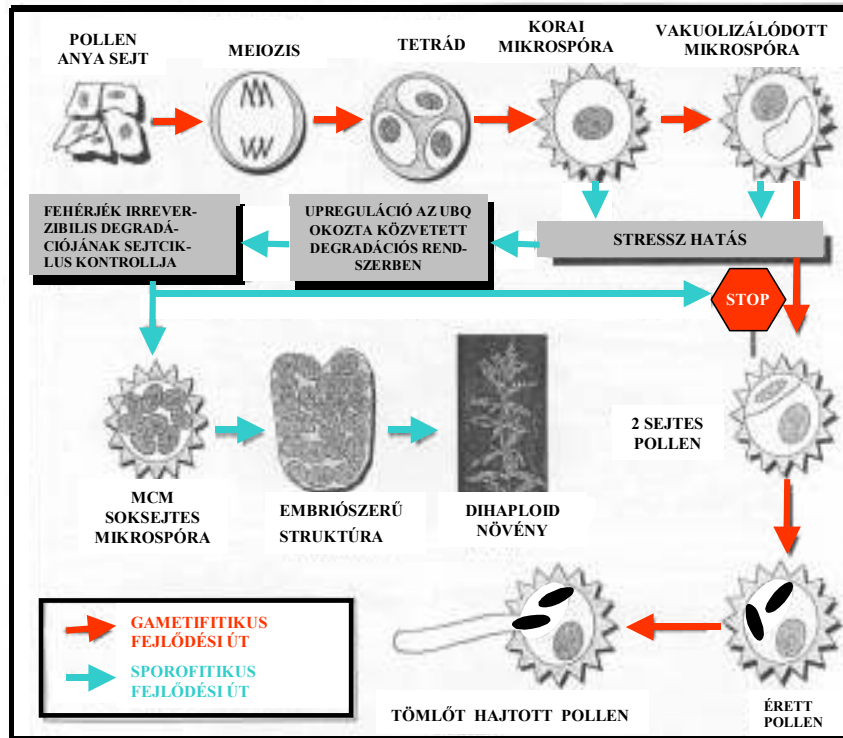
Ettől eltérő formák, amelyek általában nem osztódó mikrospórák, vagy nagyfokú vakuolizáltságot mutató MCM sok keményítő szemcsével, valamint az MNM szintén nem embriogén fejlődésűek, legalábbis a tenyészetbe vonást követő 16. napig tartó intervallumban, ami a vizsgált időtartam volt.

Ami az androgenikus (MCM) soksejtes mikrospórák polarizáltságát illeti elmondható, hogy feltételezhetően a (MCM) soksejtes mikrospórák struktúráját a nem homogén elrendeződésű és méretű sejtek alkotják, ami a további fejlődés során még kifejezettebbé válik. Ez egyébként a differenciáció első jeleinek tudható be, ami az embriókban és az embrió jellegű struktúrákban is megfigyelhető. A nagyon korai polarizációt más kutatócsoportok is megfigyelték búzában (Olmedilla et al. 2000).

Az ultrastrukturális tulajdonságok alapján (pl. az osztódó sejtek, valamint nem vakuolizált gazdag citoplazmával rendelkező sejtek, az ép újonnan keletkező exine stb.) potenciálisan androgénnek tekinthető az osztódó sejt, és hogy az MCM gaszterekben található ubiquitinhez kötött alkotórészek mennyisége jóval nagyobb volt és azok lokalizációja erősebb jelet produkált, mint azon sejtek jelölése, amelyek degradáción mentek keresztül. Hasonló eredményre jutott Li et al. (1995) a *Nicotiana* antérája és bibéje tanulmányozása során. Ezek a kutatók az előbb említett ubiquitinhez kötődő összetevőket az antéra differenciálódó szöveteiben találták, de a nem degenerálódó tapétum sejtjeiben. Ezek a kutatási eredmények is alátámasztják azt a megfigyelést, hogy a sejttani folyamatok és a génexpresszió szabályozásában egyaránt az ubiquitin biokémiai útnak fontos szerep jut (Finley et al. 1991), mely biztosít egy dinamikus protein degradációt és szintézist (von Kampen et al. 1992). Úttörő munkájukban Callis et al. (1994) a kukorica pollen fejlődését vizsgálták és nagy jelentőséget tulajdonítottak az ubiquitin és az ubiquitinhez kötött proteinek kutatásának. Munkájukban kimutatták, hogy a szabad ubiquitin és ubiquitinhez kötött proteinek fejlődéstanilag kontrollált, szabályozott elvesztése korrelációba hozható volt a gametofitikus fejlődési program kifejeződésével a mikrospóráknál. Összefoglalva elmondható, hogy a sporofitikus fejlődési folyamatot az ubiquitin ill. az ubiquitinhez kötött proteinek mennyiségi növekedése kíséri, és részben kiváltója az ubiquitin és az ubiquitinhez kötött protein fajták egyidejű mennyiségének megemelkedése. Az androgenetikus indukciót követően az antérában található struktúrák heterogenitása igen nehézé teszi a molekuláris és a biokémiai szintű vizsgálatokat. Így a részletezett immunocitokémiai megközelítés segítségünkre lehet azon sejttani strukturális változások nyomonkövetésében, amelyek androgenetikus útra terelt sejtekben megfigyelhetők. Kísérleti eredményeink tükrében

elmondható, hogy a megnövekedett mennyiségű fehérjék nem csupán következményként lépnek fel és identifikálhatók a sporofitikus útra terelt mikrospórákban, hanem ennek a sporofitikus fejlődési útnak a kiváltásáért is felelősek, tehát annak részben okozói. A 4/19. ábrában részletezett hipotézis szerint Alché et al. (2000) elképzelték, miként az induktív kezelések, amelyek általában stresszre épülnek, kiváltják ennek a degradatív rendszernek upregulációs aktivációját (Almoguera et al. 1995; Belknap et al. 1996). Ez az upregulációs mechanizmus idézheti elő az aszimmetrikus sejtosztódást szabályozó, ill. a gametofitikus fejlődési út kialakulásáért felelős sejtciklust szabályozó fehérjék (ez a sejtciklus egyébként a stressz körülmények között szünetel) irreverzibilis degradációját. A fehérjéknek ez a hirtelen bekövetkező irreverzibilis degradációja fokozódhat a stressz aktiválta bizonyos abnormális védekezési mechanizmusok indukciója révén. Erre vonatkozó bizonyítékokat találunk Worrall et al. (1994) és Mascarenhas et al. (1996) munkáiban. Mihelyt a megfelelő tenyésztési körülmények közé kerülnek a mikrospórák a metabolikus biokémiai utak helyreállítódnak és a sporofitikus fejlődési irányt beleértve a szimmetrikus osztódást alternatívaként működhet a visszafordíthatatlanul károsodott gametofitikus sejtciklussal szemben. Ennek a hipotézisnek az igazolása érdekében az ubiquitin és az ubiquitinhez kötött proteinek összehasonlító vizsgálatára van szükség mind a sporofitikus, mind a gametofitikus pollen fejlődési út tanulmányozásában.

4/19. ábra
Feltételezett modell az androgenézis
indukciójában szerepet játszó ubiquitin közvetett
degradatív útvjáról



4.5. A szőlő gametofiton fejlődésdinamikája

4.5.1. Szőlő pollen és termő vizsgálat

A gabonafélék női gametofitonjának citológiai vizsgálatánál alkalmazott beágyazási, félvékony metszetkészítési módszer (Timár et al. 1997) a szőlő esetében is alkalmasnak bizonyult. Előzetes tapasztalatok nem álltak rendelkezésünkre a szőlőtermő műgyantába ágyazásáról, a termő megfelelően impregnálódott.

Mindegyik termőről elmondhatjuk, hogy a két termőlevélhez tartozó négy magkezdeményt mindenütt megtaláltuk, csökevényes, abnormális fejlődést nem tapasztaltunk. Esetenként előfordult, hogy öt magkezdeményt találtunk. Tehát a vizsgálat szempontjából jó alany a szőlőtermő, mivel egy termő megmetszésével szerencsés térbeli elhelyezkedéssel 4, illetve 5 embriózsákról gyűjthetünk adatot, kaphatunk értékelhető információt.

Az első vizsgált fejlődési állapot a szőlő hím gametofitonnál a tetrád állapot (4/20. ábra), ahol a jól festődő tetrádok még nem váltak szét.

A tetrád állapotú virágokról az alábbiak mondhatók el. A magkezdeményen (4/21. ábra) jól megkülönböztethetőek a nucellusz és az integumentum, (még nem különült el külső és belső rétegre). A nucellusz központi részében található a nagy méretű, jól festődő sejtmaggal rendelkező makrospóra anyasejt. (A makrospóra anyasejtből redukciós osztódással keletkezik a makrospóra a leendő embriózsák első sejtje.)

A tetrád állapotú mikrospóra után megkülönböztettünk egy korai egymagvas állapotot, jellemzője a szabálytalan forma, a halványzöld festődésű, vékony pollenfal, a sejtmag nem vagy csak alig látható.

Ezt követően a középső egymagvas, rögbilabda formájú mikrospóra állapot figyelhető meg. Vastag sötétzöld pollenfala van, a sejtmag halványan festődött és a mikrospóra középpontjában található (4/22. ábra).

A középső egymagvas fejlettségű virágok termőjében (4/23. ábra), már jól elkülöníthető a külső és belső integumentum. A magkezdemény már gyakorlatilag teljes mértékben visszahajló (anotrop), ami a kifejlett magkezdemény jellemzője szőlőben. A makrospóra anyasejt sokkal szembetűnőbb, mint az előző fejlettségi állapotban, alakja megnyúltabb. Késői egymagvas mikrospóra kerekded formájú, mely egyre sötétebben festődő citoplazmával rendelkezik. A sejtmag erősen festődő nukleólusszal a mikrospóra egyik pólusa felé vándorol, míg átellenben vakuolum alakul ki (4/24. ábra).

Korai kétmagvas mikrospóra citoplazmája sötét, a sejtmagok csak nehezen fedezhetők fel, az egyik sejtmag egy lencseszerű lefűződésben található (4/25. ábra).

A késői egymagvas-kétmagvas átmeneti állapotú virágok jól fejlett magkezdeményében 1-2 magvas embriózsák található. A sejtmagvak szerencsés esetben egy metszeten is láthatók, de a térbeli elhelyezkedés alapján leginkább egymás utáni metszeten, ahol a sejtmagok eltérő pozíciója jelzi, hogy két sejtmagról van szó (4/26. és 27. ábra).

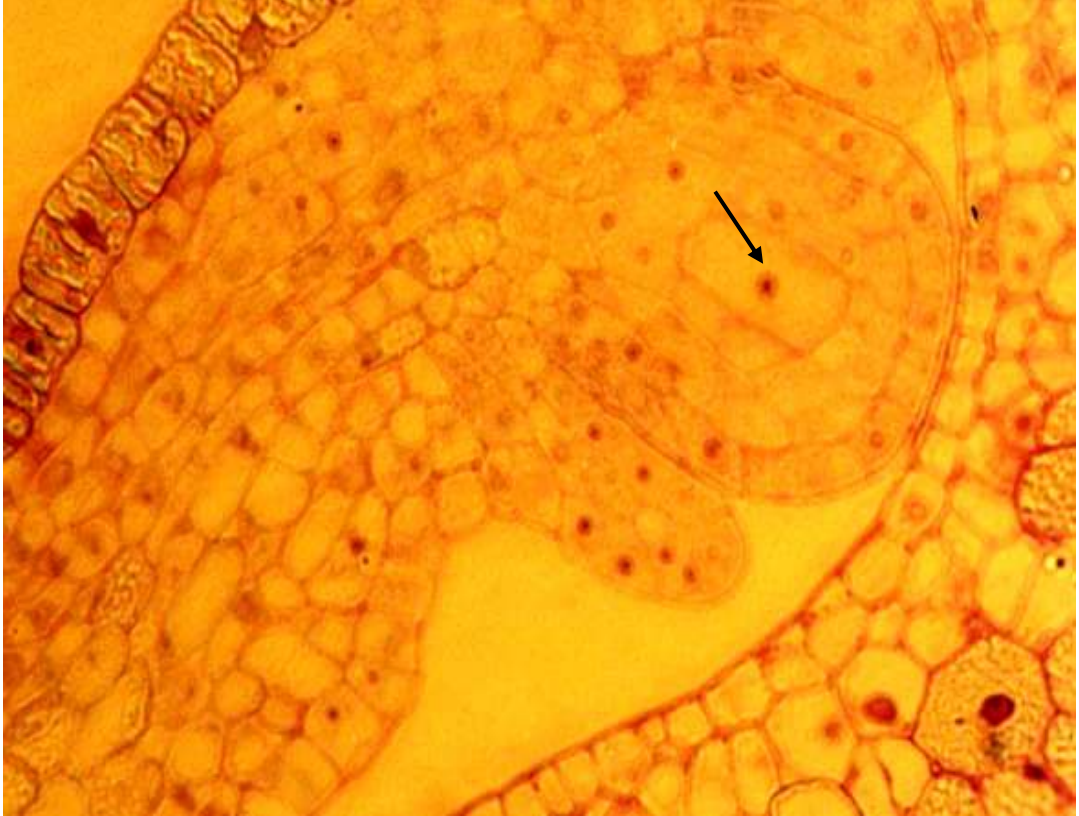
Az érett pollennél a citoplazma festődése egyenletesen sötétlila, a sejtmagok egyáltalán nem láthatók, a pollenfala sötétzöld színű. A preparátum melegítés hatására sem deríthető, átlátszatlan maradt (4/28. ábra).

4/20. ábra
Tetrád állapotú szőlő mikrospóra



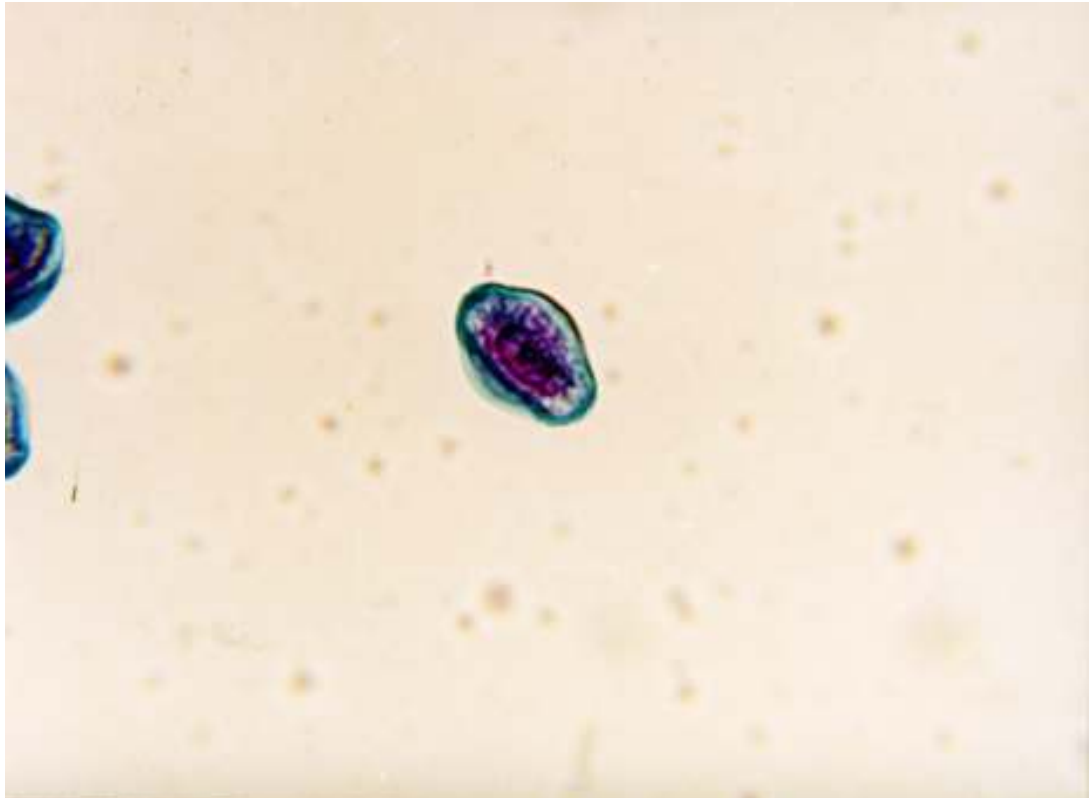
A nyilak a tetrádokat jelölik

4/21. ábra
A tetrád állapotú szőlő virág magkezdeménye

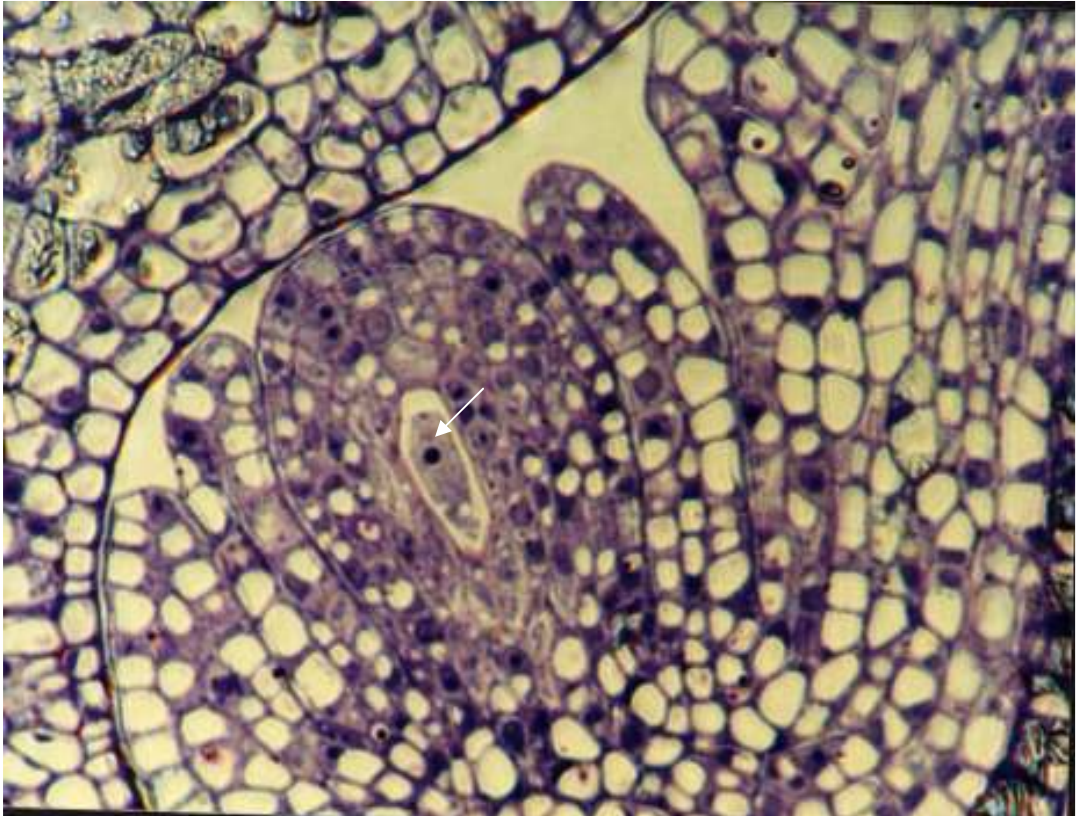


A nyíl a funkcionális makrospórát jelöli.

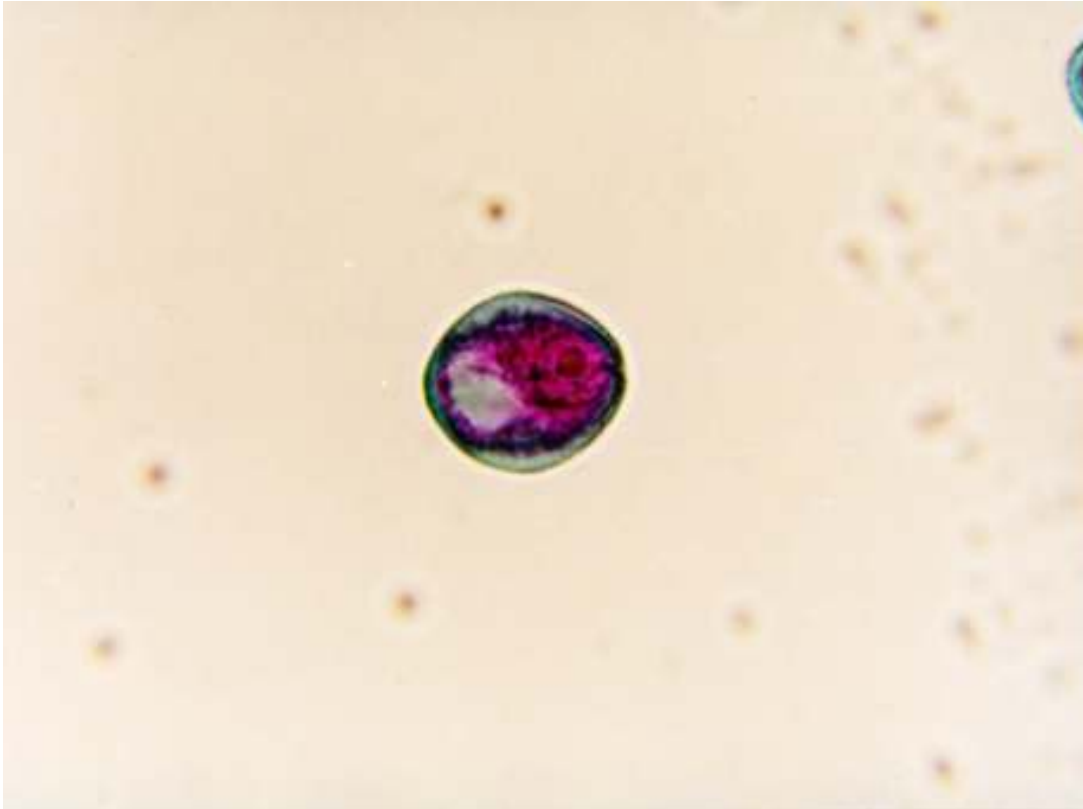
4/22. ábra
Középső egymagvas állapotú szőlő mikrospóra



4/23. ábra
Középső egymagvas állapotú szőlő virág
magkezdeménye



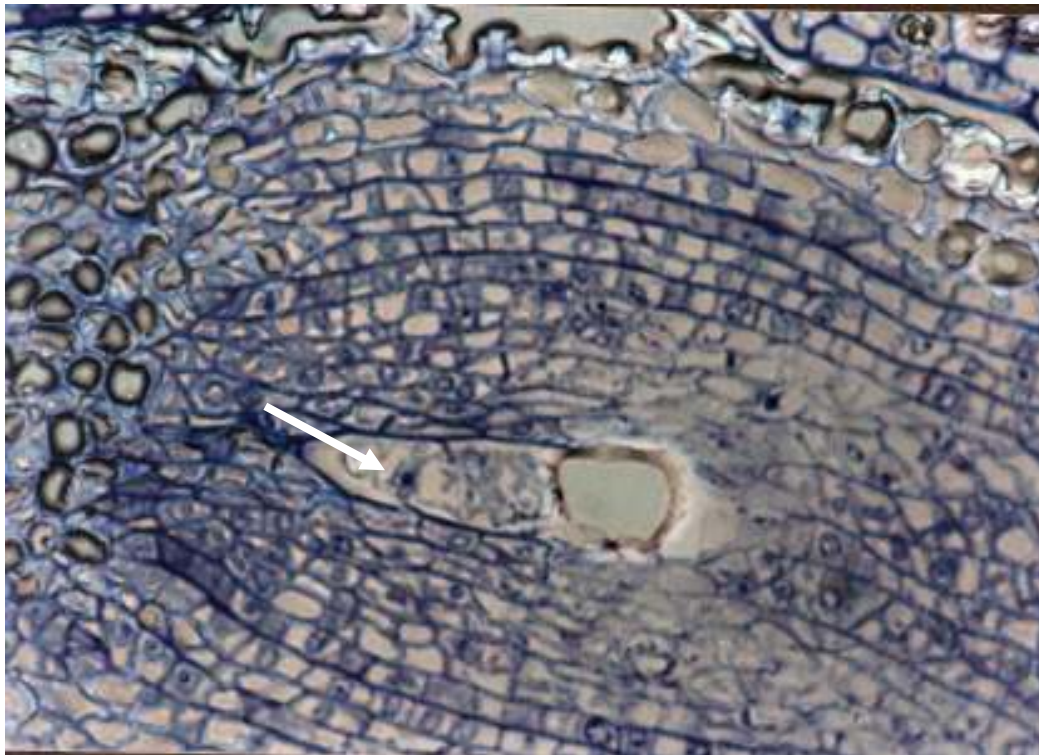
4/24. ábra
Késői egymagvas állapotú szőlő mikrospóra



4/25. ábra
Korai kétmagvas állapotú szőlő pollen

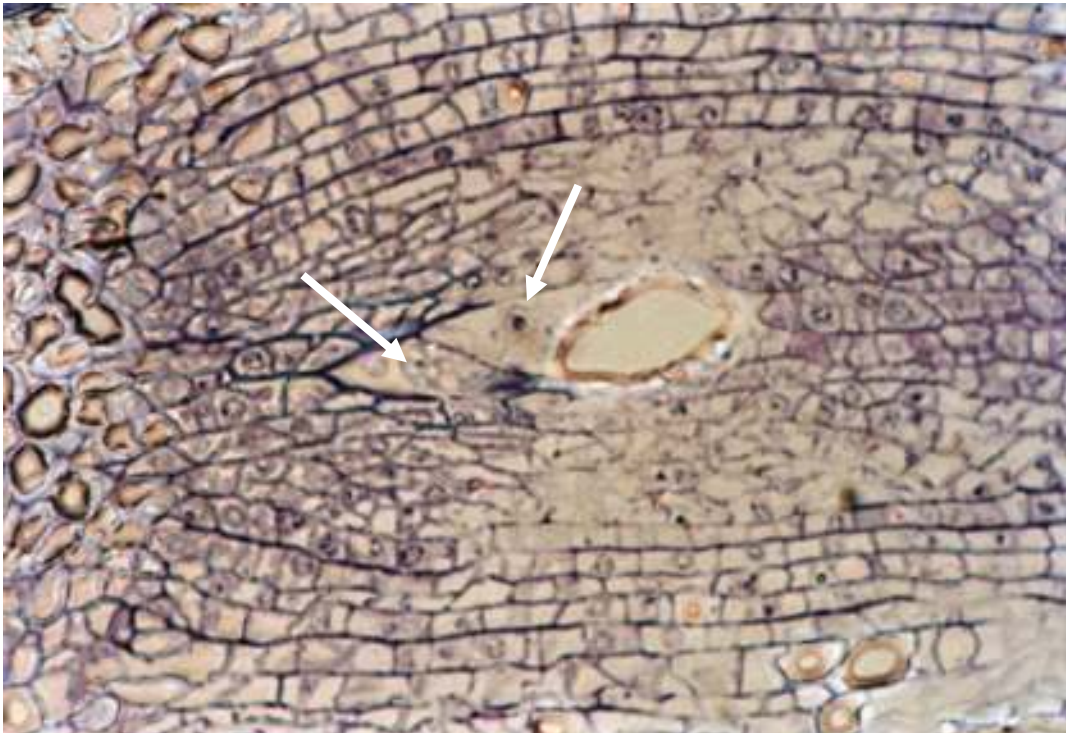


4/26. ábra
Késői 1-2 magvas átmeneti állapotú szőlő
virág magkezdeménye



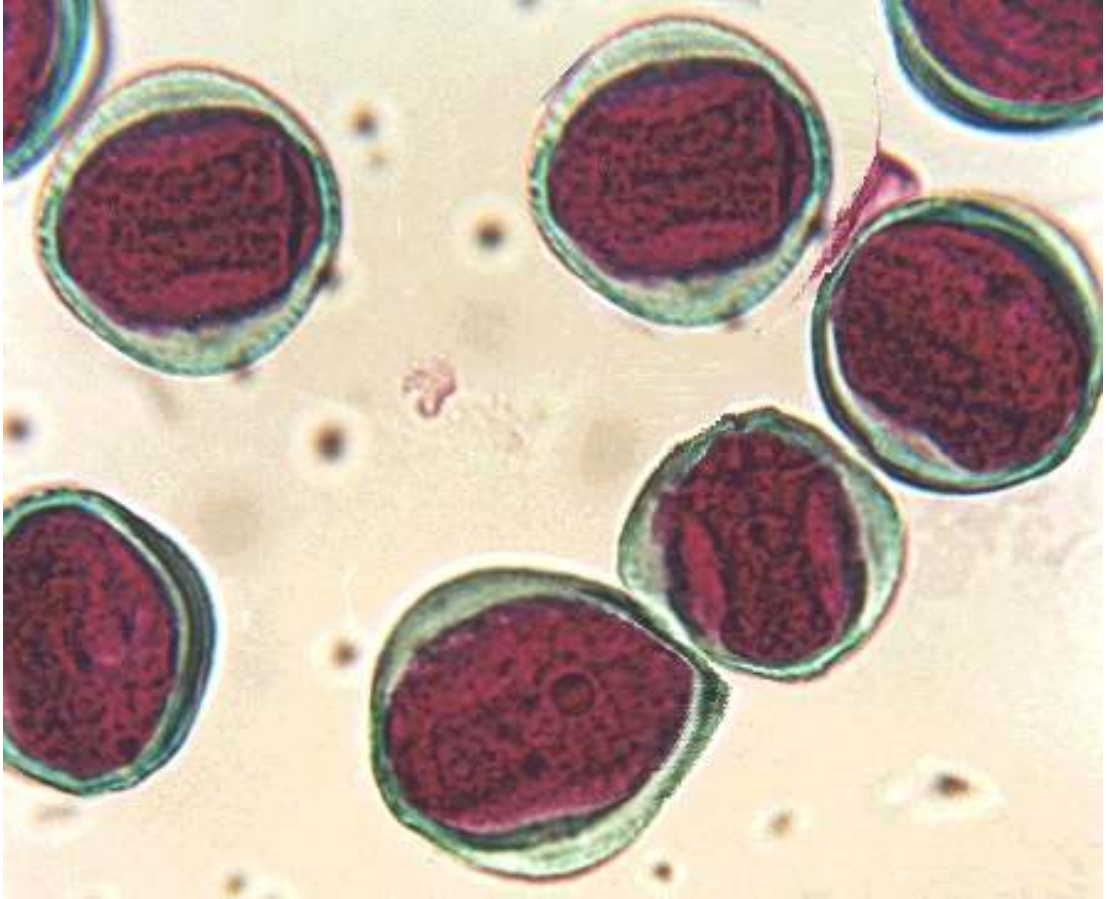
A nyíl az embriózsákban lévő sejtmagot jelöli.

4/27. ábra
Késői 1-2 magvas átmeneti állapotú szőlő
virág magkezdeménye



A nyilak az embriózsákban lévő sejtmagokat jelölik.

4/28. ábra
Érett szőlő pollen



5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

A termesztett búza és rokon fajainak virágzás és szaporodásbiológiai vizsgálata fontos alapinformációkat szolgáltat a biotechnológiai beavatkozásokat is alkalmazó, korszerű növénynemesítési kutatások számára. A hím és női gametofiton (a pollen és az embriózsák) kialakulásának és érésének részletes citológiai, szövettani vizsgálata az ivaros folyamatok szinkronizációjának tanulmányozása egyrészt gazdagítja a mai napig hiányos ismereteinket a különböző gabonafajok gametofitikus folyamatairól, másrészt lehetőséget teremt a környezeti változások direkt és közvetett hatásainak vizsgálatára, valamint az ivaros nemzedék, az ivarsejtek *in vitro* mikromanipulációjára biotechnológiai célból.

Eredményeink azt mutatták, hogy a különböző genomösszetételű és ploidszintű *Triticum* fajok pollenfejlődése, a 3-sejtes állapot kialakulása „*in planta*” és *in vitro* egyaránt 1 hét alatt lezajlik a meiozist követően. A 3-sejtes pollen un. érése és kiszóródása a portokból már nagymértékben függött az abiotikus környezeti tényezőktől (elsősorban a hőmérséklettől). Az embriózsák kialakulása úgy természetes, mint *in vitro* körülmények között időben megelőzte a 3-sejtes pollen kialakulását, így bebizonyosodott, hogy a vizsgált *Triticum* fajok nőelzők (protogynek). Arról azonban, hogy a petesejt a kialakulását követő igen fiatal állapotban termékenyülőképese-e, még nincsenek megbízható eredményeink, ehhez további vizsgálatok szükségesek.

Ultrastrukturális vizsgálataink eredményei arra utalnak, hogy az igen fiatal, az érett (antéziskori) és az öreg búza petesejtek morfológiailag, szerkezetileg és ebből eredően funkcionálisan is különböznek egymástól. További vizsgálatunk választ adhat olyan alapvető kérdésekre, hogy pl. mivel váltható ki a partenogenetikus petesejt aktiváció, és erre melyik fejlődési állapot a legalkalmasabb, vagy milyen fejlettségű petesejtbe injektáljunk agronomiailag hasznos géneket a stabil integráció elérése érdekében.

Az embriózsák és a petesejt mérete a hexaploid fajnál volt a legnagyobb, és a ploidszint csökkenésével a méretek is csökkentek. Ez a tendencia azonban az embriók vonatkozásában már nem volt megfigyelhető. Az embriózsák és a petesejt méretei nem korreláltak az embrió méreteivel a vizsgált *Triticum* fajoknál.

A női gametofitonról alkotott ismereteink bővítése hozzájárul a csoportunkban folyó *in vitro* fertilizációs kísérletek további sikeres folytatásához és a növényi „lombik-baby” program megvalósításához.

A kukorica *in vitro* androgenezisének citológiai és ultrastrukturális vizsgálata nemzetközi szempontból is úttörő munkának számít, mivel az indukciós gyakoriság általában olyan alacsony mikrospórára vetítve, hogy a folyamatot nem sikerül követni. Intézetünkben rendelkezésre álltak a saját előállítású nagy haploidindukciós képességű kukorica genotípusok és a hatékony portoktenyésztési módszer, amely lehetővé tette a mikrospóra eredetű struktúrák részletes ultrastrukturális vizsgálatát és spanyol együtműködésben a folyamat biokémiai elemzését. Az általunk kidolgozott kukorica haploidindukciós módszer gyakorlati alkalmazhatóságát az intézet kukoricanevelőivel közösen vizsgáljuk és értékeljük.

A szőlő haploid/dihaploid növényeknek a makrogametofiton sejtjeiből történő indukciójához sok egyéb tényező mellett elengedhetetlen az embriózsák fejlettségi állapotának meghatározása és az optimális fejlettségi állapot kiválasztása a szövettenyésztési módszerek célirányos alkalmazására. Az *in vitro* ovarium vagy ovulum tenyészetekből nagy eséllyel kaphatunk ginogenetikus haploid, homozigóta dihaploid növényegyedeket, amelyeket a továbbiakban nemesítési és genetikai vizsgálatokra használhatunk fel.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során kísérleteinket búzával, kukoricával, és szőlővel végeztük, ezen belül 3-búzafajjal és -fajtával, egy kukorica hibriddel, egy szőlő fajtával és hibriddel.

Vizsgálataink kiterjedtek a hím és a női gametofiton fejlődésére és az azt befolyásoló környezeti tényezőkre. Tanulmányoztuk: a szántóföldi kisparcellás *in vivo*, a fitotroni kontrollált klimatikus növénynevelési, a szilárd táptalajú, petricsészés *in vitro* tenyésztési környezeti tényezők és a hideg stressz hatását.

1. A gabonafélék közül három, eltérő ploidszintű és genom összetételű búza faj (*T. aestivum* cv Mv 15, *T. araraticum* és a *T. monococcum*) hím és női gametofitonjának *in vivo* és *in vitro* fejlődését követtük nyomon a meiozistól az érett pollen és embriózsák kialakulásáig.

A hím gametofitonok differenciálódási dinamikájában nagy eltérések nem adódtak a különböző ploidszintből eredően a háromsejtes fejlődési állapotig. A haploid hím gametofiton fejlődésbeli különbsége az érett pollen kiszóródásakor jelentkezett a leggyorsabb fejlődésű hexaploid fajtánál. A mikrospórák fejlődése lassúbb volt az *in vitro* környezetben, az egymagvas fejlődési állapot egy kicsit hosszabb periódusának bizonyult az első pollen mitózis alatt a kontrollhoz viszonyítva. A genotípusból adódóan lényeges különbség nem mutatkozott az *in vitro* pollenfejlődésben. Mind az *in vitro*, mind az *in vivo* környezetben az egymagvas mikrospórából a hárommagvas funkcionális pollenné fejlődés egy héten belül megtörtént. Eltérés volt azonban a különböző fejlődési állapotok hosszában az *in vitro* és a természetes körülmények között.

A hím gametofiton fejlődését három – Mu (középső 1 magvas), Bn (2 magvas), Tc (3 sejtes), - fejlődési stádiumban a pollenszemek átmérője alapján vizsgáltuk. A varianciaanalízis eredménye szerint a *Triticum* fajok vonatkozásában megbízhatóak a különbségek $p=0,1\%$ -os szinten. Eltérést egy esetben $p=0,5\%$ -os szinten, valamint két esetben nem kaptunk szignifikáns különbséget bármely két kombináció összehasonlításával.

2. Az *in vitro* kalászka kultúrákban az embriózsákok fejlődése megegyezett az *in vivo* kontrollal, mindhárom faj esetében különbség a méretbeli növekedésben tapasztalható. A hexaploid faj embriózsákja szignifikánsan nagyobb méretű a másik két fajénál. A női gametofitonok maximális kiterjedésüket a hím gametofitonok érése előtt már két-három nappal elérték. A differenciálódás dinamikájára a

ploidszint volt hatással, a tetraploid és a diploid faj 7-sejtes női gametofitonjának differenciálódásához egy nappal hosszabb időre volt szükség, mint a hexaploid faj esetében.

3. A hétsejtes női gametofiton fejlődése gyorsabb, mint a hím gametofitoné. A vizsgált fajoknál az embriózsák a funkcióképes makrospórából három, illetve négy nap alatt jött létre az egymást követő három gyors mitózis eredményeképpen, míg a két mikrospóra mitózissal differenciálódó trinukleátus pollen csak a hetedik napon volt megfigyelhető. A hím és a női gametofiton fejlődés aszinkronja áll fenn, a *Triticum* fajok protogyniáját támasztva alá.

Az *in planta* fejlődött petesejtek a kialakulástól a receptív állapotig érési folyamaton mennek keresztül, méretnövekedés és alakváltozás kíséretében.

4. A *Triticum* faj kéthetes embrióinak térfogat adatai eltérő fejlődési intenzitást mutattak akár az antéziskori embriózsák-, vagy az érett szem csíra- ill. embrió térfogatával vetettük össze. Az átlag értékek alapján a diploid búza kéthetes embriói meghaladták a hexaploid búza embrióinak térfogatát is. Ugyancsak ezt erősítette meg, amikor a kéthetes magkezdeményeket az érett szemekhez viszonyítottuk. A diploid kéthetes magkezdemény mérete az érett szem közel 60%-át, a hexaploid az 50%-át, a tetraploid csupán 23%-át érte el.

5. Az *in planta* növekedésű petesejtek vizsgálatát az excizált vagy izolált petesejtek követték, melyek gömb formájukat a kiemelés után vették fel. A petesejtek és a sejtmagok méretváltozása összefügg az életkorukkal. A petesejtek átmérőinek vizsgálatához a kasztrálástól számítva 3, 6, 9, 12, 15, 18 napos petesejteket használtunk, a két hexaploid búzafajta a Chinese Spring és a Siete Cerros esetén. Mindkét fajta tekintetében a petesejt és a sejtmag átlagos növekedése hasonlóan emelkedő volt a harmadik naptól a 18. napig. A sejt- és magátmérők a maximumok elérésében különböztek a két fajtánál. A megtermékenyítés szempontjából meghatározó 6 és 9 napos sejtek átmérője 63,49 μm és 73,32 μm volt.

A 3, 6, 9, 12, 15, 18 napos petesejtekből készített félvékony metszeteket használtuk a morfológiai vizsgálatok végzése során és jellemeztük a sajátosságaik alapján, melyek szintén összefüggtek a korukkal. A három legjellemzőbb és legnagyobb eltérést mutató fiatal (3 napos), receptív (9 napos), és öreg (18 napos) petesejtek jelentették.

6. Az izolált petesejt fénymikroszkópos megfigyelésénél részletesebb ultrastrukturális feltárást végezhattünk a TEM segítségével.

Az antézis előtti fiatal fejlettségi állapotú 3 napos petesejt citoplazmájában lipid testek, mitokondriumok, amiloplasztok, keményítő szemek találhatóak a perifériális vakuolumok között.

A receptív állapotú, 9 napos petesejt, az antézishez időben a legközelebb esett. Ultrastrukturális jellemzői a denz citoplazma, mitokondriumok nagyszámú jelenléte, a nukleuszban az endoplazmatikus retikulum, a polarizáltság erőteljesen megfigyelhető.

Az öreg petesejt számos sajátossággal rendelkezik. A sejtmag kromatin állománya degradálódott. A sejtmag membránjához kromatin maradványok tapadtak un. blebbingeket képezve. A citoplazmában lipid, keményítő, protein halmozódott fel. Lízis volt megfigyelhető a vezikulumokban és autofág vakuolumok jelentek meg. Az öreg petesejtek a programozott sejthalál jellegzetességeit viselték.

7. A Chinese Spring búzafajta érett, háromsejtes pollenjét és generatív, vegetatív sejt adatait hasonlítottuk össze. A két hímivarsejt dimorfizmusát a méretükben meglévő következetes különbség is jelzi. A pollen átmérője nagyságrendileg megegyezik a hexaploid petesejt méretével, míg az ivarsejtek méretük alapján csak a negyede az érett petesejt átmérőjének.
8. A DH109 x ZK 191/a hibridvonalhoz tartozó kukorica antérákat késői 1 magvas fejlettségi állapotban izoláltuk. Ezeknek embrioid jellegű struktúráit hidegkezelés segítségével állítottuk elő YP táptalajon.

A fénymikroszkópos vizsgálatok szerint az antérákból készített metszeteken 2 sejtes mikrospóra jelenléte volt kimutatható két nappal az éheztetési eljárást követően. A tenyésztett mikrospórák többféle variációja, az un. MCM, azaz többsejtes mikrospórák, illetve a többmagvas mikrospórák, azaz MNM egyaránt megfigyelhetők voltak a tenyésztésbe vonást követő ötödik naptól kezdődően csakúgy, mint degenerált és nem indukálódott mikrospórák, amelyek szintén előfordultak a populációban. A sokfajta mikrospóra alpopulációknak az előfordulása arra hívta fel a figyelmünket, hogy sokféle sejtosztódási, ill. fejlődési típus figyelhető meg egyidőben a kultúrában.

Az ultramikroszkópos vizsgálatok tanúsága szerint ezekben a celluláris formákban, sejt csoportosulásokban sajátosságok figyelhetők meg csakúgy, mint az egyes sejtmag pórusok jelenléte az indukció korai stádiumában, valamint az intine alatt megjelenő vastag sejtfal képződése. Ezekben a struktúrákban bizonyos fokú polaritás is megfigyelhető volt. A proembrió jellegű struktúrák kb. 10-13 nappal a

tenyésztésbe vonás időpontjától voltak fellelhetők, ugyanakkor az embrió jellegű struktúrák megjelenése ennél későbbi időpontra tehető mintegy 16 nappal a tenyésztés kezdetétől.

Az ubiquitin vizsgálat érdekében a kereskedelmi forgalomban lévő poliklonális antitesteket használtuk az antérák félvékony metszetein immunocitokémiai detektálás céljára. Az előbb említett összes sejt típusban a jelölés megfigyelhető volt, kivéve a degenerált és a nem indukálódott mikrospórák esetében. Az MCM (soksejtes mikrospórák), androgenikus mikrospórák esetében a jelölés intenzitása lényegesen nagyobb volt. A vizsgálat során az ubiquitin, pollen sejtciklus, ill. androgenezis indukciójában betöltött szerepére, valamint annak a degradatív útvonal biztosításában betöltött szerepére vonatkozóan került sor egy modell felállítására.

9. A szőlő virág fejlődésdinamikai vizsgálatokor – a búza vizsgálatoknál alkalmazott metodikát adaptáltuk - mindkét fajta esetén a hím és női gametofiton fejlődési állapotát detektáltuk.

A szőlő pollen fejlődésében hét fázist különítettünk el. Meghatároztuk a jellemző strukturális bélyegeket. A szisztematikus mintavételekkel korrelációt kerestünk a magkezdemény és a pollenszemek egyes fejlődési állapotai között.

A pollen fejlődés stádiumai közvetett módszerként használható arra, hogy az embriózsák sejtfejlődési fokát meghatározzuk és így optimális állapotot kiválasztva használjuk szövettenyésztés céljára.

1. SUMMARY OF NEW SCIENTIFIC RESULTS

Our examinations have been carried out on three wheat species and varieties, a maize hybrid and a grape variety and a hybrid. Our studies have involved the development of male and female gametophytes, and the environmental factors affecting the developmental process. The effects of environmental factors and cold stress were investigated *in vivo* in small plots, under controlled climatic conditions in phytotron chamber, and *in vitro* in Petri dishes on solid medium.

1. The *in vivo* and *in vitro* development of the male and female gametophytes of three wheat species (*T. aestivum* cv Mv 15, *T. araraticum* and *T. monococcum*) with different ploidy levels and genome compositions was examined from the state of meiosis to the formation of mature pollen and embryo-sac.

Significant difference in the dynamics of the differentiation of male gametophytes due to the difference in ploidy levels was not found up to the tricellular developmental state. The difference in the development of haploid male gametophytes could be observed at the rapid grower hexaploid variety during the spreading of mature pollens. Microspores developed at a slower pace *in vitro*, the uninucleate state was found to be slightly longer at the first pollen mitosis comparing to that of the control. Genotype did not have considerable influence on the *in vitro* pollen development. The development from uninucleate microspores to functional trinucleate pollens completed within one week both *in vitro* and *in vivo*. However, the length of the different developmental states varied under *in vitro* and natural conditions.

The *in vivo* and *in vitro* development of the male gametophyte was studied on the basis of the diameter of pollen grains in three developmental states, namely Mu (mid uninucleate), Bn (binucleate), Tc (tricellular). In accordance with the result of the analysis of variance, the differences are reliable at $p=0.1\%$ level for the *Triticum* species. Difference was found on one occasion at $p=0.5\%$ level, and there were two cases where significant difference could not be found comparing any of the combinations.

2. The development of the embryo-sac in the *in vitro* spikelet culture was similar to that of the *in vivo* control, however, there was a difference in size for all three species. The embryo-sac of the hexaploid species is significantly larger than that of the other two species. The female gametophytes reached their maximal dimension two or three days before the ripening of the male gametophytes. The dynamics of the differentiation was influenced by the ploidy level, the differentiation of the 7-cellular

female gametophytes took one day longer for the tetraploid and diploid species than for the hexaploid species.

3. The development of the 7-cellular female gametophyte is faster than that of the male gametophyte. For the species examined, the embryo-sac formed in three or four days from the macrospore as a result of three consecutive rapid mitosis, while the trinucleate pollen developed as the outcome of two microspore mitosis could only be observed on the seventh day. The development of the male and female gametophytes is asynchronous, confirming the protogyny of *Triticum* species.

The ova developing *in planta* from the initiation to the receptive state undergo a maturing process accompanied by growth and the changing of their shapes.

4. The cubic contents of the 2-week-old embryos of the *Triticum* species demonstrated a difference in the intensity of development comparing to the cubic contents of either the embryo-sacs at anthesis, or the mature embryo. On the basis of the averages, the cubic contents of the 2-week-old embryos of the diploid wheat exceeded even that of the hexaploid wheat. It was also verified when the two-week-old seed buds were compared to the mature grains. The size of the two-week-old diploid seed bud was 60% of the mature grain, while it was 50% for the hexaploid and 23% for the tetraploid wheat.
5. The studying of the ova developed *in planta* was followed by the examination of excised or isolated ova, which took spherical shape after being removed. The changes in the size of ova and the nuclei are connected with their age. The diameter of the ova was examined on the two hexaploid wheat varieties Chinese Spring and Siete Cerros on 3, 6, 9, 12, 15, 18 days old ova calculated from castration. The average growth of the ova and the nuclei was similarly increasing from day 3 to day 18 for both varieties. However, the diameters of the cells and the nuclei of the two varieties reached their maximum values at different times. The diameters of 6 and 9 days old cells were 63,49 μm and 73,32 μm .

The morphologic examinations were carried out on half-thin cuttings prepared from 3, 6, 9, 12, 15, 18 days old ova. The morphologic features were also connected to their age. The largest difference could be observed in the case of young (3 days old), receptive (9 days old) and old (18 days old) ova.

6. By examining the isolated ova with optical microscope, more detailed ultrastructural observations could be taken using TEM.

In the cytoplasm of the 3 days old ovum prior to anthesis, lipid bodies, mitochondria, amiloplasts, starch granules can be found among the peripheral vesicles.

The 9-day-old receptive ovum was the closest to anthesis. It can be characterised by dense cytoplasm, large number of mitochondria, the endoplasmatic reticle in the nucleus and polarisation.

The old ovum has several features. The chromatin in the nucleus is degraded. Chromatin residues are adhered to the membrane of the nucleus forming the so called blebblings. Lipid, starch and protein are accumulated in the cytoplasm. Lysis could be observed in the vesicles, and autophag vacuoles appeared. The old ovum can be characterised by the features of programmed cell death.

7. The generative and vegetative features of the mature, 3-cellular pollens of the wheat variety Chinese Spring were compared. The dimorphism of the two male gametes is indicated by the consistent difference in their sizes. The diameter of the pollen is similar to that of the hexaploid ovum, while the size of the male gamete is only the quarter of the size of the mature ovum.
8. The maize anthers of the hybrid line 'DH109 x ZK 191/a' were isolated at late uninucleate state. The embryoid structures were formed on YP medium by cold treatment.

On the basis of the optical microscopic examinations, 2-cellular microspores were found on the cuttings prepared from the anthers 2 days after the starving treatment. Several variations of the cultured microspores such as multicellular microspores (MCM) and multinuclear microspores (MNM) were observed in the population from day 5, as well as degenerate and non-induced microspores. The occurrence of several microspore sub-populations drew our attention to the fact that microspore types differing in cell division and development can be observed in the culture.

The ultramicroscopic examinations showed that in these cellular forms and cell clusters special characteristics can be detected such as the nucleus pores in the early stage of induction and the formation of thick cell wall under the intine. A certain degree of polarity could also be observed in these structures. Proembryonic structures could be found 10-13 days after the initiation of the culture, while embryonic structures appeared on approximately day 16.

Commercially available policlonal antibodies were used for the ubiquitin examination to complete immunocytochemical detection on half-thin cuttings of the anthers in co-operation with Spanish researchers. Marking could be found for all of

the cell types mentioned above except for degenerate and non-induced microspores. The intensity of the marking was higher in the case of MCM's and androgenic microspores. A model was set to demonstrate the role of ubiquitin in the pollen cell cycle and the induction of androgenesis, and in the ensuring of the degrading route.

9. For examining the dynamics of the grape flower's development, the methods applied for wheat were adapted and the developmental state of the male and female gametophytes were detected at both varieties.

In the development of grape pollen, seven phases were defined. The typical structural features were specified. Correlation was searched between the individual developmental states of the seed bud and pollen grains by systematic samplings.

The cell development in the embryo-sac and the optimal stage of development for tissue cultures were determined using an indirect method.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton mondok köszönetet Dr. Bedő Zoltán Igazgató Úrnak a támogatásáért.

Köszönöm Dr. Barnabás Beátának Tudományos Igazgatóhelyettesnek, témavezetőmnek a szakmai irányítást és hogy lehetővé tette kutatómunkám végzését.

Dr. Nagy Jánosnak témavezetőmnek köszönöm a segítségnyújtását.

Osztályvezetőmnek Dr. Páldi Emilnek hasznos tanácsait, jobbító szándékú kritikai észrevételeit köszönöm.

Dr. Balázs Ervin Osztályvezetőm bátorítását, türelmét hálásan köszönöm.

A Növényi Sejtbiológiai Osztályon dolgozó kollégáimnak megköszönöm a segítségét, mellyel munkám eredményes végzéséhez hozzájárultak.

Köszönettel adózok: az angol nyelvi lektorunk, a Biometriai csoport és a Könyvtár segítőkész munkájáért, a hazai és a külföldi partnerek lelkiismeretes együttműködéséért.

Családomat köszönet illeti a biztatásért, a türelméért és a kitartásomba vetett hitükért.

Végül köszönöm mindazoknak, akik olvasták dolgozatomat és idejüket áldozták rá.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- ALEXANDER, M.P.:1969. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technol.*, 44. 117-122.
- ALMOGUERA, C. COCA, M.A. JORDANO, J.:1995. Differential accumulation of sunflower tetraubiquitin mRNAs during zygotic embryogenesis and developmental regulation of their heat-shock response. *Plant Physiol.* 107. 765-773.
- ALCHÉ, J.D. CASTRO, A.J. SOLYMOSS, M. TIMÁR, I. BARNABÁS, B. RODRÍGUEZ-GARCÍA, M.I.: 2000. Cellular Approach to Study of Androgenesis in Maize Anthers: Immunocytochemical Evidence of the Involvement of the Ubiquitin Degradative Pathway in Androgenesis Induction. *J. Plant Physiol.* 156. 146-155.
- BARNABÁS, B. SÁGI, L. SZAKÁCS, É.:1987.(a) Androgenetikus haploidok előállítása búzánál és kukoricánál. A biotechnológia jelentősége és szerepe a mezőgazdaságban. VEAB, Veszprém pp. 28-32.
- BARNABÁS, B. FRANSZ, P.L. SCHEL, J.H.N.:1987.(b) Ultrastructural studies on pollen embryogenesis in maize (*Zea mays* L.) *Plant Cell Reports.* 6. 212-215.
- BARNABÁS, B. KOVÁCS, G.:1986. Pollen selection. In: Balla L. (eds.) *Research Results from the Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences 1981-1985.* Martonvásár. pp. 32-33.
- BARNABÁS, B.: 1988.(a) Pollen-biotechnológiai kutatások a növénynevelés szolgálatában. Akadémiai doktori tézisek. Martonvásár.
- BARNABÁS, B. KOVÁCS, G. ÁBRÁNYI, A. PFAHLER, P.L.:1988.(b) Effect of pollen storage by drying and deep-freezing on the expression of different agronomic traits in maize (*Zea mays*). *Euphytica.* 39. 221-225.
- BARNABÁS, B. KOVÁCS, G.:1988. Perspectives of pollen and male gamete selection in cereals. In: WILMS, H. J. KEIJZER, C. J. (eds): *Plant sperm cells as tools for biotechnology.* Pudic, Wageningen. p.137-147.
- BARNABÁS, B. KOVÁCS, G.:1990. Pollen maturation in floret cultures in wheat (*T. aestivum* L.), In: Barnabás, B.-Liszt, K. (eds): *Characterization of male transmission units in higher plants.* MTA Copy, Budapest, p. 59-62.

- BARNABÁS, B. KOVÁCS, G.:1992. *In vitro* pollen maturation and successful seed production in detached spikelet cultures in wheat (*Triticum aestivum* L.) Sex. Plant Reprod. 5. 286-291.
- BARNABÁS, B. OBERT, B. KOVÁCS, G.: 1999. Colchicin an efficient genom-doubling agent for maize (*Zea mays* L.) microspores cultured in anthero. Plant Cell. Rep. 18. 858-862.
- BARNABÁS, B. PFALER, P. L. KOVÁCS, G.:1991. Direct effect of colchicine on the microspore embryogenesis to produce dihaploid plants in wheat (*Triticum aestivum* L.) Theor. Appl. Genet. 81. 675-678.
- BARNABÁS, B. TIMÁR, I. PÓNYA, ZS.:1997. Különböző ploidszintű *Triticum* fajok női gametofitonjának differenciálódása természetes és *in vitro* körülmények között. Növénytermelés. 46. 2. 125-131.
- BARNABÁS, B., SZAKACS, E., KARSAI, I., BEDŐ, Z.:2001. *In vitro* androgenesis of wheat: from fundamentals to practical application. Euphytica. 119. 1-2, 211-216.
- BATEMAN, A.J.:1952. Self-incompatibility system in angiosperms. I. Theory. Heredity. 6. 285-310.
- BATYGINA, T.B.:1974. Embryologia pshenitsy.Kotos, Leningrad.
- BEDŐ, Z. KARSAI, I. VIDA, GY. LÁNG, L.:1992. Breadmaking quality of doubled haploid lines derived from wheat anther culture. J. Genet. and Breed. 46. 263-268.
- BEDŐ, Z. KARSAI, I. BALLA, L. LÁNG, L.:1993. Modified single doubled haploid descent selection in wheat *Triticum aestivum* L. Cereal Res. Commun. 21. 125-132.
- BEDŐ, Z. KARSAI, I. LÁNG, L. VIDA, GY.:1996. Breadmaking quality of doubled haploid lines of wheat. In: Jain, S.M. Sopory, S.K. Veilleux, R.E. (eds), *In vitro* Haploid Production in Higher Plants, Kluwer Academic Publishers, Vol. 2. 93-109.
- BELKNAP, W.R. GARBARINO, J.E.:1996. The role of ubiquitin in plant senescence and stress responses. Trends Plant Sci. 1. 331-335.
- BENNETT, M.D. SMITH, J.B. KEMBLE, R.:1972. The effect of temperature on meiosis and pollen development in wheat and rye. Can .J. Genet. Cytol. 14. 615-624.

- BENNETT, M.D. RAO, M.K. SMITH, J.B. BAYLISS, M.W.:1973. Cell development in anther, the ovule and the young seed of *Triticum aestivum* L. var. Chinese Spring, Phil. Trans. R. Soc. London. Ser. B. 266 38-81.
- BENITO-MORENO, R.M. MAKE, F. HAUSER, M.T. HEBERLE-BORS, E.:1988. Sporophytes and male gametophytes from *in vitro* cultured immature tobacco pollen. In: Cresti, M. Gori, P. Pacini, E. (eds.): Sexual reproduction in higher plants. Springer. Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo. 137-142.
- BERLESE, A.N.:1892. Studi sulla forma, struttura e sviluppo del seme nelle Ampelidae. Anno VI. Malpighia. Vol. VI. 482-536.
- BERZY, T. JANDA, T. MARTON, L.CS. FEHÉR, CS.:1998. A szárazságnak, mint stressztényezőnek a hatása két beltenyészett kukoricavonal virágzására. Növénytermelés. 47. 4. 359-369.
- BERZY, T.: 1994.(a) A környezeti tényezők és stresszviszonyok szerepe a hibridkukorica vetőmag előállításában. Egyetemi doktori értekezés. Gödöllő. 114. p.
- BERZY, T. SZUNDY, T. PINTÉR, J. FEHÉR, CS.:1994.(b) A bibevirágzás kezdetén észlelt címersérülés hatása a kukorica vetőmag hozamára és minőségére. Növénytermelés. 43. 2. 109-118.
- BINAROVA, P. STRAATMAN, K. HAUSE, B. HAUSE, G. VAN LAMMEREN, A.A.M.:1993. Nuclear DNA synthesis during the induction of embryogenesis in cultured microspores and pollen of *Brassica napus* L. Theor. Appl. Genet. 87. 9-16.
- BINAROVA, P. HAUSE, G. CENKLOVÁ, V. CORDEWENER, J.H.G. VAN LOOKEREN CAMPAGNE, M.M.:1997. A short severe heat shock is required to induce embryogenesis in late bicellular pollen of *Brassica napus* L. Sex. Plant Reprod. 10. 200-208.
- BOUQUET, A. DAVIS, H.P.:1989. Culture *in vitro* d'ovules et d'embryons de vigne (*Vitis vinifera* L.) appliquee a la selection de varietes de raisins de table sans pepins. Agronomie. 9. 6. 565-574.
- BREWBAKER, J.L.:1957. Pollen cytology and incompatibility systems in plants. J. Hered. 48. 217-277.

- CALLIS, J. BEDINGER, P.:1994. Developmentally regulated loss of ubiquitin and ubiquitinated proteins during pollen maturation in maize. PNAS. 91. 6074-6077.
- CAMPENOT, M.K. ZHANG, G. GUTLER, A.J. CASS, D.D.:1992. Zea mays embryo sacs in culture. I. Regeneration from 1 day after pollination embryos. A. J. Bot. 79. 1368-1373.
- CAO, Y. RUSSEL, S.D.:1997. Mechanical isolation and ultrastructural characterization of viable egg cells in *Plumbago zeylanica* L. Sex Plant Reprod. 10. 368-373.
- CASS, D. D. PETEYA, D. J. ROBERTSON, B.L.:1985. Megagametophyte development in *Hordeum vulgare*. 1. Early megagametogenesis and the nature of cell wall formation. Can. J. Bot. 63. 2164-2171.
- CASS, D. D. PETEYA, D. J.:1986. Megagametophyte development in *Hordeum vulgare* 2. Later stages of wall development and morphological aspects of megagametophyte cell differentiation. Can. J. Bot. 64. 2327-2336.
- CERSOSIMO, A.:1986. *In vitro* anther culture in vitis sp. R. V. Enologia. 39. 12. 520-531.
- CHABOUD, A. PEREZ, R. DIGONNET, C. DUMAS, C.:1992. Gamete recognition in angiosperms: Model and strategy for analysis. In: Perspectives in Plant Cell Recognition. 59-77.
- COHEN, J.J.:1993. Apoptosis. Immuno Today. 14. 126-130.
- COMEAU, A. NADEAU, P. PLOURDE, A. SIMARD, R. MAËS, O. KELLY, S. HARPER, L. LETTRE, J. LANDRY, B. ST-PIERRE, C. A.:1992. Media for the *in ovulo* culture of proembryos of wheat and wheat-derived interspecific hybrids or haploids. Plant Sci. 81. 117-125.
- CORDEWENER, J.H.G. HAUSE, G. GÖRGEN, E. BUSINK, R. HAUSE, B. DONS, J.J.M. VAN LAMMEREN, A.A.M. VAN LOOKEREN CAMPAGNE, M.M. PECHAN, P.:1995. Changes in synthesis and localization of the 70 kDa class of heat shock proteins accompany the induction of embryogenesis in *Brassica napus* L. microspores. Planta. 196. 747-755.
- DIEU, P. BECKERT, M.:1986. Further studies of androgenetic embryo production and plant regeneration from *in vitro* cultured anthers in maize (*Zea mays* L.). Mydica, 31. 245-259.

- DOW, D.A. MASCARENHAS, J.P.:1991. Synthesis and accumulation of ribosomes in individual cells of the female gametophyte of maize during its development. *Sex. Plant. Reprod.* 4. 250-253.
- DUDITS, D. HESZKY, L.: 2000. *Növényi biotechnológia és géntechnológia.* Agroinform Kiadó, Budapest.
- DUMAS, C. FAURE, J. E.:1995. The use of *in vitro* fertilization and zygote culture in crop improvement. *Current Opinion in Biotechnology.* 6. 183-188.
- DUMAS, C. KNOX, R.B. MC CONCHIE, C.A. RUSSELL, S.D.:1984. Emerging physiological concepts in fertilization. *What is News Plant Physiol.* 15. 168-174.
- DUPUIS, I. ROECKEL, P. MATTHYS-ROCHON, E. DUMAS, C.:1987. Procedure to isolate viable sperm cells from maize (*Zea mays* L.) pollen grains. *Plant Physiol.* 85. 876-878.
- EDER, J.:1992. Untersuchungen zum Auftreten von Mehrlingen und haploiden Sämlingen bei Reben. Thesis, 83.
- EMONS, A.M.C. KIEFT, H. DE RUIJTER, N.C.A.:1991. Histological comparison of single somatic embryos of maize from suspensionculture with somatic embryos attached to callus cells. *Plant Cell Rep.* 10. 485-488.
- EVANS, A.D. SHARP, R.W. AMMIRATO, P. YAMADA, Y. (eds.):1983. *Handbook of Plant Cell Culture.* Vol. 1-4. McMillan Publ. Comp. New York.
- FAURE, J.E. MOGENSEN, H.L. KRANZ, E. DIGGONET, C. DUMAS, C.:1992. Ultrastructural characterization and three-dimensional reconstruction of isolated maize (*Zea mays* L) egg cell protoplasts. *Protoplasma* 171: 97-103.
- FINLEY, D. CHAU, V.:1991. Ubiquitination. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7. 25-69.
- GALUN, E. JUNG, Y. LANG, P.:1962. Culture and sex modification of male cucumber *in vitro*. *Nature.* 194. 596-598.
- GARRIDO, D. VICENTE, O. HEBERLE-BORS, E. RODRIGUEZ-GARCÍA, M.I.:1995. Cellular changes during the acquisition of embryogenic potential in isolated pollen grains of *Nicotiana tabacum*. *Protoplasma.* 186. 220-230.

- GORDEY, I.A. GORDEY, G.M.:1983. Genetic principles of increasing the crossability of bread wheat (*T. aestivum* L.) with cultivated rye (*Secale cereale* L.) I. Genotypic specificity of the cross compatibility interaction of bread wheat with diploid and tetraploid rye. Genetika. USSR. 19. 4. 641-646.
- GORIN, A. P.:1953. Tsvetenie psenitsi Izvestia TSHA, 1. 51-54.
- GRAY, J. JOHAL, G.S.:1999. Programmed cell death in plants, in *Arabidopsis*. In: Roberts, J.A. Anderson, M. (eds) Sheffield Academic Press.
- GRESSHOFF, P.M. DOY, C.H.:1974. Derivation of a haploid cell line from *Vitis vinifera* L. and the importance of the stage of meiotic development of anthers for haploid culture of this and other genera. Z. Pflanzenphysiol. 73. 132-141.
- GUHA, S. MAHESHWARI, S.C.:1964. *In vitro* production of embryos from anther of *Datura*. Nature. 204. 497.
- HAIG, D.:1990. New perspectives on the angiosperm female gametophyte. The Botanical Rev. 56. 237-274.
- HAUSE, G. SCHRÖDER, M.B.:1987. Reproduction in *Triticale*, 2. Karyogamy. Protoplasma. 139. 100-104.
- HAUSE, G. HAHN, H.:1998. Cytological characterization of multicellular structures in embryogenic microspore cultures of *Brassica napus* L. Bot. Acta. 111. 204-211.
- HE, G. Y. KORBULY, E. BARNABÁS, B.:1993. High frequency callus formation of fertile plants from haploid cell suspension and regeneration of fertile plants from haploid cell suspensions derived from anther culture in wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Science. 90. 81-87.
- HEBERLE-BORS, E.:1985. *In vitro* haploid formation from pollen a critical review. Theor. Appl. Genet. 71. 361-374.
- HEBERLE-BORS, E.:1989. Isolated pollen culture in tobacco: plant reproductive development in a nutshell. Sex. Plant Reprod. 2. 1-10.
- HEGEDÜS, Á. KOZMA, P. NÉMETH, M.:1966. A szőlő. Akadémiai kiadó. Budapest.
- HERCZEGH, M. 1895. Bortermelésünk a vezérek és az Árpád királyok korában. Szől. Borgazd. L. 1. 4-7.

- HESLOP-HARRISON, J.: 1972. Physiology of development: from seeds to sexuality. Vol. VI. C. Academic Press, New York, p.133.
- HESLOP-HARRISON, J.: 1975. incompatibility and the pollen stigma interaction. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26.403-425.
- HESZKY, L. LI, S.N. HORVÁTH, ZS.:1986. Rice tissue culture and application to breeding. II. Factors affecting the plant regeneration during subculture of diploid and haploid callus. *Cereals Res. Comm.* 14. 289-296.
- HESZKY, L. LI, S.N. SIMON-KISS, I. LÖKÖS, K. DO, Q.B.:1991. *In vitro* production of rice in Hungary. In: Bajaj, I.P.S. (eds): *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 14. Rice. Springer-Verlag Berlin, pp. 619-637.
- HESZKY, L. SIMON-KISS, I.:1992. "DAMA", the first plant variety of biotechnology origin in Hungary, registered in 1992. *Hung. Agric. Res.* 1. 30-32.
- HOEKSTRA, S. VAN ZIJDERVELD, M.N. HEIDEKAMP, J. VAN DER MARK, F.:1993. Microspore culture of *Hordeum vulgare* L.: the influence of density and osmolality. *Plant Cell Rep.* 12. 661-665.
- HOFER, M. HANKE, V.:1990. Induction of androgenesis *in vitro* in apple and cherry. *Acta Horticulturae.* 280. 333-336
- HOFER, M. HANKE, V.:1994. Anther culture of apple and cherry: effect of the stage of pollen development – correlative relations with morphological characters of the flower. *Gartenbauwissenschaft.* 59. 5. 225-228.
- HOFER, M. GRAFE, C.:1999. Induction of haploids and DH-material in apple. *Erwerbsobstbau.* 41. 143-148.
- HOLM, P.B. KNUDSEN, S. MOURTZEN, P. NEGRI, D. OLSEN, F.L. ROUÉ, C.:1994. Regeneration of fertile barley plants from mechanically isolated protoplasts of the fertilized egg cell. *Plant Cell.* 6. 531-543.
- HOLLÓ, R. MISIK, S. ALTMAN, A.:1997. Investigation of microsporogenesis in grape for dihaploid production via anther culture. *Acta Horticulturae.* 447. 345-346.
- HOSHIKAWA, K.: 1959. Cytological studies of double fertilization in wheat (*T. aestivum* L.) *Proc. Crop Sci. Soc. Japan* 28. 143-146.

- HOSHIKAWA, K.: 1960. Influence of temperature upon the fertilization of wheat, grown in various levels of nitrogen, Proc. Crop. Sci. Soc. Jpn. 28. 291.
- HU, S. LI, L. ZHOU, C.:1985. Isolation of viable embryo sacs and their protoplasts of *nicotiana tabacum*. Acta Bot. Sin. 27. 337-344.
- HUANG, B.Q. RUSSEL, S.D.:1992. Female germ unit: organization, isolation and function. Int. Rev. Cytol. 140. 233-293.
- IMRE, K. KRISTÓF, Z.:1999. Isolation and osmotic relations of developing megagametophytes of *Torenia fournieri*. Sex. Plant Reprod. 12. 152-157.
- IVÁNY, K. KISMÁNYOKI, T. RAGASITS, I.:1994. Növénytermesztés. Mezőgazda Kiadó. Budapest.
- JENSEN, W. A. FISHER, D. B.:1967. Cotton embryogenesis: double fertilization. Phytomorphology. 17. 261-269.
- JENSEN, W. A. FISHER, D. B.:1968. Cotton embryogenesis: The sperm. Protoplasma. 65. 277-286.
- JENSEN, W. A. FISHER, D. B.:1970. Cotton embryogenesis: The pollen tube in the stigma and style. Protoplasma. 69. 215-235.
- JENSEN, W. A.:1973. Fertilization in flowering plants. Bioscience. 23. 21-27.
- JENSEN, W. A.:1974. Dynamic Aspects of Plant Ultrastructure. A. W. Robards (ed.) New York. McGraw Hill. 481-503.
- JENSEN, W. A.:1974. Reproduction in flowering plants. In: Dynamic Aspects of Plants Ultrastructure. 481-503.
- JOHANSEN, B. von BOTHMER, R.:1994. Pollen size in *Hordeum* L.: correlation between size, ploidy level, and breeding system. Sex. Plant Reprod. 7. 259-263.
- JONES, A.M. DANGL, J.L.:1996. Longjam at the Styx: programmed cell death in plants. Trends Plant Sci. 4. 114-119.
- KAMPEN VON, J. WETTERN, M.:1992. Ubiquitin-abhängige Degradation und Modifikation von Proteinen. Naturwissenschaften. 79. 163-170.
- KAMPEN, VON J. WETTERN, M. SCHULZ, M.:1996. The ubiquitin system in plants. Physiol. Plant. 97. 618-624.
- KARSAI, I. BEDŐ, Z. BALLA, L.: 1993. Effect of donor plant growth environment on *in vitro* androgenesis in wheat *Triticum aestivum* L. Acta Agr. Hung. 42. 3-9.

- KARSAI, I. BEDŐ, Z. 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. Cult.* 39. 49-53.
- KARSAI, I. BEDŐ, Z.:1998. Relationship between anther culture response and aluminium tolerance in wheat *Triticum aestivum* L. *Euphytica*, 100. 249-252.
- KERTÉSZ, Z. PAUK, J. BARABÁS, Z.: 1991. Production and utilization of doubled haploid wheat mutants in hybrid and conventional breeding. *Cereal Research Communications*. 19. 1-2. 109-117.
- KIM, S.K. PEAK, K.Y.:1981. Studies on anther culture of grape. I. Varietal differences in callus formation. *J. Korean Soc. Hortic. Sci.* 22. 89-91.
- KOVÁCS, G. BARNABÁS, B.: 1989. Pollen szelekció: a módszer elméleti alapjai és nemesítési perspektívái. *Növénytermelés*, 38. 347-355.
- KOVÁCS, G. TAKÁCS, I. BARNABÁS, B.: 1992. *In vitro* gaméta érlelés és megtermékenyítés gabonaféléknél. *Növénytermelés*. 41.2.177-184.
- KOVÁCS, G. TAKÁCS, I. BARNABÁS, B.:1991. *In vitro* spikelet cultures as tools for gamete selection in wheat. In: Ottaviano, E. Mulcahy, D. L. *Angiosperm pollen and ovules. Basic and Applied aspects.* Springer Verlag, Berlin-Heidelberg.
- KOVÁCS, G. BARNABÁS, B.:1993. Klasszikus extenzív magyar búzafajták androgenézisének vizsgálata antérakultúrában. *Növénytermelés*. 1993. 42. 6.
- KOVÁCS, M. BARNABÁS, B. KRANZ, E.:1994. The isolation of viable egg cells of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Sex. Plant Reprod.* 7. 311-312.
- KOVÁCS, M. BARNABÁS, B. KRANZ, E.:1995. Electro-fused isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) gametes develop into multicellular structures. *Plant Cell Reports*. 15. 178-180.
- KOZMA, P.:1966. Szőlőtermesztés. II. Mg. Kiadó, Budapest.
- KRANZ, E. BAUTOR, J. LÖRZ, H.:1991.(b) *In vitro* fertilization of single, isolated gametes of maize mediated by electrofusion. *Sex. Plant Reprod.* 4. 12-16.
- KRANZ, E. BAUTOR, J. LÖRZ, H.:1991.(a) *In vitro* fertilization of single, isolated gametes of maize mediated by electrofusion. *Sex. Plant Reprod.* 4. 12-14.

- KRANZ, E. LÖRZ, H. DIOGENET, C. FAURE, J. E.:1992. *In vitro* fusion of gametes and production of zygotes. *Int. Rev. Cytol.* 140. 470-423.
- KRANZ, E. LÖRZ, H.:1993. *In vitro* fertilization with isolated, single gametes results in zygotic embryogenesis and fertile maize plant. *Plant Cell.* 5. 739-746.
- KRANZ, E. LÖRZ, H.:1994. *In vitro* fertilisation of maize by single egg and sperm cell protoplast fusion mediated by high calcium and high pH. *Zygote* 2. 125-128.
- KRANZ, E. WIEGEN, P. LÖRZ, H.:1995. Early cytological events after induction of cell division in egg cells and zygote development following *in vitro* fertilization with angiosperm gametes. *The Plant Journal* 8. 1. 311-312.
- KRANZ, E. DRESSELHAUS, T.:1996. *In vitro* fertilization with isolated higher plant gametes. *Trends in Plant Science.* 1. 82-88.
- KRISTÓF, Z. IMRE, K.:1996. Isolation of living megaspore of *Torenia fournieri*. *Protoplasma.* 192. 245-248.
- LARSEN, J. LARSEN, K. LUNGQVIST, A. ØSTERBYE, U.:1973. Complex self-incompatibility systems within the angiosperms and the possibility of reconstructing a self-incompatibility system from different forms within a self-fertile species. *Incomp. Newslett. Assoc. EURATOM-ITAL. WAGENINGEN.* 3. 79-80.
- LELLEY, J. RAJHÁTHY, T.: 1955. A búza és nemesítése. Akadémiai Kiadó, Budapest. 146-154.
- LEWIS, D.:1949. Incompatibility in flowering plants. *Biol. Rev.* 24. 472-496.
- LI, Y.Q. SOUTHWORTH, H.F. LINSKENS, D.L. MULCAHY, D.L. CRESTI, M.:1995. Localization of ubiquitin in anthers and pistil of *Nicotiana*. *Sex. Plant Reprod.* 8. 123-128.
- MAHESHWARI, W.: 1950. An introduction to the embryology of angiosperms. McGraw-Hill publications, New York.
- MAHESHWARI, W.:1958. *In vitro* culture of excised ovules of *Papaver somniferum*. *Science.* 127.342.
- MAKSIMOV, I.L.:1972. On some biological possibilities of utilizing heterosis in winter wheat and on assessing the F1 hybrids. *Trudy po Prikladnoi Botanike, Genetike i Selekcii.* 48. 2. 23-50.

- MASCARENHAS, J.P. CRONE, D.E.:1996. Pollen and the heat shock response. *Sex. Plant Reprod.* 9. 370-374.
- MOGENSEN, H.L. SUTHAR, H.K.:1979. Ultrastructure of the egg apparatus of *Nicotiana tabacum* L.(Solanaceae) before and after fertilization. *Bot. Gaz.* 140. 168-179.
- MOGENSEN, H.L.:1982. Double fertilization in barley and the cytological explanation for haploid embryo formation, embryoless caryopses, and ovule abortion. *Carlsberg Res. Comm.* 47. 313-353.
- MOGENSEN, H.L.:1992. The male germ unit: Concept, composition and significance. *Int. Rev. Cytol.* 140. 129-148.
- MOL, R. 1986. Isolation of protoplasts from female gametophytes of *Torenia fournieri*. *Plant. Cell. Rep.* 3. 202-206.
- MOL, R. MATTHYS-ROCHON, E. DUMAS, C.:1993. *In vitro* culture of fertilized embryo sacs of maize: Zygotes and two-celled proembryos can develop into plants. *Planta* 189. 213-217.
- MOL, R. MATTHYS-ROCHON, E. DUMAS, C.:1995. Embryogeny and plant regeneration from maize zygotes by *in vitro* culture of fertilized embryo sacs. *Plant Cell Reports* 14. 12. 743-747.
- MOLNÁR-LÁNG, M. RAJKI, E.: 1983. Effect of the age of the pistil on the tissue structure of the developing grain in cytoplasmic male sterile wheats. *Acta Agronomica* 32. 58-63.
- MOLNÁR-LÁNG, M. SUTKA, J.:1994. The effect of temperature on seed set and embryo development in reciprocal crosses of wheat and barley. *Euphytica*. 78. 53-58.
- MORRISON, J.W.:1955. Fertilization and post fertilization development in wheat. *Can. J. Bot.*33. 168-176.
- MOURITZEN, P. HOLM, P.B.:1995. Isolation and culture of barley megasporocyte protoplasts. *Sex. Plant. Reprod.* 8. 321-325.
- MULLINS, M.G. SRINIVASAN, C.:1976. Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of the grapevine (cv. Cabernet sauvignon) by apomixis *in vitro*. *J. Exp. Bot.* 27. 100. 1022-1030.
- MURASHIGE, T. SKOOG, F.:1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* 17. 473.

- NAGY, J.:1995. A talajművelés, a műtrágyázás, a növényszám és az öntözés hatásának értékelése a kukorica (*Zea mays* L.) termésére. Növénytermelés. 44. 3. 251-260.
- NAUMOVA, T.N. MATZK, F.:1998. Differences in the initiation of the zygotic and parthenogenetic pathway in the Salmon lines of wheat: ultrastructural studies. *Sex Plant Reprod.* 11 121-130.
- NAWASCHIN, S.:1898. Resultate einer Revision der Befruchtungsvorgänge bei *Lilium martagon* und *Fritillaria tenella*. *Bull. Acad. Imp. Csi. St. Petersburg.* 33. 39-47.
- NEUHAUS, G LUSARDI, M.C.:1991. Maize somatic and zygotic embryos as target for maize transformation. In: *Abstr. 1st Maize European Network Meeting*, p.32. Gargnano, Italy.
- NEUMANN, M. SKIEBE, K.: 1983. Results of crosses between bread wheat and triticale. *Archiv für Zuchtungs forschung.* 13. 6. 387-392.
- NITSCH, J. P.:1951. Growth and development *in vitro* excised ovaries. *Am. J. Bot.*, 38. 566-577.
- O'BRIEN, T.P. MCCULLY, M.E.:1981. *The study of Plant Structure. Principles and Select Methods.* Termarcaphi P.T.Y. LTD. Melbourne, Ausztralia.
- OBERMAYER, E.: 1918. Vizsgálatok a rozs és a búza virágzása és megtermékenyülése köréből. *Kísérletügyi Közlemények.* Pallas. 20. 1-83.
- OLMEDILLA, A., BONET, F.J.:2000. Structural changes during early embryogenesis in wheat pollen. *Protoplasma.* 211.1-2. 94-102.
- OUYANG, T.W. CHUANG, C.C. TSENG, C.C.:1973. Induction of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured *in vitro*. *Sci. Sinica,* 16. 79-95.
- PAREDDY, D. GREYSON, R. I. WALDEN, D. B.:1985. *In vitro* germination of pollen from cultured tassels. *Maize Genet. Coop. Newslett.* 59. 73-74.
- PAREDDY, D. GREYSON, R. I. WALDEN, D. B.:1987. Fertilization and seed production with pollen from *in vitro* cultured maize tassels. *Planta.* 170. 141-143.
- PAUK, J. KERTÉSZ, Z. BARABÁS, Z.: 1988. Búza törzsek előállítás a portoktenyészetből és szereplésük teljesítménykísérletekben. *Növénytermelés.* 37. 197-203.

- PAUK, J. KERTÉSZ, Z.: 1997. Production and evaluation of doubled haploid wheat lines. *J. Appl. Genet.* 28. 425-435.
- PECHAN, P.M. KELLER, W.A.:1988. Identification of potentially embryogenic microspores in *Brassica napus*. *Physiol. Plant.* 74. 377-384.
- PERCIVAL, J.:1921. *The wheat Plant*. Ducworth Co. London.
- PFAHLER, P.L. BARNETT, R.D. LUKE, H.H. WILCOX, M.: 1982. Ploidy level and genetic background effects on rye pollen fertility and geometry. *Journal of Palynology.* 18. 1-2. 13-18.
- PICKERING, R.A.: 1984. Crossability relationships between certain species in *Hordeae*. *Barley Genetics Newsletter.* 14. 14-17.
- POLLOWICK, P. L. GREYSON, R. I.: 1982. The relative efficiency of cytokinins in the development of normal spikelets on cultured tassels of *Zea mays*. *Can. J. Bot.* 62. 830-834.
- POLLOWICK, P. L. GREYSON, R. I.: 1985. Microsporogenesis and gametophyte maturation in cultured tassels of *Zea mays* L. *Can. J. Bot.* 63. 2169-2199.
- POLLOWICK, P. L. RAMAN, K. GREYSON, R. I.: 1981. *In vitro* liquid culture of corn tassel. *Maize Genet. Coop. Newlett.* 55. 116.
- POPE M.N.:1943. The temperature factor in fertilization and growth of the barley ovule. *J. Agric. Res.* 66. 389-402.
- PRETOVA, A.. DE RUIJTER, N.C.A. VAN LAMMEREN, A.A.M. SCHEL, J.H.N.:1993. Structural observations during androgenic microspore culture of the 4c1 genotype of *Zea mays* L. *Euphytica.* 65. 61-69.
- RAGHAVAN, V.:1986. *Embryogenesis in Angiosperms: a developmental and experimental study*. Cambridge University Press, New York. USA
- RAJASEKARAN, K. MULLINS, M.G.:1979. Embryos and plantlets from cultured anthers of hybrid grapevines. *J. exp. bot.* 30. 399-407.
- RAJHÁTHY, T.:1955. Szaporodásbiológia. In: *Lelley-Rajháthy: A búza és nemesítése*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 146-154.
- RAJKI, E.:1961. A búza virágzásbiológiája. *Doktori. Tézisek, Martonvásár.* 1-163.
- RANDOLPH, L.F.:1936. Developmental morphology of the cariopsis in maize. *J. Agric. Res.* 53. 882-916.

- RASHID, A. SIDDIQUI, A.W. REINERT, J.: 1982. Subcellular aspects of origin and structure of pollen embryos of *Nicotiana*. *Protoplasma* 113. 202-208.
- RÁTHAY, E.:1989. Die Geschlechtsverhältnisse der Reben und ihre Bedeutung für den Weinbau. I-II.
- REYNOLDS, T.L.:1997. Pollen embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* 33. 1-10.
- RÉDEI, GY.:1955. Rearing wheats from ovaries cultured *in vitro*. *Acta Bot. Sci. Hung.* 2. 183-185.
- RUSSEL, S.D.:1979. Fine structure of megagametophyte development in *Zea mays*. *Can. J. Bot.* 57. 1093-1110.
- RUSSEL, S.D.:1985. Preferential fertilization in *Plumbago*: Ultrastructural evidence for gamete-level recognition in an angiosperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82. 6129-6132.
- RUSSEL, S.D.:1991. Isolation and characterization of sperm cells in flowering plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 42. 189-204.
- RUSSEL, S.D.:1992. Double fertilization. *Int. Rev. Cytol.* 140. 357-388.
- RUZIC, D. CEROVIC, R. MICIC, N.: 1997. Evaluation of the factors which affect the formation of callus in anther culture of peach and plum. *Jugoslovensko Vocarstvo.* 31. 2. 95-103.
- SALUNKHE, C.K. RAO, P.S. MINAL-MHATRE, M.: 1999. Plantlet regeneration via somatic embryogenesis in anther callus of *Vitis latifolia* L. *Plant Cell. Reports.* 1999. 18. 670-673.
- SANGWAN-NORREEL, B.S.: 1978. Cytochemical and ultrastructural peculiarities of embryogenic pollen grains and of young androgenic embryos in *Datura innoxia*. *Can. J. Bot.* 56. 805-817.
- SHERIDAN, W.F. CLARK, J.K: 1994. Fertilization and embriyogeny in maize. In: Freeling, M. Walbot, V.(eds) *The maize handbook* Springer-Verlag, New York, USA
- SPURR, A.R.: 1969. A low viscosity resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastr. Res.* 26. 31-43.
- SZAKÁCS, É. BARNABÁS, B.: 1988. Cytological aspects of *in vitro* androgenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) using fluorescent microscopy. *Sex. Plant Reprod.* 11. 217-222.

- SZAKÁCS, É. BARNABÁS, B.: 1989. Sperm cell isolation from wheat (*Triticum aestivum* L.) pollen. Proceedings of the Third Sperm Cell Meeting in Martonvásár. Hungary. 12-16 June 1989.
- SZAKÁCS, É. BARNABÁS, B.: 1995. The effect of colchicine treatment on microspore division and microspore-derived embryo differentiation in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Euphytica*. 83. 209-213.
- THEUNIS, C.H. PIERSON, E.S. CRESTI, M.:1991. Isolation of male and female gametes in higher plants. *Sex Plant Reprod.* 4. 145-154.
- TIAN, G. W. SHEN, J. H.:1992. Ultrastructural Observation of Fertilization in Wheat (*Triticum aestivum* L.) I. The Fusion of the Sperm and Egg nuclei. *Chinese J. Bot.* 4. 2. 87-91.
- TIMÁR, I. KRISTÓF, Z. BARNABÁS, B.:1997. Comparative studies on the male and female gametophyte development in three different *Triticum* species. *Plant Science*. 126. 97-104.
- TISCHNER, T. KÓSZEGI, B. VEISZ, O.:1997. Climatic programmes used in the Martonvásár phytotron most frequently in recent years. *Acta Agron. Hung.* 45. 85-104.
- TOURAEV, A. ILHAM, A. VICENTE, O. HEBERLE-BORS, E.:1996a. Stress induced microspore embryogenesis in tobacco: an optimized system for molecular studies. *Plant Cell Rep.* 15. 561-565.
- TOURAEV, A. INDRIANTO, A. WRATSCHKO, I. VICENTE, O. HEBERLE-BORS, E.:1996b. Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. *Sex. Plant Reprod.* 9. 209-215.
- TOURAEV, A. PFOSSER, M. VICENTE, O. HEBERLE-BORS, E.:1996c. Stress as the major signal controlling the developmental fate of tobacco microspores: towards a unified model of induction of microspore/ pollen embryogenesis. *Planta*. 200. 1. 144-152.
- TOURAEV, A. VICENTE, O. HEBERLE-BORS, E.: 1997. Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends in Plant Science* 2. 293-301.
- TÖPFER, R. STEINBISS, H.H.:1985. Plant regeneration from cultured barley ovules. *Plant Sci.* 41. 49-54.

- VAN LAMMEREN, A.A.M.:1986. A comparative ultrastructural study of the megagametophytes in two strains of *Zea mays* L. before and after fertilization. Agric. Univ. Wageningen. 86-1. 1-37.
- VAN der MAAS, H.M. ZAAL, M.A.C.M. DE JONG, E.R. KRENS, F.A. WENT, J.L.:1993. Isolation of viable egg cells of perennial rye-grass (*Lolium perenne* L) Protoplasma 173. 86-89.
- VEILLEUX, R.E.:1994. Development of new cultivars via anther culture. Hort. Science. 29. 1238-1241.
- VENABLE, J.H. COGGESHALL, R.:1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. J. Cell Biol. 25. 407-408.
- VICENTE, O. BENITO-MORENO, R.M. HEBERLE-BORS, E.:1991. Pollen cultures as a tool to study plant development. Cell Biol. Rev. 25. 295-306.
- WAGNER, V.T. SONG, Y. MATTHYS-ROCHON, E. DUMAS, C.:1988. The isolated embryo sac of *Zea mays* L. Structural and ultrastructural observations. In: Cresti, M. Gori, P. Pacini, E. (eds) Sexual Reproduction in Higher Plants, Springer-Verlag, Berlin. 125-130.
- WAGNER, V.T. KARDOLUS, J.P. WENT, J.L. van:1989.a Isolation of the lily embryo sac. Sex. Plant. Reprod. 2. 219-224.
- WAGNER, V.T. SONG, Y.C. MATTHYS-ROCHON, E. DUMAS, C.:1989.b Observations on the isolated embryo sac of *Zea mays* L. Plant Sci. 59. 127-132.
- WARDLAW, I.F. DAWSON, I.A. MUNIBI, P. FEWSTER, R.:1989.(a) The Tolerance of Wheat to High Temperatures during Reproductive Growth.I. Survey Procedures and General Response Patterns. Aust. J. Agric. Res. 40. 1-13.
- WARDLAW, I.F. DAWSON, I.A. MUNIBI, P.:1989.(b) The Tolerance of Wheat to High Temperatures during Reproductive Growth.II. Grain Development. Aust. J. Agric. Res. 40. 15-24.
- WHITE, P. R.:1954. The Cultivation of Animal and Plant Cell. Roland Press. New York.
- WORRALL, D. TWELL, D.:1994. Pollen maturation: where ubiquitin is not required? BioEssays 16. 873-875.
- XI, X.Y. CUI, D.C.:1983. Relationship between pollen and embryo sac development in wheat (*T. aestivum* L.). Bot. Gaz. 2. 191-200.

- YOU, R. JENSEN, W.A.:1985. Ultrastructural observations of the mature megagametophyte and fertilization in wheat (*Triticum aestivum* L). Can. J. Bot. 63. 163-178.
- ZAKI, M.A.M. DICKINSON, H.G.:1990. Structural changes during the first divisions of embryos resulting from anther and free microspore culture in *Brassica napus*. Protoplasma. 156. 149-162.
- ZHANG, Y. WU, Y.W. ZHANG, C.L. ZHANG, F. WANG, Y.X. YANG, S. XIAO, H.Y.:1982. Studies on cross incompatibility in *Aegilops squarrosa* x *Triticum aestivum*. Acta Agronomica Sinica.8.2.137-140.
- ZHANG, Y.M. TIAN, Y.T. LUO, X.F.:1997. Development of grape biotechnology research. J. of Beijing Forestry University. 19. 1. 71-76.
- ZHOU, C. YANG, H.Y.: 1985. Observations on enzymatically isolated, living and fixed embryo sacs in several angiosperm species. Planta 165. 225-231.
- ZHU, C. HU, S.Y. HSU, L.Y.:1980. Ultrastructure of sperm cell in mature pollen grain of wheat. Sci. Sin. 23. 371-387.
- ZOU, C.J. LI, P.F.:1981. Induction of pollen plants of grape (*Vitis vinifera* L.). Acta Bot. Sin. 23. 79-81.

8. FÜGGELÉK

8/9. táblázat
Chinese Spring búzafajta petesejt átmérője

| | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | |
|--------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Horz. átv. átmérő µm | Vert. átv. átmérő µm | Horz. átv. átmérő µm | Vert. átv. átmérő µm | Horz. átv. átmérő µm | Vert. átv. átmérő µm | Horz. átv. átmérő µm | Vert. átv. átmérő µm | Horz. átv. átmérő µm | Vert. átv. átmérő µm |
| 3 nap | 46,3781 | 56,5371 | 73,3218 | 68,0212 | 61,3958 | 55,2120 | 58,7456 | 62,2792 | 55,2120 | 56,5371 |
| 6 nap | 61,3958 | 64,9293 | 65,6537 | 59,1873 | 66,6961 | 71,5548 | 59,6290 | 60,1873 | 68,4629 | 68,0212 |
| 9 nap | 80,8304 | 87,4558 | 79,0636 | 83,4806 | 75,9717 | 82,5972 | 72,8798 | 78,1802 | 65,8127 | 70,8714 |
| 12 nap | 92,7562 | 92,3145 | 74,2049 | 82,1555 | 70,6714 | 74,2049 | 69,3403 | 72,4382 | 67,5795 | 70,6714 |
| 15 nap | 89,2226 | 92,3145 | 73,7633 | 79,9470 | 91,8728 | 82,5972 | 77,2968 | 66,1307 | 84,6057 | 89,6643 |
| 18 nap | 79,0636 | 82,1555 | 83,4806 | 86,5724 | 83,9223 | 86,1307 | 79,0636 | 81,7138 | 106,0071 | 125,4417 |

| | 6 | | 7 | | 8 | | 9 | | 10 | |
|--------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Horz. átv. átmérő µm | Vert. átv. átmérő µm | Horz. átv. átmérő µm | Vert. átv. átmérő µm | Horz. átv. átmérő µm | Vert. átv. átmérő µm | Horz. átv. átmérő µm | Vert. átv. átmérő µm | Horz. átv. átmérő µm | Vert. átv. átmérő µm |
| 3 nap | 64,4870 | 49,0283 | 71,5548 | 65,8127 | 55,2120 | 54,3286 | 63,5498 | 62,1258 | 70,2580 | 68,3054 |
| 6 nap | 67,1376 | 71,9665 | 69,3463 | 72,8799 | 68,4629 | 71,5548 | 62,7208 | 67,5795 | 64,9293 | 68,9046 |
| 9 nap | 70,6714 | 75,5300 | 64,0459 | 67,5795 | 64,0459 | 68,4629 | 68,9046 | 74,2049 | 71,5548 | 76,4134 |
| 12 nap | 72,4382 | 78,1802 | 68,9046 | 72,8799 | 73,7633 | 75,0883 | 68,0212 | 72,4382 | 68,9046 | 71,1131 |
| 15 nap | 79,9470 | 85,0724 | 76,4134 | 78,6219 | 75,9717 | 76,1802 | 76,6501 | 82,8304 | 90,1060 | 95,8481 |
| 18 nap | 81,7138 | 87,4558 | 84,0813 | 88,9399 | 71,5548 | 76,4134 | 71,5548 | 77,7385 | 79,0636 | 85,2473 |

8/10. táblázat
Siete Cerros búzafajta petesejt átmérője

| | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | |
|--------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Horz. átvonásig µm | Vert. átvonásig µm | Horz. átvonásig µm | Vert. átvonásig µm | Horz. átvonásig µm | Vert. átvonásig µm | Horz. átvonásig µm | Vert. átvonásig µm | Horz. átvonásig µm | Vert. átvonásig µm |
| 3 nap | 58,0788 | 58,5371 | 62,7208 | 65,3710 | 65,8127 | 70,2287 | 61,2658 | 65,3730 | 59,6760 | 63,1625 |
| 6 nap | 59,1873 | 60,0707 | 57,8622 | 60,0541 | 56,9780 | 61,3375 | 72,8788 | 75,3216 | 61,3606 | 64,9293 |
| 8 nap | 67,1378 | 72,8798 | 71,1131 | 72,4362 | 71,5548 | 82,1656 | 77,7385 | 77,2908 | 69,3463 | 76,0803 |
| 12 nap | 82,1656 | 88,6943 | 85,0890 | 90,1000 | 82,1655 | 86,8890 | 89,3463 | 77,2908 | 74,2049 | 79,0638 |
| 15 nap | 78,1862 | 79,5053 | 76,0893 | 76,9470 | 64,4878 | 68,0212 | 59,6200 | 84,0459 | 77,2968 | 79,0470 |
| 18 nap | 60,5124 | 62,7208 | 72,4362 | 72,4362 | 67,1378 | 70,2287 | 64,4878 | 74,2049 | 71,5548 | 74,6496 |

| | 6 | | 7 | | 8 | | 9 | | 10 | |
|--------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Horz. átvonásig µm | Vert. átvonásig µm | Horz. átvonásig µm | Vert. átvonásig µm | Horz. átvonásig µm | Vert. átvonásig µm | Horz. átvonásig µm | Vert. átvonásig µm | Horz. átvonásig µm | Vert. átvonásig µm |
| 3 nap | 53,4452 | 61,3848 | 54,7703 | 64,3286 | 43,2862 | 49,0283 | 63,1625 | 65,3710 | 60,0707 | 64,4878 |
| 6 nap | 64,9293 | 69,3463 | 56,8637 | 64,0459 | 63,1625 | 66,2644 | 63,6942 | 66,8061 | 61,8375 | 64,9293 |
| 8 nap | 75,0853 | 74,2049 | 73,7633 | 72,4362 | 73,7633 | 75,8717 | 65,3710 | 69,7880 | 71,0665 | 77,2968 |
| 12 nap | 79,0638 | 82,5972 | 81,7138 | 83,0369 | 72,8798 | 75,5300 | 79,5053 | 82,1655 | 67,5795 | 74,6496 |
| 15 nap | 69,3463 | 70,6714 | 73,3216 | 74,0803 | 76,0561 | 82,1656 | 72,4362 | 76,9717 | 76,4134 | 81,2721 |
| 18 nap | 74,6496 | 62,5972 | 68,4629 | 71,1131 | 79,0638 | 80,0090 | 62,5972 | 83,6623 | 76,2544 | 79,5422 |

8/11. táblázat
Chinese Spring búzafajta petesejtmag átmérője

| | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | |
|--------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Horz. átmérő µm | Vert. átmérő µm | Horz. átmérő µm | Vert. átmérő µm | Horz. átmérő µm | Vert. átmérő µm | Horz. átmérő µm | Vert. átmérő µm | Horz. átmérő µm | Vert. átmérő µm |
| 3 nap | 8,8339 | 8,8339 | 12,3675 | 14,1343 | 11,0424 | 8,8339 | 10,6007 | 11,0258 | 10,6007 | 9,7173 |
| 6 nap | 12,8092 | 12,8092 | 9,7173 | 8,8339 | 8,8339 | 10,6007 | 10,6007 | 8,3022 | 10,1590 | 10,1590 |
| 9 nap | 13,6928 | 14,1343 | 9,7173 | 11,0424 | 8,8339 | 9,7173 | 10,1590 | 10,6007 | 14,1343 | 11,0424 |
| 12 nap | 15,1590 | 8,2756 | 12,3675 | 13,6928 | 11,0258 | 11,4841 | 12,3675 | 9,2756 | 12,8092 | 13,6928 |
| 15 nap | 15,0177 | 16,3169 | 11,4841 | 11,0258 | 13,6928 | 12,3675 | 13,6928 | 14,1343 | 14,1343 | 13,6928 |
| 18 nap | 11,4841 | 11,4841 | 13,2509 | 12,3675 | 13,6928 | 11,8258 | 14,5760 | 12,8092 | 15,4984 | 14,1343 |

| | 6 | | 7 | | 8 | | 9 | | 10 | |
|--------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Horz. átmérő µm | Vert. átmérő µm | Horz. átmérő µm | Vert. átmérő µm | Horz. átmérő µm | Vert. átmérő µm | Horz. átmérő µm | Vert. átmérő µm | Horz. átmérő µm | Vert. átmérő µm |
| 3 nap | 10,6007 | 8,3022 | 7,5626 | 9,7173 | 8,3022 | 8,8339 | 8,8339 | 8,8339 | 8,8339 | 7,5626 |
| 6 nap | 10,6007 | 11,0424 | 12,3675 | 12,3675 | 10,6007 | 10,1590 | 10,1590 | 10,1590 | 10,0007 | 9,2756 |
| 9 nap | 10,1590 | 15,1590 | 11,0424 | 8,3022 | 10,1590 | 8,3022 | 9,7173 | 11,4841 | 10,1590 | 11,0424 |
| 12 nap | 12,8092 | 15,0177 | 11,8258 | 10,6007 | 12,8092 | 9,2756 | 12,8092 | 11,8258 | 11,0424 | 11,0424 |
| 15 nap | 16,7845 | 26,3169 | 14,1343 | 15,0177 | 13,6928 | 12,8092 | 13,2509 | 13,2509 | 15,9011 | 11,8258 |
| 18 nap | 15,0177 | 15,4594 | 16,7845 | 17,0678 | 11,4841 | 10,1590 | 11,0258 | 14,1343 | 13,6928 | 12,8092 |

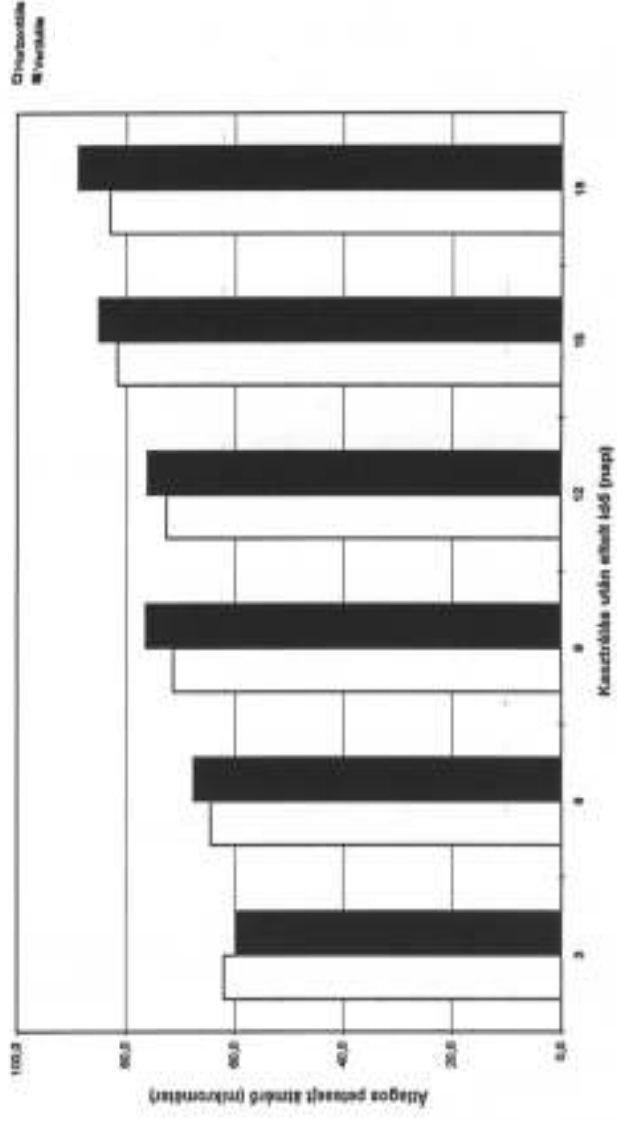
8/12. táblázat

Siete Cerros búzafajta petesejtmag átmérője

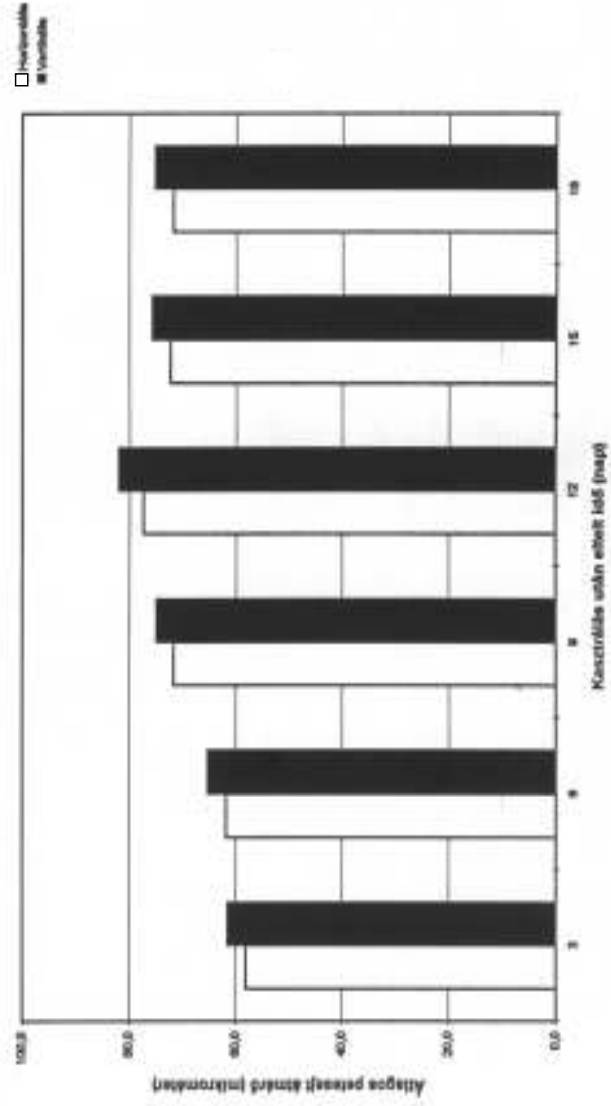
| | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | |
|--------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Horz. átmérő µm | Vert. átmérő µm | Horz. átmérő µm | Vert. átmérő µm | Horz. átmérő µm | Vert. átmérő µm | Horz. átmérő µm | Vert. átmérő µm | Horz. átmérő µm | Vert. átmérő µm |
| 3 nap | 9,2758 | 6,3622 | 7,5088 | 6,6254 | 9,7173 | 10,6007 | 8,6254 | 4,4170 | 11,4841 | 12,2092 |
| 6 nap | 5,7420 | 6,1837 | 11,9258 | 12,8092 | 8,3622 | 9,7173 | 11,9258 | 11,4841 | 14,1343 | 11,4841 |
| 9 nap | 15,0177 | 11,9258 | 13,2509 | 12,8092 | 11,9258 | 14,1343 | 15,0177 | 14,1343 | 14,5760 | 13,6926 |
| 12 nap | 13,6926 | 12,8092 | 11,0424 | 12,3675 | 10,6007 | 12,3675 | 15,9011 | 10,1990 | 11,0424 | 10,1990 |
| 15 nap | 14,1343 | 14,1343 | 13,6926 | 14,1343 | 12,3675 | 11,9258 | 10,1990 | 11,4841 | 14,1343 | 15,4594 |
| 18 nap | 11,9258 | 8,7173 | 9,2758 | 8,3622 | 10,6007 | 8,3622 | 13,2509 | 11,4841 | 11,0424 | 12,3675 |

| | 6 | | 7 | | 8 | | 9 | | 10 | |
|--------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Horz. átmérő µm | Vert. átmérő µm | Horz. átmérő µm | Vert. átmérő µm | Horz. átmérő µm | Vert. átmérő µm | Horz. átmérő µm | Vert. átmérő µm | Horz. átmérő µm | Vert. átmérő µm |
| 3 nap | 9,7173 | 11,4841 | 10,6007 | 11,4841 | 7,9505 | 7,5088 | 11,9258 | 10,1990 | 11,9258 | 11,0424 |
| 6 nap | 13,6926 | 14,5760 | 9,2758 | 7,5088 | 11,4841 | 12,3675 | 11,0424 | 12,8092 | 9,7173 | 11,9258 |
| 9 nap | 9,7173 | 11,0424 | 13,2509 | 12,8092 | 12,3675 | 13,2509 | 10,6007 | 11,0424 | 14,1343 | 11,9258 |
| 12 nap | 15,4594 | 15,4594 | 16,3428 | 16,3428 | 16,3428 | 12,8092 | 11,9258 | 11,9258 | 10,6007 | 10,6007 |
| 15 nap | 14,1343 | 11,9258 | 13,2509 | 9,2758 | 11,4841 | 12,8092 | 11,9258 | 12,8092 | 13,2509 | 12,8092 |
| 18 nap | 14,1343 | 13,2509 | 11,9258 | 11,0424 | 11,9258 | 10,1990 | 8,7173 | 9,5402 | 12,6324 | 11,9687 |

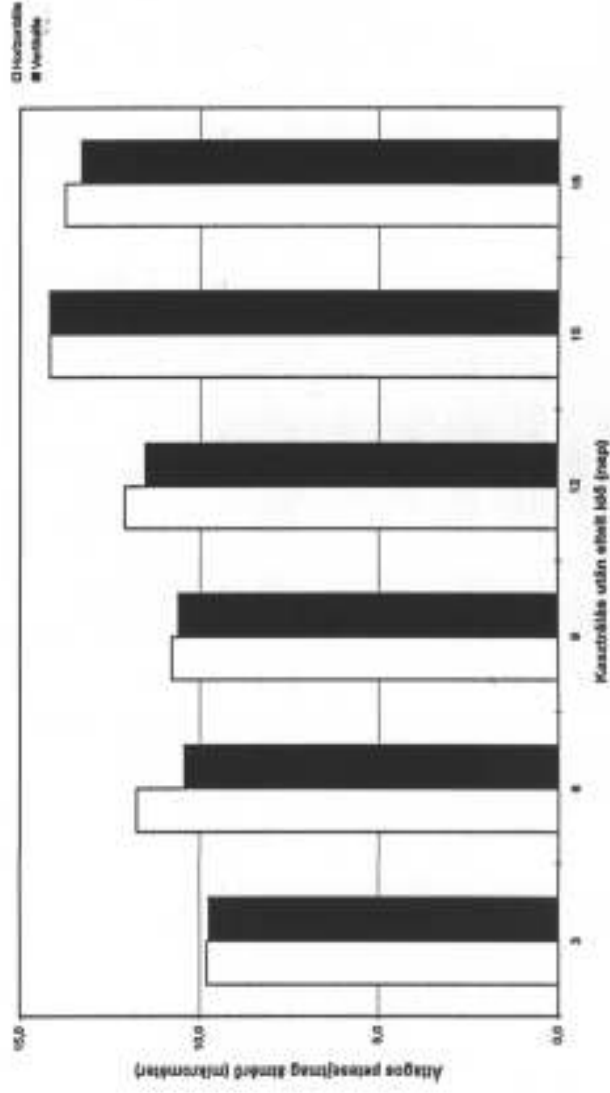
8/29. ábra
Chinese Spring búzafajta átlagos petesejt átmérője



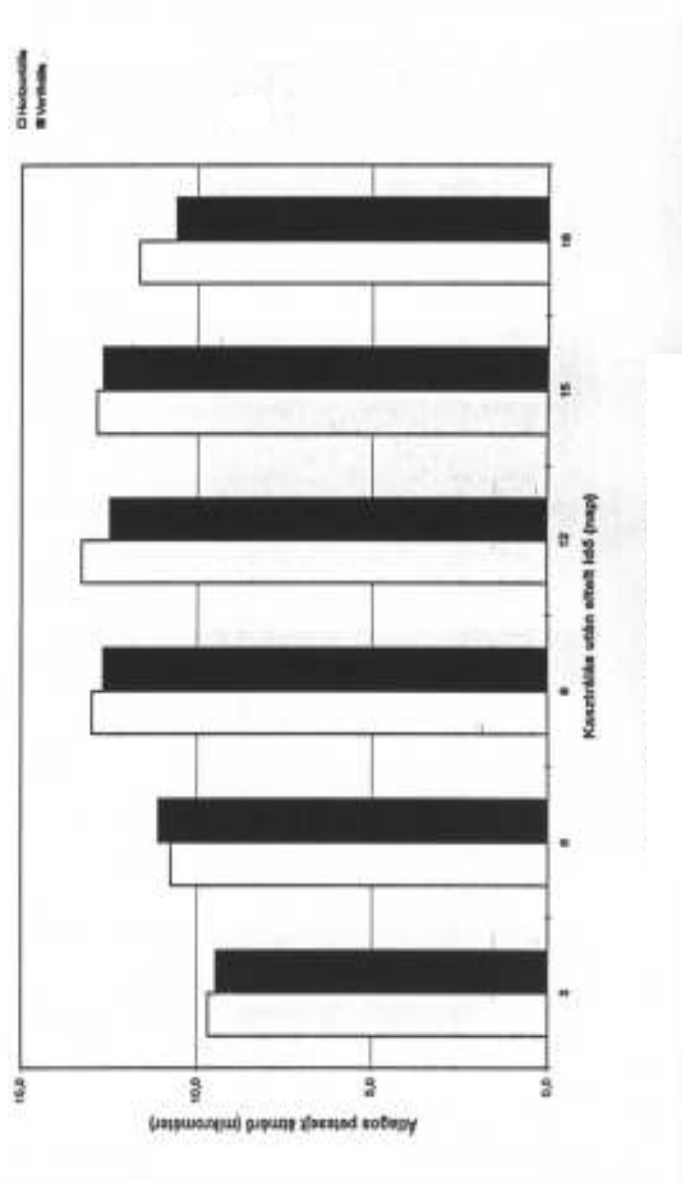
8/30. ábra
Siete Cerros búzafajta átlagos petesejt átmérője



8/31. ábra
Chinese Spring búzafajta átlagos petesejtmag átmérője



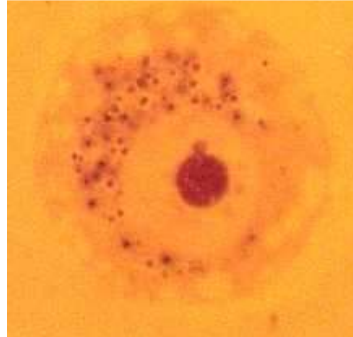
8/32. ábra
 Siete Cerros búzafajta átlagos petesejtnagymérete



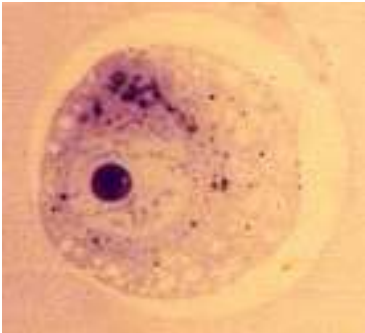
8/ 33. ábra
Siete Cerros búzafajta izolált petesejtjeinek fénymikroszkópos képei



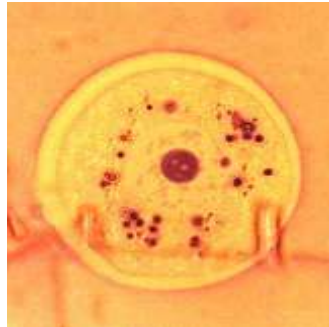
Siete Cerros 3 napos petesejt



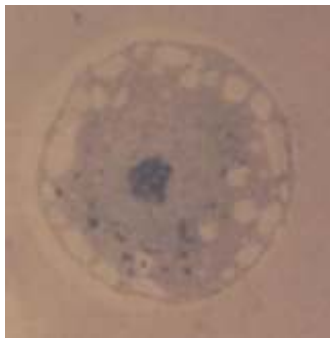
Siete Cerros 6 napos petesejt



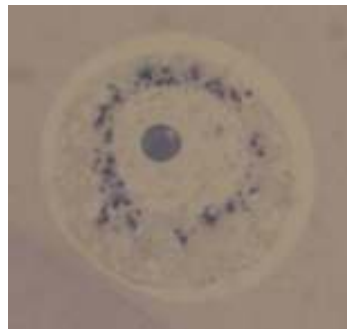
Siete Cerros 9 napos petesejt



Siete Cerros 12 napos petesejt



Siete Cerros 15 napos petesejt



Siete Cerros 18 napos petesejt

RÖVIDÍTÉS JEGYZÉK

Bc - (bicellular) kétsejtes állapot

Bn - (binukleátus) kétmagvas állapot

BSA - Bovine serum albumin

cv - cultivar

D.E.R. 736 - diglycidyl ether of polypropylene glycol

DMAE - dimethylaminoethanol

DNS - dezoxiribonukleinsav

eBn - (early binucleate) korai kétmagvas állapot

ERL - vinylcyclohexene dioxide, 1-epoxiethyl-3,4-epoxycyclohexane

LSM - lézer scanning mikroszkóp

Lu - (late uninucleate) késői 1 magvas állapot

MCM - többsejtes mikrospóra

MNM - többsejtmagvas mikrospóra

Mu - (mid uninucleate), középső 1 magvas állapot

NSA - nonylsuccinic anhydride

PBS – Phosphate-buffered saline

PEG - polietilén glikol

PGR - plant grow room

PGV - plant grow vestibule

Pm - (premitotic) osztódás előtti állapot

PMC - pollenanyasejt

QTL - quantitative trait loci

RAPD, - random amplifikált polimorfikus DNS

RNS - ribonukleinsav

SEM - scanning elektronmikroszkóp

SzD - szignifikáns differencia

TBS - Tris buffered saline

Tc - (tricellular) háromsejtes, érett állapot

TEM - transzmissziós elektronmikroszkóp

YP - YU-PEI (táptalaj)